

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Identifizierung des *NYX*-Gens

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschreibt die Identifizierung eines bisher unbekanntes Gens, *NYX*, das in Patienten mit der X-chromosomal rezessiv vererbten, vollständigen Form der kongenitalen stationären Nachtblindheit (CSNB1) mutiert ist. Es gibt unterschiedliche Methoden, die zur Isolierung eines unbekanntes Genes eingesetzt werden. Bei der „funktionellen Klonierung“ ist das Genprodukt, also das Protein, bereits identifiziert und physiologisch charakterisiert und kann aufgrund seiner bekannten Funktion mit einer Krankheit assoziiert werden. Ein anderer Weg stellt die „positionelle Klonierung“ dar. Bei dieser Strategie handelt es sich um die Isolierung eines Gens, basierend auf seiner bekannten Position im Genom, die durch Kopplungsanalysen in Familien ermittelt wird. Im Jahre 1986 wurde die erste erfolgreiche positionelle Klonierung eines Genes, dem *CGD*-Gen (chronic granulomatous disease) beschrieben (Royer-Pokora *et al.*, 1986). Des Weiteren konnten Gene, die in Patienten mit der Duchenne-Muskeldystrophie (Monaco *et al.*, 1986), der cystischen Fibrose (Rommens *et al.*, 1989) und der Huntington-Krankheit (Huntington's disease collaborative research group, 1993) mutiert sind, mit dieser Strategie identifiziert werden. In dieser Arbeit sollte mit Hilfe der positionellen Klonierung, das mit CSNB1 assoziierte Gen isoliert werden. Vorangegangene genetische Kartierungen in Familien mit X-chromosomaler Nachtblindheit ergaben zwei unterschiedliche Loci, CSNB1 und CSNB2, beide auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Bech-Hansen *et al.*, 1997; Boycott *et al.*, 1998; Rozzo *et al.*, 1999). Mittels Positionsklonierung wurde das Gen, das in CSNB2-Patienten defekt ist, isoliert (Bech-Hansen *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 1998). Es handelt sich hierbei um ein Gen, das für die  $\alpha_1$ -Untereinheit eines spannungsabhängigen Retina-spezifischen Kalzium-Kanals (*CACNA1F*) kodiert. Kopplungsanalysen und Kartierungen von Rekombinationsbruchpunkten sowie Haplotypenanalyse in Familien mit CSNB1, führten zur Einengung des kritischen Intervalls auf 1-2 cM (Pusch *et al.*, 2001). Beide Arten der X-chromosomal vererbten Nachtblindheit können mit Hilfe der Elektroretinographie unterschieden werden. Patienten mit der unvollständigen Form (CSNB2) zeigen eine reduzierte Stäbchenadaptation im dunkeladaptierten Blitz-Elektroretinogramm (ERG), während die Stäbchen-spezifische Antwort bei Patienten mit der vollständigen Form (CSNB1) völlig fehlt (Miyake *et al.*, 1986). Die in dieser Arbeit für die positionelle Klonierung des *CSNB1*-Gens verwendeten DNAs stammten von Patienten, die weder der

einen noch der anderen Form zugeordnet werden konnten, da die Patienten zu einem Zeitpunkt diagnostiziert wurden, als die genaue Unterscheidung mittels Elektroretinographie noch nicht möglich war. Die Identifizierung des in CSNB2-Patienten veränderten *CACNAIF*-Gens (Bech-Hansen *et al.*, 1998 und Strom *et al.*, 1998) ermöglichte uns die gesammelten nicht-differenzierten X-chromosomalen CSNB Patienten-DNAs auf Mutationen mittels SSCP-Analyse (Sheffield *et al.*, 1993) in diesem Gen zu untersuchen. Dadurch konnten eine Erweiterung des Mutationsspektrums in *CACNAIF* und eine Verringerung der möglichen Patienten-DNAs für die Identifizierung des *CSNB1*-Gens erzielt werden. Die SSCP-Analyse gilt als einfache, empfindliche und, im Vergleich zur direkten DNA-Sequenzierung, als kostengünstige Methode, die sich als Voranalyse zur Identifizierung von Sequenzvarianten eignet. Insbesondere bei einem großen Gen wie *CACNAIF* mit 48 Exonen und einem umfangreichen zu untersuchenden Patientenkollektiv wäre es zu aufwendig, alle Exone zur Detektion von Mutationen zu sequenzieren. Die Sensitivität dieser Methode beträgt bei amplifizierten Fragmenten mit einer Größe <200 bp etwa 90% und bei Produkten mit einer Größe von 300-350 bp etwa 80% (Condie *et al.*, 1993; Gaidano *et al.*, 1991; Kishimoto *et al.*, 1992; Michaud *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1990) d.h., 10-20 von 100 Mutationen können bei Fragmentgrößen bis 350 bp, statistisch gesehen, nicht identifiziert werden. Hier wurde durch diese Methode 11 Mutationen detektiert und durch anschließende Sequenzierung bestätigt. Alle Patienten-DNAs, die beim Mutationsscreening in *CACNAIF* negativ waren, wurden für die positionelle Klonierung des *CSNB1*-Gens verwendet. Mit Hilfe von YACs (yeast-artificial-chromosome), PACs (P1-derived artificial chromosome) und BACs (bacterial artificial chromosome) und dank des rasanten Fortschritts bei der Sequenzierung des humanen Genoms konnte das kritische 1-2 cM Intervall des *CSNB1*-Locus zu einem fast vollständigen Kontig assembliert werden. Eine Vereinfachung bei der weiteren Einengung von kritischen Intervallen bei der positionellen Klonierung stellt die Suche nach strukturellen Chromosomenveränderungen, wie z.B. Translokationen und Deletionen weniger kb, dar (Collins, 1995). Große Bereiche eines kritischen Intervalls können gegen restringierte Patienten-DNAs hybridisiert und nach auffälligen Aberrationen untersucht werden. Im Falle einer vorhandenen Chromosomenaberration, wie zum Beispiel einer Deletion, stellt dieses Verfahren im Vergleich zur Hybridisierung von kleinen (500-1000 bp) PCR-Fragmenten auf Southern-Blots, eine enorme Zeitersparnis dar. Hierbei können beispielsweise YAC-Klone mit einer Insertgröße bis hin zu mehreren Hundert Kilopasenpaaren zur Analyse eines Kontigs auf Veränderungen verwendet werden. Die

Präparation der künstlichen Hefechromosomen ist relativ aufwendig, sodass heute auch einfacher handbare BAC- (Shizuya *et al.*, 1992) und PAC-Klone mit einer Größe von etwa 130 kb (Iannou *et al.*, 1994) für diese Methodik eingesetzt werden. Da die Methode der YAC-Repräsentations-Hybridisierung (YRH) bereits zweimal erfolgreich zur Isolierung eines Gens eingesetzt wurde, nämlich zur Identifizierung des *RP3*- und *RP2*-Gens (Roepman *et al.*, 1996; Schwahn *et al.*, 1998), fand sie auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung. Weder die Hybridisierung des YAC-Amplikons #11 (Abbildung 8) noch BAC- und PAC-Fragmenten des kritischen Intervalls auf Southern-Blots mit Patienten-DNA detektierte Aberrationen. Parallel hierzu wurde die Region auf Kandidatengene untersucht. Dabei handelte es sich entweder um bekannte Gene, deren Funktion schon beschrieben ist und aufgrund dessen mit einer bestimmten Krankheit assoziiert sein könnten oder um Sequenzabschnitte, die basierend auf Vorhersageprogrammen ein Gen mit funktionellen Motiven darstellt. Bekannte Kandidatengene aus der kritischen Region waren das *GPR34*-Gen (G-protein coupled receptor 34), was neuronal exprimiert ist und in Signalketten beteiligt ist (Marchese *et al.*, 1999; Schoneberg *et al.*, 1999), *IPPH2*, ein Gen aus der Protease-Inhibitor-Familie, die eine grundlegende Rolle in der Koordination von regulatorischen Prozessen spielt und wichtige gewebs- und entwicklungsstadienspezifische Funktionen hat, *DDX3* (DEAD/H BOX X-linked), Park *et al.*, 1998), das *DFFRX*-Gen (*Drosophila fat facets related X-Gen*), welches das humane Ortholog des *Drosophila melanogaster* Gens *faf* (*Drosophila fat facets gene*) ist, das an der Entwicklung der Facettenaugen beteiligt ist (Jones *et al.*, 1996), und die membran-assoziierte Guanylat-Kinase CASK (calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase), die eine wichtige Rolle in einem neuronalen Signalweg spielt (Stevenson *et al.*, 2000). In keinem dieser bekannten Kandidatengen konnte mittels Southern-Blot Hybridisierung und/oder direkter Sequenzierung pathogene Mutationen nachgewiesen werden (Jacobi *et al.*, 2000). Interessanterweise kartieren in der chromosomalen Region Xp11.3 - Xp11.4 eine Reihe von Loci für verschiedenen Augenerkrankungen, wie zum Beispiel idiopathischer kongenitaler Nystagmus (Carbot *et al.*, 1999), X-gekoppelte progressive Zapfendystrophie (Hong *et al.*, 1994; Seymour *et al.*, 1998), Åland Island Eye Disease (Glass *et al.*, 1993) und X-gekoppelte Opticusatrophie (Assink *et al.*, 1997), für die bisher noch keine krankheitsassoziierten Mutationen identifiziert werden konnten. Daher gelten die für CSNB1 ausgeschlossenen Gene noch weiterhin als Kandidaten für diese Erkrankungen. Schließlich führte aber die Hybridisierung des *GARP*-homologen 800 bp Fragments zur Identifizierung einer Deletion in einer CSNB1-Familie. Hybridisierungen von Fragmenten

eines restringierten PACs aus diesem Bereich (RPCI-1 16915) dagegen lieferte kein spezifisches Signal. Eine mögliche Erklärung für letzteres könnte sein, das *NYX* durch den hohen GC-Gehalt Sekundärstrukturen ausbildet, die nicht vollständig aufgelöst, bzw. aufgebrochen werden konnten, was auch bei Amplifikationen dieser Bereiche oder bei der Hybridisierung von Arrays problematisch ist – die intermolekularen Watson-Crick Basenpaarbindungen werden blockiert (McDowell *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 1994; Milner *et al.*, 1997; Southern *et al.*, 1999).

## 4.2 Mutatiosspektrum in *CACNA1F* und *NYX*

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das Mutationsspektrum bei XLCSNB-Patienten im *CACNA1F*-Gen aufgeklärt. In 11 verschiedenen Patienten wurden Mutationen in diesem Gen identifiziert (Ergebnisse Tabelle 1). 36% der Mutationen stellen eine Stopp-Mutation dar (Q428X, R614X, R884X, Q1348X), 36% führen zu einem Aminosäureaustausch (L1068P, S1254I, R1285S, R1919H) und jeweils eine DNA-Sequenzänderung resultiert in einer „stillen Mutation“ (H1092H), einer Veränderung einer Spleißstelle (Akzeptormutation), bzw. in einer Nukleotidinsertion (L1045fsX1055), die eine Leserahmenverschiebung zur Folge hat. Die gefundenen Veränderungen R1919H und H1092H wurden als Polymorphismen in japanischen Familien beschrieben (Nakamura *et al.*, 2001), die mit einer Häufigkeit von 21 in 100, bzw. 63 in 100 Kontrollen auftraten. Da in 100 Kontroll-Chromosomen europäischen Ursprungs der R1919H Austausch nicht detektiert wurde, ist anzunehmen, das es sich bei dieser Veränderung um einen seltenen Polymorphismus in europäischen Familien handelt. Der H1092H Austausch wurde aufgrund der Ergebnisse in japanischen Familien nicht in europäischen Familien untersucht.

Mit unseren Kooperationspartnern in Tübingen und München konnten in 26 verschiedenen Patienten Veränderungen im *NYX*-Gen identifiziert werden. Auffällig war, dass bei verschiedenen Patienten die identische Mutation gefunden wurde (Ergebnisse, Tabelle 2). Der C31S Austausch wurde bei einem holländischen und bei zwei deutschen Patienten (2438B, 5886 und 5884), die Stopp-Mutation C35X bei zwei deutschen Patienten (9606 und 2438T), der P175R Austausch in vier deutschen Patienten (2675, 2677, 2996, 2999), der N312S Austausch in zwei holländischen Patienten (2491 und 3345) und auch der L347P Austausch in zwei holländischen Patienten (2422 und 2423) gefunden. Die meisten der hier in *NYX* identifizierten Mutationen führen zu einem Aminosäureaustausch (56%)

(C31S, P57T, A64E, A143P, P175R, A187K, L307P, N312S, L347P und G370V), 22% sind "in frame" Deletionen/Insertionen (I101del, E114\_A118del, R207\_L208insLRR, A243\_P246del), d.h. komplette Triplets fehlen oder werden hinzugefügt, sodass der Leserahmen unterbrochen wird, während nur jeweils 17% der Veränderungen Stoppmutationen und größere Deletionen darstellen, die vermutlich zur Trunkierung des Proteins führen. Eine große Deletion in den Exonen 1 und 2 hat wahrscheinlich den kompletten Verlust des Proteins zur Folge. Bech-Hansen und seine Mitarbeiter (2000) untersuchten zeitgleich 22 CSNB1-Familien und identifizierten 14 verschiedene Mutationen in *NYX*. Betrachtet man das Spektrum der Mutationen im *NYX*-Gen, so erhärtet sich die Hypothese, dass Veränderungen in diesem Gen tatsächlich für den Phänotyp der kompletten Form der kongenitalen stationären Nachtblindheit verantwortlich sind. Inzwischen hat sich das Mutationsspektrum in *CACNA1F* und *NYX* aufgrund von mehreren veröffentlichten Studien stark vergrößert (Bech-Hansen *et al.*, 1998; Strom *et al.*, 1998; Boycott *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2001; Bech-Hansen *et al.*, 2002; Wutz *et al.*, 2002; Zito *et al.*, 2002; Jacobi *et al.*, 2003). In drei von uns analysierten XLCSNB-Patienten wurde bisher keine Mutation identifiziert. Ursachen hierfür könnten sein, dass sich Aberrationen auch in regulatorischen Elementen oder in noch nicht identifizierten Exonen befinden oder dass es sich dabei um Patienten handelt, die Mutationen in bis heute noch nicht identifizierten Genen haben, die aber zu einem ähnlichen, oder nicht von CSNB1 unterscheidbaren Phänotyp führen. Die Existenz eines dritten Locus für XLCSNB kann auch nicht ganz ausgeschlossen werden (Einleitung, Abbildung 6, Ref. 6 und 7) auch wenn die meisten der analysierten Patienten entweder eine Mutation in *CACNA1F* oder *NYX* tragen. Bei der Betrachtung der bisher identifizierten Mutationen in diesen Genen fällt auf, dass in *CACNA1F*, neben den in beiden Genen häufig auftretenden Nukleotidaustauschen, ein sehr viel höherer Prozentsatz an Stopp- und Spleißstellenmutationen als bei *NYX* aufzufinden ist. Es wurde gezeigt, dass viele vererbaren neurologischen Funktionsstörungen durch Mutationen in Ionenkanälen verursacht werden (Hübner *et al.*, 2002). Beispielsweise führen Veränderungen in der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des Zapfen cGMP Kationenkanals, *CNGA3* und *CNGB3* entsprechend zur kompletten und inkompletten Form der autosomal rezessiven Form der Farbblindheit (Kohl *et al.*, 1998; Kohl *et al.*, 2000). Die meisten in *CNGA3* identifizierten Mutationen führen zu Aminosäureaustauschen, während ein breites Mutationsspektrum in *CNGB3* gefunden wurde. Ein sehr häufig auftretender Aminosäureaustausch (S435F) in Patienten mit der inkompletten Form der Farbblindheit, führt zur Bildung von heteromeren Kanälen, die, im

Vergleich zu Wildtyp Heteromeren, eine deutlich verstärkte Affinität zu cAMP und cGMP hatte. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die S435F Mutation Veränderungen der Poreneigenschaften des Kanals bei gleicher Lokalisation wie das Wildtyp Protein aufwies. Beispielsweise führte die gefundene Mutation zu einer verringerten Leitfähigkeit des einzelnen Kanals (Peng *et al.*, 2003). Die in dieser Arbeit in dem L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal gefundene Punktmutationen führen zu Austausch von konservierten Aminosäuren, die eine Änderung der Nettoladung zur Folge haben. Vermutlich führen die Stopp-Mutationen zu einem nicht funktionsfähigen Kanal, sodass anzunehmen ist, dass Patienten mit der inkompletten Form der Nachtblindheit mit Funktionsverlust-Mutationen assoziiert sind. Wahrscheinlich kommt es im dunkeladaptierten Zustand durch diese Mutationen zur Verringerung der Freisetzung des Kalziums und des Neurotransmitters Glutamat, was eine relative Depolarisierung der Bipolarzellen zur Folge hat (Pietrobon 2002). Die Patch-Clamp Technologie, erlaubt Größe und Dauer eines Ionenstroms zu messen und könnte Aufschluss über die pathogenen Auswirkungen der Mutationen auf die Funktion des Kanals geben.

Die meisten in *NYX* gefundenen Mutationen führen zu einem Aminosäureaustausch in der hochkonservierten LRR-Region des Proteins. Es wurde gezeigt, dass das LRR-Motif wichtig für Protein-Interaktionen homophiler oder auch heterophiler Art (Kobe *et al.*, 1994) ist und so ist anzunehmen, dass Mutationen in diesen Wiederholungen eine Interaktion nicht mehr zulassen und es somit zum Funktionsverlust von Nyctalopin kommt. Aus der 3D-Struktur (Ergebnisse, Abbildung 17) wird ersichtlich, dass die Deletion in Kodon 187 des Patientens 5387 in einer Verkürzung der  $\beta$ -Faltblatt Organisation des dritten LRRs resultiert. Die Insertion von 3 Aminosäuren zwischen den Positionen 207 und 208 führt zu Verlängerung des 6. LRRs, was vermutlich die Zerstörung der  $\alpha$ -helicalen Struktur zur Folge hat. Auch in anderen Studien wird beschrieben, dass nicht nur trunkierende oder deletierende Mutationen zum Verlust der Funktion eines Proteines führen können. Beispielsweise kann auch die veränderte subzelluläre Lokalisation des Proteins die Funktion beeinflussen. Aberrationen im *TYR*-Gen führen zum okulokutanen Albinismus. Das *TYR*-Protein ist ein Enzym, das eine kritische Rolle bei der Melaninsynthese in dem, dem Golgi-Apparat nachgeschaltetem, Melanosom hat. Lokalisationsstudien zeigten, dass Punktmutationen in diesem Gen zu einer Ansammlung des Proteins im ER führen und somit der für die Melaninsynthese wichtige Transport in den Golgi-Apparat ausbleibt (Halaban *et al.*, 2000). Einzelne, meist stark konservierte Aminosäuren können für den Strukturhalt von Bedeutung sein. Beispielsweise führen

einzelne Aminosäureaustausche in einer transmembranen Helix-C Domäne in *RHO* zu einer Fehlorientierung der Helix. Das veränderte Opsin kann nicht mehr an das 11-cis Retinal binden, die Phototransduktionskaskade ist gestört und es kommt zur autosomalen RP (Garriga *et al.*, 1996). Experimentelle Studien werden zeigen, inwiefern die Funktion von NYX durch die gefundenen Aminosäureaustausche gestört ist.

### 4.3 Expression von NYX in Mensch und Maus

Die Expression des *NYX*-Gens konnte mittels RT-PCR in verschiedenen Geweben bei Mensch und Maus nachgewiesen werden (siehe Ergebnisse, Abbildung 11 und Abbildung 13 C). Im Vergleich dazu konnte in einer anderen unabhängigen Studie lediglich die Expression des humanen *NYX*-Gens in der Retina und Niere gezeigt werden (Bech-Hansen *et al.*, 2000). Ein Grund für diese Diskrepanz könnte die schwache Expression von *NYX* sein. Nur mittels nested RT-PCR und nicht stringenten Bedingungen konnte die Expression in unterschiedlichen Geweben gezeigt werden. Die Northern-Blot-Analyse des Gens resultierte in keinem spezifischen Signal. Obgleich auch das Maus *Nyx*-Gen nahezu ubiquitär exprimiert ist, lieferte die Hybridisierung eines Northern-Blots und eines cDNA Blots mit einer *Nyx*-Sonde unterschiedlich große Transkripte in verschiedenen Geweben. Auch die RT-PCR Bedingungen konnten stringenter gewählt werden. Dies lässt vermuten, dass das Maus *Nyx*-Gen stärker exprimiert ist, als sein humanes Ortholog. Keine der im Northern-Blot gefundenen Transkripte stimmten mit der zu erwartenden Größe der Maus cDNA von etwa 5,3 kb überein. Außerdem ist die mit RACE-PCR ermittelte cDNA des Maus *Nyx*'s um einiges größer als die humane cDNA. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass sowohl die humane- als auch Maus *NYX* cDNA noch nicht identifizierte 5'- und 3'-untranslatierte Regionen besitzt. Untersuchungen der genomischen Mausequenz im 3'-Bereich von *Nyx* ergaben drei putative Polyadenylierungsstellen ([http://argon.cshl.org/tabaska/polyadq\\_form.html](http://argon.cshl.org/tabaska/polyadq_form.html); Gregg *et al.*, 2003). Die Verwendung von zum Beispiel zwei dieser Stellen würde in Transkriptgrößen resultieren, die mit den im Northern-Blot von Maus-Auge gefundenen Transkripten von etwa 9 kb übereinstimmen. Die kleineren Transkripte sprechen für alternative mRNAs dieses Gens. Eine unabhängige Northern-Blot Studie zur Expression von *Nyx* lieferte ein 7 kb großes retina-spezifisches Transkript (Gregg *et al.*, 2003), was auch für alternative Transkripte dieses Gens spricht. Hier sind noch weitere Analysen zur Bestimmung und Verifikation des Expressionsmusters notwendig.

*In-situ*-Hybridisierungs-Studien zur zellspezifischen Expression von *NYX* lieferten in unterschiedlichen Arbeitsgruppen teilweise auch verschiedene Ergebnisse. In humaner Retina wurde *NYX* neben der inneren Körnerschicht (INL) und in den Ganglienzellen sowie der äußeren nukleären Schicht und den Innersegmenten der Photorezeptorzellen nachgewiesen (Bech-Hansen *et al.*, 2000). Studien von unseren Kooperationspartnern in Tübingen zeigten sowohl mit einer humanen *NYX*-Sonde aus der 3' untranslatierten Region (Nukleotid Position 1887 – 2406; *GenBank#* AJ278865) als auch mit einer Maus *Nyx*-Sonde (Nukleotid Position 557-1107 der humanen Sequenz) ein Hybridisierungssignal in der inneren nukleären Schicht und den Ganglienzellen auf Maus- und Rattenretinaschnitten unterschiedlicher postnataler Stadien. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass *NYX* in Nagetieren offensichtlich primär in den Amakrinzellen und in den Ganglienzellen exprimiert wird. Eine Expression in den Bipolarzellen ist eher unwahrscheinlich, bzw. nur wenig ausgeprägt, denn deren Zellkörper lokalisieren vornehmlich in der inneren Hälfte der INL (Pesch *et al.*, 2003). Eine unabhängige RNA-*in-situ*-Studie mit dem Maus *Nyx*-Gen resultierte in einer ähnlichen Färbung in der INL von Maus-Augen (Gregg *et al.*, 2003).

Immunhistologische Protein-Lokalisationsstudien, ausgeführt von unseren Kooperationspartnern in Tübingen, zeigten zwar neben der allgemeinen Färbung der INL auch eine Färbung am Übergang zu der äußeren plexiformen Schicht (OPL) der Retina, jedoch ist es noch nicht geklärt ob die gefärbten Zellen den Bipolar- oder eher den Horizontalzellen zuzuordnen sind (Pesch *et al.*, 2003). Aufgrund der Motivvorhersage für *NYX* wird vermutet, dass es sich bei diesem Protein um ein in der Plasmamembran verankertes extrazelluläres Protein handelt. Zum einen könnte das Protein innerhalb und zwischen den retinalen Schichten transportiert werden oder mit Proteinen der Bipolarzellen interagieren. Somit ist der Ort der Synthese nicht notwendigerweise auch der Ort der Funktion, was den Verlust der b-Welle bei CSNB1-Patienten erklären würde.

Die frühe Expression von *Nyx* in der Retina lässt vermuten, dass das Protein bei der Synaptogenese und der neuronalen Formation in der INL eine Rolle spielt. Die Expression von *Nyx* in frühen Stadien und in ausdifferenzierten Zellen lässt auf eine dauerhafte Funktion schließen, wie z.B. den Aufbau und die Erhaltung der extrazellulären Matrix oder die Beteiligung an Zelladhäsionsprozessen. Die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich Expression des humanen und Maus *NYX*-Gens könnten einen spezieabhängigen Effekt darstellen. Jedoch müssen auch die verschiedenen Gewebsbehandlungen (Paraffin- gegenüber Kryoschnitten) und die unklare *post mortem* Zeit des humanen Materials in

Betracht gezogen werden. Untersuchungen an humanem Material sind meist anspruchsvoller als bei tierischem. Die Retina wird nach dem Tod eines Menschen meist spät entnommen. Oft gilt das „Augenmerk“ bei Organspendern der Hornhaut, die heute häufig in der Transplantationschirurgie eingesetzt wird. Die Gefahr des Abbaus der mRNA der Retina hierbei ist groß.

#### 4.4 Antikörper gegen das NYX-Protein

Zum Nachweis des NYX-Proteins in lymphoblastoiden Zellen von CSNB1 Patienten im Vergleich zu nicht betroffenen Personen, oder in histologischen Schnitten, sollte ein polyklonaler Antikörper hergestellt werden. Unterschiedliche Ansätze wurden hierfür gewählt (Methoden 2.2.4). Keines der fünf gewonnenen Antiseren war in der Lage, ein in HeLa- bzw. COS-7 Zellen exprimiertes NYX-Protein oder das endogene NYX-Protein in lymphoblastoiden Zellen im Western Blot oder der Immunfluoreszenz spezifisch zu erkennen. Auch nach Affinitätsaufreinigung mit aufgereinigtem rekombinantem NYX-Protein oder dem zur Immunisierung verwendeten Peptid erkannten die Antikörper das NYX-Protein nicht. Alle Antikörper zeigten Kreuzreaktionen gegen andere Proteine. Ein Grund hierfür könnte die Struktur des NYX-Proteins sein, die aus einem alternierenden kurzen  $\beta$ -Faltblatt, einer Knäuelkonformation, einer  $\alpha$ -Helix-Struktur und einer zweiten Knäuelkonformation besteht. Die Gesamtstruktur stellt wahrscheinlich, wie für andere LRR-Moleküle gezeigt (Kobe und Deisenhofer, 1994), ein hufeisenförmiges Protein dar (Abbildung 17). Dabei sind die LRR-Motive nach innen gewendet, während die hydrophoben  $\alpha$ -Helices nach außen gerichtet sind. Das zur Immunisierung verwendete Peptid sollte beispielsweise aber hydrophile Sequenzen besitzen, da dies die Wahrscheinlichkeit der Oberflächenpräsenz erhöht und damit die Zugänglichkeit für den Antikörper. Sekundärstrukturen wie  $\alpha$ -Helices sollten vermieden werden (Vorschläge für die Auswahl der Peptide von der Firma Eurogentec; Krisch *et al.*, 1998). Wahrscheinlich sind die hydrophilen Bereiche des Proteins aufgrund seiner hufeisenförmigen Struktur für den Antikörper nicht zugänglich. Tatsächlich war es sehr schwer geeignete Peptide des NYX-Proteins zur Herstellung von Antiseren auszuwählen. Die berechnete Oberflächenwahrscheinlichkeit der ausgewählten Peptide nach Kyte und Doolittle (1982) war sehr gering. Ein weiteres Problem kann auch die zu geringe Spezifität der gewonnenen Antiseren darstellen. Bei polyklonalen Antiseren handelt es sich immer um Antikörper-Gemische gegen die determinanten Gruppen des Antigens, die von Spender zu Spender

verschieden sind (Milstein, 1980). Eine Lösung dieses Problems wäre die Herstellung eines monoklonalen Antikörpers. Im Jahre 1975 gelang es Kohler und Milstein erstmalig, Zellen eines Mäuse-Myeloms mit Antikörper-produzierenden B-Lymphozyten aus der Milz von Mäusen zu verschmelzen. Die so entstandenen Hybridzellen besitzen sowohl die Fähigkeit der Lymphozyten, Antikörper gegen ein beliebiges Antigen zu synthetisieren, als auch die Eigenart der Myelomzellen, unsterblich zu sein. Einzelne Hybridzellen kann man im Nährmedium zu Zellklonen heranwachsen lassen, wobei alle Zellen dieses Klons denselben Antikörper produzieren. Im Unterschied zum polyklonalen Antikörper besteht der Vorteil monoklonaler Antikörper darin, dass theoretisch unendlich viele homogene Antikörper gegen ein definiertes Epitop erzeugt werden (Dunbar und Skinner, 1990).

#### **4.5 Charakterisierung funktioneller Domänen von Nyctalopin**

Das stäbchenabhängige Sehen beruht auf der Übertragung der visuellen Information der Außensegmente der Photorezeptoren an die angrenzenden Zellschichten der Retina. Die Signale werden an die den Photorezeptoren folgenden depolarisierenden Bipolarzellen weiter gegeben (Daw *et al.*, 1990). Ein Merkmal bei Patienten mit der kompletten Form der kongenitalen stationären Nachtblindheit ist, dass die den Stäbchen nachgeschalteten Prozesse ausbleiben, was sich durch die Abwesenheit der b-Welle im ERG bemerkbar macht (Miyake *et al.*, 1986). Daher wird vermutet, dass diese Erkrankung durch einen Defekt in der synaptischen Übertragung zwischen den Stäbchen und den nachgeschalteten Neuronen 2. Ordnung, im Speziellen den Bipolarzellen, resultiert. Welche Rolle Nyctalopin bei dieser Signalübertragung spielt, gilt es noch zu erforschen. Es werden jedoch spezifische Domänen für dieses Protein vorhergesagt die vermuten lassen, dass NYX für ein extrazelluläres, an der Membran verankertes Protein mit Leucin-reichen Wiederholungen kodiert, das wahrscheinlich für Protein-Protein Interaktionen verantwortlich ist (Pusch *et al.*, 2000). Viele Proteine aus der LRR-Protein Familie wie Connectin (Nose *et al.*, 1994) oder Chaoptin (Krantz *et al.*, 1990) stellen Adhäsionsmoleküle dar, die durch einen GPI-Anker extrazellulär an der Plasmamembran lokalisiert sind (Kobe und Deisenhofer, 1994). Um die subzelluläre Synthese und Lokalisation von NYX zu analysieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Färbemethode entwickelt, die zuerst die Oberflächenproteine in lebenden Zellen und, nach Fixierung und Permeabilisierung der Zellen, Proteine im Zellinnern nachweist. In lebenden Zellen konnte

V5-NYX an der extraplasmatischen Seite der Plasmamembran punktförmig nachgewiesen werden. Diese Signale sind spezifisch für Membran-verankerte Proteine. Es wurde gezeigt, dass Proteine mit einem GPI-Anker in 200-300 nm großen Mikrodomänen lokalisieren (Friedrichson und Kurzchalia, 1998; Varma und Mayor, 1998). Diese Mikrodomänen können den intrazellulären Transport von assoziierten Proteinen diktieren, und/oder als Assemblierungsstellen für zytoplasmatische Signalmoleküle fungieren (Simon und Ikonen, 1997). Mit zellspezifischen Markern konnte gezeigt werden, dass NYX im Zellinnern im ER und Golgi-Apparat lokalisiert. Diese Ergebnisse stimmen mit der Synthese von membrangebundenen Proteinen überein, die zuerst an die innere ER-Membran gebunden werden, bevor sie modifiziert und über den sekretorischen Signalweg an die Zelloberfläche transportiert werden (Barz und Walter, 1999). Der Golgi-Apparat, der ein zentrales Organell im sekretorischen Signalweg darstellt, spielt eine wichtige Rolle in der Prozessierung, Reifung und beim Transport von neuen, im ER synthetisierten, Proteinen (Palade, 1975; Rothman, 1994). Die Kolo-kalisation von NYX mit dem Golgi-Apparat spricht für eine Modifizierung des Proteins, z.B. einer Glycosylierung. Das ist aber eine Annahme, die noch experimentell untersucht werden muss. Um auszuschließen, dass die gefundene Expression des NYX-Fusionsproteins nicht Zelltyp-spezifisch ist, wie es für andere Proteine der Fall ist (Mayor *et al.*, 1994; Schwahn *et al.*, 2001), wurde die Verteilung von Nyctalopin in zwei Zelltypen untersucht; in HeLa- und COS-7 Zellen. In beiden Zelltypen lokalisierte NYX an der Zelloberfläche, im Golgi-Apparat und im ER, was dafür spricht, dass NYX zelltyp-unabhängig an der Oberfläche verankert ist (Zeitze *et al.*, 2003).

Der Aminosäuresequenzvergleich von NYX und seinem Maus Orthologen zeigte, dass das LRR-Kernstück am stärksten konserviert ist (> 90%), während die Signalsequenz und der C-terminale Bereich des Proteins mit 62%, bzw. 52% eine schwächere Homologie aufwiesen (Gregg *et al.*, 2003; Pesch *et al.*, 2003). Mittels Computerprogrammen wurden zwar die LRR- und das Signalpeptid für das Maus NYX-Protein vorhergesagt, nicht aber der GPI-Anker (Gregg *et al.*, 2003, Pesch *et al.*, 2003). Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zeigten aber, dass es sich bei beiden Proteinen um ein extrazelluläres, an der Plasmamembran verankertes Molekül handelt, das im ER synthetisiert und über den Golgi-Apparat an die Oberfläche transportiert wird. Vermutlich ist das verwendete Vorhersageprogramm für GPI-Anker nicht auf das Maus Nyx-Protein anwendbar. *In vivo* Lokalisationsstudien des für die C-terminale Sequenz deletierten Maus V5-Nyx-Proteins

zeigten, dass die deletierte Domäne für die Plasmamembranbindung erforderlich ist. Eine ähnliche Studie zeigte, dass obwohl nur für eines von zwei Oberflächenproteinen ein GPI-Anker vorhergesagt wurde, beide jedoch trotzdem an der Plasmamembran verankert waren (Voth *et al.*, 1984).

Des Weiteren konnte in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das NYX-Protein ohne GPI-Anker nach 30-minütiger Nachinkubation mit antikörperfreiem Medium von der Plasmamembran gelöst wurde. Zwar wird das Protein noch im ER synthetisiert und über den Golgi-Apparat korrekt weiter transportiert, kann aber nicht mehr an der Oberfläche der Zellen verankert werden. Dies beobachteten wir sowohl für das menschliche als auch das Maus NYX-Protein.

Die Trunkierung der Signalsequenz alleine oder zusätzlich zur GPI-Anker Deletion resultierte im Verlust der membrangebundenen Proteinsynthese, was zu einer Anreicherung des Proteins im Zytosol führte. Die typische ER- und Golgi-Färbung, wie sie für die Vollängenproteine gefunden wurden, blieb aus. Dies entspricht der Theorie, dass die N-terminale Signalsequenz für die Synthese des Proteins im ER- und für dessen Transport über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche verantwortlich ist.

Lokalisationsstudien im überexprimierten System können auch Aufschluss über die Folgen einer krankheits-assoziierten Mutation für das Protein geben. Beispielsweise führten pathologische Punktmutationen in dem *RS1*-Gen (Retinoschisis) wahrscheinlich zur Missfaltung des Proteins, sodass das Protein entweder, abhängig von der Mutation, nur reduziert oder überhaupt nicht mehr transportiert wurde. Des Weiteren hatte ein krankheits-assoziiertes Aminosäureaustausch den proteasomalen Abbau des RS1-Proteins zur Folge (Wang *et al.*, 2002). In CSNB1-Patienten gefundene Mutationen aus der LRR-Region verursachten bei der Überexpression in HeLa- bzw. COS-7 Zellen keine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation. Folglich ist die typische Lokalisation von NYX durch Mutationen, wie sie in CSNB1-Patienten gefunden wurden nicht beeinträchtigt, aber möglicherweise die Funktion. Die hauptsächlich in den LRRs gefundenen Mutationen könnten zur Störung von Interaktionen mit anderen Proteinen führen, was den Funktionsverlust zur Folge hätte.

## 4.6 Transkriptionelle Regulation des *NYX*-Gens in Mensch und Maus

Um die Regulation der Expression von *NYX* aufzuklären, wurden Promotorstudien für sowohl das humane als das Maus-Gen durchgeführt. Promotorregionen können sich aus vielen einzelnen Elementen zusammensetzen, von denen einige am Transkriptionsstartpunkt liegen, während andere mehrere kb vor dem ersten Exon eines Gens liegen können (Darnell *et al.*, 1990). Es gibt auch Beispiele dafür, dass wichtige regulierende Sequenzen im 3'-Bereich eines Gens liegen (Morgan und Kalsheker, 1997). Neben Konsensussequenzen wie die TATA-, CAAT- oder die GC-Box, die sich stromaufwärts eines Transkriptionsstarts befinden und Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren sind, liefern Regionen mit einem hohen Konservierungsgrad und die Anwesenheit von CpG-Inseln einen Hinweis auf eine putative Promotorregion (Kenyon und Craig, 1999; Ioshikhes und Zhang, 2000). Die vergleichende genomische Sequenzanalyse von *NYX* in Mensch und Maus lieferte neben Exon 2 und Exon 3 auch stark konservierte Bereiche in Intron 2 und im 5'- und 3'-UTR. Etwa 5 kb stromaufwärts des humanen ersten Exons wurde sowohl in der humanen als auch in der Maus Sequenz eine CpG-Insel vorhergesagt. Diese befindet sich in einem etwa 1 kb großen Bereich, der eine Identität von 60% aufweist. Computerprogramme sagten in diesen Bereichen für die humane Sequenz einen Promotor und eine weitere Transkriptionstartstelle und für die Maus Sequenz einen Promotor mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit voraus. Auch wenn das erste Exon des *NYX*-Gens etwa 5 kb stromabwärts von dem vorhergesagten Transkriptionstartpunkt liegt, wäre es möglich, dass diese Sequenz trotzdem die Startstelle von *NYX* darstellt. Außerdem wird für die humane Sequenz stromaufwärts von *NYX* nur mit geringer Wahrscheinlichkeit ein Transkriptionsstart mit einer benachbarten TATA-Box vorhergesagt. Wie schon unter 4.3 des Diskussionsteils erwähnt, ist vermutlich die gesamte cDNA des Gens noch nicht bestimmt. Um die vorhergesagten Promotoren zu testen, wurden Reporter-Gen-Analysen durchgeführt. Hierbei wurde das Luziferase-Gen (*luc*) als Reporter-Gen verwendet. Die putativen Promotoren wurden stromaufwärts von *luc* kloniert und die Expression im Luminometer gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei der untersuchten Vollängen-Maussequenz in NIH 3T3 embryonalen Maus-Fibroblasten um einen Promotor handelt, der Maus-spezifische, positiv regulierende Elemente beinhaltet. Eine schwächere Luziferaseaktivität der Vollängensequenz konnte auch in HeLa-Zellen gemessen werden. Deletionskonstrukte in den Mauszellen zeigten eine

kontinuierliche Abnahme der Luziferaseaktivität, während in HeLa-Zellen keine Veränderungen gemessen wurde. Allerdings konnte in beiden Zelllinien bei dem Deletionskonstrukt mit einer Insertgröße von 375 bp keine Promotoraktivität gemessen werden. Die vollständige Abnahme der Luziferaseaktivität bei dem Deletionskonstrukt mit einer Insertgröße von 375 bp in humanen und Maus Zellen ist wahrscheinlich durch die Abwesenheit des vorhergesagten Transkriptionsstarts an der Nukleotidposition 562-563 begründet. Keine signifikante Luziferaseaktivität wurde mit den humanen Konstrukten gemessen. Eventuell fehlen hier noch weitere positiv regulierende Elemente, die für die Expression notwendig sind, die sich entweder in anderen konservierten Bereichen oder auch im 5'- oder 3'-UTR befinden können. Diese Annahmen bedürfen aber noch der experimentellen Evaluierung. Möglicherweise führten aber auch die gewählten Zelllinien dazu, dass keine signifikante Luziferaseaktivität mit den humanen Konstrukten detektiert werden konnte. Zwar konnten wir zeigen, dass NYX in unterschiedlichen Geweben exprimiert ist, die Expression des endogenen Proteins in diesen Zelllinien wurde jedoch nicht getestet.

#### **4.7 Bedeutung der Erkenntnisse für zukünftige Studien von Nyctalopin**

Diese Arbeit lieferte die Grundvoraussetzungen für das Verständnis der molekularen Pathogenesemechanismen der kompletten Form der kongenitalen stationären Nachtblindheit. Neben der Identifizierung des humanen und Maus *NYX*-Gens und Studien zur Expression waren auch Untersuchungen zur Transkriptionsregulation dieses Gens Bestandteil der Arbeit. Der in Maus und Mensch stark konservierte und durch Computerprogramme vorhergesagte Mauspromotor konnte experimentell bestätigt werden. Zur weiteren Analyse des putativen humanen *NYX*-Promotors und auch des Mauspromotors könnten diese in einen Luziferase-Vektor mit positiv regulierenden Elementen kloniert werden. Auch werden Untersuchungen in anderen Zelllinien, wie in Retinoblastoma-, HEK- (engl.: human kidney epithelium, humane Nieren-Epithelium) und RPE-Zellen Aufschluss über die Luziferaseaktivität der Promotoren geben. Bei einer erhöhten Luziferaseaktivität könnten die durch den Sequenzvergleich ermittelten stark konservierten Elemente in Intron 2 auf eine positive Regulation untersucht werden. Für ein transgenes Mausmodell könnten diese Elemente mit dem jeweiligen Promotor in einen GFP-Vektor kloniert und in Maus Oozyten injiziert werden. Da beide Gene nahezu

ubiquitär exprimiert sind, werden vermutlich auch Zellen unterschiedlicher Gewebe angefärbt werden, die GFP exprimieren. Interessant wäre, ob die Expression von GFP in der Retina in diesem Modell mit den gefundenen *in-situ* Hybridisierungsergebnissen, d.h. eine spezifische GFP-Färbung in den Ganglien- und Amakrinzellen, übereinstimmen. Ein zellspezifischer Promotor der Ganglien- und Amakrinzellen könnte auch für andere Anwendungen, wie z.B. der Gentherapie von Bedeutung sein.

Die Identifizierung des Mauspromotors von *NYX* ermöglicht uns, die an diese Sequenz bindenden Proteine, so genannte Transkriptionsfaktoren, zu analysieren. Dies könnte durch die veränderte Wanderungsgeschwindigkeit von DNA-Proteinkomplexen in der Gelelektrophorese erzielt werden.

Viele GPI-verankerte Proteine spielen eine Rolle beim Proteintransport (Brown und Rose, 1992) und bei der Prozessierung von Signalen (Stulning *et al.*, 1997; Rodgers *et al.*, 1994). Proteine der LRR-Superfamilie repräsentieren eine Gruppe von Molekülen mit unterschiedlichen biologischen Funktionen, wie z.B. die Steuerung des Zellwachstums und -differenzierung, sowie die Regulation der zellulären Homöostase (Hocking *et al.*, 1998). Die GPI-verankerten LRR-Proteine Chaoptin und Connectin spielen eine wichtige Rolle als Adhäsionsmoleküle in der neuronalen Entwicklung von *Drosophila*. Chaoptin ist in den Photorezeptoren exprimiert (Krantz und Zipursky, 1990), Connectin lokalisiert in den Synapsen von Neuronen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die zelluläre Lokalisation von *NYX* durch pathogene Mutationen des LRR-Kernstücks nicht verändert wird. Daher wird Nyctalopin wahrscheinlich nicht als intrazelluläres Transportmolekül fungieren. Ähnlich wie Chaoptin könnte auch *NYX* ein extrazelluläres, an der Plasmamembran verankertes kleines Proteoglykan darstellen, das für die Bildung der Synapsen zwischen den Neuronen des ON-Pathways verantwortlich ist (Bech-Hansen *et al.*, 2000). Eventuell spielen hier Interaktionen mit anderen in der Retina exprimierten Proteinen eine Rolle, die eventuell durch Immunpräzipitationsansätze isoliert werden könnten.

Eine weitere Möglichkeit, die zur Aufklärung molekularer Pathogenesemechanismen führen kann, stellen Tiermodelle dar. Es wurden einige Mausmodelle beschrieben, die, wie auch CSNB1-Patienten, keine Stäbchenantwort im dunkeladaptierten Blitz-Elektroretinogramm (ERG) aufweisen. Das natürlich vorkommende Mausmodell, die *nob*-Maus, wurde wegen dem Fehlen der b-Welle im ERG als Modell für die komplette Form der kongenitalen stationären Nachtblindheit angesehen (Candille *et al.*, 1999). Tatsächlich wurde kürzlich gezeigt, dass eine Deletion im Maus *Nyx*-Gen zu diesem Phänotyp wie bei

CSNB1-Patienten führt (Gregg *et al.*, 2003). Interessanterweise ist die b-Welle im ERG in Mäusen, denen entweder der G-Protein gekoppelte metabotrope Glutamatrezeptor mGluR<sub>6</sub> oder die  $\alpha$ -Untereinheit des G<sub>0</sub>-Proteins fehlt, auch nicht vorhanden (Pardue *et al.*, 1998; Masu *et al.*, 1995; Dhingra *et al.*, 2000). Dabei ist die Antwort der Photorezeptoren, die sich in der a-Welle widerspiegelt, wie auch die Gesamtstruktur der Retina, normal (Lamb, 1996). Der G-Protein gekoppelte metabotrope Glutamatrezeptor mGluR<sub>6</sub> aktiviert eine intrazelluläre Signatransduktionskaskade (Nawy und Jahr, 1991) im ON-Pathway der Sehkaskade. Inwiefern NYX durch Regulation oder direkte Interaktion mit diesen, den Photorezeptoren nachgeschalteten Proteinen aus der Phototransduktionskaskade in Verbindung tritt, gilt es in der Zukunft zu klären. Beispielsweise könnte man die Expression bestimmter Kandidatengene, wie z.B. *mGluR<sub>6</sub>*, im nob-Modell mit dem der Wildtypexpression mittels sensitiver Real-Time PCR oder Chip-Methodik vergleichen. Immunhistologische Kollokalisationsstudien oder Ko-Immunpräzipitationsexperimente mit Antikörpern gegen die entsprechenden Kandidatenproteine und gegen das endogene Nyctalopin würden Aufschluss über eine direkte Interaktion liefern.

Auch durch die Überexpression des genomischen *NYX*-Gens in einem Mausmodell könnten Veränderungen der retinalen Funktionen erzielt werden, die Aufschluss über den Pathogenesemechanismus bei CSNB1 liefern. Abhängig vom Transkriptionslevel und des Phänotyps der Transgenen könnten diese mit der nob-Maus eingekreuzt werden, um zu sehen, ob dies zum „Rescue“ des nob-Phänotyps führt. Zusätzlich könnte dem Maus-PAC, der die komplette genomische *NYX*-Sequenz trägt, durch heterologe Rekombination in *E.coli* (Yang *et al.*, 1997) die in CSNB1-Patienten gefundenen Punktmutationen eingeführt werden, um den molekularen Effekt einzelner Mutationen näher zu charakterisieren.