

5 ZUSAMMENFASSUNG

Kongenitale stationäre Nachtblindheit (CSNB) bezeichnet eine klinisch unterscheidbare Gruppe von nicht progressiven retinalen Erkrankungen, deren Vererbung autosomal dominant (adCSNB), autosomal rezessiv (arCSNB) oder X-chromosomal (XLCSNB) sein kann. Mit dem Elektroretinogramm (ERG) können zwei verschiedene Formen der XLCSNB unterschieden werden. Bei der kompletten Form (CSNB1) fehlt die Stäbchen-Adaption vollständig, während sie bei der inkompletten Form (CSNB2) verlangsamt ist. Die zapfenabhängigen Reizantworten sind nur bei der inkompletten Form reduziert. Des Weiteren wird CSNB1 mit Kurzsichtigkeit (Myopie) assoziiert, während bei CSNB2-Patienten sowohl Kurz- als auch Weitsichtigkeit (Hyperopie) auftreten können. Durch genetische Kartierung in Familien mit XLCSNB konnten zwei Loci auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms ermittelt werden (Xp11.23 und Xp11.4). Mittels Positionsklonierung wurde das Gen, das in Patienten mit CSNB2 verändert ist, in vorangegangenen Studien kloniert. Es kodiert für die $\alpha 1$ -Untereinheit eines spannungsabhängigen Kalzium-Kanals (CACNA1F). Mittels Mutationsanalysen in unserem Patientenkollektiv wurde das Mutationsspektrum in diesem Gen aufgeklärt. Ein großer Anteil der gefundenen Mutationen stellen Nukleotidaustausche dar, die zu einem verfrühten Stopp Kodon führen. Durch Vorstudien verschiedener Arbeitsgruppen konnte der *CSNB1*-Genort in Xp11.4 kartiert werden. Mittels einer Kombination aus positioneller Klonierung und Kandidatengenanalyse war es uns möglich, das mit CSNB1 assoziierte Gen zu ermitteln. Zunächst wurden bei zwei CSNB-Patienten unterschiedliche, etwa 4 kb große Deletionen in einem vorhergesagten Gen identifiziert. Anschließend wurden 15 weitere Mutationen in 23 Patienten gefunden. Das bis dahin unbekannte Gen wurde *NYX* (Nyctalopin on chromosome X) genannt. Die meisten Mutationen führen, im Gegensatz zu den in *CACNA1F* gefunden Veränderungen, zu Aminosäureaustauschen. *NYX* besteht aus drei Exonen und ist in unterschiedlichen Geweben schwach exprimiert, was nur durch RT-PCR Experimente gezeigt werden konnte, da in der Northern-Blot-Analyse keine Transkripte nachweisbar waren. Auch das orthologe Gen der Maus ist in unterschiedlichen Geweben exprimiert.

Mittels vergleichender Sequenzanalyse, zwischen Mensch und Maus, wurden stark konservierte Bereiche in Intron 2, sowie im 5'- und 3'-UTR detektiert. Etwa 5 kb stromaufwärts des humanen Exons 1, wurde neben einer evolutionär konservierten Region auch eine Transkriptionsstartstelle, eine CpG-Insel und eine Promotorregion vorhergesagt.

In einem Luziferase Reporter Gen Assay wurde gezeigt, dass es sich bei diesem Bereich in der genomischen Maus Sequenz tatsächlich um einen Promotor handelt, dessen Kapazität mittels Deletionskonstrukten auf 126 bp eingengt werden konnte. Dabei handelt es sich um einen Bereich, indem auch ein Promotor mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit vorhergesagt wurde. Die gemessene Luziferaseaktivität des putativen humanen Promotors war dagegen niedrig, sodass anzunehmen ist, dass dem humanen *NYX* Promotor noch positiv regulierende Bereiche zur Funktion fehlen.

Die Suche nach bekannten Motiven ergab, dass das humane und Maus *NYX* für ein bisher unbekanntes Leucin-reiches Protein mit 11 typischen LRRs kodiert, die durch 2 Cystein-reiche LRRs flankiert werden. Außerdem wurden für beide Proteine eine Signalsequenz und für das humane Protein ein GPI Anker vorhergesagt. Diese Motive sind typisch für die Gruppe der kleinen Leucin-reichen Proteoglycane (SLRP = small leucine rich proteoglycans) in der extrazellulären Matrix (ECM). Diese können nicht nur für den Zusammenhalt der ECM verantwortlich sein, sondern auch Adhäsionsmolekülen darstellen, die das Zellwachstum regulieren und an der Signaltransduktion beteiligt sind. *NYX* zeigt eine auffällig große strukturelle Ähnlichkeit zu Choptin und Connectin, zwei *Drosophila* LRR-Proteine, die auch ein Signalpeptid und einen GPI-Anker haben. Choptin ist für Adhäsionsprozesse der Photorezeptormembranen verantwortlich, während Connectin an der Synapsenbildung und -formation im Muskelgewebe beteiligt ist. In dieser Arbeit konnte durch transiente Überexpression von V5-markiertem humanen und Maus *NYX*-Konstrukten in COS-7 und HeLa-Zellen gezeigt werden, dass beide Proteine Oberflächenproteine darstellen. Sie werden im ER synthetisiert und über den Golgi-Apparat an die Plasmamembran transportiert. Diese spezifische Lokalisation wird durch Deletionen in der Signalsequenz oder im GPI-Anker verändert. Punktmutationen in der LRR-Region haben jedoch keine Auswirkungen auf die Lokalisation. Diese Studien lassen vermuten, dass Nyctalopin eine Rolle als Adhäsionsmolekül spielt. *NYX* könnte aber auch als Ligand und/oder als Rezeptormolekül in Zellsignalwegen fungieren.

Die Identifizierung von *NYX* ermöglicht nun eine molekular-genetische Diagnostik bei CSNB1-Patienten. Studien über die Transkriptionsregulation dieses Gens bilden die Grundlage für die Anwendung eines Zell-spezifischen Promotors beispielsweise für gentherapeutische Ansätze. Zukünftige Studien werden zeigen, inwiefern Adhäsionsprozesse für den generellen Mechanismus der CSNB1 Erkrankung in der Retina verantwortlich sind.

SUMMARY

Congenital stationary night blindness (CSNB) describes a clinical heterogeneous group of nonprogressive retinal disorders. The mode of inheritance can be autosomal dominant (adCSNB), autosomal recessive (arCSNB) or X-chromosomal (XLCSNB). According to the rod-specific electroretinogram (ERG), XLCSNB patients can be associated with either the complete form (CSNB1) without rod function or with the incomplete type (CSNB2) with residual rod function. Only in the incomplete type a substantially reduced cone function is found. Furthermore CSNB1 can be associated with myopia, while patients with CSNB2 may suffer from either myopia or hyperopia. Genetic mapping in families with XLCSNB revealed two different loci on the proximal short arm of the X-chromosome (Xp11.23 and Xp11.4). With a positional cloning approach the gene underlying the defect in patients with CSNB2 was identified. It codes for the α 1-subunit of a voltage dependent calcium channel (*CACNA1F*). Analysis of XLCSNB patients resulted in an expansion of the mutation spectrum of this gene. A large proportion of the mutations lead to premature stop codons. The DNA of those patients where no mutation in *--IF* could be detected, were used for the positional cloning approach of the *CSNB1* gene. Previous studies have mapped the CSNB1 locus in Xp11.4. Using a combination of positional cloning and candidate gene approaches we were able to isolate the gene associated with CSNB1, which was named *NYX* (nyctalopin on chromosome X). Initially, two patients with two different deletions of about 4 kb in size in a predicted gene were identified. Further analysis revealed 15 new mutations in 23 patients. Most of these mutations lead to an amino acid exchange, in contrast to those in *CACNA1F*. *NYX* consists of three exons, which are almost ubiquitously expressed. Since no hybridization signal was detected on a northern blot, these results are based on RT-PCR experiments. In addition the mouse orthologous *Nyx* gene revealed almost the same expression pattern than that found in human. However, northern blot analysis of this gene revealed hybridization signals.

Comparative sequence analysis of the genomic sequence of the human with mouse *NYX* identified highly conserved regions in intron 2 and in the 5'- and 3'-UTR. About 5 kb upstream of the human *NYX* exon 1, an evolutionary conserved region, a CpG-island and a promoter were predicted. With a luciferase reporter gene assay we could show that the mouse putative promoter region contains indeed a promoter. Deletion constructs revealed a minimal region of 126 bp which is necessary to drive transcription. In this region a

promoter with high probability was predicted. However, no luciferase activity was detected with constructs containing the human putative promoter. One possible explanation could be, that enhancer elements are missing in the analyzed region.

A search for known motifs revealed that the human and mouse *NYX* code for yet unknown leucine- rich repeat proteins, each carrying 11 typical LRRs flanked by 2 cysteine-rich LRRs. Furthermore, while a signal peptide was predicted for both proteins, a GPI anchor was only found for the human one. These motifs are typically detected in proteins belonging to the small leucine-rich proteoglycans (SLRP) which are localized in the extracellular matrix (ECM). They were found to be responsible for the maintenance of the ECM. Additionally, they can be adhesion molecules, which regulate cell growth and are involved in processes of the signal transduction cascade. Regarding the structure, *NYX* shows a high similarity to chaoptin and connectin, two *Drosophila* LRR proteins, which contain a signal peptide and a GPI anchor. Whereas chaoptin plays an important role in photoreceptor cell morphogenesis to organize closely opposed membranes of photoreceptor cells by direct adhesive interactions, connectin has been shown to reveal a repulsive function during motor neuron growth cone guidance and synapse formation. Here we could show, that *NYX* is also attached extracellular to the plasma membrane via a GPI anchor. This was done by overexpressing human and mouse V5-*NYX* constructs in COS-7 and HeLa cells to study the subcellular localization of the proteins. They are synthesized in the ER and transported to the cell surface through the Golgi apparatus. Deletion of the signal peptide or the GPI anchor disturb this typical localization. These studies suggest that nyctalopin plays an important role as an adhesion molecule in the human and mouse retina. Alternatively, this protein could act as a ligand and/or a receptor molecule in cell-signaling pathways in the retina.

The identification of *NYX* now allows molecular-genetic tests of CSNB1 patients. Initial analysis of the transcriptional regulation of this gene presents the basis of a cell-specific promoter, e.g. in gene therapy approaches. Future studies will show whether *NYX* is able to mediate adhesion of retinal cells.