

Aus der Abteilung Medizinische Genetik  
Kinderklinik und Poliklinik im Dr. Von Haunerschen Kinderspital der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Jan Murken

**MOLEKULARGENETISCHE UNTERSUCHUNG  
BEI INKOMPLETTER KONGENITALER STATIONÄRER  
NACHTBLINDHEIT (CSNB2)**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Krisztina Wutz

aus

Budapest

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. J. Murken  
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Dichgans

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. S. R. Thureau  
Prof. Dr. T. Igo-Kemenes

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. A. Meindl

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2002

*Meinen Eltern und Till*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die Bedeutung der Genetik für die Augenheilkunde .....	1
1.2 Das X-Chromosom .....	2
1.2.1 Transkriptionskarte der Region Xp11.23 .....	3
1.3 Kongenitale stationäre Nachtblindheit (CSNB) .....	6
1.3.1 Autosomal-dominante CSNB (CSNB3) .....	9
1.3.2 X-Chromosomale CSNB ( <i>x</i> /CSNB) .....	11
1.3.2.1 Diagnostik und Klassifikation der <i>x</i> /CSNB .....	12
1.3.2.2 Heterozygote Überträgerinnen.....	17
1.3.2.3 Genetische Kartierung .....	17
1.4 Åland Island Eye Disease (ÅIED).....	20
1.5 X-Chromosomaler kongenitaler Nystagmus ( <i>x</i> /CN) .....	23
1.6 Zielsetzung der Arbeit .....	24
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.1 Patienten .....	26
2.2 Material .....	27
2.3 Methoden .....	30
2.3.1 Präparation genomischer DNA.....	30
2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	31
2.3.3 Horizontale Gelelektrophorese .....	34
2.3.4 Reinigung von PCR-Produkten .....	35
2.3.5 SSCP .....	36
2.3.6 Sequenzierung .....	38
2.3.7 Southern-Blot.....	41
2.3.8 Northern-Blot.....	42

---

2.3.9 Hybridisierung.....	42
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
3.1 Das <i>CACNA1F</i> -Gen.....	46
3.1.1 Klonierung des <i>CACNA1F</i> -Gens.....	46
3.1.2 Expressionsmuster von <i>CACNA1F</i> .....	48
3.1.3 Vergleichende Sequenzanalyse .....	50
3.2 Mutationsanalyse im <i>CACNA1F</i> -Gen.....	52
3.2.1 <i>CACNA1F</i> -Mutationsanalyse bei Patienten mit CSNB2.....	52
3.2.2 <i>CACNA1F</i> -Mutationsanalyse bei Patienten mit ÅIED-verwandtem Phänotyp ..	58
3.2.3 <i>CACNA1F</i> -Mutationsanalyse bei Patienten mit ÅIED.....	60
3.2.4 <i>CACNA1F</i> -Mutationsanalyse bei Patienten mit CSNB1.....	61
3.2.5 <i>CACNA1F</i> -Mutationsanalyse bei Patienten mit <i>x</i> ICN.....	61
3.2.6 Sequenzvarianten im <i>CACNA1F</i> -Gen .....	61
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>63</b>
4.1 Diskussion der Fehlermöglichkeiten .....	63
4.1.1 Sensitivität und Spezifität der verwendeten Methoden .....	63
4.2 Das <i>CACNA1F</i> -Gen.....	64
4.2.1 Struktur und Funktion von <i>CACNA1F</i> .....	65
4.2.1.1 Spannungsabhängige Ca <sup>2+</sup> -Kanäle .....	65
4.2.1.2 Zusammensetzung der HVA-Kanäle.....	69
4.3 Pathogenese von Ionenkanalerkrankungen.....	77
4.3.1 Pathogenese der CSNB2.....	80
4.4 Mutationsanalyse im <i>CACNA1F</i> -Gen.....	82
4.4.1 <i>CACNA1F</i> -Mutationsanalyse bei Patienten mit CSNB2.....	82
4.4.2 <i>CACNA1F</i> -Mutationsanalyse bei Patienten mit ÅIED-verwandtem Phänotyp... 86	
4.4.3 <i>CACNA1F</i> -Mutationsanalyse bei Patienten mit ÅIED.....	87
4.4.4 <i>CACNA1F</i> -Mutationsanalyse bei Patienten mit CSNB1.....	88
4.4.5 <i>CACNA1F</i> -Mutationsanalyse bei Patienten mit <i>x</i> ICN.....	90
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>92</b>

---

<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>95</b>
<b>7 Anhang.....</b>	<b>115</b>
<b>8 Danksagung.....</b>	<b>132</b>
<b>9 Erklärung.....</b>	<b>133</b>
<b>10 Lebenslauf.....</b>	<b>134</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
ad	autosomal-dominant
ÅIED	Åland Island Eye Disease
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ar	autosomal-rezessiv
AS	Aminosäure
<b>BAC</b>	künstliches Bakterienchromosom ( <i>bacterial artificial chromosom</i> )
bp	Basenpaare
BSA	( <i>bovine</i> ) Rinderserumalbumin
BTZ	Benzothiazepine
<b>C</b>	Crosslinker
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	zyklisches (cyclic) Adenosin-Mono-Phosphat
CBBM	Colorblindness, blue-mono-cone-monochromatic type
cDNA	komplementäre (complementary) DNA
cds/m <sup>2</sup>	candela/m <sup>2</sup>
cGMP	zyklisches (cyclic) Guanosin-Mono-Phosphat
cM	centiMorgan
cm	Zentimeter
CN	kongenitaler (congenital) Nystagmus
Contig	Anzahl überlappender DNA-Fragmente ( <i>contiguous</i> )
COD	Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (cone dystrophy)
CPDX2	X-chromosomale dominante Chondrodysplasia punctata
CpG	Dinukleotid mit der Basenfolge CG in 5'-3'-Richtung
CSNB	kongenitale (congenital) stationäre Nachtblindheit
<b>D</b>	Dioptrin
dB	Dezibel
dCTP	Desoxy-Cytosin-5'-triphosphat
del	Deletion
DHP	Dihydropyridin
DMD	Duchenne-Muskeldystrophie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DXS	einmal vorkommende ( <i>single copy</i> ) DNA-Sequenz auf dem X-Chromosom
<b>EA</b>	episodische Ataxie
EBP	Emopamil bindendes Protein
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure ( <i>acid</i> )
EMBL	European Molecular Biology Laboratory

---

EOG	<u>E</u> lektro <u>o</u> kulogramm
ERG	<u>E</u> lektro <u>r</u> etinogramm
EST	exprimierte sequenzmarkierte Stelle ( <i>expressed <u>s</u>equen<u>s</u>e <u>t</u>ag</i> )
<b>FISH</b>	<u>F</u> luoreszenz <u>i</u> n <u>s</u> itu- <u>H</u> ybridisierung
<b>GDP</b>	<u>G</u> uanosin- <u>d</u> iphosphat
GRAIL	<u>G</u> ene <u>R</u> ecognition and <u>A</u> nalysis <u>I</u> nternet <u>L</u> ink
GTP	<u>G</u> uanosin-5'- <u>t</u> riphosphat
<b>h</b>	Stunde ( <i>hour</i> )
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	deionisiertes und destilliertes Wasser („ <u>b</u> idest“)
HVA	<i>high-voltage-<u>a</u>ctivated</i>
Hz	<u>H</u> ertz
<b>Ig</b>	<u>I</u> mmunglobulin
INL	innere Körnerschicht ( <u>i</u> nn <u>e</u> r <u>n</u> uclear <u>l</u> ayer)
ins	<u>I</u> n <u>s</u> ertion
<b>kb</b>	<u>K</u> ilobasen
kDa	<u>K</u> ilodalton
<b>Lod</b>	Logarithmus der Wahrscheinlichkeit (logarithm of the <u>o</u> dds)
log	<u>L</u> ogarithmus
L-Typ	<i>long-lasting-Ca<sup>2+</sup>-Kanal</i>
LVA	<i>low-voltage-<u>a</u>ctivated</i>
<b>M</b>	<u>M</u> olar
Mb	<u>M</u> egabasen
min	<u>M</u> inuten
ml	<u>M</u> illiliter
µl	Mikroliter
µg	Mikrogramm
mm	<u>M</u> illimeter
mM	<u>M</u> illimolar
ms	<u>M</u> illisekunden
<b>ng</b>	<u>N</u> anogramm
nm	<u>N</u> anometer
nmol	<u>N</u> anomol
Nr.	<u>N</u> ummer
nt	<u>N</u> ukleotid
N-Typ	<i>neither L nor T-Typ</i>
<b>OA</b>	<u>o</u> kulärer <u>A</u> lbinismus
OAT	<u>O</u> rnithin- <u>δ</u> - <u>A</u> mino <u>t</u> ransferase
OD	optische <u>D</u> ichte
ONL	äußere Körnerschicht ( <u>o</u> uter <u>n</u> uclear <u>l</u> ayer)
OPT	optische Atrophie
<b>PAA</b>	<u>P</u> henylalkylamine

PAC	<i>P1-derived artificial chromosome</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDE	<u>Phosphodi</u> esterase
pers	<u>pers</u> önlich
PKC	<u>Proteink</u> inase <u>C</u>
pmol	<u>Pico</u> mol
Pos.	<u>Posi</u> tion
PRCC	papilläres Nierenzellkarzinom ( <i>papillary renal cell carcinoma</i> )
pS	<u>Pico</u> sekunde
P-Typ	<u>Purkinje</u> -Typ
<b>RACE</b>	schnelle Vermehrung von cDNA-Enden ( <i>rapid amplification of cDNA ends</i> )
RFLP	<u>Restriktions</u> fragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RP	<u>Retinitis</u> pigmentosa
RPE	retinales <u>Pigment</u> epithel
RPGR	<u>Retinitis</u> pigmentosa <u>GTPase</u> <u>Regulator</u>
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT-PCR	<u>Reverse-Transkriptase-PCR</u>
R-Typ	<i>remaining</i> -Typ
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sec	<u>Sekun</u> den
STR	skotopische Schwellenwertantwort ( <i>scotopic threshold response</i> )
SSCP	Einzelstrang-Konformationspolymorphismus ( <i>single-strand-conformational polymorphism</i> )
SSPE	<i>sodium, sodium phosphate EDTA</i>
STS	sequenzmarkierte Stelle ( <i>sequence-tagged-site</i> )
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'- <u>Tetramethylethylendi</u> amin
Tris	<u>Tris</u> (hydroxymethyl)aminomethan
<b>U</b>	Enzymeinheit ( <i>unit</i> )
u. a.	<u>unter</u> anderem
UTR	<u>un</u> translatierte Sequenz ( <i>region</i> )
UV	<u>Ultravio</u> lett
<b>V</b>	<u>Volt</u>
v. a.	<u>vor</u> allem
VDCC	spannungsabhängige Ca <sup>2+</sup> -Kanäle ( <i>voltage-dependent Ca<sup>2+</sup>-channels</i> )
<b>WAS</b>	<u>Wiskott-Aldrich</u> -Syndrom
<i>xl</i>	X-gekoppelt, X-chromosomal ( <i>X-linked</i> )
Xp	kurzer Arm des X-Chromosoms
Xq	langer Arm des X-Chromosoms
Xter	<u>terminaler</u> Anteil des X-Chromosoms
Xcen	<u>centromerwärts</u> gelegener Anteil des X-Chromosoms
<b>YAC</b>	künstliches Hefechromosom ( <i>yeast artificial chromosome</i> )

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Die Bedeutung der Genetik für die Augenheilkunde

Die Bedeutung der Genetik für die Augenheilkunde ergibt sich aus der Tatsache, dass 50% aller Erblindungsfälle vor dem 7. Lebensjahr und mindestens 33% aller Erblindungsfälle eine genetische Ursache haben. Zudem sind eine Vielzahl von weiteren, genetisch determinierten Augenkrankheiten und Augenfehlbildungen bekannt. Darüber hinaus kommen Augenmanifestationen bei angeborenen Stoffwechselstörungen, erblichen Syndromen und Chromosomenanomalien vor. So stellt z. B. bei einem Verdacht auf ein okulo-zerebro-renales Syndrom (Lowe) die Katarakt ein obligates Symptom dieser Erkrankung dar.

In den Anfängen der Ophthalmogenetik konnten v. a. durch Stammbaumanalysen wichtige Erkenntnisse auf dem Gebiet der hereditären Augenerkrankungen gewonnen werden. Ein großer Teil unseres heutigen Wissens basiert auf zahlreichen Forschungsprojekten damaliger Ophthalmologen.

So entstanden u. a. zahlreiche Arbeiten über die Retinitis pigmentosa, die ihr gehäuftes familiäres Auftreten sowie den Zusammenhang mit elterlicher Blutsverwandtschaft beschrieben (F. C. Donders (1818-1889)) und die schließlich ihre drei verschiedenen Vererbungsformen sowie ihre Assoziation mit anderen Symptomen aufzeigten (E. Nettleship (1845-1913), C. H. Usher (1865-1942), J. Bell (1879-1980)). Ein großer Verdienst auf dem Gebiet der hereditär-degenerativen Netzhauterkrankungen ist auch Theodor Leber (1840-1917) zuzuschreiben, der zudem der Erstbeschreiber der „kongenitalen tapeto-retinalen Amaurose“ war, auf die nach heutigem Wissensstand mehr als 10% aller angeborenen Blindheitsfälle zurückzuführen sind.

Mit der Wiederentdeckung der Mendel'schen Gesetze und der Einführung der Begriffe Homozygotie und Heterozygotie durch W. Bateson (1861-1926) wurde es in den folgenden Jahren zunehmend möglich, latente Merkmalsträger zu identifizieren und ihr Risiko, das krankhafte Gen an ihre Nachkommen weiterzugeben, zu präzisieren. Diese Möglichkeit wurde ergänzt durch den sog. „Heterozygoten-Nachweis“ bei Überträgerinnen X-chromosomaler Augenerkrankungen, wie z. B. der ophthalmoskopisch auffälligen mosaikartigen Fundusperipherie beim *Albinismus solum bulbi* (A. Vogt (1879-1943)), des „Netzhautleuchtens“ bei  $x$ /RP oder des bei Chorioideremie charakteristischen „Salz- und Pfeffer-Fundus“ (Hammerstein und Lisch, 1985, S. 7-20).

Weitere Erkenntnisse traten im Gefolge immer besserer zur Verfügung stehender Techniken auf. Über die Methoden der Biochemie und der klinischen Zytogenetik gelangte man schließlich zu den Möglichkeiten der Molekularbiologie, durch die das Methodenspektrum der Ophthalmogenetik eine wesentliche Bereicherung erfuhr.

So ist es v. a. der Molekulargenetik zu verdanken, dass chromosomale Loci identifiziert und damit die Diagnostik und das grundlegende Verständnis für viele hereditäre (Augen-) Erkrankungen verbessert werden konnten. Dadurch kennt man inzwischen zahlreiche Gene, die in mutiertem Zustand Anomalien des Auges nach sich ziehen (Rosenfeld *et al.*, 1994). Bemerkenswert ist dabei, dass so viele X-chromosomale Genloci für pathologische Merkmale des Auges bekannt sind, und so wird das X-Chromosom nicht ohne Grund als „Augen-Chromosom“ bezeichnet (Falls, 1952).

## 1.2 Das X-Chromosom

Das menschliche X-Chromosom ist ein submetazentrisches Chromosom mit einer Größe von 165 Mb DNA, für das aufgrund seiner Größe und des Gehalts an „CpG“-Inseln ca. 3000 Gene geschätzt werden.

Einen wichtigen Aufschluss über das X-Chromosom liefert eine YAC/STS-Karte mit einer Auflösung von 75 kb (Nagaraja *et al.*, 1997). Mit der Erstellung dieser Karte, die mehr als 90% des Chromosoms umfasst, verfolgte man zwei Ziele. Zum einen wollte man Orte hoher bzw. niedriger Rekombination aufzeigen, was dadurch gelang, dass die Abstände in cM zwischen aufeinanderfolgenden Markern gegen die entsprechenden Entfernungen in Mb aufgetragen wurden. So konnte das durchschnittliche Verhältnis von 1,3 cM/Mb bestätigt werden, es wurde jedoch eine ausgedehnte Region von 17 Mb mit sehr wenigen Rekombinationsereignissen (0,16 cM/Mb) gefunden, die am Zentrum der X-Inaktivierung am *XIST*-Locus (Xq13.3) beginnt und sich nach distal bis Xq21.3 erstreckt. Als Ausgleichsregionen mit höherer Rekombination (5 cM/Mb) vermutet man Regionen auf Xp und Xq26-27.

Außerdem sollte mit Hilfe von ESTs (*expressed sequence tags*), die direkte Indikatoren für die Lokalisation von Genen sind, der Gengehalt bestimmter Regionen abgeschätzt werden. Da jedoch erst ca. 300 ESTs auf dem X-Chromosom kartiert werden konnten, wurde die Gendichte anhand des GC-Gehalts der DNA bestimmt. Dabei konnten fünf Regionen mit relativ hohem GC-Gehalt nachgewiesen werden, die durch Southern-Blot Analyse, FISH (*in situ*-Hybridisierung mit Fluoreszenzfarbstoffen) oder *long-range* Sequenzierung bestä-

tigt wurden. Von diesen fünf Regionen bildet die Region Xp11.23–11.22 ein Kernstück dieser Doktorarbeit.

### 1.2.1 Transkriptionskarte der Region Xp11.23

Bei der Region Xp11.23-11.22 handelt es sich um eine äußerst genreiche Region, in der u. a. Gene für Erkrankungen wie das Wiskott-Aldrich-Syndrom (Derry *et al.*, 1994), *x*ICSNB (Boycott *et al.*, 1998b), *x*RP (Meindl *et al.*, 1996; Schwahn *et al.*, 1998), ÅIED (Glass *et al.*, 1993), verschiedene Formen der mentalen Retardierung (Lubs *et al.*, 1999) sowie die X-chromosomal vererbte spinale Muskelatrophie (Kobayashi *et al.*, 1995) liegen bzw. vermutet werden. In den letzten Jahren wurden viele Bemühungen darauf verwendet, diese Region mittels der Konstruktion von YAC-Contigs näher zu analysieren und zu kartieren (Coleman *et al.*, 1994; Kwan *et al.*, 1995; Fisher *et al.*, 1995; Boycott *et al.*, 1996). Die lückenlose und fehlerfreie Kartierung scheiterte jedoch daran, dass sich aufgrund des hohen GC-Gehalts dieser Region die YACs sehr oft als instabil und chimär erwiesen und somit nicht zur Bestimmung physikalischer Abstände sowie zur Kartierung herangezogen werden konnten. Neuere Ansätze, die dieses Problem zu umgehen versuchten, erfolgten mit der Konstruktion einer 3,5 Mb genomische DNA umfassenden *longe-range*-Pulsfeldgelelektrophorese-Karte zwischen den Loci *TIMPI* und DXS146 sowie eines 1,1 Mb langen Cosmid-Contigs zwischen den Loci *HB3* und DXS1039 (Schindelhauer *et al.*, 1996) und eines BAC-Contigs zwischen den Loci *OATLI* und DXS255 (Boycott *et al.*, 1998a). Dies ermöglichte, zusätzlich zu bereits bekannten Genen (z. B. *TIMPI*, *Araf1*, *SYN*, *PFC*, *WASP*, *TFE3*, *SYP*, *MG21*, *MG44*, *MG61*, *MG81*) neue Gene zu isolieren (u. a. *LI*, *T54* (Schindelhauer *et al.*, 1996), *LMO6*, *CACNA1F* (Fisher *et al.*, 1997)) bzw. bereits bekannte ESTs in diese Region zu kartieren, wie z. B. *RBM*, *Xp664*, *EBP* (Schindelhauer *et al.*, 1996) und *A4* (Fisher *et al.*, 1997). V. a. in der Region zwischen dem *HB3*-Locus und DXS1039 waren aufgrund der hohen Dichte an CpG-Inseln noch 20-30 weitere Gene zu erwarten, die als potentielle Kandidatengene für Erkrankungen wie *x*ICSNB oder ÅIED in Betracht kamen. Zusätzlich konnten kürzlich zwei weitere Gene, *UHX1* und *PCTK1*, in die Region zwischen DXS1266 und DXS337 auf Xp11.23 kartiert werden (Brandau *et al.*, 1998), die zusammen mit *UBE1* und DXS8237E innerhalb von 70 kb liegen und somit eine äußerst genreiche Region bilden sowie ebenfalls als mögliche Kandidatengene für RP2 oder mentale Retardierung in Frage kamen.



rungen wie dem Wilms-Tumor, der Greig'schen Cephalosyndactylie und anderen Neoplasien (Knight *et al.*, 1994).

Dem Zinkfinger-Gencluster schließt sich der *OATL1*-Locus an. Hierbei handelt es sich um OAT (Ornithin- $\delta$ -Aminotransferase)-verwandte Sequenzen, deren Analyse ergab, dass es sich um prozessierte Pseudogene handelt (Geraghty *et al.*, 1993).

Daran anschließend findet man die Gene *MG21*, *MG44*, *MG61* und *MG81* mit bislang unbekannter Funktion, die ebenfalls zu den Kandidatengenen für retinale Erkrankungen zählen, da sie aus retinalem Gewebe isoliert wurden (Schindelhauer *et al.*, 1996). Desweiteren liegen hier das *EBP*-Gen, das für eine  $\Delta^8\Delta^7$ -Sterolisomerase (Emopamil bindendes Protein, EBP) codiert und bei Patienten mit CPDX2 (X-chromosomale, dominante Chondrodysplasia punctata) mutiert ist (Derry *et al.*, 1999). Schließlich wurde das *RBM*-Gen, dessen Produkt ein RNA-bindendes Protein darstellt, in diesen Bereich kartiert (Derry *et al.*, 1995).

Mit der Eingrenzung des Genorts für CSNB2 auf das Intervall DXS722 bis DXS255 (Boycott *et al.*, 1998b) erwiesen sich schließlich v. a. die im folgenden aufgeführten Gene als aussichtsreiche Kandidatengene für die CSNB2.

Im folgenden Gencluster liegen die Gene *WASP* und *GFI*. Mutationen im *WASP*-Gen führen zum Wiskott-Aldrich-Syndrom, einer Immundefizienz mit Ekzemen, Thrombozytopenie und rekurrenden Infekten (Derry *et al.*, 1994). Das WAS-Protein zeigt eine GTP-abhängige Interaktion mit Cdc42 und hat eine Funktion in der Signaltransduktion, deren Störung zu Abnormalitäten im Zytoskelett von T-Lymphozyten und anderer Blutzellen führt (Kolluri *et al.*, 1996). *GFI* ist ein gewebsspezifisches, DNA-bindendes Protein, das Sequenzen einer Vielzahl von in Erythrozyten exprimierten Genen erkennt. Es ist während aller Stadien der Erythrozytenentwicklung präsent und gilt somit als Kandidat für ein wichtiges Regulatorprotein der Genexpression in der erythrozytären Zelllinie (Zon *et al.*, 1990).

Proximal von dieser Region finden sich weitere vereinzelt liegende Gene, u. a. *TFE3*. Es gehört zur Familie der Helix-Loop-Transkriptionsfaktoren und bindet an  $\mu$ E3-Enhancer der schweren Ig-Ketten (Beckmann *et al.*, 1990). Zudem konnte in letzter Zeit nachgewiesen werden, dass TFE3 beim Nierenzellkarzinom, das mit der Translokation t(X;1)(p11.2;q21.1) assoziiert ist, mit PRCC (*papillary renal cell carcinoma*) ein Fusionsprotein bildet (Sidhar *et al.*, 1996). Erst kürzlich kloniert werden konnte das Gen *T54*, zu dem bereits ein EST aus dem kindlichen Gehirn bekannt war, das selber aber keine Homologien zu bereits bekannten Genen zeigt, im Gegensatz zur *HB2E*-Sequenz, die eine entfernte Homologie zum Protein Phosphatase 1 zeigt (Schindelhauer *et al.*, 1996). Als letztes soll hier noch ein ebenfalls in dieser Region gelegener Gencluster, bestehend aus den Ge-

nen *SYP*, *LMO6*, *CACNA1F* sowie *A4*, genannt werden. Synaptophysin ist ein Transmembranprotein, das in den synaptischen Vesikeln des Gehirns und endokriner Zellen vorkommt, von dessen genauer Funktion jedoch noch nichts bekannt ist (Ozcelik *et al.*, 1990). *LMO6* zeigt signifikante Homologien zu LIM-Domänen-Proteinen. LIM-Domänen spielen eine Rolle bei der Protein-Protein-Interaktion. *LMO6* enthält drei solcher Domänen (Fisher *et al.*, 1997). *CACNA1F* codiert für die  $\alpha_1$ -Untereinheit eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals vom L-Typ (Fisher *et al.*, 1997; Nyakatura *et al.*, 1997). Das Produkt von *A4* ist ein differenzierungsabhängiges Protein, das zwar schon zuvor beschrieben, aber noch nicht lokalisiert worden war. Es handelt sich um ein integrales Membranprotein, das bei der Zelldifferenzierung im Darmepithel eine Rolle spielt (Oliva *et al.*, 1993).

### 1.3 Kongenitale stationäre Nachtblindheit (CSNB)

Bei der kongenitalen stationären Nachtblindheit handelt es sich um eine klinisch und genetisch heterogene Erkrankung. Sie umfasst eine Gruppe von Erkrankungen, die durch eine seit Geburt vorhandene nichtprogressive Nachtblindheit, verminderte Sehschärfe sowie durch das variable Auftreten von Myopie, Nystagmus und Strabismus bei fehlender pigmentaler Degeneration gekennzeichnet sind.

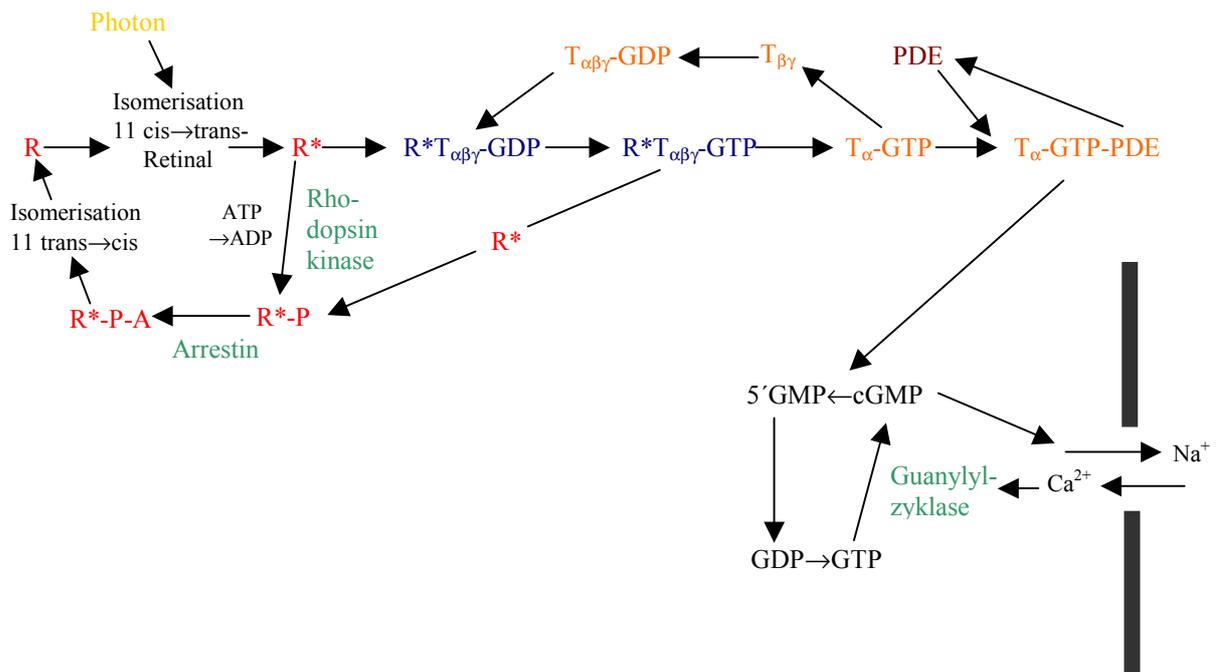
Erste Beschreibungen fanden sich 1838, als Cunier seine Ergebnisse über die wohl bekannteste Familie mit CSNB veröffentlichte. Er hatte sieben Generationen einer südfranzösischen Familie mit autosomal-dominanter Vererbung untersucht, die von Jean Nougaret abstammten. Er fand ein herabgesetztes Vermögen, nachts zu sehen, wobei er alle anderen visuellen Funktionen als vollkommen normal beschrieb. Bestätigt wurden seine Ergebnisse durch Nettleship (1907), dem es durch seine Untersuchungen möglich wurde zu sagen, dass es sich um eine stationäre und nichtprogressive Form der Nachtblindheit handelte, sowie durch DeJean (1949). In der folgenden Zeit konnten weitere Formen der CSNB beschrieben werden. Erste Berichte über eine X-chromosomale Variante finden sich bei Donders (1855), eine autosomal-rezessive Form konnte 1825 durch Gassler nachgewiesen werden. Während die X-chromosomale Form immer mit Myopie assoziiert ist und sehr oft auch mit schlechter Sehschärfe, Strabismus und Nystagmus, ist die Kombination der autosomal-rezessiven Variante mit Myopie häufig, jedoch fakultativ. Bei der autosomal-dominanten Form dagegen tritt keine Myopie auf. Unabhängig vom Vererbungsmodus wurde dabei jeweils ein unauffälliger Fundus beschrieben, im Gegensatz zu zwei weiteren zu diesem Formenkreis gehörenden Erkrankungen, der Oguchi-Krankheit und dem Fundus

albipunctatus. So einigte man sich schließlich auf eine Einteilung in eine CSNB mit normalem Fundus, die autosomal-dominant, autosomal-rezessiv oder X-chromosomal vererbt werden kann, sowie eine CSNB mit ophthalmoskopisch auffälligem Fundus, zu der man die Oguchi-Krankheit und den Fundus albipunctatus rechnete (Carr, 1974). Da die beiden letzten Formen aufgrund der auffälligen Funduserscheinungen eine eigene Kategorie innerhalb der CSNB bilden und sich etwas von den zuvor genannten Formen abgrenzen, wird in dieser Arbeit nicht näher auf sie eingegangen.

Diese Einteilung ist auch heute im klinischen Alltag besser einsetzbar als die von Merin getroffene Unterteilung in eine CSNB mit normalem Fundus und autosomal-dominanter sowie autosomal-rezessiver Vererbung, in eine Form mit hoher Myopie, die einen X-chromosomalen sowie autosomal-rezessiven Vererbungsmodus zeigt und in eine Form mit ophthalmoskopisch auffälligem Fundus (Lorenz *et al.*, 1996).

Eine weitere Unterteilung der CSNB erfolgte aus elektrophysiologischer und psychophysischer Sicht. Der ERG-Typ I (Riggs-/Nougaret-Typ) mit positiver Maximalantwort und erloschenem Stäbchen-ERG lässt dabei einen Defekt in den Außensegmenten der Stäbchen vermuten und ist bei autosomal-dominanter Vererbung zu finden (Riggs, 1954). Der ERG-Typ II (Schubert-Bornschein-Typ) mit normaler a-Welle und kleiner bzw. fehlender b-Welle lässt sich bei autosomal-rezessiver oder X-chromosomaler CSNB ableiten (Schubert und Bornschein, 1952), was einen Defekt in der neuronalen Transmission zwischen den Photorezeptoren und den Bipolarzellen annehmen lässt.

Die bislang charakterisierten autosomal-dominanten Formen der CSNB sind durch Mutationen bedingt, die zu einer mangelhaften neuronalen Transmission innerhalb der retinalen Neurone bzw. zu einer fehlerhaften Regulation in der Signaltransduktionskaskade und damit zu einer gestörten Übertragung, Weiterleitung und Verarbeitung des Lichtreizes führen.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der Phototransduktionskaskade. Nach Absorption eines Lichtquants entsteht durch Isomerisation des Rhodopsins (R) Metarhodopsin II (R\*). Dieses ist das Eingangssignal für den sehr schnell ablaufenden Metarhodopsin-Transducin-Zyklus, bei dem ein T<sub>α</sub>-GTP-PDE-Komplex entsteht. Dieser Komplex ist das Eingangssignal für den intrazellulären 5'GMP-cGMP-Zyklus. Da der intrazelluläre Transmitter cGMP die Natriumkanäle offenhält, bewirkt die Reduktion der cGMP-Konzentration eine Schließung der Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Kanäle und damit eine Hyperpolarisation. Nähere Erläuterungen finden sich im Text (P = Phosphat, A = Arrestin, T = Transducin, PDE = Phosphodiesterase).

Die Anpassung an die Beleuchtungsbedingungen wird durch zwei retinale Rezeptortypen erleichtert. Mit den Stäbchen wird in der Dämmerung gesehen (skotopisches Sehen), mit den Zapfen am Tag (photopisches Sehen). In den Außensegmenten der Rezeptorzellen findet man die Moleküle der Sehfärbstoffe. Bei den Stäbchen handelt es sich um das Rhodopsin, das aus einem Glykoprotein (Opsin) und einer chromophoren Gruppe (11-cis-Retinal) zusammengesetzt ist, bei den Zapfen unterscheidet man drei verschiedene Sehfärbstoffe („Jodopsine“).

Im Dunkeln sind die Stäbchen und Zapfen depolarisiert, bei Belichtung kommt es zu einer Hyperpolarisation. Nach Absorption eines Lichtquanten entsteht durch Isomerisation des Rhodopsins R über mehrere Zwischenstufen das Metarhodopsin II („aktives Rhodopsin“

R\*). Dieses aktiviert zum einen Transducin, wird dann aber selbst durch Phosphorylierung durch die Rhodopsin-Kinase sowie durch Bindung an das Enzym Arrestin inaktiviert und durch die Umwandlung des Retinals aus der 11-trans in die 11-cis-Form regeneriert. Durch die Bindung des R\* an Transducin und die anschließende Phosphorylierung wird die  $\alpha$ -Untereinheit des Transducins freigesetzt, die eine cGMP-abhängige Phosphodiesterase aktiviert, indem sie deren  $\gamma$ -Untereinheiten abspaltet. Dieser Komplex aus  $\alpha$ -Transducin und der Phosphodiesterase bewirkt eine Inaktivierung des cGMP. Da cGMP das intrazelluläre Molekül ist, welches die für die Depolarisierung notwendigen Ionenkanäle offenhält, schließen sich diese und es kommt zu einer mit einem Abfall der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration einhergehenden Hyperpolarisierung. Die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration steuert ihrerseits über ein Mediatorprotein eine Guanylylzyklase, die die Umwandlung von GTP in cGMP reguliert. Bei niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen hört die Freisetzung des inhibitorischen Transmitters an der Synapse auf, womit die postsynaptischen Neurone desinhibiert, d. h. erregt werden. Die Synapsen liegen den Neuronen zweiter Ordnung gegenüber. ON- und OFF-Schaltkreise werden durch unterschiedliche Rezeptormoleküle in der postsynaptischen Membran von ON- und OFF-Bipolarzellen aktiviert. Die ON-Bipolarzelle wird bei Belichtung demzufolge depolarisiert, die OFF-Bipolarzelle wird dabei hyperpolarisiert, ebenso wie die Horizontalzellen, die laterale Interaktionen in der äußeren plexiformen Schicht bewirken (Schmidt-Thews, 1995, Seite 291).

Eine konstante Aktivierung der Phototransduktionskaskade täuscht den Zustand vor, der durch die Einwirkung von hellem Licht hervorgerufen wird. Dadurch wird das Auge desensibilisiert und verliert die Fähigkeit, auf schwache Lichtreize zu reagieren, was man als Nachtblindheit bezeichnet (Sieving *et al.*, 1995).

### 1.3.1 Autosomal-dominante CSNB (CSNB3)

Seitdem der Genort für *adCSNB* durch Kopplungsanalysen in einer großen dänischen Familie („Rambusch-Stammbaum“) auf 4p16.3 kartiert werden konnte (Gal *et al.*, 1994), wurden Mutationen im Gen für Rhodopsin, die  $\beta$ -Untereinheit der cGMP-Phosphodiesterase sowie das  $\alpha$ -Transducin (*GNAT1*) beschrieben.

Mutationen im Rhodopsin-Gen waren schon als Ursache für die autosomal-dominante sowie die autosomal-rezessive Variante der Retinitis pigmentosa (RP) nachgewiesen worden (Dryja *et al.*, 1990, Inglehearn *et al.*, 1993). Angesichts der Tatsache, dass einige der beschriebenen CSNB-Fälle keine a-Welle im ERG aufweisen (Riggs-/Nougaret-Typ), was

auf einen Defekt in der Phototransduktion hinweist, wurde der Möglichkeit einer Mutation im Rhodopsin-Gen auch bei *adCSNB* nachgegangen. Die bislang beschriebenen Mutationen (Ala292Glu, Gly90Asp, Thr94Ile) (Dryja *et al.*, 1993; Rao *et al.*, 1994; al-Jandal *et al.*, 1999) ähneln dem Wildtyp-Rhodopsin in seiner Fähigkeit, Transducin zu aktivieren, mit dem Unterschied, dass die von ihnen codierten Opsine auch ohne gebundenes 11-cis-Retinal sowie in Abwesenheit von Licht eine Transducin-aktivierende Eigenschaft besitzen. Sie erwecken so den Anschein eines ständig hellen Hintergrundes, was eine ständige Aktivierung der Phototransduktionskaskade bewirkt. Durch diese andauernde endogene Stimulation werden die Stäbchen desensibilisiert und ihre Empfindlichkeit gegenüber schwachem Licht reduziert. Im Gegensatz zu der durch Rhodopsin-Mutationen verursachten *adRP*, findet man bei der *adCSNB* keine retinalen Degenerationen, auch die Dichte und Regenerationsfähigkeit des Rhodopsins sind normal (Sieving *et al.*, 1995).

Nach der Kartierung des Locus für *adCSNB* auf 4p16.3 wurde schließlich auch die  $\beta$ -Untereinheit der cGMP-Phosphodiesterase (PDE6 $\beta$ ), die in dieselbe Region lokalisiert wurde (Altherr *et al.*, 1992) und fast ausschließlich in den Stäbchen exprimiert wird, als Kandidatengen für *adCSNB* in Erwägung gezogen. Bestätigt wurde diese Annahme durch die Entdeckung einer His258Asp-Mutation bei Nachkommen des 1909 von S. H. A. Rambusch erstmals beschriebenen „Rambusch-Stammbaums“ (Gal *et al.*, 1994). Diese *missense* Mutation führt dazu, dass die  $\gamma$ -Untereinheit der PDE nicht mehr an die  $\beta$ -Untereinheit binden kann. Ist nur eine der beiden  $\gamma$ -Untereinheiten mit der aktivierten Mutante verbunden, bleibt ein großer Teil der PDE wenigstens z. T. aktiv und hält den cGMP-Spiegel hoch. Dadurch bleiben die Kationenkanäle auch im Dunkeln geschlossen und die Stäbchen ständig hyperpolarisiert, unfähig in den Zustand bei Dunkelheit zurückzukehren oder auf Lichteinfall zu antworten. Das Ergebnis dieser Desensibilisierung ist die Unfähigkeit, auf schwaches Licht zu reagieren bzw. Nachtblindheit. Dies ist konsistent mit dem ERG, das einen selektiven Verlust der Stäbchen-vermittelten Dunkeladaptation sowie ein beinahe komplettes Fehlen der Stäbchenaktivität zeigt.

Bei den Nachfahren Jean Nougarets konnte schließlich eine *missense* Mutation (Gly38Asp) im  $\alpha$ -Transducin-Gen (*GNAT1*) gefunden werden (Dryja *et al.*, 1996). Geht man von demselben Mechanismus aus, der bei einer Mutation eines Gly-Restes in p21<sup>ras</sup> auftritt, führt die Mutation im *GNAT1*-Gen zu einer inaktiven  $\alpha$ -Untereinheit des Transducin. Da man jedoch erwarten würde, dass die funktionierenden  $\alpha$ -Untereinheiten, die durch das bei Heterozygotie ebenfalls vorhandene Wildtyp-Allel codiert werden, ausreichen würden, um

die Phototransduktionskaskade aufrecht zu erhalten, und da die bisher publizierten Mutationen bei *adCSNB* alle zu einer ständigen Aktivierung der Kaskade führen, gab es weitere Spekulationen über die biochemischen Auswirkungen dieser Mutation. Neu genährt wurden sie durch elektrophysiologische Untersuchungen an Trägern der Gly38Asp-Mutation. Diese ergaben, dass die Stäbchenfunktion noch vorhanden ist, wenn auch subnormal, und dass die Zapfenfunktion etwas beeinträchtigt ist. Diese Befunde sind gut vereinbar mit der Annahme, dass die Transducin-Mutante ständig aktiv ist und dass die Nachtblindheit auch hier aus einer Desensibilisierung der Stäbchen resultiert (Sandberg *et al.*, 1998).

Dadurch, dass *adCSNB* jeweils auf Mutationen zurückgeht, die Bestandteile der Phototransduktionskaskade betreffen, ist in allen Fällen ein ERG vom Riggs-/Nougaret-Typ zu erwarten, das durch eine reduzierte photopische Antwort ohne signifikanten Anstieg unter skotopischen Bedingungen gekennzeichnet ist (Riggs, 1954). Dem widersprechend wurden jedoch in der Vergangenheit neben einer Familie, innerhalb der beide ERG-Typen auftraten (Auerbach *et al.*, 1969), drei Betroffene mit autosomal-dominantem Erbgang publiziert, deren ERG Befunde denen des Schubert-Bornschein-Typs bei kompletter *x/CSNB* ähnelten, während die Dunkeladaptationskurven keine Übereinstimmung zeigten. Aufgrund der von anderen *adCSNB*-Familien unterschiedlichen elektrophysiologischen Befunden postulierte man, eine Familie mit *adCSNB* gefunden zu haben, die sich von den zuvor beschriebenen unterschied (Noble *et al.*, 1990).

### 1.3.2 X-Chromosomale CSNB (*x/CSNB*)

Die X-chromosomale Form der CSNB unterscheidet sich von den autosomal vererbten Formen durch ihre Assoziation mit Myopie bzw. Hyperopie sowie durch das variable Auftreten von Nystagmus und Strabismus. Das ERG zeigt stets den Schubert-Bornschein-Typ, der durch ein „negatives ERG“ gekennzeichnet ist. Dies bedeutet, dass die a-Welle größer als die b-Welle, bzw. dass das Verhältnis  $b/a < 1$  ist. Aus elektrophysiologischer und psychophysischer Sicht lassen sich dabei zwei Formen unterscheiden. Eine Form, bei der keine Stäbchenfunktion mehr nachweisbar ist (komplette CSNB, CSNB1), sowie eine Form, bei der noch eine Reststäbchenfunktion erhalten ist (inkomplette CSNB, CSNB2) (Miyake *et al.*, 1986).

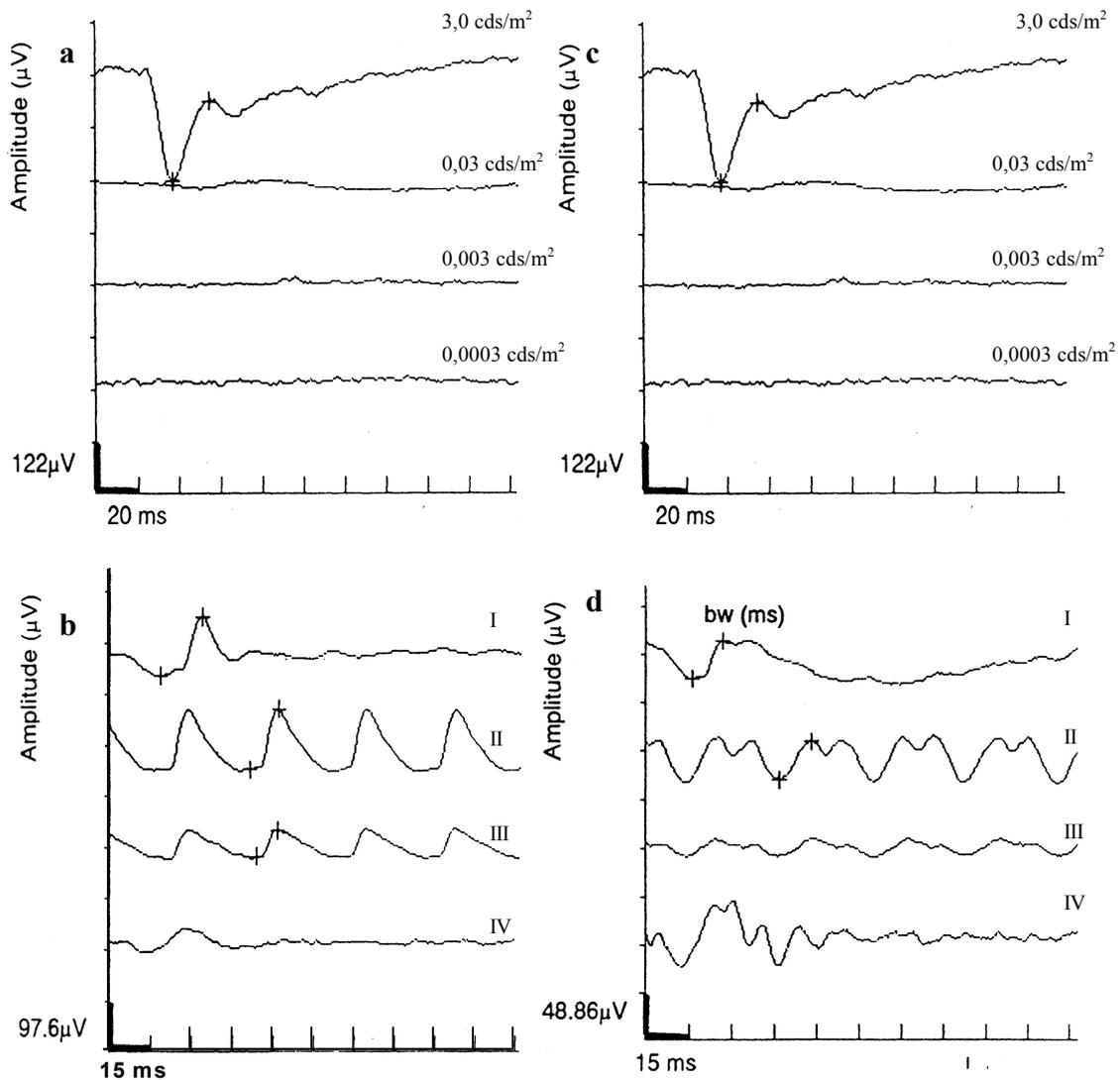
### 1.3.2.1 Diagnostik und Klassifikation der $x$ /CSNB

Entscheidend für die Diagnosestellung und die Klassifikation in CSNB1 bzw. CSNB2 ist das ERG. Die Messung der Stäbchenantwort am dunkeladaptierten Auge, die durch einen um 2,5 logarithmische Einheiten gegenüber dem Standardblitz abgeschwächten Lichtblitz ausgelöst wird, lässt bei CSNB1-Patienten keine Stäbchenaktivität erkennen, während CSNB2-Patienten eine b-Welle mit erniedrigter Amplitude aufweisen. Die Maximalantwort auf helle Einzelblitze, an der eine Kombination von Zapfen- und Stäbchensystem beteiligt ist, ergibt bei beiden Formen eine normale a-Welle bei gleichzeitig subnormaler b-Welle, was zu einem b/a-Verhältnis  $< 1$  („negatives“ ERG) führt (Miyake *et al.*, 1986).

Die ebenfalls unter skotopischen Bedingungen abgeleiteten oszillatorischen Potentiale sind bei CSNB2 verzögert, zeigen aber normale Amplituden, im Gegensatz zu Patienten mit CSNB1, bei denen sich keine oszillatorischen Potentiale ableiten lassen. Im photopischen ERG dagegen können bei Betroffenen mit CSNB2 keine oszillatorischen Potentiale nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Zapfensystem unter photopischen Bedingungen nicht optimal arbeitet, während es mit skotopischen Bedingungen sehr gut zurecht kommt. Dies lässt den Gedanken aufkommen, dass Nachtblindheit evtl. nicht der adäquate Terminus für CSNB2 ist, was dadurch bestätigt wird, dass die meisten Patienten kaum über ein beeinträchtigtes Sehen bei Nacht klagen (Tremblay *et al.*, 1995).

Das photopische ERG (Zapfen-ERG) bei CSNB2 zeigt initial nur eine kleine Negativität und eine längere Gipfelzeit, da die b-Welle keinen definierten Beginn zeigt. Ebenso wie bei CSNB1 ist die Amplitude der b-Welle erniedrigt, jedoch stärker, was auf eine im Vergleich zur CSNB1 stärker gestörte Zapfenfunktion hinweist.

Im 30 Hz Flicker-ERG zeigen sich bei Patienten mit CSNB1 kaum Unterschiede zur Normalbevölkerung, während es bei Betroffenen mit CSNB2 erloschen bzw. signifikant erniedrigt ist. Zudem zeigen Patienten mit CSNB2 im 30 Hz Flicker-ERG während Lichtadaptation, die auf eine 30 minütige Dunkeladaptation folgt, eine ausgeprägte Steigerung der Amplitude, die jedoch nie den Normalwert erreicht. Desweiteren verändert sich die Wellenform in charakteristischer Weise. Nach ca. 2 Minuten tritt ein zweiter positiver „Peak“ auf, der zu Beginn noch kleiner als der erste ist, dann aber an Größe zunimmt. Diese beiden Phänomene können weder bei CSNB1 noch bei der Oguchi-Krankheit beobachtet werden (Miyake *et al.*, 1987a).



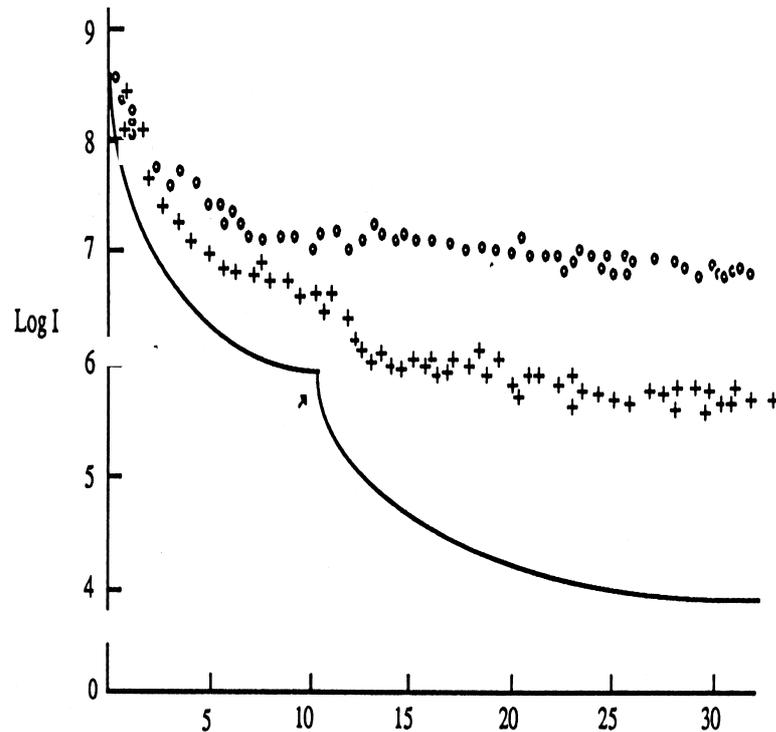
**Abb. 3:** ERG-Charakteristika bei CSNB1 und CSNB2. **3a** zeigt das Stäbchen-ERG eines Patienten mit CSNB1. Jede Zeile zeigt einen Durchschnitt von sechs Antworten auf Einzelblitze unterschiedlicher Helligkeit. **3b** zeigt das Zapfen-ERG (I) sowie die 30 Hz Flicker Antworten (II: nach 10 minütiger Lichtadaptation, III: nach Dunkeladaptation) und die oszillatorischen Potentiale (IV), die bei einem Patienten mit CSNB1 abgeleitet wurden. Für alle Antworten wurden Lichtblitze der maximalen Helligkeit ( $3,0 \text{ cds/m}^2$ ) verwendet. Bei den oszillatorischen Potentialen unterscheidet sich die Skalierung dabei vom Rest der Abbildung (Zeit: 10 ms gegenüber 15 ms, Amplitude:  $48,8 \mu\text{V}$  gegenüber  $97,6 \mu\text{V}$ ). **3c** zeigt das Stäbchen-ERG eines Patienten mit CSNB2 während in **3d** das Zapfen-ERG (I) sowie die 30 Hz Flicker Antworten (II: nach 10 minütiger Lichtadaptation, III: nach Dunkeladaptation) und die oszillatorischen Potentiale (IV) aufgezeichnet sind. Hierbei ist die Skalierung innerhalb der Abbildung einheitlich. Die Ableitungsbedingungen entsprechen denen bei CSNB1 (modifiziert nach Ruether *et al.*, 1993).

Weitere differentialdiagnostische Unterschiede ergeben sich aus der Ableitung der *long-flash* ON- und OFF- Antworten unter photopischen Bedingungen, bei denen dem Auge längere Lichtreize angeboten werden. Die ON-Antwort ist bei beiden Formen verändert. Während a- und b-Welle jeweils verzögert auftreten, ist die Amplitude der a-Welle bei CSNB1 normal, während sie bei CSNB2 erniedrigt ist. Die b-Wellen sind in beiden Fällen subnormal, was v. a. bei CSNB1 ein kleineres b/a-Verhältnis als normal ergibt. Die OFF-

Antwort ist dagegen nur bei Patienten mit CSNB2 verändert und zeigt eine verzögerte d-Welle mit erniedrigter Amplitude (Langrova *et al.*, 1999; Miyake *et al.*, 1987b). Geht man davon aus, dass die ON-Antwort den Abfall der späten Rezeptorpotentiale in den Zapfen widerspiegelt und die OFF-Antwort die Funktion der Zapfen sowie mittleren Retinaschichten, so liegt die Störung bei CSNB1 in den mittleren Retinaschichten, während die Zapfenfunktion nicht betroffen ist. Dies wird dadurch bestätigt, dass die Dichte und Kinetik der Zapfen normal sind. Im Gegensatz dazu scheint bei CSNB2 ein Missverhältnis der Transmitterfreisetzung der Zapfen ursächlich zu sein. Diese Befunde lassen auf eine unterschiedliche Pathogenese beider Formen im photopischen System schließen, was die Annahme unterstützt, dass es sich bei CSNB1 und CSNB2 um unterschiedliche Erkrankungen handelt, wobei CSNB2 wahrscheinlich eine kombinierte Stäbchen-Zapfen-Dysfunktion darstellt.

Diese Vermutung wird durch die Analyse der skotopischen Schwellenwert-Antworten (*scotopic threshold response*, STR) unterstützt, die klinische Informationen über proximale retinale Dysfunktionen sowie z. T. auch über die Stäbchen liefern können (Sieving *et al.*, 1986). Bei Patienten mit CSNB1 lassen sich weder oszillatorische Potentiale noch STRs ableiten, was Hinweise darauf gibt, dass der proximale Stäbchenweg gestört ist, so dass evtl. die Stäbchensignale die Bipolarzellen nicht erreichen können. Patienten mit CSNB2 dagegen zeigen bei erhöhten Schwellenwerten klar nachweisbare STRs mit jedoch stark verzögerten Gipfelzeiten und normaler b-Welle. Dies lässt sich aber dadurch erklären, dass die b-Welle eine Summation aus einer positiven PII-Komponente und einer negativen STR-Komponente darstellt, so dass eine verzögerte STR sie normal erscheinen lässt, da sie nicht die negative STR-Komponente enthält (Miyake *et al.*, 1994).

Die Dunkeladaptationskurven bei CSNB1 lassen keine Stäbchenfunktion mehr erkennen und zeigen einen monophasischen Verlauf, was darauf hinweist, dass nur die Zapfen an der Adaptation beteiligt sind, während sich bei CSNB2 noch eine Stäbchendunkeladaptation erkennen lässt. Der Verlauf ist hierbei biphasisch mit einem Empfindlichkeitsverlust im Zapfen- (7 dB) sowie Stäbchenanteil (11 dB).



**Abb. 4:** Dunkeladaptationskurven bei CSNB1 und CSNB2. Im Vergleich zu einer Dunkeladaptationskurve einer Normalperson (-) sind die Kurven eines Patienten mit CSNB1 (o) und CSNB2 (+) aufgetragen (modifiziert nach Héon und Musarella, 1994).

Der erweiterten Diagnostik dienen psychophysische Methoden wie die skotopische Schwellenperimetrie, die qualitative und quantitative Aussagen über die Funktion der am Testort antwortenden Photorezeptoren erlaubt. Dies ermöglicht im Gegensatz zum Ganzfeld-ERG, das nur Summen der Stäbchen- und Zapfenantworten registriert, die Analyse lokalisierter Funktionsdefekte sowie ihre räumliche Verteilung. Es zeigt sich hierbei bei Patienten mit CSNB2 ein diffuser Empfindlichkeitsverlust bei 500 nm sowie bei 600 nm, wobei der größere Empfindlichkeitsverlust bei 600 nm wohl durch eine Verlagerung der skotopischen spektralen Empfindlichkeitskurve in den langwelligen Bereich zustande kommt, während der Empfindlichkeitsverlust bei 500 nm den Stäbchenschaden dokumentiert. Entsprechende Aussagen über ähnliche Untersuchungen bei CSNB1 fehlen bislang noch (Lorenz *et al.*, 1996).

Das Elektrokulogramm zeigt in beiden Gruppen in den meisten Fällen ein normales L/D-Verhältnis. Dies steht etwas im Gegensatz zu der bei Betroffenen mit CSNB2 gefundenen Auslöschung der c-Welle im ERG. Da die c-Welle ein Korrelat zur Hyperpolarisation in der apikalen Membran des Pigmentepithels darstellt, ergeben sich aus dieser Tatsache Hinweise auf Störungen in der apikalen Membran (Takahashi *et al.*, 1988).

Bei weiteren klinischen Untersuchungen ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Formen im Bezug auf die Sehschärfe, Gesichtsfeldausfälle waren ebenso nicht nachweisbar. Bezüglich des Refraktionsfehlers lassen sich die meisten Patienten mit CSNB1 als stark bis moderat myop klassifizieren, während CSNB2-Patienten mild myop oder sogar hyperop sind. Probleme mit dem Farbsehen beklagt keine der beiden Gruppen, auch der Fundus zeigt keine auffälligen Veränderungen, wobei jedoch bei einigen Patienten mit CSNB1 myopische Degenerationen wie z. B. ein tigroider Fundus zu vermerken sind. Weitere okuläre Symptome wie Nystagmus (CSNB1: 20-60 %; CSNB2: 35-60 %, je nach Literaturangabe) oder Strabismus (CSNB1: 60 %, fast ausschließlich Esotropie; CSNB2: 40 %, fast ausschließlich Exotropie) sind variabel (Miyake *et al.*, 1986; Ruether *et al.*, 1993).

**Tab. 1:** Vergleich elektrophysiologischer und klinischer Befunde bei CSNB1 und CSNB2

	CSNB1	CSNB2
Sehschärfe	reduziert	reduziert
Refraktionsfehler	stark/moderat myop	mild myop/hyperop
Nystagmus	20-60 %	35-60 %
Strabismus	60 %, v. a. Esotropie	40 %, v. a. Exotropie
Farbensinn	evtl. Tritanopie	evtl. Tritanopie
Fundus	normal, evtl. myopische Degenerationen	normal
EOG	normal	normal
Stäbchen-ERG	∅ b-Welle	subnormale b-Welle
oszillatorische Potentiale	erloschen	vorhanden
scotopic treshold response (STR)	STR erloschen	STR vorhanden
Zapfen-ERG	normal/subnormal	reduziert
30 Hz Flicker-ERG	normal	erloschen
Dunkeladaptation	∅ Stäbchenadaptation, monophasisch	Stäbchenadaptation vorhanden, biphasisch

Die Revision der gesamten ERG-Befunde veranlasste schließlich zur Annahme, dass bei CSNB1 ein Defekt in den mittleren Retinaschichten bei der Übertragung der Stäbchensignale zu den ON-Bipolarzellen zugrunde liegt, während bei CSNB2 Stäbchen sowie Zapfen betroffen sind, sowie evtl. auch Strukturen, die am Aufbau der b-Welle beteiligt sind (Boy-cott *et al.*, 1998b).

### 1.3.2.2 Heterozygote Überträgerinnen

Bei X-chromosomalen Erkrankungen, die das Auge betreffen, hängt die Auswirkung auf den Phänotyp bei weiblichen Überträgerinnen von der jeweils betroffenen Struktur ab. Bei okulärem Albinismus sowie Chorioideremie, einer Erkrankung aus der Gruppe der tapeto-retinalen Dystrophien, zeigen Überträgerinnen einen anomalen Phänotyp. Dagegen manifestiert sich die Erkrankung bei der X-gekoppelten Retinoschisis und der Norrie-Krankheit ebenso wie bei der *x*/CSNB (Bech-Hansen und Pearce, 1993) wenig bis gar nicht. Homozygot erkrankte Frauen mit *x*/CSNB dagegen zeigen ebenso wie betroffene Männer eine variable Ausprägung der Symptome (milde bis moderate Myopie, Hyperopie) und weisen dieselben ERG- sowie Dunkeladaptationskurven auf (Ruttum *et al.*, 1992). Bei Überträgerinnen lassen sich im Vergleich zu gesunden Frauen signifikant erniedrigte oszillatorische Potentiale ableiten, während sich die a- und b-Welle im Einzelblitz-ERG sowie die Amplituden der skotopischen und photopischen b-Wellen ebenso wie die Dunkeladaptationskurven nicht signifikant von der Normalbevölkerung unterscheiden (Miyake und Kawase, 1984). Legt man diese Daten zugrunde, kann der Konduktorinnenstatus bei ca. 25% der Überträgerinnen nicht nachgewiesen werden. Deshalb versucht man mit weiteren elektrophysiologischen Untersuchungen die Trefferquote zu erhöhen. Dazu gehören u. a. die skotopische Perimetrie, die bei Überträgerinnen einen moderaten Empfindlichkeitsverlust bei 600 nm nachweist, ebenso wie die photopische Schwellenperimetrie, die einen diffusen, aber signifikanten Empfindlichkeitsverlust aufweist (Lorenz *et al.*, 1996). Wichtig für die Diagnostik und Beratung heterozygoter Überträgerinnen ist jedoch v. a. die Identifizierung des Gendefekts.

### 1.3.2.3 Genetische Kartierung

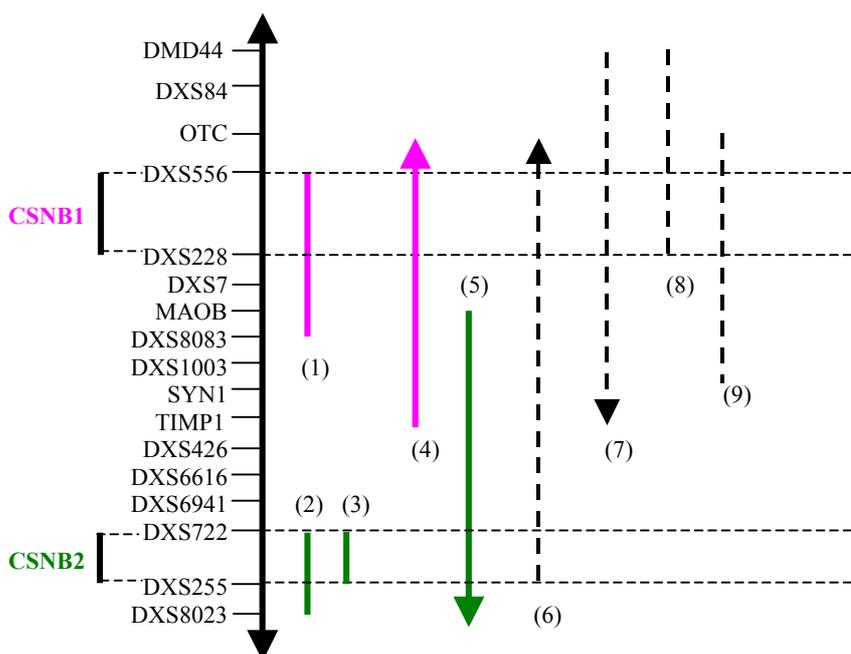
Trotz der Tatsache, dass eine elektrophysiologische Differenzierung in komplette und inkomplette CSNB möglich war (Miyake *et al.*, 1986), ist man lange von einem gemeinsamen Genort ausgegangen. Nachdem eine Kopplung mit dem Locus für Farbenblindheit schon früh ausgeschlossen werden konnte (White, 1940), konnte die Region für CSNB in ersten Kopplungsstudien auf Xp11 eingegrenzt werden (Gal *et al.*, 1989; Musarella *et al.*, 1989; Bech-Hansen *et al.*, 1990). So wurde mit Hilfe von RFLP-Analysen in drei Familien mit polymorphen X-chromosomalen Markern ein erster Locus in der Nähe von DXS7, das auf Xp11.3 liegt, identifiziert (Gal *et al.*, 1989). Bestätigt wurde dies durch eine weitere RFLP-Analyse in Familien mit kompletter und inkompletter CSNB, die eine Kopplung von

CSNB1 mit DXS7 auf Xp11.3 ergab, einem Locus, der durch die Analyse von Rekombinanten unterstützt wurde. Ihre Auswertung ergab eine wahrscheinliche Lokalisation des Genortes proximal zu *OTC* sowie DXS206 bzw. distal zu *TIMPI* sowie DXS255. Die Familie mit inkompletter CSNB war uninformativ für DXS7. Eine Multimarker-Kopplungsanalyse der Familien mit CSNB1 erbrachte zwei bevorzugte Reihenfolgen: *OTC-CSNB-DXS7-TIMPI-DXS255* bzw. *OTC-DXS7-CSNB-TIMPI-DXS255*. Zwar erwies sich mit der Hereinnahme der Familie mit CSNB2 die zweite Möglichkeit als wahrscheinlicher, doch es konnte kein signifikanter Nachweis für Heterogenität erbracht werden (Musarella *et al.*, 1989). Weitere Kopplungsanalysen konnten den möglichen Genort auf Xp11 bestätigen. So lokalisierten sie CSNB auf Xp11.22 in einer Entfernung von 6 cM von DXS255, wobei keine genauen Angaben darüber gemacht werden konnten, ob der Genort proximal oder distal von DXS255 liegt (Bech-Hansen *et al.*, 1990). Seit der ursprünglichen Lokalisation von CSNB auf Xp11 bestand jedoch stets eine gewisse Unsicherheit, ob die Erkrankung als heterogen anzusehen sei, oder ob es sich um einen einzigen Locus mit variablem klinischen Phänotyp handelt. Letzteres wurde durch Studien unterstützt, die das Vorkommen sowohl von CSNB1 als auch CSNB2 innerhalb einer Familie beschrieben (Pearce *et al.*, 1990; Khouri *et al.*, 1988). Eine weitere Studie koppelte zumindest beide Formen in dieselbe Region, indem sie den Locus für CSNB2 in dem Intervall zwischen *TIMPI* und DXS255 vermutete (Musarella *et al.*, 1992). Die Daten der wenigen informativen Familien ergaben jedoch schließlich, dass mindestens zwei, wenn nicht noch mehr Loci für CSNB zu erwarten waren.

Im Gegensatz zu zuvor publizierten Daten, der Genort könne distal von *TIMPI* liegen (Musarella *et al.*, 1989), konnte mittels Rekombination nachgewiesen werden, dass der Genort für CSNB, bzw. einer der möglichen Genorte, proximal zu DXS7 zwischen DXS7 und *TIMPI* zu finden ist (Bech-Hansen *et al.*, 1992). Bestätigt wurde dies durch eine weitere Kopplungsanalyse, bei der der Locus durch zwei informative Crossing-over proximal zu *MAOA* auf Xp11.3-11.23 zwischen *MAOA* und DXS246 lokalisiert werden konnte (Aldred *et al.*, 1992), ein Ergebnis, das auch andere Studien erbrachten, die die Region auf das Intervall von *OTC* bis DXS1003 eingrenzten (Berger *et al.*, 1995). Erstmalige Zugeständnisse an eine mögliche Heterogenität wurden jedoch erst 1993 nach einer Untersuchung an einer großen mennonitischen Familie mit drei betroffenen Schwestern gemacht (Bech-Hansen und Pearce, 1993). Sie ließ einen Genort für CSNB proximal zu *TIMPI* vermuten, zusätzlich zu einem distal zu *TIMPI*, der zuvor beschrieben worden war (Musarella *et al.*, 1989; Aldred und Wright, 1991; Li *et al.*, 1991). Weitere Hinweise auf geneti-

sche Heterogenität lieferten „neue“ Genorte für CSNB auf Xp. So wurde eine Kopplung von CSNB zwischen *DMD44* und *DXS7* auf Xp21.1 in die Nähe des Genortes für RP3 beschrieben (Bergen *et al.*, 1995), was durch die Analyse einer weiteren Familie bestätigt werden konnte (Bergen *et al.*, 1996). Als CSNB4 wurde bei einer Familie, die den Phänotyp der inkompletten kongenitalen stationären Nachtblindheit aufwies, ein neuer Genort eingeführt, der durch Rekombinationsereignisse auf Xp11.4-11.3 zwischen *DXS556* und *DXS8080* in dasselbe Intervall wie COD kartiert wurde (Hardcastle *et al.*, 1997).

Doch erst mit der Untersuchung von elf Familien mit CSNB1 und 21 Familien mit CSNB2 konnte der endgültige Beweis dafür erbracht werden, dass zwei Genorte für *x*/CSNB auf Xp existieren (Bech-Hansen *et al.*, 1997; Boycott *et al.*, 1998b). Mittels RFLP- und Mikrosatellitenanalyse konnte der Genort für CSNB1 auf Xp11.4-11.3 zwischen *DXS556* und *DXS228* kartiert werden. Mit einer krankheitsspezifischen Haplotypen-Analyse in Familien mennonitischen Ursprungs wurde der Genort für CSNB2 schließlich auf eine Region von 1,2 Mb zwischen den Markern *DXS722* und *DXS255* eingegrenzt.



**Abb. 5:** Lokalisation von CSNB1 und CSNB2 aufgrund von Rekombinationsereignissen. Auf der linken Seite der Abbildung ist ein Teil des X-Chromosoms mit einigen polymorphen Markern dargestellt. Die vertikalen Linien und Pfeile auf der rechten Seite des X-Chromosoms geben, basierend auf informativen Crossing-overn, minimale Regionen für Familien mit CSNB1 und solche mit CSNB2 sowie solche, die nicht als komplett oder inkomplett klassifiziert werden konnten (gestrichelte Linien) wieder. (1) und (2) kennzeichnen die minimalen Regionen für die CSNB1- und CSNB2-Loci, basierend auf Untersuchungen in zwei Familien, die die genaueste Lokalisation für die Gene für die komplette (1) bzw. die inkomplette (2) Form der *x*/CSNB lieferten. (3) gibt die Region an, die die Haplotypen-Analyse in Familien mennonitischen Ursprungs lieferte. Weitere rekombinante Chromosomen aus älteren Berichten sind ebenfalls eingezeichnet: eine Familie mit bekannter CSNB1 (4), eine mit bekannter CSNB2 (5) sowie vier weitere mit unbekanntem Status (6, 7, 8, 9). Konnte dabei die proximale bzw. distale Begrenzung des CSNB-Gens in der Familie nicht genau definiert werden, ist dieses Ende mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Linien sind jeweils zwischen dem am meisten

distal bzw. proximal gelegenen Marker gezogen. Auf der linken Seite des X-Chromosoms sind die derzeitigen minimalen Genorte für CSNB1 und CSNB2 angegeben.

Die Familiennummern in Klammern (1-9) beziehen sich auf folgende Studien: (1-3): Boycott *et al.*, 1998b; (4): Li *et al.*, 1991; (5): Bergen *et al.*, 1994; (6): Gal *et al.*, 1989; (7): Aldred *et al.*, 1992; (8): Bergen *et al.*, 1995; (9): Berger *et al.*, 1995 (modifiziert nach Boycott *et al.*, 1998b).

Mit diesen Daten konnte ebenfalls eine Allelität zu RP2 sowie RP3 ausgeschlossen werden (Boycott *et al.*, 1998b).

## 1.4 Åland Island Eye Disease (ÅIED)

Populationsgenetische Untersuchungen auf den Åland Inseln in der Ostsee führten 1964 zu einer Familie, die einen X-chromosomalen Erbgang für ein Syndrom mit horizontalem oszillierendem Nystagmus mit kleiner bzw. mäßiger Amplitude, häufig stark herabgesetztem Visus (0,06-0,4), progressiver Myopie (bis -20 D), Astigmatismus (bis 7,5 D), Protanomalie, gestörter Dunkeladaptation, Fundusalbinismus sowie Foveahypoplasie mit fehlendem Fovealreflex zeigte. Bei Überträgerinnen konnten leichte Farbsinnstörungen und ein im ENG registrierbarer Nystagmus nachgewiesen werden (Forsius und Eriksson, 1964). Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Nachuntersuchung dieser Familie, die drei Jahre später durchgeführt wurde (Waardenburg *et al.*, 1969). Erste elektrophysiologische Untersuchungen ergaben ein subnormales Stäbchen-ERG, ein negatives skotopisches ERG, eine reduzierte a-Welle in der Maximalantwort, eine fehlende Antwort auf 30 Hz Flicker und einen erhöhten Stäbchen-Schwellenwert bei der Dunkeladaptation (Elenius *et al.*, 1968).

Lange Zeit konnte man sich nicht über eine Einordnung dieses Syndroms in eine bestimmte Erkrankungskategorie einigen, was auch dadurch erschwert wurde, dass bei einigen Patienten Befunde wie Strabismus, Photophobie, sowie eine blau-hypoplastische oder auch durchleuchtbare Iris erhoben werden konnten. So wurde in der ÅIED anfangs eine eigenständige Variante des okulären Albinismus, der Forsius-Eriksson-Typ OA2, vermutet (François, 1979; McKusick 1968, 1980), neben dem klassischen Nettle-ship-Falls-Typ, von dem sich die ÅIED durch das Fehlen charakteristischer Fundusmuster bei weiblichen Überträgerinnen und durch den negativen Befund bei der Hautbiopsie, die keine Makromelanosomen entdecken ließ, unterschied. Eine Allelität oder Pseudo-Allelität wollte man jedoch nicht ausschließen (Waardenburg *et al.*, 1969). Weitere Untersuchungen an betroffenen Mitgliedern der Originalfamilie führten jedoch zur Verwerfung der Theorie, dass es sich bei der ÅIED um eine Form des okulären Albinismus handeln könnte. Als Begründung wurde angebracht, dass die Hypopigmentierung v. a. am hinteren Pol und nicht,

wie beim OA, in der Peripherie zu finden sei und Unterschiede im Spontan- bzw. optokinetischen Nystagmus bestünden. Zudem konnte bei elektrophysiologischen Untersuchungen keine fehlgeleitete Kreuzung der Optikusneurone im Chiasma opticum („misrouting“) nachgewiesen werden, das zu dem für den OA so charakteristischen Verlust des Stereosehens führt (van Dorp *et al.*, 1985). So einigte man sich darauf, das Krankheitssymbol von OA2 in ÅIED zu ändern (Mandel *et al.*, 1989).

Dass die Klassifikation als eine Form des OA nicht adäquat gewesen war, zeigten nach Krill (1977), der als erster die Behauptung aufstellte, ÅIED und CSNB2 seien eine Erkrankung, weitere Untersuchungen. Diese brachten aufgrund der Ähnlichkeiten im ERG bzgl. der Negativität und der gestörten Dunkeladaptation die Frage auf, inwieweit und ob ÅIED und CSNB2 unterschieden werden könnten. So erbrachten klinische und ophthalmologische Untersuchungen an einem sechsjährigen Jungen mit einer Deletion von Xp21 ein Syndrom mit Merkmalen von sowohl ÅIED als auch CSNB2, kongenitaler adrener Hypoplasie, Glycerolkinasemangel und Duchenne-Muskeldystrophie (Pillers *et al.*, 1988, 1990; Weleber *et al.*, 1989). Aufgrund von Befunden wie denen eines anomalen photopischen ERGs, eines negativen skotopischen ERGs, kongenitalem Nystagmus, Foveahypoplasie und Fundushypopigmentierung, entschloss man sich zur Diagnose ÅIED, unter dem Zusatz, dass diese Erkrankung der CSNB2 äußerst ähnlich, wenn nicht sogar mit ihr identisch sei.

In der Folgezeit wurden weitere Familien mit ähnlichen Befunden, wie sie bei der Originalfamilie von 1964 zu finden waren, beschrieben und von ihren Untersuchern als ÅIED klassifiziert. So wurde 1990 eine dänische Familie nach Ausschluss zuvor gestellter Diagnosen wie X-gekoppelter Nystagmus, OA oder exzessiver Myopie mit ÅIED diagnostiziert (Rosenberg *et al.*, 1990). Bei ihr hatten zuvor ausgeprägte Variationen im Phänotyp innerhalb der Familie, die von starker Myopie ohne Nystagmus bis hin zu einem ausgeprägten Nystagmus bei kaum vorhandenem Refraktionsfehler sowie von einer normalen bis albinoid reichenden Funduspigmentierung reichten, die klinische Diagnose erschwert. Ausschlaggebend war letztendlich v. a. das mit dem skotopischen ERG der Originalfamilie beinahe identische ERG, das auch zur Aussage führte, ÅIED und CSNB2 seien dieselbe Erkrankung.

Schon im darauffolgenden Jahr konnte nach einer vergleichenden Studie zwischen Mitgliedern der Originalfamilie und einer kürzlich entdeckten Familie aus Südfinnland mit ähnlicher Symptomatik eine neue, ÅIED-verwandte X-chromosomal vererbte Erkrankung beschrieben werden (Carlson *et al.*, 1991). Die Betroffenen zeigten mit ÅIED überein-

stimmende Merkmale bzgl. der reduzierten Sehschärfe, des Astigmatismus sowie der gestörten Dunkeladaptation. Unterschiede zu ÅIED bestanden darin, dass nur drei von fünf Betroffenen myop waren, nur bei einem ein Nystagmus nachweisbar war, in fast allen Fällen ein normaler Farbensinn bestand und keine Anzeichen von OA zu finden waren. Im ERG beider Erkrankungen ließen sich gestörte Zapfen- und Stäbchenantworten nachweisen. Während bei der ÅIED die Zapfenantwort fast ausgelöscht war, zeigten die Mitglieder der ÅIED-verwandten Familie zwar auch eine reduzierte Zapfenantwort, jedoch war diese nicht in demselben Ausmaß vermindert. Der größte Unterschied ließ sich jedoch bei der b-Welle in der Maximalantwort auf einen weißen Lichtreiz feststellen, die bei ÅIED subnormal, bei der ÅIED-verwandten Form jedoch fast komplett unterdrückt war. Aus diesen unterschiedlichen klinischen und elektrophysiologischen Befunden schloss man, in der ÅIED-verwandten Form eine vom Original verschiedene, eigenständige Erkrankung gefunden zu haben.

Kurze Zeit später konnte eine weitere Familie mit einer X-chromosomalen Augenerkrankung, die Gemeinsamkeiten mit ÅIED und CSNB2 aufwies, evaluiert werden (Glass *et al.*, 1993). Die Mitglieder hatten normale Fundi, was ebenso wie die Tatsache, dass die Überträgerinnen klinisch sowie elektrophysiologisch gesund waren, den OA als Differentialdiagnose ausschloss. Zudem zeigten sich ein Nystagmus, ein progressiver Verlust der Sehfunktion bis ins frühe Erwachsenenalter bei anschließend stationärem Verlauf, Myopie (-30 D bis -3 D) sowie Astigmatismus, Tritanomalie und eine gestörte Dunkeladaptation. Das ERG war vom Schubert-Bornschein-Typ, zeigte jedoch kaum eine 30 Hz Flickerantwort, und auch die oszillatorischen Potentiale waren kaum mehr ableitbar, ähnlich der Beschreibung des ERGs bei ÅIED. So klassifizierte man diese Familie als ÅIED, wobei man auch hier befand, dass die ausgeprägten Gemeinsamkeiten von ÅIED und CSNB2 beide Erkrankungen nicht unterscheidbar machten, und davon ausging, falls sich ÅIED und CSNB2 als allelisch erweisen würden, CSNB2 die leichtere Form mit einem geringeren Defekt der Zapfenfunktion wäre.

Nach eingehender Betrachtung der klinischen und elektrophysiologischen Befunde geht man heute davon aus, dass es eine Originalfamilie mit ÅIED gibt (Forsius und Eriksson, 1964) sowie drei ÅIED-verwandte Familien (Rosenberg *et al.*, 1990; Carlson *et al.*, 1991; Glass *et al.*, 1993). Ob es sich bei der ÅIED-verwandten Form und der CSNB2 um identische Erkrankungen handelt, war ein Gesichtspunkt, der in dieser Arbeit untersucht werden sollte.

Der Locus für ÅIED wurde anfangs aufgrund einer Kopplung mit dem XG-Blutgruppen-Locus auf dem terminalen Anteil von Xp vermutet (Race und Sanger, 1975). Auf der anderen Seite konnte bei einem Patienten mit einem ÅIED-ähnlichen Bild eine Deletion von Xp21 nachgewiesen werden (Pillers *et al.*, 1988, 1990; Weleber *et al.*, 1989), was zur Annahme führte, dass der Locus für ÅIED auf Xp21.3-21.2 zu suchen sei. Dies erweist sich jedoch nach heutigen Erkenntnissen als nicht möglich. Um den ÅIED-Genort genauer eingrenzen zu können, wurden Kopplungsanalysen in der Originalfamilie durchgeführt (Alitalo *et al.*, 1991). Der höchste Lod-Score ergab sich hierbei für den Marker DXS255 auf Xp11.22. Die Multimarker-Kartierung favorisierte einen Locus zwischen DXS7 und DXS72 auf Xp11.4-Xq21.1. Somit konnte die Lage auf Xp21 weitestgehend ausgeschlossen werden, nicht jedoch die Tatsache, dass ÅIED und CSNB2 evtl. durch Mutationen im selben Gen verursacht werden.

Eine genauere Eingrenzung erfolgte bis heute nicht, da die weiteren Kopplungsanalysen an Familien mit der ÅIED-verwandten Form erfolgten, von der man annimmt, dass sie mit ÅIED nicht allelisch ist. Sie konnten den Locus zunächst in die Nähe von DXS255 und *TIMP1* auf dem proximalen Xp und schließlich proximal zu DXS7 und *PGK*, eng verbunden mit dem Cluster DXS255, *TIMP1*, DXS146 sowie DXS14, lokalisieren (Schwartz und Rosenberg, 1991). Bestätigt wurde diese Region durch die Analyse einer weiteren Familie, die ebenfalls eine enge Kopplung mit *TIMP1* und DXS255 auf Xp11 erbrachte. Eine Lage außerhalb von Xp11 wurde zudem dadurch weitestgehend ausgeschlossen, als dass Rekombinationen im distalen Bereich von Xp sowie Xq beobachtet wurden (Glass *et al.*, 1993). Somit konnte auch die ÅIED-verwandte Form in dasselbe Intervall wie CSNB2 kartiert werden, wobei jedoch auch hier die Frage nach der Allelität offen blieb.

## 1.5 X-Chromosomaler kongenitaler Nystagmus (x/CN)

Eine weitere hereditäre Augenerkrankung, deren Genort auf Xp vermutet wurde, ist die idiopathische Form des X-chromosomalen angeborenen Nystagmus. Der kongenitale Nystagmus ist eine häufige Erkrankung (1:1500), die durch beidseitige, spontane, rhythmisch ablaufende sowie unwillkürliche Augenbewegungen charakterisiert ist. Er beginnt etwa im sechsten Lebensmonat und ist häufig mit schwersten Störungen des visuellen Systems vergesellschaftet. Man findet ihn hauptsächlich als Sekundärveränderung bei genetischen Augenerkrankungen wie dem Albinismus, der Achromatopsie, der Leber'schen angeborenen Amaurose oder der Katarakt, zudem ist er als Symptom bei wenigstens drei

X-chromosomalen Erkrankungen (OA1, CSNB1, Blau-Monochromatismus (CBBM)) bekannt. Sein Auftreten bei diesen Erkrankungen begleitet einen klinisch offensichtlichen Defekt im sensorischen Teil des Sehvorgangs (kongenitaler sensorischer Nystagmus).

Als idiopathisch wird der kongenitale Nystagmus eingestuft, wenn mögliche nervale Störungen oder Augenerkrankungen ausgeschlossen werden konnten. Hierbei repräsentiert er eine anomale Entwicklung derjenigen Gehirnareale mit okulomotorischen Funktionen, die der Fixationskontrolle und der Kontrolle der Augenbewegungen dienen. Daraus entstand auch die Bezeichnung kongenitaler motorischer Nystagmus. Neben der X-chromosomalen Vererbung sind auch eine autosomal-rezessive und eine autosomal-dominante Variante bekannt. In einigen Familien wird sowohl eine X-chromosomal-rezessive Übertragung als auch eine X-chromosomal-dominante Linie vermutet, was evtl. durch identische Mutationen bedingt ist, die unterschiedliche Penetranz bei den heterozygoten Frauen zeigen (Hemmes, 1924; Waardenburg *et al.*, 1961).

1996 konnte ein Gen für die autosomal-dominante Form des kongenitalen Nystagmus auf das Chromosom 6p12 kartiert werden (Kerrison *et al.*, 1996). Für die häufigste Form, den *x/CN*, konnte bis heute nur eine mögliche Region auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp11.3-11.4) angegeben werden (Cabot *et al.*, 1998). Erste Kopplungsanalysen in Familien mit motorischem *x/CN*, die ein uneinheitliches dominantes Vererbungsmuster zeigten, konnten durch Ausschluss einer Kopplung mit OA1, CSNB2 und CBBM jedoch die Hypothese bestätigen, dass es sich beim *x/CN* um eine eigenständige Erkrankung handelt.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Grundlage dieser Arbeit bildet die erst kurz zuvor erfolgte Kopplung des Genortes für die inkomplette Form der CSNB (CSNB2) zwischen die Marker DXS722 und DXS255 auf Xp11.23 (Bech-Hansen *et al.*, 1997). Ein Cosmid-PAC-Contig zwischen den Markern DXS6950 und DXS255 war vor Beginn der Arbeit durch Arbeitsgruppen in München und Jena kloniert und sequenziert worden. Aus den gelieferten Primärsequenzen konnten mit Hilfe von Exon-Vorhersageprogrammen (GENSCAN (Burge und Karlin, 1997), GRAIL (Uberbacher und Mural, 1991), GENEFINDER) und ESTs insgesamt 40 Gene, u. a. 24 neue Gene, identifiziert werden.

Zwei dieser neuen Gene, *jm9* und *CACNA1F* (= *jm8*), wurden als Kandidatengene für CSNB2 in Betracht gezogen. Im Hinblick auf die Tatsache, dass als mögliche Pathogenese der CSNB2 eine fehlerhafte Neurotransmission zwischen Photorezeptoren und Bipolarzel-

len vermutet wurde, handelt es sich bei diesen Genen jeweils um Gene, die für Ionenkanäle codieren und die im mutierten Zustand evtl. zu veränderten Ionenströmen und somit zu einer veränderten Transmitterfreisetzung führen können.

*Jm9*, das für einen Kaliumkanal codiert, konnte in einer anderen Arbeit (Diplomarbeit N. Gutwillinger) aufgrund fehlendem Nachweises von Mutationen als mögliches Krankheitsgen ausgeschlossen werden.

Somit ergaben sich für diese Arbeit folgende Fragen, die mit molekulargenetischen Methoden untersucht werden sollten:

- Handelt es sich bei *CACNA1F* um das bei *CSNB2* mutierte Krankheitsgen?
- Lässt sich die genetische Heterogenität von *CSNB1* und *CSNB2* eindeutig bestätigen?
- Handelt es sich bei *CSNB2* und der *ÁIED*-verwandten Form um allelische Erkrankungen, die durch Mutationen in demselben Gen hervorgerufen werden?
- Lassen sich in der Original-*ÁIED*-Familie oder in Familien mit *x/CN* Mutationen in dem für *CSNB2* codierenden Gen nachweisen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Patienten mit kompletter sowie inkompletter  $x$ /CSNB,  $\dot{A}$ IED,  $\dot{A}$ IED-verwandtem Phänotyp sowie X-chromosomalem Nystagmus ( $x$ /CN) molekulargenetisch untersucht.

Die klinischen sowie elektrophysiologischen und psychophysischen Untersuchungen wurden in freundlicher Zusammenarbeit von der Universitäts-Augenklinik Tübingen, der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universität Regensburg, dem Department of Medical Genetics der Universität Helsinki, dem Institut für Medizinische Genetik der Universität Zürich sowie dem Institut de Pathologie et de Génétique in Loveral durchgeführt.

Die Überweisung an die Augenklinik war jeweils aufgrund verminderter Sehschärfe, Nystagmus sowie Strabismus erfolgt, wobei die wenigsten der Patienten über Schwierigkeiten beim Sehen in der Nacht klagten. Die X-chromosomale Vererbung wurde durch Stammbaumanalyse nachgewiesen: in mindestens zwei Generationen mussten betroffene Männer zu finden sein bei jeweils asymptomatischen Frauen (bis auf CSNBX-13 und CSNBX-14: nur eine Generation). In jeder Familie fand sich nur eine der beiden CSNB-Formen. Zur Diagnose und Klassifikation bediente man sich elektrophysiologischer und psychophysischer Methoden. Eine Schlüsselstellung hat hierbei das ERG inne. Als richtungsweisend gilt hierbei das Standardprotokoll aus dem Jahr 1989, das 1994 aktualisiert wurde (Marmor und Zrenner, 1995). Ebenso unerlässlich ist die Prüfung der Dunkeladaptation. Als weitere Methoden standen die Perimetrie (Schwellenperimetrie, skotopische Perimetrie), die Prüfung des Farbensehens sowie das EOG zur Verfügung.



---

- Dextransulfat	Pharmacia Biotech, Freiburg
- Dichlordimethylsilan	Merck, Darmstadt
- DNA-Polymerization Mix	Pharmacia Biotech, Freiburg
- Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
- Ethansäure (96 %)	Merck, Darmstadt
- Ethidiumbromid	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
- Ficoll 400	Pharmacia Biotech, Freiburg
- FMC SeaKem <sup>®</sup> LE Agarose	Biozym, Oldenburg
- Formamid	Sigma, Deisenhofen
- GeneAmp <sup>®</sup> 10x Puffer	Amersham Life Science, Braunschweig
- Glyzerin	Merck, Darmstadt
- Harnstoff	BioRad, München
- Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
- Kaliumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
- Klenow-Polymerase	Boehringer, Mannheim
- Lachsspermien-DNA	Sigma, Deisenhofen
- Längenstandard 1 kb-Leiter	Gibco BRL, Eggenstein
- Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
- $\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
- Natriumacetat	Merck, Darmstadt
- Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
- N, N'-Bisacrylamid	BioRad, München
- Orange G	Merck, Darmstadt
- Protease E (Pronase)	Sigma, Deisenhofen
- QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
- QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
- Salzsäure	Apotheke Klinikum Innenstadt
- SDS	Sigma, Deisenhofen
- Sephadex-G50	Pharmacia Biotech, Freiburg
- Serdogel	Serva, Heidelberg
- Silan A 174	Merck, Darmstadt
- Taq-DNA-Polymerase	Amersham Life Science, Braunschweig
- TEMED	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

- Titriplex III (EDTA) Merck, Darmstadt
- Tris Amersham Buchler, Braunschweig
- Xylencyanol Merck, Darmstadt

#### Apparate und Hilfsmittel

- Electrophoresis Power SupplyConsort E425 Bachofer, Reutlingen
- FluorImager Molecular Dynamics,
- Gilson-Pipetten Abimed, Langenfeld
- MGW Lauda RM6 Kühlung
- Peltier Thermal Cycler-200 Biozym, Oldenburg
- Pipettenspitzen Sarstedt, Nürnberg
- Protean<sup>®</sup> II xi Cell Elektropho – resekammern BioRad, München
- Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml) Eppendorf, Hamburg
- Sequenzierer ABI PRISM<sup>™</sup> 377 Applied Biosystems, Weiterstadt
- Spectrophotometer Gene Quant Pharmacia, Freiburg
- SpeedVac Bachofer, Reutlingen
- UV-Transilluminator Herolab, Wiesloch
- Zentrifuge Rotixa/RP Hettich, Hettingen

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Präparation genomischer DNA

(nach Miller *et al.*, 1988)

#### Reagenzien

- Erythrozyten-Lysepuffer (pH 7,4):
  - 155 mM NH<sub>4</sub>Cl
  - 10 mM KHCO<sub>3</sub>
  - 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA
- SE-Puffer (pH 8,0):
  - 75 mM NaCl
  - 25 mM EDTA
- Pronase (4 U/mg)
  - Protease E aus *Streptomyces griseus*
- SDS (20 %)
- 5 mM NaCl
- Ethanol (100 % und 70 %)
- TE-Puffer (pH 8,0):
  - 10 mM Tris-HCl
  - 1 mM EDTA

#### Durchführung

5-10 ml EDTA-Blut werden mit 40-45 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgefüllt, 20 min auf Eis stengelassen, bis das Blut lysiert ist, und anschließend zentrifugiert (1000 rpm, 7°C, 10 min). Der Überstand mit den lysierten Erythrozyten wird abgekippt, das Pellet, in dem sich die kernhaltigen Leukozyten befinden, nochmals mit 30 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgefüllt, 10 min auf Eis stengelassen und nochmals zentrifugiert (1000 rpm, 7°C, 10 min). Der Überstand wird erneut verworfen, das Pellet in 5 ml SE-Puffer aufgenommen sowie mit 25 µl Pronase und 250 µl SDS (20 %) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Proteolyse erfolgt die Proteinfällung durch Zugabe von 2 ml 5 M NaCl, Vortexen und Zentrifugieren (2500 rpm, 25°C, 10 min). Der die DNA enthaltende Überstand wird durch eine sterile Kompresse in ein 50 ml Röhrchen geschüttet. Nun erfolgt die DNA-Fällung mit zwei Volumina 100 %igem Ethanol (-20°C). Die DNA, die jetzt als Knäuel ausgefallen ist, wird mit 70 %igem Ethanol nachgewaschen, das man dann in einer

Stunde bei Raumtemperatur verdampfen lässt. Schließlich wird die DNA in ca. 500 µl TE-Puffer über Nacht unter ständigem Mischen gelöst.

Die DNA-Konzentration lässt sich dann durch Extinktionsmessung bei 260 nm mittels optischer Dichte mit Hilfe eines Spektrophotometers bestimmen ( $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg/ml}$ ).

### 2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(nach Saiki *et al.*, 1988)

Mit Hilfe der PCR können definierte Ziel-DNA-Sequenzen *in vitro* bis zu  $10^6$  mal vervielfältigt werden. Die Reaktion besteht dabei aus aufeinanderfolgenden Zyklen mit je drei Schritten, bei denen die neusynthetisierten DNA-Stränge jeweils als Matrizen für die weitere DNA-Synthese dienen:

- Denaturierung:

Die menschliche genomische DNA wird bei ca. 95°C denaturiert, wobei die beiden Oligonukleotidprimer und die vier dNTPs im Überschuss vorhanden sind.

- Renaturierung (*Annealing*):

Dann wird das Reaktionsgemisch soweit abgekühlt, dass die beiden Oligonukleotidprimer spezifisch an die komplementären Sequenzen, die die gesuchte DNA-Region einrahmen, binden können. Die PCR-Primer sind dabei derart gestaltet, dass sie aus ca. 20 Nukleotiden bestehen, der Gesamtprozentsatz an GC (40-60 %) und die Länge jeweils so gewählt werden, dass die Schmelztemperatur  $T_m$  beider Oligonukleotide nahezu gleich ist und dass die Basen am 3'-Ende beider Primer nicht komplementär sind, da die Primer sonst Dimere bilden können, die die Effizienz der Reaktion verringern. Optimale Primersequenzen können mit dem Computerprogramm *Mac Vector* gesucht werden. Zur Berechnung der Schmelztemperatur  $T_m$  dient folgende Formel:

$$T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{A}+\text{T}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{C}+\text{G})$$

Die optimale *Annealing*-Temperatur liegt in der Regel 5°C unter der errechneten  $T_m$ .

- Synthese:

Sie erfolgt in der Regel bei 72°C mit Hilfe der Taq-Polymerase, die man z. B. aus *Thermus Aquaticus* gewinnt (Chien *et al.*, 1976). Sie ist bis zu 94°C hitzebeständig und hat eine optimale Arbeitstemperatur von ca. 72°C. Damit ist es nicht mehr notwendig, die Polymerase nach jeder Runde neu hinzuzugeben, wie es im Originalpro-

tokoll für die PCR (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986; Mullis und Faloona, 1987) angegeben ist, bei dem mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I gearbeitet wird, welches bei der Temperatur, die zur DNA-Denaturierung benötigt wird, inaktiviert wird.

Die Synthese erfolgt in Gegenwart von  $Mg^{2+}$  und der Desoxyribonukleotide am freien 5'-OH-Primer-Ende.

### Reagenzien

- 10x Reaktionspuffer (pH 8,3):
  - 500 mM KCl
  - 100 mM Tris-HCl
  - 15 mM  $MgCl_2$
  - 0,1 % (w/v) Gelatine
- GeneAmp<sup>®</sup> 10x-PCR-Puffer (pH 9,0):
  - 100 mM Tris-HCl
  - 500 mM KCl
  - 15 mM  $MgCl_2$
  - 0,01 % (w/v) Gelatine
- gereinigte Desoxyribonukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (20 mM) (1:10 in  $H_2O_{bd}$ )
- synthetische Oligonukleotidprimer:

20 nmol lyophilisierte Primer werden in 40  $\mu$ l TE-Puffer gelöst. Davon wird eine Gebrauchslösung (50 pmol/ $\mu$ l) hergestellt (1:10 in  $H_2O_{bd}$ ) und bei  $-20^\circ C$  gelagert.
- Taq-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l):

stabil in 20 mM Tris-HCl (pH 8,0)

  - 100 mM KCl
  - 1 mM DTT
  - 0,1 mM EDTA
  - 50 % (v/v) Glyzerin
  - Stabilisatoren
- AmpliTaq Gold<sup>™</sup>-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l):

stabil in 20 mM Tris-HCl (pH 9,0)

  - 100 mM KCl
  - 1,0 mM DTT

- 0,1 mM EDTA
- 0,5 % Tween<sup>®</sup>
- 50 % (v/v) Glycerin

- H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>
- DNA (50 ng/μl)

### Durchführung

Verfahren wird nach dem Standard-PCR-Protokoll:

Die PCR wird in 0,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt, benutzt werden PTC-200-Maschinen. Die verwendeten Primersequenzen und die *Annealing*-Bedingungen sind im Anhang angegeben.

- Herstellung eines Reaktionsansatzes (50 μl):
  - 10x PCR-Puffer                      5,0 μl
  - dNTP (160 μmol/dNTP)            4,0 μl
  - 5'-Primer (25 pmol/μl)            1,0 μl
  - 3'-Primer (25 pmol/μl)            1,0 μl
  - Taq-DNA-Polymerase              0,1 μl
  - DNA (50 ng/μl)                    2,0 μl
  - ad 50 μl H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>
- PCR-Programm:
  - initiale Denaturierung            94°C 5 min
  - Zyklus aus:
    - Denaturierung                    94°C 45 sec
    - *Annealing*                        je T<sub>m</sub> des jeweiligen Primers 45 sec
    - Synthese                            72°C 45 sec

Die Anzahl der Zyklen beträgt 25-40, abhängig von der Kopienanzahl der DNA zu Beginn der Reaktion.

- *final extension*                    72°C 5 min

Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgt bei 4°C oder -20°C.

Sollte das Ergebnis der PCR zu schwach oder unspezifisch sein, kann die Verwendung der AmpliTaq Gold<sup>™</sup>-DNA-Polymerase zu einem besseren Resultat führen. Die Durchführung entspricht der des Standard-Protokolls, nur werden jetzt der GeneAmp<sup>®</sup>10x-PCR-Puffer und die AmpliTaq Gold<sup>™</sup>-DNA-Polymerase verwendet, außerdem beträgt der initiale Denaturierungsschritt 10 min bei 94°C.

### 2.3.3 Horizontale Gelelektrophorese

Mittels der horizontalen Gelelektrophorese in einem Agarosegel können DNA-Fragmente aufgetrennt und isoliert werden. Man verwendet ein homogenes Puffersystem, das über die gesamte Trennzeit und -distanz den gleichen pH gewährleistet. Dabei wandern geladene Moleküle in die Richtung der Elektrode mit entgegengesetztem Vorzeichen. Da die DNA-Stränge bei neutralem pH aufgrund ihrer Phosphodiesterbindungen negativ geladen sind, wandern sie in Richtung der Anode. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit ( $\mu$ ) wird dabei durch verschiedene Faktoren beeinflusst. So ist sie umgekehrt proportional zum  $\log_{10}$  der Basenzahl (Helling *et al.*, 1974), zudem besteht eine lineare Beziehung zwischen dem  $\log$  der Wanderungsgeschwindigkeit und der Gelkonzentration ( $\tau$ ).

Auch die DNA-Konformation spielt eine Rolle, da DNA-Superhelices und gestreckte DNA-Formen desselben Molekulargewichtes mit verschiedenen Geschwindigkeiten im Agarosegel wandern (Thorne, 1966), ebenso wie die Zusammensetzung des Puffers. Je geringer die Ionenkonzentration des Elektrophorese-Puffers ist, desto langsamer wandert die DNA, ist der Ionengehalt jedoch sehr hoch, entsteht unter Umständen so viel Wärme, dass die DNA denaturiert. Auch die Gegenwart von interkalierenden Substanzen, wie z. B. Ethidiumbromid, einem fluoreszierenden Farbstoff, der benützt wird, um DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen (Sharp *et al.*, 1973), reduziert die Wanderungsgeschwindigkeit um ca. 15%. So sollte die freie Konzentration an Ethidiumbromid nur 0,1-0,5  $\mu\text{g/ml}$  betragen. Keinen signifikanten Einfluss auf die elektrophoretische Mobilität der DNA in Agarosegelen haben dagegen, im Gegensatz zur Wanderungsgeschwindigkeit in Polyacrylamidgelen (Allet *et al.*, 1973), die Temperatur oder die Basenzusammensetzung (Thomas und Davis, 1975). Um eine optimale Auftrennung der DNA-Fragmente zu erhalten, sollte die Spannung 2-5 V/cm Elektrodenabstand betragen, da bei höheren Spannungen höhermolekulare DNA-Fragmente nicht mehr proportional zur angelegten Spannung wandern.

#### Reagenzien

- 10x TBE-Puffer (pH 8,0):
  - 840 mM Tris-HCl
  - 900 mM Borsäure
  - 20 mM NaEDTA
- FMC SeaKem<sup>®</sup> LE Agarose
- Ethidiumbromid (10 mg/ml)

- Längenstandard 1 kb (1:10 in H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>)  
für DNA-Fragmente von 500 bp-12 kb
- Probenauftragspuffer:  
25 % (w/v) Ficoll 400  
0,25 % Orange G, Bromphenolblau oder Xylencyanol

#### Durchführung

Zur Herstellung des Agarosegels erhitzt man, je nach gewünschter zu erreichender Konzentration, 0,7-1,5 g Agarose mit 100 ml 1x TBE-Puffer, wobei zu je 100 ml Gellösung 2 µl Ethidiumbromid zugesetzt werden. Dann kühlt man die Lösung auf 60°C ab und gibt sie in die vorbereitete Gelkammer, in der man sie erstarren lässt und dann mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Anschließend werden die mit dem Probenauftragspuffer verdünnten Proben sowie ein Längenstandard, der dazu dient, die Größe der DNA-Fragmente abzuschätzen, in die Geltaschen pipettiert und bei einer Spannung von 2-5 V/cm Elektrodenabstand aufgetrennt. Zur Auswertung legt man dann das Gel unter UV-Licht, mit dem man aufgrund des Ethidiumbromids, das zwischen die Basen interkaliert und unter UV-Licht orange fluoresziert, die DNA-Fragmente sichtbar machen kann.

### 2.3.4 Reinigung von PCR-Produkten

#### Reagenzien

- QIAquick PCR Purification Kit
- QIAquick Gel Extraction Kit

#### Durchführung

Ist die PCR bereits sauber, kann sie direkt gemäß des *QIAquick PCR Purification Kit*-Protokolls über Säulen gereinigt werden. Ist das PCR-Produkt jedoch durch unerwünschte Fragmente verunreinigt, muss es mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und nach dem *QIAquick Gel Extraction Kit*-Protokoll bearbeitet werden. Im letzten Schritt wird die DNA jeweils mit 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> eluiert.

Die so gereinigte PCR kann als Ausgangsprodukt zum Sequenzieren, Hybridisieren oder Ligieren und Transformieren verwendet werden.

### 2.3.5 SSCP

(nach Orita *et al.*, 1989b)

Mit Hilfe der Analyse von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (single-strand-conformational polymorphism analysis, SSCP) lassen sich Mutationen wie Insertionen, Deletionen und auch Substitutionen einzelner Basen sowie Polymorphismen erkennen (Orita *et al.*, 1989 a, b; Hayashi, 1991; Hayashi und Yandell, 1993). Dabei macht man sich zunutze, dass einzelsträngige DNA zur Rückfaltung und Ausbildung komplexer Strukturen neigt, deren elektrophoretische Mobilität in einem nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel nicht nur von der Länge der Molekülkette, sondern auch von der Konformation, die durch die DNA-Sequenz bestimmt wird, abhängt. So werden die verschiedenen Konformationen der DNA-Einzelstränge je nach Gehalt an  $\beta$ -Hydroxylgruppen unterschiedlich stark aufgetrennt.

In dieser Arbeit wurde, um die Sensitivität der SSCP zu erhöhen, jeweils mit 10 %igem Glycerin in der Polyacrylamidgelmatrix und ohne Glycerin gearbeitet. Zudem wurde eine vereinfachte Form der SSCP-Analyse angewendet, um im Unterschied zum Originalprotokoll von Orita *et al.* den Einsatz von Radioaktivität zu vermeiden.

#### Reagenzien

- Dichlordimethylsilan
- Silan A 174
- Ethanol
- Ethansäure (10 %)
- Serdogel  
Lösung aus Acrylamid und N, N'-Methylenbisacrylamid
- 10x TBE-Puffer
- H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>
- APS (25 %)
- TEMED
- Glycerin (87 %)
- SSCP-Auftragspuffer  
25 % (w/v) Ficoll 400 mit Bromphenolblau wird 1:3 mit Formamid (pH 7,0) versetzt.
- 0,6x TBE-Laufpuffer
- <sup>TM</sup>Vistra Green
- 1 M Tris pH 8,0

### Durchführung

Gearbeitet wird mit Protean<sup>®</sup> II xi Cell Elektrophoresekammern und einem Set aus jeweils drei Glasplatten. In der Mitte befindet sich eine sog. Ohrenplatte, außen eine kleine Platte, an der später das mit Glycerin gegossene Gel haftet, sowie eine große Platte, die für das ohne Glycerin gegossene Gel bestimmt ist. Zunächst werden die Ohrenplatten auf beiden Seiten mit dem abstoßenden Dichlordimethylsilan und die Außenplatten auf der dem Gel zugewandten Seite mit einem haftenden Gemisch aus 18 µl Silan A 174, 5 ml Ethanol und 185 µl 10 %iger Ethansäure eingerieben. Nach Reinigung der Platten mit 80 %igem Ethanol wird das Set derart zusammengebaut, dass zwischen den Platten jeweils zwei 0,5 mm breite Spacer liegen. In den so entstandenen Zwischenraum wird dann in horizontaler Lage das Gel gegossen, wobei auf einer Seite Kämme als Platzhalter für die späteren Auftragstaschen eingesetzt werden. Pro Polyacrylamidgel verwendet man

- 6 ml Serdogel
- 1,2 ml 10x TBE-Puffer
- 12,8 ml H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>  
bzw. bei mit Glycerin gegossenen Gelen
  - 10,8 ml H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>
  - 2,0 ml Glycerin
- 80 µl APS (25 %)
- 8,0 µl TEMED

Wenn die Gele auspolymerisiert sind (nach 30-60 min), werden die Kämme gezogen und die Glasplatten senkrecht in die Elektrophoresekammern eingespannt. Schließlich wird 0,6x TBE-Puffer in die Kammern bis ca. 1 cm über den unteren Plattenrand und in die Geltaschen gegeben.

Derweil werden jeweils 3,8 µl PCR-Produkt mit 10,2 µl des SSCP-Auftragspuffers gemischt, und 10 min bei 94°C denaturiert. Jeweils 6 µl von dem Gemisch werden auf ein Gel aufgetragen.

Während des Laufes werden die Elektrophoresekammern an eine Kühlung angeschlossen, um eine konstante Puffer-Temperatur von 20°C zu gewährleisten.

Die Dauer der SSCP beträgt je nach Fragmentgröße und angelegter Spannung:

- 120 bp bei 120 V für 13 h
- 200 bp bei 120 V für 15 h
- 300 bp bei 120 V für 18 h

Nach dem Abbau der Elektrophoresekammern werden die Glasplatten auseinander genommen und die Gele mit dem Fluoreszenzfarbstoff <sup>TM</sup>Vistra Green gefärbt, wobei pro Gel 5 ml einer Lösung aus 5 ml 1 M Tris (pH 8,0) und 1  $\mu$ l <sup>TM</sup>Vistra Green verwendet werden. Die so gefärbten Gele werden mit einem FluorImager gescannt und anschließend mit dem Programm *Image Quant* (Molecular Dynamics) ausgewertet.

### 2.3.6 Sequenzierung

(nach Sanger *et al.*, 1977)

Die DNA-Sequenzierung mit Didesoxynukleotiden (ddNTPs) basiert auf einer Neusynthese von DNA an einer einzelsträngigen Matrix und dem zufälligen Einbau von basenspezifischen Didesoxynukleotiden, denen am 3'-Kohlenstoff eine OH-Gruppe fehlt, weswegen sie hier keine Phosphodiesterbindung ausbilden können und somit zum Abbruch der Synthese führen. Der Primer bindet spezifisch an einen Bereich jenseits des 3'-Endes, an dem die Synthese des komplementären DNA-Stranges beginnt. Die Synthese erfolgt dabei in vier parallelen Reaktionsansätzen, die jeweils die vier normalen dNTPs und ein bestimmtes ddNTP enthalten. Da die Konzentration des ddNTP-Analogons wesentlich geringer ist als die des zugehörigen normalen dNTPs, kommt es zufällig und nur bei sehr wenigen der möglichen Basenpositionen zu Kettenabbrüchen. Es entsteht somit eine Population von DNA-Fragmenten verschiedener Größe, die ein übereinstimmendes 5'-Ende, das durch den Primer festgelegt ist, und variable 3'-Enden, die durch das jeweilige ddNTP festgelegt sind, besitzen. Die entstandenen Fragmente lassen sich dann in einem denaturierenden Polyacrylamidgel auftrennen. Erleichtert wird die DNA-Sequenzierung durch automatisierte Systeme für die Sequenzierung fluoreszenzmarkierter DNA (Wilson *et al.*, 1990), bei denen die Primer oder ddNTPs mit einem Fluorophor versehen sind. Während der Elektrophorese mißt ein Detektor die Fluoreszenzsignale der vorbeiwandernden DNA und zeichnet sie auf. Da verschiedene Fluorophore in den vier basenspezifischen Reaktionsansätzen eingesetzt werden, können alle vier Ansätze auf einer Gelspur aufgetragen werden. Die Ergebnisaussage erfolgt in Form von Intensitätsprofilen für jedes der Fluorophore. In dieser Arbeit wurden die automatisierten DNA-Sequenzbestimmungen mit dem *ABI PRISM<sup>TM</sup>-System 377* (Perkin Elmer) unter Verwendung des *BigDye Terminatoren Kits*, der die vier mit fluoreszierendem Farbstoff markierten ddNTPs enthält, durchgeführt.

Dabei wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet:

- Cycle Sequencing Reaktion:

Reagenzien

- gereinigte PCR-Produkte
- Primer
- BigDye Terminator Premix (BD-Premix)
- H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>

Durchführung

Um doppelsträngige DNA-Matrizen für eine Standard-Sequenzierung verwenden zu können, muss die DNA vor Bindung der Primer denaturiert werden. Damit dadurch nicht die Qualität der Sequenzen leidet, bedient man sich der zyklischen Sequenzierung (lineare Amplifizierung), einer Art PCR-Sequenzierung mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Kretz *et al.*, 1994). Die Reaktion wird in mehreren Zyklen aus Denaturierung, Renaturierung und DNA-Synthese durchgeführt, wobei sich die Temperatur bei den einzelnen Schritten jeweils ändert. Im Unterschied zur normalen PCR wird pro Reaktionsansatz nur ein Primer (entweder *forward* oder *reverse*) verwendet.

- Herstellung eines Reaktionsansatzes (10 µl):

- BD-Premix                      2,0 µl
- Primer                              0,2 µl
- DNA (50-100 ng/µl)            x µl
- ad 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>

- Cycle Sequencing Programm:

25 Zyklen aus jeweils:

- 96°C 30 sec
- 50°C 15 sec
- 60°C 4 min

- Fällung der DNA:

Reagenzien

- 3 M Na-Acetat (pH 5,0)
- H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>
- 100 % Ethanol
- 70 % Ethanol

### Durchführung

Anschließend wird das erhaltene Produkt in 90 µl H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> und 10 µl 3 M Na-Acetat aufgenommen, in 250 µl 100 %igem Ethanol inkubiert und dann abzentrifugiert (15000 rpm, 30 min). Das Pellet wird mit 250 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert (15000 rpm, 20 min) und schließlich für 10 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

- Sequenziergel:

### Reagenzien

- Acrylamidlösung (30 %)  
hergestellt aus 58 g Acrylamid und 2 g N, N'-Methylenbisacrylamid (29:1)
- 10x TBE-Puffer
- APS (10 %)
- TEMED
- 7 M Harnstoff
- H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>
- Sequenzauftragspuffer:  
5 Vol Formamid  
1 Vol 25 mM EDTA  
Dextra Blau

### Durchführung

Zur Herstellung des 5 %igen denaturierenden Polyacrylamidgels löst man den Harnstoff in 20 ml H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> und 7,5 ml 30 %iger Acrylamid-Lösung. Dann filtriert und entgast man die Lösung, gibt 20 µl TEMED und 350 µl APS zu und gießt die Lösung zwischen die mit Isopropanol gereinigten Glasplatten. Nachdem ein Haifischkamm ins Gel gesteckt wurde, lässt man das Gel für eine Stunde polymerisieren. Anschließend wird das Gel in den Sequenzierer eingebaut und die Kammern mit Laufpuffer gefüllt.

Die Proben werden in 3 µl des Sequenzauftragspuffers gelöst, bei 90°C für 2 min denaturiert und schließlich aufs Sequenzgel aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 2500 V, 48 Watt über 8 h.

- Auswertung der Sequenzen:

Die Sequenzrohdaten werden vom Computerprogramm *ABI PRISM* (Perkin Elmer) erfasst, analysiert und als Elektropherogramm ausgegeben. Zur weiteren Analyse dienen die Programme *Sequence Navigator* und *Sequence Analysis*.

### 2.3.7 Southern-Blot

(nach Southern, 1975)

Dieses Verfahren dient dem Transfer von DNA-Fragmenten auf eine feste Trägermatrix. Puffer wird durch Kapillarkräfte aus einer Vorratswanne durch das Gel und die Blotfolie in einen Stapel trockener Papierhandtücher gesogen. Dabei wird die über Gelelektrophorese aufgetrennte, negativ geladene DNA an die positiv geladene Blotfolie transportiert, an der sie absorbiert wird. Beim sog. „Zoo-Blot“ wird anstelle menschlicher DNA die DNA verschiedener Tierarten verwendet.

#### Reagenzien

- 0,25 N HCl
- H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>
- 0,5 M NaOH
- 0,4 M NaOH
- 2,0x SSC-Lösung:
  - SSC-Lösung 20x:
    - 3 M NaCl
    - 300 mM Na<sub>3</sub>Citrat
- Postblot-Waschpuffer:
  - 0,2 M Tris-HCl (pH 7,5)
  - 2,0x SSC-Lösung

#### Durchführung

Das Agarosegel wird 15 min in 0,25 N HCl unter ständigem Schütteln geschwenkt (Depurinisierung). Nach kurzem Spülen mit H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> wird die im Agarosegel fixierte DNA durch zweimaliges 20 minütiges Schwenken im Denaturierungspuffer (0,5 M NaOH) in einzelsträngige DNA überführt (Denaturierung). Beim Blotten wird die DNA mit der 0,4 M NaOH-Lösung, welche sich in der Blotwanne befindet, aus dem Gel auf die darüberliegende Nylonmembran gesaugt. Die Blotzeit beträgt bei gespaltener genomischer DNA 4-5 h. Nach dem Blotten wird die Membran einmal für 10 min in Postblot-Waschpuffer gewaschen und für 10 min in 2,0x SSC-Puffer neutralisiert und dann auf Filterpapier getrocknet.

### 2.3.8 Northern-Blot

(nach Alwine *et al.*, 1977)

Der unter dem Namen Northern-Blot bekannt gewordene Transfer von Gesamt-RNA oder mRNA aus verschiedenen Geweben und Entwicklungsstadien auf eine Nylonmembran bedient sich ebenfalls der Technik des Kapillarblottings. Der Northern-Blot wird hierbei mit 10-20 ng cDNA-Amplifikaten aus RT-PCR-Experimenten hybridisiert.

Als Kontrolle wird mit  $\beta$ -Actin hybridisiert, welches in allen Geweben mit einem Transkript von 2,0 kb bzw. in Herz und Skelettmuskel mit 1,7 kb exprimiert wird.

Für diese Arbeit wurde ein *Human Multiple Tissue Northern (MTN<sup>TM</sup>) Blot* mit den Geweben Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas (2  $\mu$ g poly(A)<sup>+</sup>-RNA pro Spur) der Firma Clontech (#7760-1) benutzt. Der zweite Northern-Blot (12  $\mu$ g Gesamt-RNA) mit den Geweben Kleinhirn, Retina und retinales Pigmentepithel (RPE) wurde freundlicherweise vom Institut für Humangenetik in Würzburg zur Verfügung gestellt.

### 2.3.9 Hybridisierung

Mit radioaktiv markierten DNA- oder RNA-Sonden, die an komplementäre DNA oder RNA auf der Blotfolie binden, kann man mit hoher Nachweisempfindlichkeit DNA-Fragmente analysieren.

- radioaktive Markierung von Sonden:

(nach Feinberg und Vogelstein, 1983)

In dieser Arbeit erfolgte die radioaktive Markierung der DNA-Fragmente durch die zufällige Anlagerung von Hexa-Oligonukleotiden (*random priming*) und Einbau von [ $\alpha^{32}$ P]-dCTP.

#### Reagenzien

- [ $\alpha^{32}$ P]-dCTP
- H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>
- BSA (10 mg/ml)
- Oligo-labeling-Puffer (OLB-C):  
Gemisch aus Lösung A, B und C im Verhältnis 1:2,5:1,5  
Lösung 0:  
1,25 M Tris-HCl (pH 8,0)

125 mM MgCl<sub>2</sub>

Lösung A:

1 ml Lösung 0

18 µl β-Mercaptoethanol

je 5 µl 0,1 M dATP, dGTP, dTTP

Lösung B :

2 M Hepes (pH 6,6)

Lösung C:

Zufallsprimer (5'-pd(N)<sub>6</sub>-Oligonukleotide, Pharmacia) in TE-Puffer (pH 7,6) gelöst; Endkonzentration: 90 A<sub>260</sub> U/ml

- Klenow-Polymerase (2,0 U/µl)
- TES-Puffer:
  - 20 mM NaCl
  - 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)
  - 2 mM EDTA
  - SDS (0,25 %)
  - 0,25 % (w/v) Bromphenolblau

### Durchführung

Zur Herstellung einer [ $\alpha^{32}$ P]-dCTP markierten Sonde werden 10-20 ng DNA eingesetzt. Die DNA wird mit H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> auf 32 µl verdünnt, 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Auf Eis werden dann 2 µl BSA, 10 µl OLB-C und 0,5 µl Klenow-Polymerase hinzugefügt. Die Markierung wird für 2 h bei Raumtemperatur oder 30 min bei 37°C unter Zugabe von 2-3 µl [ $\alpha^{32}$ P]-dCTP durchgeführt. Die Markierungsreaktion wird durch Zugabe von 100 µl TES-Puffer gestoppt. Anschließend wird das markierte DNA-Fragment über eine Sephadex-G50-Säule (2000 rpm, 10 min) von überschüssigen dNTPs gereinigt.

- Hybridisierung:  
(nach Johnson *et al.*, 1984)

### Reagenzien

- 2,0x SSC-Lösung
- Prähyb-Mix:
  - 1,5x SSPE-Lösung:
  - SSPE-Lösung 20x:

- 3,6 M NaCl
- 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 20 mM EDTA (pH 7,4)
- SDS (1,0 %)
- Magermilchpulver (0,5 %)
- Lachsspermien-DNA (10 mg/ml)
- Hyb-Mix:
  - 1,5x SSPE-Lösung
  - SDS (1,0 %)
  - Magermilchpulver (0,5 %)
  - Dextransulfat (10 %)
- Waschlösung 1:
  - 2,0x SSC-Lösung
  - SDS (0,1 %)
- Waschlösung 2:
  - 0,5x SSC-Lösung
  - SDS (0,1 %)
- Waschlösung 3:
  - 0,1x SSC-Lösung
  - SDS (0,1 %)

### Durchführung

Die in 2x SSC-Lösung geschwenkten Nylonmembranen (Southern-/Northern-Blots) werden in Hybridisierungsröhren gerollt und nach Zugabe von 10 ml Prähyb-Mix für 2 h bei 65°C unter ständigem Rotieren prähybridisiert. Bevor der Prähyb-Mix durch 10 ml Hyb-Mix ersetzt wird, werden dem Hyb-Mix 1 µl, bei 95°C für 10 min denaturierte Lachsspermien-DNA zugesetzt. Schließlich wird die radioaktiv markierte DNA-Sonde hinzupipettiert und über Nacht bei 65°C im Hybridisierungsofen hybridisiert.

Die Nylonmembranen werden kurz mit 2x SSC-Lösung gespült und dann mit den Waschlösungen 1-3 gewaschen. Das sequentielle Waschen erfolgt dabei in Abhängigkeit der verwendeten DNA-Sonde, wobei die Bedingungen von 2,0x SSC-Lösung mit 0,1 % SDS für 10 min bei Raumtemperatur (niedrige Stringenz) bis 0,1x SSC-Lösung mit 0,1 % SDS für 10-20 min bei 65°C (hohe Stringenz) variieren.

Die Autoradiographie erfolgt jeweils mit Fuji RX-Filmen und CAWO SE6 Verstärkerfolien bei -70°C.

In Tabelle 3 sind die Waschbedingungen und Expositionszeiten für den Zoo-Blot und den Northern-Blot dargestellt.

**Tab. 3:** Waschbedingungen und Expositionszeiten von Zoo- und Northern-Blots

	Waschlösung 1 (2,0x SSC, 0,1 % SDS)	Waschlösung 2 (0,5x SSC, 0,1 % SDS)	Waschlösung 3 (0,1x SSC, 0,1 % SDS)	Expositionszeit der Autoradiogramme (-70°C)
Zoo-Blot	10 min, 25°C	10 min, 25°C	5 min, 25°C	2 Tage
Northern-Blot	10 min, 25°C	10 min, 25°C	10 min, 60°C	2 Tage

Sequentielles Waschen nach Zoo- und Northern-Blot-Hybridisierung sowie Expositionszeiten der Autoradiogramme.

## 3 ERGEBNISSE

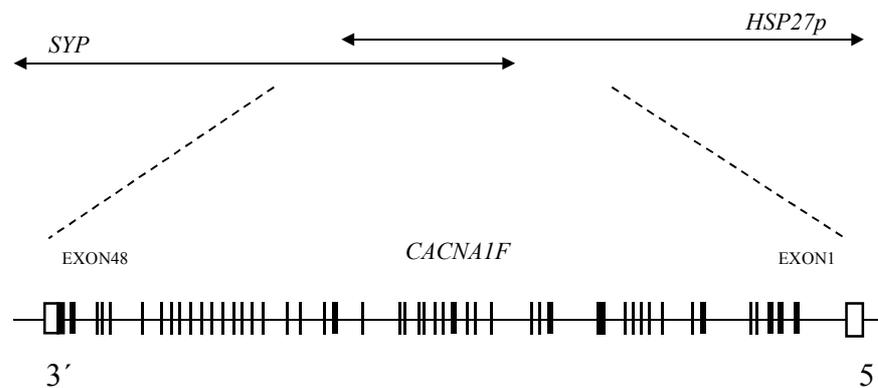
### 3.1 Das *CACNA1F*-Gen

Im Rahmen der Analyse eines den *SYP*-Locus enthaltenden Cosmids (Syp-A1236-Cosmid) konnten bereits 1997 zentromerwärts des *SYP*-Locus 16 Exons vom 3'-Ende eines neuen Gens identifiziert werden, das als *CACNA1F* bezeichnet wurde und welches Homologien zu  $\alpha_1$ -Untereinheiten von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vom L-Typ aufwies. Expressionsstudien mit Proben aus diesem 3'-Ende (Exon 6-12) wiesen auf eine Expression ausschließlich im Skelettmuskel hin (Fisher *et al.*, 1997).

#### 3.1.1 Klonierung des *CACNA1F*-Gens

Im Rahmen einer kompletten Sequenzierung von 700 kb genomischer DNA zwischen den Markern DXS722 und DXS1331 konnte kürzlich die gesamte Struktur des *CACNA1F*-Gens aufgeklärt werden (Strom *et al.*, 1998).

Eine Region von 28 kb umfassend, liegt *CACNA1F* auf den Cosmiden P037 und M0111. Das 3'-Ende befindet sich 5 kb proximal vom *SYP*-Gen, das 5'-Ende 600 bp distal des *HSP27*-Pseudogens auf Xp11.23.



**Abb. 6:** Physikalische Kartierung von *CACNA1F*: Das Gen wurde auf den Cosmiden LLNLc110P037 und LLNLc110M0111 durch Sequenzierung und mit Hilfe von Exon-Vorhersageprogrammen identifiziert. Es wird von Synap-tophysin (*SYP*) und einem HSP-Pseudogen (*HSP27p*) flankiert.

Mit Hilfe computergestützter Suche in Sequenzdatenbanken wurden für das putative 3'-Ende des Gens zwei ESTs (AA019974, AA317815) gefunden, die aus retinalem Gewebe stammten. Eine RT-PCR mit Primern von zwischen den einzelnen  $\alpha_1$ -Untereinheiten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ nicht konservierten Exons und retinaler cDNA als Matritze sowie

die anschließende Sequenzierung der überlappenden PCR-Produkte ergaben 48 Exons mit einer codierenden Sequenz von 5901 Nukleotiden. Diese codieren für ein Protein von 1966 Aminosäuren Länge und einem Molekulargewicht von 219,5 kDa. 44 der 48 Exons wurden auch durch das Exon-Vorhersageprogramm GENSCAN, 43 durch GRAIL und 36 durch GENEFINDER vorhergesagt. Bis auf die Spleiß-Akzeptorstellen von Intron 2, 19 und 34 entsprechen alle Exon-/Intronübergänge der GT-AG-Regel (Padgett *et al.*, 1986).

**Tab. 4:** Größen der Exons und Introns und Spleiß-Sequenzen des *CACNA1F*-Gens

Exon	Nukleotid-Nr.	bp	3'-Spleißstelle*	5'-Spleißstelle*	Intron (bp)
1	1-25	25	-	AAGgtgagagaatcc	1358
2	26-275	249	ttctccatatagACA	GAA <b>g</b> catcctggaag	371
3	276-381	105	tgtccacctgagGCC	CTGgtaaggcccgcc	213
4	382-521	139	tcccaccctagGAG	CGGgtgcgctctgc	241
5	522-664	142	ctcccccatcagGCT	CGAgtgagtggcaca	95
6	665-817	152	ccctccccgcagGCC	CCGgttagtctgccc	1773
7	818-1014	196	gtcttcctgcagACA	TGGgtgaggtggact	112
8	1015-1118	103	ttctctccccagATG	TGGgtgagggaccta	909
9	1119-1276	157	ctcctccctcagGGA	TTGgttctatggctg	268
10	1277-1369	92	ctctccctgcagGGC	ATGgtgggggtccag	108
11	1370-1463	93	ccttgccctacagCCA	CCTgtgagggccccc	166
12	1464-1490	26	cttctttttcagAAA	CTGgtgagttgggaa	148
13	1491-1650	160	cccttccccccagCCG	AGGgtacacccccag	923
14	1652-1877	225	ctctccccacagAGT	CAGgtttgtattagg	1628
15	1878-2085	207	tttctgctgcagACA	CAGgtaggatctgga	91
16	2086-2206	120	tcccacccccagATC	ACTgtatccttggag	115
17	2207-2288	81	agctcatcccagACA	CGGgtgagatctggc	1442
18	2289-2334	45	ttcctcgcacagGGA	CTGgtgagttagatg	511
19	2335-2383	48	tctgtcctcagGTG	GAG <b>g</b> caagtgggag	683
20	2384-2543	159	ctctggtgccagACA	CCCgtgagtgccgga	184
21	2544-2673	129	ccctctccacagGCT	CATgtgagcctttgg	380
22	2674-2733	59	ctcacacccccagATT	AAGgtgactaatggg	147
23	2734-2840	106	tctgtccccagATG	CCAgttaagtgcagaga	87
24	2841-2928	87	ccccttccccagCTC	AAGgtaacccccacc	450
25	2929-3036	107	gggtgccccgcagCAT	AAGgtggggcaaaca	91
26	3037-3089	52	tcctctctacagGGG	CAAgtgagtgcccaa	1231
27	3090-3236	146	gcacatccacagGGG	TGCgtgagggacagg	839
28	3237-3438	201	tggctcccacagACT	CAGgtgacctctgac	98
29	3439-3597	158	cctggtatgcagCGT	CAGgtctgagatccc	817
30	3598-3708	110	tttctcctgcagCAC	AAGgtggccccctt	257
31	3709-3792	83	tcctacttgcagCAT	AATgtgagaactggc	825
32	3793-3813	20	atctccctccagAAT	GAGgtagcccaccct	179
33	3814-3942	128	ccctcacccccagAGC	CAGgtaatcccctac	359
34	3943-4008	65	ccatccctatagGCC	CAG <b>g</b> caagtggggac	254
35	4009-4100	91	atgtgtccacagATG	CAGgtgacatctact	417
36	4101-4260	159	gactcccaccagGTG	CTGgtgagaaccatt	230
37	4261-4388	127	actggccccacagATC	CAAgtatgccctcta	279

38	4389-4485	96	caactcctccagGGG	AAGgtctgtgcacct	187
39	4486-4588	102	tcgtgtttgcagAGA	AAGgtgtaggggagg	259
40	4589-4690	101	cctccaacgcagGGA	ACGgtgagctatccc	182
41	4691-4821	130	ccttgccccctagAGG	CAGgtcttcggggca	236
42	4822-4953	131	ccacccccacagGCT	AAAgtggggacaagt	578
43	4954-5123	169	gactctccacagGCC	CAGgtattatcaagt	1402
44	5124-5231	107	ccctttccccagGAG	TCGgtacactggcca	150
45	5232-5359	127	ccaccacacagGCT	CAGgtgagagcaggg	105
46	5360-5472	112	accacccccagGTC	CAGgtgaggctgtgg	699
47	5473-5670	197	attctggctcagGGT	GCTgtgagtccagag	249
48	5671-5974	303	ctgtgccccccagGTG	-	-

\*Die codierenden Sequenzen sind in Groß-, die Intronsequenzen in Kleinbuchstaben wiedergegeben.

Die Spleiß-Akzeptorstellen von Intron 2, 19 und 34, die nicht der GT-AG-Regel folgen, sind fett markiert.

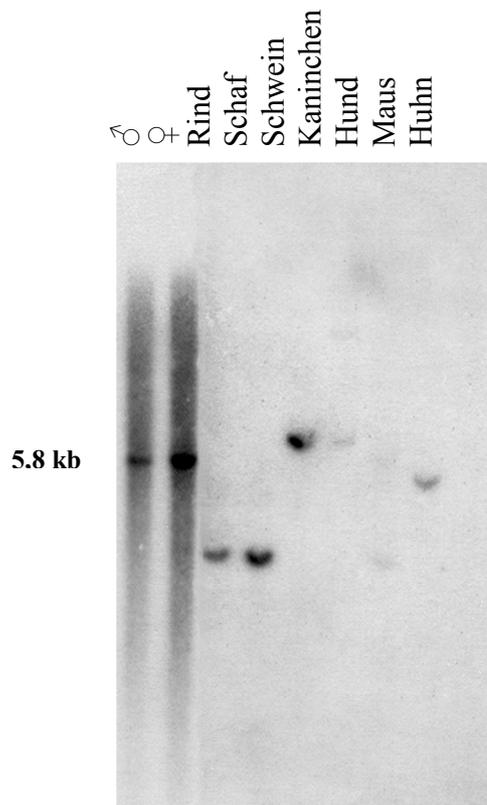
Mit Hilfe einer 5'-RACE-PCR konnte die 5'-UTR um 62 bp jenseits des ersten ATG erweitert werden, das nicht mit der Consensus-Sequenz für den Translationsstart übereinstimmt (Kozak, 1987). Die 3'-RACE-PCR ergab eine 3'-UTR von 73 Nukleotiden mit einem Polyadenylierungssignal (AATAA) 25 bp jenseits des Stop-Codons. Somit umfasst die gesamte cDNA-Sequenz 6036 bp mit einem offenen Leserahmen von 5901 bp (1966 AS) sowie einer 5'-UTR von 62 bp und einer 3'-UTR von 73 bp (EMBL: AJ224874).

Die gesamte Aminosäuren- und Nukleotidsequenz des *CACNA1F*-Gens ist im Anhang dieser Arbeit angegeben.

### 3.1.2 Expressionsmuster von *CACNA1F*

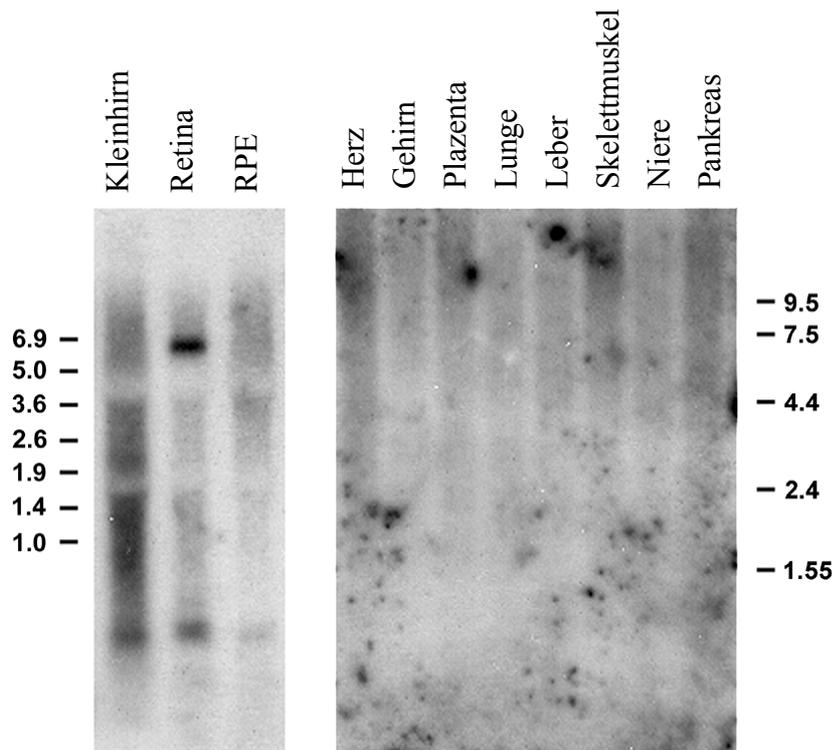
Einer der beiden cDNA-Klone aus dem 3'-Ende (jm8-13) wurde sequenziert und ergab eine zwischen den einzelnen  $\alpha_1$ -Untereinheiten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ weniger konservierte Sequenz als andere Bereiche des Gens. Deswegen wurde daraus mittels RT-PCR aus Retina-cDNA ein 584 bp großes Fragment amplifiziert, das als Probe für Expressionsstudien dienen sollte.

Zunächst wurde die Probe unter wenig stringenten Bedingungen mit einem Southern-Blot von *EcoRI* verdauter genomischer DNA aus Mensch sowie verschiedenen Tierarten hybridisiert. Dieser sog. „Zoo-Blot“ ergab lediglich eine einzelne Bande bei jeder Spezies, was darauf hinweist, dass keine Kreuzhybridisierung mit anderen Genen für  $\alpha_1$ -Untereinheiten besteht. Ihre Größe von 5,8 kb beim Menschen entspricht der des erwarteten *EcoRI*-Restriktionsfragments.



**Abb. 7:** Evolutionäre Konservierung von *CACNA1F*. Die Zoo-Blot Hybridisierung mit der Probe jm8-13 (586 bp) ergab nur eine Bande pro Spezies. Ihre Größe von 5,8 kb entspricht der des erwarteten *EcoRI*-Restriktionsfragments.

Die Hybridisierung eines Northern-Blot mit derselben Probe ergab ein starkes Signal von ca. 6,3 kb ausschließlich in Retina-Gewebe, nicht jedoch in retinalem Pigmentepithel (RPE), Kleinhirn, Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Niere, Pankreas oder Skelettmuskel. Die zuvor beschriebene Expression im Skelettmuskel beruhte vermutlich auf der Wahl einer Probe, die einen zwischen den verschiedenen  $\alpha_1$ -Untereinheiten der bekannten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle stark konservierten Bereich enthielt.



**Abb. 8:** Analyse der *CACNA1F*-Expression in humanen Geweben mittels Northern-Blot. Nach einer Expositionszeit von zehn Tagen ist eine 6,3 kb Bande nur in retinalem Gewebe zu erkennen, nicht aber im Kleinhirn, retinalem Pigmentepithel, Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere oder Pankreas.

Die Gewebsspezifität wurde ferner dadurch bestätigt, dass die RT-PCR mit *CACNA1F*-spezifischen Primern nur aus retinaler cDNA, nicht jedoch z. B. aus cDNA von Blutzellen nachweisbare Fragmente lieferte.

Mit Hilfe der *in situ* Hybridisierung konnte zudem die genaue Lokalisation der Expression von *CACNA1F* innerhalb der Retina aufgezeigt werden. Die RNA *in situ* Hybridisierung der jm8-13 Gegensinn-Ribosonde mit fixierten Maus-Augenschnitten wies darauf hin, dass eine transkribierende Aktivität in der inneren Körnerschicht (INL), die aus den Horizontal-, Bipolar- und amakrinen Zellen besteht, sowie in der äußeren Körnerschicht (ONL) mit den Zellkernen der Photorezeptoren vorhanden ist (durchgeführt von Ch. Sauer und B. H. F. Weber, Institut für Humangenetik, Würzburg).

### 3.1.3 Vergleichende Sequenzanalyse

Datenbankanalysen der *CACNA1F*-Sequenz ergaben Homologien von 55-62 % zwischen *CACNA1F* und der  $\alpha_1$ -Untereinheit von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vom L-Typ, zu denen die  $\alpha_{1D}$ -,  $\alpha_{1S}$ - und die  $\alpha_{1C}$ -Untereinheiten gehören. Einigen Angaben zufolge reicht die Homologie sogar



Geringere Sequenzübereinstimmungen findet man dagegen zwischen den N- und C-terminalen intrazellulären Bereichen sowie den intrazellulären Schleifen zwischen den Domänen I und II sowie II und III.

Dies bestätigt die Annahme, dass *CACNA1F* für eine neue  $\alpha_1$ -Untereinheit eines trans-vers-tubulären (TT), spannungsabhängigen, Dihydropyridin (DHP)-sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal vom L-Typ codiert.

## 3.2 Mutationsanalyse im *CACNA1F*-Gen

Die Exons 1-48 wurden bei den in Tab. 2 aufgeführten Indexpatienten mit inkompletter sowie kompletter *x*/CSNB, ÅIED, ÅIED-verwandtem Phänotyp und *x*/CN mit den im Anhang angegebenen Primerpaaren amplifiziert. Die amplifizierten Fragmente wurden mittels SSCP analysiert. Amplifikate mit auffälligem Laufverhalten wurden anschließend mit dem *forward*- und *reverse*-Primer sequenziert und mit der Wildtyp-Sequenz verglichen. Die Exons 1, 18 und 46 ergaben jeweils kein auswertbares SSCP-Ergebnis und wurden bei Patienten, bei denen sich nach der Analyse der restlichen Exons keine oder nur *missense* Mutationen finden ließen, sequenziert.

### 3.2.1 *CACNA1F*-Mutationsanalyse bei Patienten mit CSNB2

Die DNA-Proben der Indexpatienten aus 21 Familien wurden mittels SSCP-Analyse und Sequenzierung auf Mutationen im *CACNA1F*-Gen hin untersucht. Bei sinnverändernden (*missense*) Mutationen wurden jeweils 120 Kontrollchromosomen mittels SSCP-Analyse auf ein ähnliches Bandenmuster hin überprüft, um häufige, in der Allgemeinbevölkerung verbreitete, Polymorphismen auszuschließen. Schließlich erfolgte die Mutationsuche bei Angehörigen von Indexpatienten, bei denen eine Mutation nachgewiesen werden konnte, um die Cosegregation der Mutation mit der Erkrankung in der Familie zu überprüfen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten 17 verschiedene Mutationen bei 19 Patienten mit CSNB2 identifiziert werden: neun sinnverändernde (*missense*) Mutationen, von denen eine bei zwei Patienten gefunden wurde, sechs sinnentstellende (*nonsense*) Mutationen, von denen ebenfalls eine zweifach auftrat, sowie je eine Insertion und eine Deletion.

**Tab. 5:** *CACNA1F*-Mutationen in Familien mit inkompletter *x*/CSNB

Exon	Mutation	Nukleotidaustausch	Konsequenz	Familie
2	R82X	nt244C→T	Arg→Stop, Pos. 82	CSNBX-03
2	R82X	nt244C→T	Arg→Stop, Pos. 82	CSNBX-04
8	G369D	nt1106G→A	Gly→Asp, Pos.369	CSNBX-02
17	F742C	nt2225T→C	Phe→Cys, Pos. 742	CSNBX-27
21	L849P	nt2546T→C	Leu→Pro, Pos. 849	CSNBX-06
24	R958X	nt2872C→T	Arg→Stop, Pos. 958	CSNBX-14
25	G1007R	nt3019G→A	Gly→Arg, Pos. 1007	CSNBX-26
27	R1049W	nt3145C→T	Arg→Met, Pos. 1049	CSNBX-13
27	L1045(insC)	nt3133(insC)	<i>frameshift</i>	CSNBX-22
30		nt3658(del12)	<i>in-frame</i> Deletion	CSNBX-05
33	R1288X	nt3862C→T	Arg→Stop, Pos. 1288	CSNBX-25
35	Q1348X	nt4042C→T	Gln→Stop, Pos. 1348	CSNBX-21
35	L1364H	nt4091T→A	Leu→His, Pos. 1364	CSNBX-15
38	C1488R	nt4462T→C	Cys→Arg, Pos. 1488	CSNBX-11
38	P1489R	nt4466C→G	Pro→Arg, Pos. 1489	CSNBX-07
38	P1489R	nt4466C→G	Pro→Arg, Pos. 1489	CSNBX-29
39	L1497P	nt4490T→C	Leu→Pro, Pos. 1497	CSNBX-23
41	K1591X	nt4771A→T	Lys→Stop, Pos. 1591	CSNBX-10
46	R1816X	nt5446C→T	Arg→Stop, Pos. 1816	CSNBX-09

### Mutation in Exon 2

Die Mutation R82X in Exon 2 fand sich bei zwei Familien. Es handelt sich hierbei um eine sinnentstellende Mutation, die zu einem stark trunkierten und damit funktionslosen Protein führt. Diese Transition c→t (cga→tga) ist eine häufig zu Mutationen führende Veränderung. Dabei handelt es sich um ein Dinukleotid mit einem Cytosin am 5'-Ende, das über eine Phosphodiesterbindung mit einem Guanin am 3'-Ende verbunden ist. Dieses CpG-Dinukleotid ist in der Säuger-DNA äußerst selten und mutiert leicht, da das Cytosin dazu neigt, methyliert und anschließend zu Thymin desaminiert zu werden. Dieses paart fälschlicherweise mit einem Guanin, woraufhin eine spezifische DNA-Glycosylase diese Fehlpaarung erkennt, das T herauschneidet und gegen ein C austauscht. Dieser Reparaturprozess ist allerdings äußerst ineffizient.

### Mutation in Exon 8

Die sinnverändernde Mutation G369D in Exon 8 liegt im terminalen Bereich des I6-Segments. Es handelt sich hierbei um einen nichtkonservativen Austausch eines zwischen den  $\alpha_1$ -Untereinheiten der einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vom L-Typ (*CACNAIS*, *CACNAID*, *CACNAIC*) konservierten, apolaren Glycins gegen ein sauer hydrophiles Aspartat mit negativ geladener Seitenkette.

### Mutation in Exon 17

Eine sinnverändernde Mutation (F742C) konnte in einer großen belgischen Familie nachgewiesen werden. Anstelle eines konservierten, apolaren, aromatischen Phenylalanins findet sich in Codon 742 im terminalen Bereich des II6-Segments ein neutrales Cystein.

### Mutation in Exon 21

Eine weitere *missense* Mutation (L849P) findet sich an Aminosäureposition 849 in der intrazellulären Schleife zwischen den Segmenten II6 und III1. Es handelt sich um den Austausch eines zwischen den einzelnen  $\alpha_1$ -Untereinheiten nicht konservierten, apolaren Leucins mit großer, aliphatischer verzweigter Seitenkette gegen ein ebenfalls apolares Prolin mit cyclischem Aufbau.

### Mutation in Exon 24

Eine Transition c→t (nt2872: cga→tga) führt zum Auftreten eines Stop-Signals im Codon 958 anstelle eines Arginins. Diese Mutation (R958X) liegt in Exon 24 im stark konservierten III4-Segment.

### Mutation in Exon 25

Im ebenfalls hoch konservierten III5-Segment findet sich eine weitere sinnverändernde Mutation (G1007R). Es handelt sich hierbei um den nichtkonservativen Austausch eines apolaren Glycins gegen ein positiv geladenes, basisch hydrophiles Arginin.

### Mutationen in Exon 27

Zu einer Verschiebung des Leserahmens führt die Insertion einer Base in Exon 27 an Position 3133 (nt3133(insC)). Dies hat ein verfrühtes Stop-Codon an Aminosäureposition 1055 zur Folge. Diese Mutation liegt zwischen den Segmenten III5 und III6 in einem we-

niger konservierten Bereich, der zwei kleinere intramembranöse Segmente enthält und für die Selektivität des Ca<sup>2+</sup>-Kanals verantwortlich ist (sog. „Pore-loop“).

Im selben Bereich zwischen Segment III5 und III6 kommt es zu einem nichtkonservativen Austausch eines konservierten Arginins mit positiver Ladung gegen ein apolares Tryptophan mit aromatischer Seitenkette (R1049W).

#### Mutation in Exon 30

In Exon 30 konnte eine 12 bp lange Deletion, die zu keiner Leserahmenverschiebung führt, identifiziert werden. Es resultiert eine Deletion von vier Aminosäuren im IV2-Segment, u. a. eines stark konservierten Phenylalanin- und Threoninrestes.

#### Mutation in Exon 33

In der vierten transmembranen Domäne des Segments IV führt die Transition c→t (nt3862: cga→tga) zum Auftreten eines Stop-Signals anstelle eines Arginins in einem gut konservierten Bereich (R1288X).

#### Mutationen in Exon 35

Zwei weitere Mutationen finden sich in Exon 35 in der sog. „Pore-loop“ zwischen den Segmenten IV5 und IV6. Zum einen handelt es sich abermals um eine sinnentstellende Mutation (Q1348X), bei der ein Glutamin durch ein Stop-Signal ersetzt wird.

Zum anderen findet sich eine sinnverändernde Mutation (L1364H) mit einem nichtkonservativen Austausch eines konservierten, apolaren, verzweigt-kettigen Leucins gegen ein positiv geladenes Histidin mit aromatischer Seitenkette.

#### Mutationen in Exon 38

Sämtliche weiteren Mutationen liegen im C-terminalen, intrazellulären Ende des Proteins. Dazu gehören u. a. zwei benachbart liegende *missense* Mutationen. Bei einer kommt es zum nichtkonservativen Austausch eines ungeladenen Cysteins an konservierter Position gegen ein positiv geladenes Arginin (C1488R). Die zweite Mutation konnte in zwei Familien identifiziert werden. Anstelle eines apolaren cyclischen Prolins findet sich auch in diesem Fall ein positiv geladenes Arginin (P1489R).

### Mutation in Exon 39

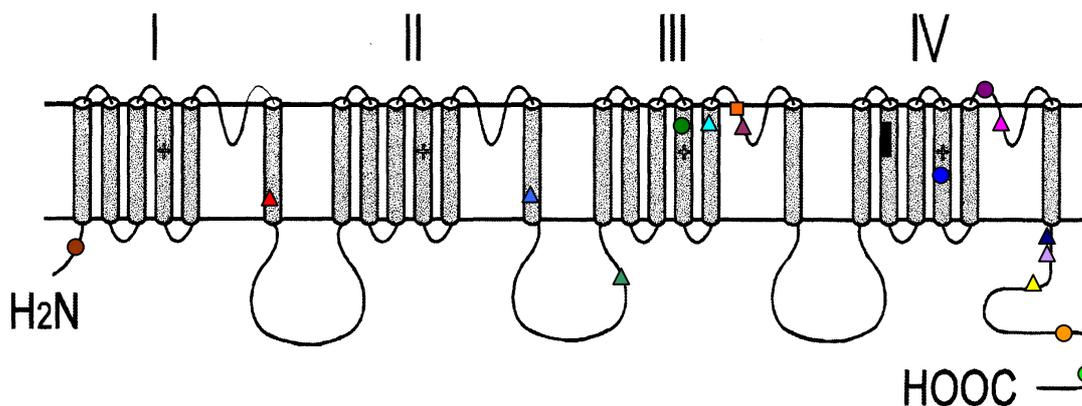
Eine sinnverändernde Mutation vom konservativen Typ konnte am Beginn von Exon 39 beobachtet werden. Hierbei ersetzt ein konservierter, apolarer Prolinrest ein ebenfalls apolares Leucin (L1497P).

### Mutation in Exon 41

In Exon 41 konnte eine weitere *nonsense* Mutation gefunden werden. Hierbei führt der Austausch eines nicht konservierten Lysins in ein Stop-Signal (K1591X) zu einem verkürzten Protein.

### Mutation in Exon 46

Hier hat die Transition  $c \rightarrow t$  (nt5446:  $cga \rightarrow tga$ ), die zu einem Stop-Signal anstelle eines konservierten Arginins führt (R1816X), ebenfalls einen verfrühten Translationsabbruch zur Folge.



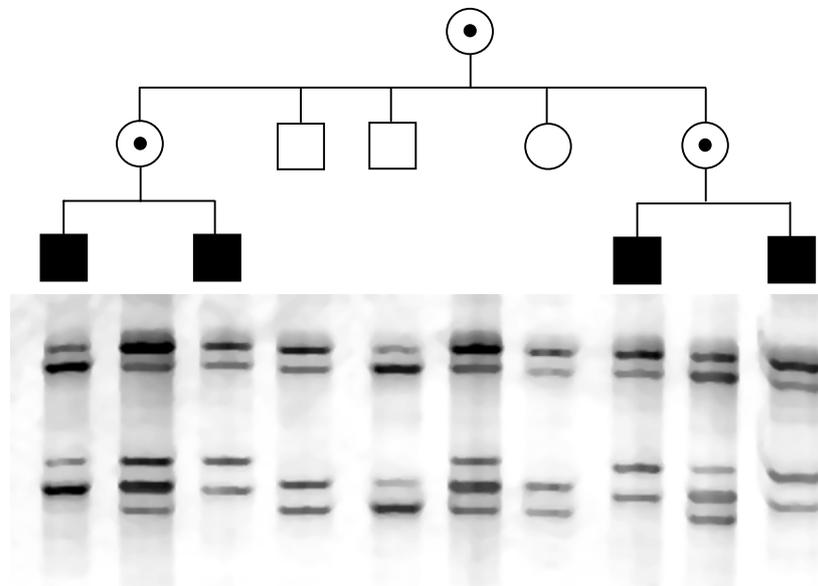
**Abb. 10:** Lokalisation der *CACNA1F*-Mutationen in Familien mit CSNB2. Die gefundenen Mutationen sind durch folgende Signale dargestellt:

● R82X	● R958X	— nt3658(del12)	▲ C1488R	● R1816X
▲ G369D	▲ G1007R	● R1288X	▲ P1489R	
▲ F742C	■ L1045(insC)	● Q1348X	▲ L1497P	
▲ L849P	▲ R1049W	▲ L1364H	● K1591X	

Das Bandenmuster sämtlicher *missense* Mutationen wurde mittels SSCP-Analyse von 120 Kontrollchromosomen auf die Möglichkeit eines in der Bevölkerung häufig vorhandenen Polymorphismus hin untersucht. Dabei ließen sich jedoch bei keiner der gesunden Kontrollpersonen ähnliche Bandenmuster nachweisen.

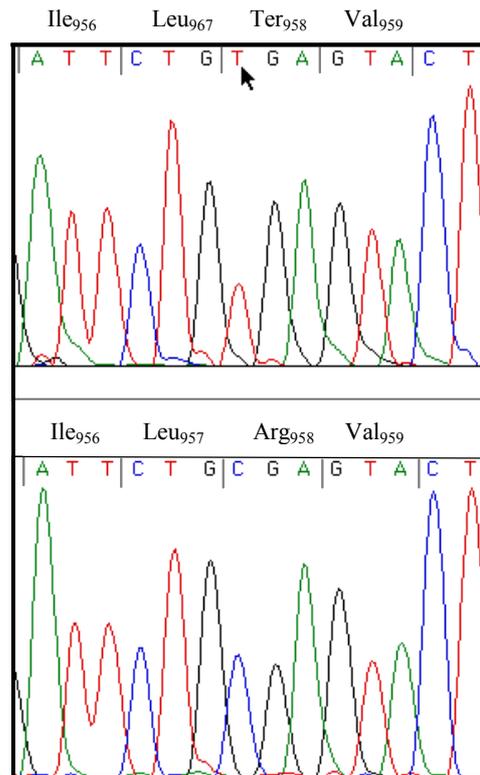
Zum Nachweis einer wahrscheinlichen Pathogenität der gefundenen Mutationen im *CACNA1F*-Gen wurden weitere betroffene bzw. gesunde Verwandte der Indexpatienten sowie mögliche und obligate Überträgerinnen mittels SSCP-Analyse und Sequenzierung untersucht, um eine Cosegregation der Mutation mit der Erkrankung in der Familie identifizieren zu können.

Dies soll am Beispiel der Familie CSNBX-14 veranschaulicht werden. Nachdem beim Indexpatienten #7185 eine aberrante Bande im Exon 24 in der SSCP festgestellt werden konnte, wurden zehn Familienmitglieder aus drei Generationen mittels SSCP-Analyse des Exon 24 auf eine Cosegregation der Mutation mit der Erkrankung in der Familie hin untersucht.



**Abb. 11:** Stammbaum der Familie CSNBX-14. Schwarze Quadranten repräsentieren betroffene Familienmitglieder, obligate Überträgerinnen sind mit einem Punkt gekennzeichnet. Unter dem Stammbaum ist die SSCP-Analyse von Exon 24 des *CACNA1F*-Gens abgebildet. Bei den vier betroffenen Männern ist ein aberrantes Bandenmuster zu erkennen, die obligaten Überträgerinnen zeigen ein heterozygoter Bandenmuster. Das SSCP-Ergebnis zeigt, dass die Mutation mit der Erkrankung in der Familie cosegregiert.

Exon 24 des Indexpatienten #7185 wurde amplifiziert und sequenziert. Die Transition c→t (nt2872: cga→tga) führt zum Auftreten eines Stop-Signals im Codon 958 anstelle eines Arginins. Diese Mutation konnte bei weiteren Betroffenen in der Familie homozygot, bei den obligaten Überträgerinnen heterozygot nachgewiesen werden.



**Abb. 12:** Vergleich der Sequenz des *CACNA1F*-Gens um Codon 958 des Patienten #7185 aus der Familie CSNBX-14 (obere Sequenz) und einer gesunden Kontrollperson (untere Sequenz). Die Transition c→t (nt2872: cga→tga) führt zum Auftreten eines Stop-Signals im Codon 958 anstelle eines Arginins (R958X). Genomische DNA wurde eingesetzt, um Exon 24 des *CACNA1F*-Gens mit intronischen Primern zu amplifizieren und zu sequenzieren. Identische Ergebnisse wurden bei weiteren betroffenen Familienmitgliedern erzielt.

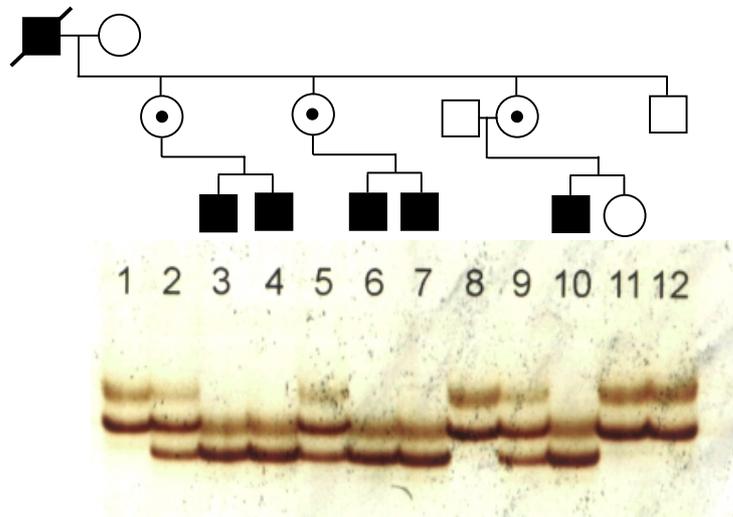
Somit konnte in jeder Familie bis auf in den Familien CSNBX-19 und CSNBX-30 eine Mutation im codierenden Bereich des *CACNA1F*-Gens nachgewiesen werden. In der Familie CSNBX-19 konnte lediglich eine Veränderung im Intron 38 (nt4486-30 G→A) nachgewiesen werden.

### 3.2.2 *CACNA1F*-Mutationsanalyse bei Patienten mit ÄIED-verwandtem Phänotyp

Kopplungsstudien, die für die ÄIED-verwandte Form eine Lokalisation auf Xp11 in enger Nachbarschaft zu den Markern DXS255, *TIMPI*, DXS146 und DXS14 in Aussicht gestellt hatten (Schwartz und Rosenberg, 1991; Glass *et al.*, 1993), sowie klinische und elektrophysiologische Untersuchungen hatten immer wieder die Frage aufgeworfen, ob es sich bei CSNB2 und der ÄIED-verwandten Form um allelische Erkrankungen handeln könnte, die durch Mutationen in demselben Gen verursacht werden. Einen Beitrag zur Klärung dieser Frage sollte die Analyse von DNA-Proben eines Patienten aus einer Familie mit ÄIED-verwandtem Phänotyp sowie eines sporadischen Falles aus Holland liefern.

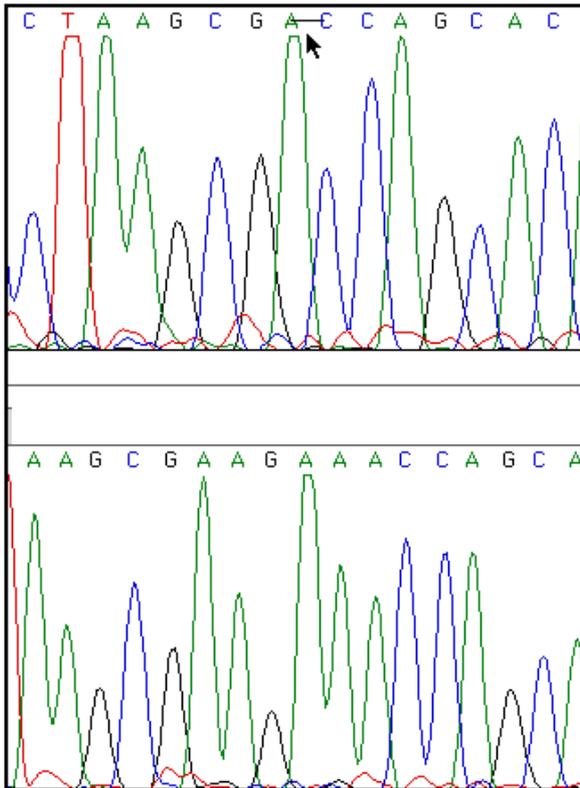
Bei dem Indexpatienten #3441 (ÄIED-like-01), dessen Familie zuvor in der Literatur beschrieben worden war (Carlson *et al.*, 1991), ergab die Sequenzierung einer Bande mit in

der SSCP veränderten Laufverhalten eine 5 bp Deletion im Exon 2 (nt151(del5)), die zu einem verfrühten Stop-Codon an Aminosäureposition 117 führt. Diese Mutation im N-terminalen, intrazellulären Ende des Proteins zeigt in der SSCP eine Cosegregation mit der Erkrankung in der Familie.



**Abb. 13:** Stammbaum der Familie ÅIED-like-01. Schwarze Quadranten repräsentieren betroffene Familienmitglieder, obligate Überträgerinnen sind mit einem Punkt gekennzeichnet. Unter dem Stammbaum ist die SSCP-Analyse von Exon 2 des *CACNA1F*-Gens abgebildet. Die fünf betroffenen Männer zeigen ein aberrantes Bandenmuster, während die obligaten Überträgerinnen ein heterozygoten Bandenmuster aufweisen. Das SSCP-Ergebnis zeigt, daß die Mutation mit der Erkrankung in der Familie cosegregiert. (Die SSCP-Analyse wurde freundlicherweise von Anne Ratala, Finnland, zur Verfügung gestellt.)

Auch in diesem Fall wurde Exon 2 des Indexpatienten #3441 sowie weiterer betroffener Familienmitglieder und Überträgerinnen sequenziert.



**Abb. 14:** Vergleich der Sequenz des *CACNA1F*-Gens um Codon 51 des Patienten #3441 aus der Familie ÅIED-like-01 (obere Sequenz) und einer gesunden Kontrollperson (untere Sequenz). Die 5 bp Deletion im Exon 2 (nt151(del5), mit einem Pfeil markiert) führt zu einem verfrühten Stop-Codon an Aminosäureposition 117. Identische Ergebnisse wurden bei weiteren betroffenen Familienmitgliedern erzielt.

Bei einem sporadischen Probanden (#14939) konnte ebenfalls in Exon 2 eine sinnverändernde Mutation identifiziert werden (C74R). Hierbei handelt es sich um den nichtkonservativen Austausch eines ungeladenen Cysteins an konservierter Position gegen ein positiv geladenes Arginin, der in keinem der 120 Kontrollchromosomen nachgewiesen werden konnte.

**Tab. 6:** *CACNA1F*-Mutationen in Familien mit ÅIED-verwandtem Phänotyp

Exon	Mutation	Nukleotidaustausch	Konsequenz	Familie
2		nt151(del5)	<i>frameshift</i>	ÅIED-like-01
2	C74R	nt220T→C	Cys→Arg, Pos. 220	ÅIED-like-02

### 3.2.3 *CACNA1F*-Mutationsanalyse bei Patienten mit ÅIED

Der Locus für die klassische ÅIED-Familie konnte in einer ersten Kopplungsstudie zwischen die Marker DXS7 und DXS72 in der Perizentromerregion mit einem höchsten Lod-Score für DXS255 auf Xp11.22 eingegrenzt werden (Alitalo *et al.*, 1991). Weitere Kopp-

lungsanalysen sind bislang nicht erfolgt, so dass bis heute nicht ausgeschlossen werden konnte, dass CSNB2 und ÅIED durch Mutationen in demselben Gen verursacht werden.

Die DNA-Probe (#3286) eines Abkömmlings der 1964 von Forsius und Eriksson beschriebenen Originalfamilie (Forsius und Eriksson, 1964) wurde deswegen vollständig sequenziert. Es konnte jedoch bis auf auch in der Allgemeinbevölkerung auftretende Polymorphismen in keinem der 48 Exons eine Mutation nachgewiesen werden.

### 3.2.4 *CACNA1F*-Mutationsanalyse bei Patienten mit CSNB1

Anhand der Mutationsanalyse bei Patienten, die zuvor unter Verwendung klinischer und elektrophysiologischer Methoden mit der kompletten Form der *x*/CSNB (CSNB1) diagnostiziert wurden, sollte bestätigt werden, dass diese Form nicht durch Mutationen im *CACNA1F*-Gen verursacht wird.

Die DNA-Proben der vier Indexpatienten wurden ebenfalls mittels SSCP-Analyse und Sequenzierung auf Mutationen im *CACNA1F*-Gen hin untersucht. Nach Analyse aller 48 Exons konnte jedoch in keiner der Familien eine Mutation in der codierenden Sequenz des Gens nachgewiesen werden. In einer Familie (CSNBX-31) konnten jedoch drei ebenfalls in der Bevölkerung auftretende Polymorphismen entdeckt werden.

Eine fünfte Familie (CSNBX-01) wurde aufgrund einer Rekombination mit dem CSNB2-Locus nicht mehr untersucht (Maurer *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

### 3.2.5 *CACNA1F*-Mutationsanalyse bei Patienten mit *x*/CN

Erste Kopplungsstudien (Cabot *et al.*, 1998) ergaben eine mögliche Lokalisation des *NYS1*-Gens auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms, einer Region, in der auch die Genorte für CSNB1, CSNB2, ÅIED sowie die ÅIED-verwandte Form liegen bzw. vermutet werden. Einen weiteren Aufschluss sollte die Untersuchung einer DNA-Probe eines Patienten aus einer großen Familie mit *x*/CN liefern. Die komplette Sequenzierung aller 48 Exons des *CACNA1F*-Gens ließ jedoch keine Mutationen im codierenden Bereich erkennen.

### 3.2.6 Sequenzvarianten im *CACNA1F*-Gen

Im Rahmen der Mutationsanalyse wurden sieben DNA-Polymorphismen identifiziert, von denen fünf in der codierenden und zwei in der nichtcodierenden Region liegen.

**Tab. 7:** Sequenzvarianten im *CACNA1F*-Gen

Exon/Intron	Polymorphismus	Nukleotid-Austausch	Konsequenz	Häufigkeit (%)
Intron 8	nt1118+6(G/A)	G oder A, Pos. 1118+6		8/16 (50,0)
Exon 13	nt1523(G/A)	G oder A, Pos. 1523	Arg oder Gln, Pos. 508	2/21 (9,5)
Exon 14	nt1809(C/T)	C oder T, Pos. 1809	stille Mutation (G603G)	7/14 (50,0)
Intron 21	nt2673+3(G/A)	G oder A, Pos. 2673+3		1/15 (6,7)
Exon 28	nt3276(G/A)	G oder A, Pos. 3276	stille Mutation (H1092H)	11/21 (52,4)
Exon 29	nt3512(G/C)	G oder C, Pos. 3512	Arg oder Pro, Pos. 1171	1/21 (4,8)
Exon 48	nt5756(G/A)	G oder A, Pos. 5756	Arg oder His, Pos. 1919	2/21 (9,5)

Die Polymorphismen sind dabei über das gesamte Gen verteilt. Sie befinden sich in der codierenden Sequenz sowohl an konservierten (nt1523(G/A)) als auch an nicht konservierten Positionen (nt1809(C/T), nt3276(C/T), nt3125(G/C), nt5756 (G/A)). Es handelt sich zum einen um stille Mutationen (G603G, H1092H), zum anderen konnten nicht synonyme Substitutionen (R508Q, R1171P, R1919H) bei einzelnen bzw. mehreren Patienten nachgewiesen werden.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Diskussion der Fehlermöglichkeiten

#### 4.1.1 Sensitivität und Spezifität der verwendeten Methoden

Ausgangsmaterial für die Mutationssuche in dieser Arbeit waren mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmente. Da die Sequenz des *CACNA1F*-Gens größtenteils bekannt war, konnten für alle Exons adäquate Primerpaare entworfen werden.

Die SSCP-Analyse selber gilt als einfach und empfindlich (Hayashi, 1992; Michaud *et al.*, 1991), eignet sich jedoch nur für Fragmente bis zu ca. 300 bp und zeigt dabei weder Art noch Position einer nachgewiesenen Mutation an (Sheffield *et al.*, 1993). Die Sensitivität der SSCP hängt dabei v. a. von der Größe des untersuchten PCR-Produktes ab. Die optimale Fragmentgröße, bei der über 90 % der Sequenzveränderungen entdeckt werden, beträgt ca. 150 bp (Sheffield *et al.*, 1993), während für kleinere und größere Fragmente die Wahrscheinlichkeit zunehmend sinkt. Betrachtet man den Austausch einer einzelnen Base, spielt die Art der Mutation (Transition oder Transversion) keine Rolle für die Entdeckung, wichtiger ist schon die Position der Basensubstitution. Auch Veränderungen, welche die Mutation flankierende Sequenzen betreffen oder die aus der Wahl mehrerer unterschiedlicher Primerpaare resultieren, können die Sensitivität insofern verändern, als dass sie mit der die Mutation enthaltenden Region Sekundärstrukturen ausbilden können. So sollte man zur Optimierung der SSCP mit mehr als einem Primerpaar für die jeweilige untersuchte Region arbeiten (Sheffield *et al.*, 1993). Oft ist auch die Sensitivität für einen Strang der DNA höher als für den komplementären Strang. Um bestmögliche Bedingungen für die Entdeckung möglichst vieler Mutationen zu schaffen, haben sich folgende Möglichkeiten bewährt:

- Verwendung einer optimalen Polyacrylamidgelmatrix, bei der durch chemische Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Vernetzer (*Crosslinker*, z. B. N,N'-Methylenbisacrylamid) ein klares, durchsichtiges Gel entsteht. Die Porengröße lässt sich dabei durch die Totalacrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad (Crosslinking) exakt und reproduzierbar einstellen.  
Bei hohen und niedrigen C-Werten erhält man große Poren, das Optimum liegt etwa bei C = 5 % (Westermeier, 1990, S.11).
- Verwendung von Fragmenten um 150 bp

- Austestung verschiedener Versuchsbedingungen, wie z. B. Zusatz von 5 bzw. 10 % igem Glycerin (Orita *et al.*, 1989b), Veränderung der Salzkonzentration oder Änderung der Temperatur (4°C, 20°C).

Falsch positive Resultate sind dabei selten (Gaidano *et al.*, 1991; Sarkar *et al.*, 1992).

Die tatsächliche Sensitivität der SSCP aus den zahlreichen veröffentlichten Angaben (Condie *et al.*, 1993; Gaidano *et al.*, 1991; Kishimoto *et al.*, 1992; Michaud *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 1990) abzuschätzen, ist jedoch schwierig, da jeweils unterschiedliche Verfahren angewendet wurden. Im allgemeinen gilt für die Sensitivität:

- < 200 bp ~ 90 %
- 300-350 bp ~ 80 %

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Amplifikaten lag die Fragmentlänge in 16 von 46 Fällen unter bzw. bei ca. 200 bp. Bei fünf der Amplifikaten ergab sich eine Länge von 300-350 bp, während sämtliche anderen eine Länge von 200-300 bp aufwiesen (siehe Anhang). Somit kann in dieser Arbeit von einer Sensitivität von ca. 80-90 % bei den mit SSCP untersuchten Amplifikaten ausgegangen werden.

Um auszuschließen, dass eine Bande mit verändertem Laufverhalten in der SSCP durch ein verunreinigtes PCR-Produkt zustande gekommen ist, wird zur Sequenzierung eines solchen „Shifts“ jeweils ein neu amplifiziertes PCR-Produkt verwendet.

Aus diesen Gründen wird ersichtlich, weshalb trotz oft eindeutiger klinischer Diagnose in einigen Fällen keine Mutation gefunden werden kann.

## 4.2 Das *CACNA1F*-Gen

Die Sequenzierung von 700 kb genomischer DNA zwischen den Markern DXS722 und DXS1331 auf Xp11.23 lieferte die gesamte genomische Sequenz des *CACNA1F*-Gens, dessen C-terminaler Anteil schon zuvor beschrieben worden war (Fisher *et al.*, 1997; Nyakatura *et al.*, 1996). Die Anwendung von Exon-Vorhersageprogrammen, die Suche in EST-Datenbanken und der Einsatz der RT-PCR führten zur Identifizierung eines 6,3 kb großen Transkripts mit 48 Exons und einer codierenden Sequenz von 5901 Nukleotiden, die als Genprodukt ein Protein von 1966 Aminosäuren Länge liefern. Expressionsstudien mit einer Probe aus einem wenig konservierten Bereich des Gens wiesen auf eine Expression ausschließlich in retinalem Gewebe hin.

Da mehrere Spleißvarianten beobachtet werden konnten, sind mehrere Isoformen mit unterschiedlicher Aminosäurelänge zu erwarten (Bech-Hansen *et al.*, 1998).

### 4.2.1 Struktur und Funktion von *CACNA1F*

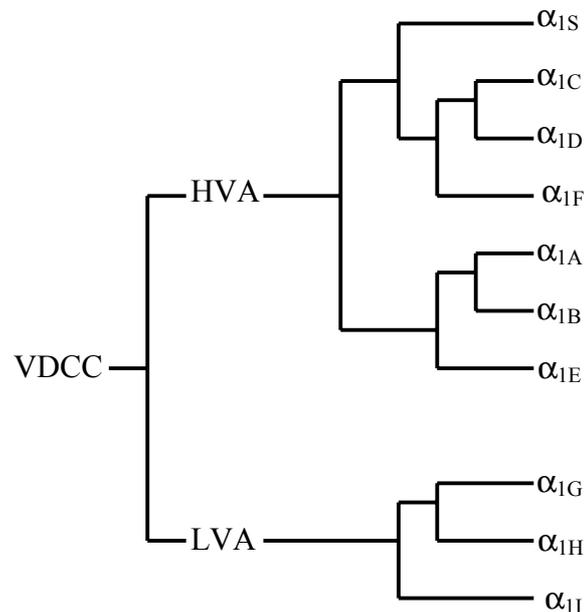
Datenbankanalysen der *CACNA1F*-Sequenz ergaben Homologien von 55-62 % zwischen *CACNA1F* und  $\alpha_1$ -Untereinheiten von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vom L-Typ, v. a. mit der Sequenz von *CACNA1D* (~ 70 % Homologie). Das Vorhandensein wichtiger Strukturmerkmale von  $\alpha_1$ -Untereinheiten DHP-sensitiver  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle sowie die ausgeprägte Homologie bestätigten *CACNA1F* als ein X-chromosomales Gen, das für eine neue  $\alpha_1$ -Untereinheit spannungsabhängiger  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ codiert.

#### 4.2.1.1 Spannungsabhängige $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle („voltage-dependent $\text{Ca}^{2+}$ -channels“)

Ionenkanäle gehören zu einer großen Familie von Makromolekülen, deren Aufgabe die Kontrolle und Aufrechterhaltung elektrischer Membranpotentiale, die Sekretion von Hormonen und Neurotransmittern sowie die Signaltransduktion beinhalten. Die Analyse der physiologischen Prozesse, die an der Kanalfunktion beteiligt sind, sowie der Sekundärstruktur einzelner Kanäle war die Basis dafür, die Ionenkanäle in verschiedene Unterfamilien einzuteilen. Die spannungsabhängigen Kanäle stellen eine dieser Unterfamilien dar. So sind die spannungsabhängigen  $\text{K}^+$ -,  $\text{Na}^+$ - sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle evolutionär verwandt und teilen sich eine grundlegende Struktur von sechs transmembranen Segmenten (S1-S6), die eine Domäne darstellen. Diese kommt beim  $\text{K}^+$ -Kanal nur einmal, in den  $\alpha_1$ -Untereinheiten der  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle jedoch viermal vor (Bulman, 1997).

Spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle („voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -channels“/VDCC) sind heteromultimere Proteine, die aus der transmembranen, den eigentlichen Kanal formenden  $\alpha_1$ -Untereinheit sowie mehreren regulatorischen Untereinheiten ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha_2\delta$ ) bestehen (Hofmann *et al.*, 1994). Sie werden durch Membrandepolarisierung aktiviert und vermitteln den schnellen und selektiven Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Sinnegger *et al.*, 1997). Wichtige physikalische Prozesse, die durch den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom kontrolliert werden, sind Muskelkontraktion, Fortleitung von Aktionspotentialen, Freisetzung von Neurotransmittern und Hormonen, Regulierung der Genexpression sowie Zellteilung und Zelltod. Die Entwicklung unterschiedlicher  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Zellfunktionen lief dabei parallel mit der Entwicklung verschiedener  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Typen, wobei die Eigenschaften jedes Kanals für seine jeweilige Funktion optimiert wurden und durch die jeweils unterschiedlichen  $\alpha_1$ -Untereinheiten ausgedrückt werden (Dunlap *et al.*, 1995).

Die VDCCs werden anhand des zur Aktivierung benötigten Membranpotentials in zwei Gruppen aufgeteilt:



**Abb. 15:**  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Stammbaum. Der Vergleich der  $\alpha_1$ -Untereinheiten basiert auf dem Alignment der Primärstruktur der membranspannenden Regionen. Die **high voltage-activated** Kanäle lassen sich in DHP-sensitive ( $\alpha_{1S}$ ,  $\alpha_{1C}$ ,  $\alpha_{1D}$ ,  $\alpha_{1F}$ ) und nicht-DHP-sensitive ( $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ ,  $\alpha_{1E}$ ) Typen aufteilen. Zu den **low voltage-activated** Kanälen gehören die  $\alpha_{1G}$ -,  $\alpha_{1H}$ - und  $\alpha_{1I}$ -Untereinheiten.

Die sog. *LVA* (*low voltage-activated*)-Kanäle werden v. a. im Vorhof des Herzens exprimiert. Sie werden bei niedrigem Membranpotential aktiviert ( $\sim -60$  mV), schnell spannungsunabhängig inaktiviert (*transient*) und haben eine geringe Leitfähigkeit von  $\sim 8$  pS (*tiny*). Diese sog. T-Typ Kanäle sind möglicherweise in Schrittmacheraktionen des Sinusknoten und in die Fortleitung von Aktionspotentialen involviert (Hofmann *et al.*, 1999).

Bislang konnten drei  $\alpha_1$ -Untereinheiten vom T-Typ identifiziert werden. Die  $\alpha_{1G}$ -Untereinheit wird v. a. im Gehirn exprimiert (Perez-Reyes *et al.*, 1998), ebenso wie die  $\alpha_{1I}$ -Untereinheit (Klugbauer *et al.*, 1999a), während die  $\alpha_{1H}$ -Untereinheit im Herzen, in der Niere und in der Leber exprimiert wird (Cribbs *et al.*, 1998). LVA-Kanäle bestehen evtl. nur aus der  $\alpha_1$ -Untereinheit, die den Spannungsmesser, den Selektivitätsfilter, die Pore sowie die Bindestelle für die T-Typ Kanal Blocker Mibefradil und Kurtoxin enthält und nicht von den bislang bekannten  $\beta$ -,  $\gamma$ - oder  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten moduliert wird. Dies schließt jedoch nicht aus, dass der T-Typ Kanal neben der  $\alpha_1$ -Untereinheit weitere, bislang nicht bekannte regulatorische Untereinheiten enthält.

Jede der drei  $\alpha_1$ -Untereinheiten enthält ebenso wie die HVA-Kanäle ein positiv geladenes S4-Segment. Im Gegensatz zu den HVA-Kanälen zeigen sie jedoch keine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Inaktivierung und haben in der SS1-SS2-Region der Domänen III und VI anstelle eines hochkonservierten Glutamats einen Aspartatrest, der wohl auch für die geringere Leitfähigkeit verantwortlich ist (Hofmann *et al.*, 1999).

**Tab. 8:**  $\alpha_1$ -Untereinheiten der LVA-Kanäle

Gen	Untereinheit	Typ	Chromosom	Expression	Sensitivität	Referenz
CACNA1G	$\alpha_{1G}$	T-Typ	17q22	Gehirn	Mibefradil Kurtoxin Ethosuximid	Perez-Reyes <i>et al.</i> , 1998
CACNA1H	$\alpha_{1H}$	T-Typ	16p13.3	Herz Niere Leber	Amlodipin Mibefradil	Cribbs <i>et al.</i> , 1998
CACNA1I	$\alpha_{1I}$	T-Typ		Gehirn		Klugbauer <i>et al.</i> , 1999a

HVA (*high voltage-activated*)-Kanäle sind dadurch gekennzeichnet, dass sie bei einem hohen Membranpotential aktiviert ( $\sim 0$  mV) sowie nur langsam  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig inaktiviert werden und auf eine Depolarisierung nur kurz aktiv reagieren. Man unterscheidet dabei zwei Klassen, wobei die Einteilung der HVA-Kanäle auf der Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Stoffgruppen basiert.

Der einen Klasse werden die L-Typ (*long-lasting*) Kanäle zugerechnet. Sie werden in neuronalen sowie neuroendokrinen Zellen, Herz- und Skelettmuskelzellen sowie in der glatten Muskulatur exprimiert. Im Skelettmuskel sind sie notwendig für die Kopplung von Erregung und Kontraktion, indem sie die Muskelkontraktion durch den Ausstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem sarkoplasmatischen Reticulum initiieren. Dadurch, dass sie einen Teil der benötigten  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bereitstellen, sind sie in der glatten Muskulatur in den Aufbau der Muskelspannung involviert. Im Herzmuskel werden sie für die Erzeugung und Ausbreitung der elektrischen Impulse sowie für den Beginn der Vorhof- und Ventrikelkontraktion benötigt. Zudem sind sie für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die  $\beta$ -Zellen des Pankreas verantwortlich und können so über den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel die Insulinsekretion regulieren (Hofmann *et al.*, 1994). Zu ihnen werden die  $\alpha_{1C}$ -,  $\alpha_{1S}$ -,  $\alpha_{1D}$ - und die neue  $\alpha_{1F}$ -Form gerechnet. Sie werden durch die klassischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalb blocker 1,4-Dihydropyridin (DHP), Phenylalkylamine (PAA) und Benzothiazepine (BTZ) blockiert.

Der anderen Klasse werden die P-Typ (Purkinje), N-Typ (*neither L nor T*), R-Typ (*remaining*) sowie Q-Typ Kanäle zugerechnet. N-Typ Kanäle werden v. a. in Neuronen exprimiert, wo sie eine wichtige Rolle bei der Neurotransmitterfreisetzung spielen. Sie werden

spezifisch durch  $\omega$ -Conotoxin GVIA blockiert. Zu ihnen gehört der  $\alpha_{1B}$ -Kanal (Williams *et al.*, 1992; Dunlap *et al.*, 1995). Der P-Typ Kanal wird nicht durch Hemmstoffe von N- bzw. L-Typ Kanälen blockiert. Seine  $\alpha_{1A}$ -Untereinheit reagiert dagegen äußerst sensitiv auf  $\omega$ -Agatoxin IVA (Dunlap *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu reagiert der durch die  $\alpha_{1A}$ -Untereinheit gesteuerte  $Ca^{2+}$ -Fluss in *Xenopus laevis* Oozyten (Q-Typ) weniger sensitiv auf  $\omega$ -Aga IVA. Noch ist unklar, ob strukturelle Unterschiede zwischen dem P- und Q-Typ bestehen und ob die unterschiedliche Affinität gegenüber  $\omega$ -Aga IVA evtl. auf Unterschieden in den  $\alpha_{1A}$ -Unterformen oder in der posttranslationalen Prozessierung beruht. So ist die Unterteilung in P- und Q-Typ eher spekulativ (Dunlap *et al.*, 1995). Ebenso wie der Q-Typ wurde auch der R-Typ erst kürzlich identifiziert. Er wird in den Körnerzellen des Kleinhirns exprimiert und zeigt sich resistent gegenüber DHP,  $\omega$ -Conotoxin GVIA sowie  $\omega$ -Aga IVA. Die durch die  $\alpha_{1E}$ -Untereinheit vermittelten  $Ca^{2+}$ -Ströme werden zum R-Typ gerechnet. Neben der Expression im Gehirn findet sich der  $\alpha_{1E}$ -Kanal auch in den endokrinen Zellen des Herzens und ist dort evtl. in die Sekretion des atrialen natriuretischen Peptids involviert (Lacinová und Hofmann, 1999).

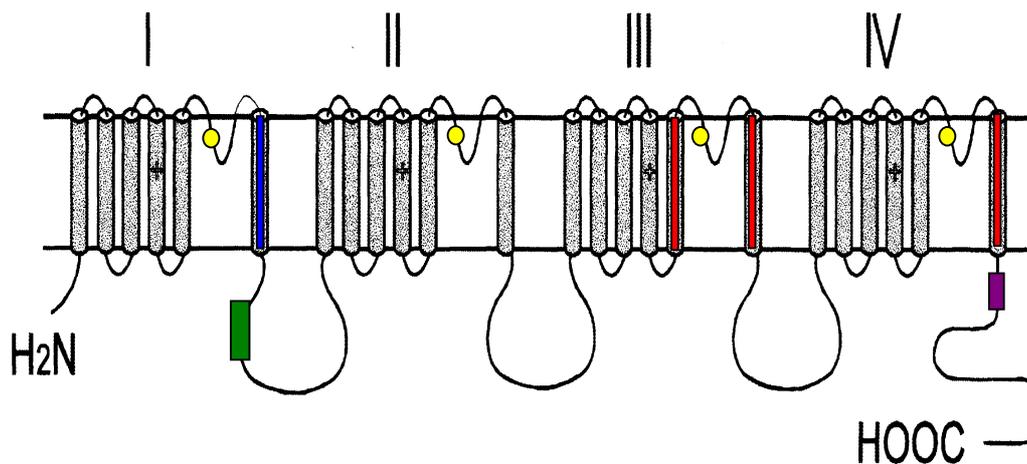
**Tab. 9:**  $\alpha_1$ -Untereinheiten der HVA-Kanäle

Gen	Untereinheit	Typ	Chromosom	Expression	Sensitivität	Referenz
CACNA1A	$\alpha_{1A}$	P/Q-Typ	19p13.1-2	Gehirn	$\omega$ -CTX MVIIC $\omega$ -Aga IVA	Starr <i>et al.</i> , 1991
CACNA1B	$\alpha_{1B}$	N-Typ	9q34	Gehirn	$\omega$ -CTX GVIA $\omega$ -CTX MVIIC	Williams <i>et al.</i> , 1992
CACNA1C	$\alpha_{1C}$	L-Typ	12p13.3	Herz, Gehirn glatte Muskulatur Fibroblasten	DHP	Mikami <i>et al.</i> , 1989 Snutch <i>et al.</i> , 1991 Sun <i>et al.</i> , 1992 Schultz <i>et al.</i> , 1993
CACNA1D	$\alpha_{1D}$	L-Typ	3p14.3	Gehirn Pankreas	DHP	Williams <i>et al.</i> , 1992 Seino <i>et al.</i> , 1992a+b
CACNA1E	$\alpha_{1E}$	R-Typ	1q25-q31	Gehirn	-	Diriong <i>et al.</i> , 1995 Williams <i>et al.</i> , 1994
CACNA1F	$\alpha_{1F}$	L-Typ	Xp11.23	Retina	DHP	Strom <i>et al.</i> , 1998 Bech-Hansen <i>et al.</i> , 1998
CACNA1S	$\alpha_{1S}$	L-Typ	1q31-q32	Skelettmuskel	DHP	Tanabe <i>et al.</i> , 1987 Hogan <i>et al.</i> , 1994 Iles <i>et al.</i> , 1994

#### 4.2.1.2 Zusammensetzung der HVA-Kanäle

HVA-Kanäle sind variabel aus den einzelnen Untereinheiten ( $\alpha_1$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha_2\delta$ ) zusammengesetzt.

Die  $\alpha_1$ -Untereinheit kann in einigen Fällen autonom funktionieren und ist dann alleine für die Aktivität des Kanals ausreichend. Jedoch unterscheiden sich in diesem Fall Zeitverlauf und Spannungsabhängigkeit stark vom nativen Kanal. Zahlreiche Strukturen, die für die Funktion und Kinetik des Kanals wichtig sind, liegen in der  $\alpha_1$ -Untereinheit. Sie wurden v. a. in Arbeiten an der  $\alpha_{1C}$ - und  $\alpha_{1S}$ -Untereinheit identifiziert. So orientieren sich die Angaben über die einzelnen funktionell wichtigen Strukturen der  $\alpha_{1F}$ -Untereinheit in dieser Arbeit an bisher beschriebenen Eigenschaften der  $\alpha_{1C}$ - und  $\alpha_{1S}$ -Untereinheit. Inwieweit daraus ähnliche Schlüsse über die Funktion und Kinetik der  $\alpha_{1F}$ -Untereinheit gezogen werden können, wird sich jedoch erst nach weiteren Untersuchungen zeigen.



**Abb. 16:** Struktur der  $\alpha_{1F}$ -Untereinheit. Sie besteht aus vier homologen Domänen, die aus jeweils fünf hydrophoben und einer amphipatischen (S4+)  $\alpha$ -Helix zusammengesetzt sind. Für die Funktion des Kanals wichtige Strukturen, die ebenfalls bei der  $\alpha_{1F}$ -Untereinheit identifiziert werden konnten, sind die Verbindungen von S5 und S6 in jeder Domäne, die einen Teil der Pore bilden und Glutamatreste  $\text{●}$  enthalten, die eine hochaffine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle darstellen, das IS6-Segment  $\text{■}$ , welches die für die langsame, spannungsabhängige Inaktivierung benötigten Aminosäuren enthält, die Verbindung von Domäne I und II  $\text{■}$ , die die AID-Region enthält, welche für die Bindung der  $\beta$ -Untereinheit verantwortlich ist, die Segmente IIIS5, IIIS6 und IVS6  $\text{■}$ , die „Hotspots“ im Bezug auf die Medikamenteninteraktion darstellen und für die Bindung von DHP, PAA und BTZ wichtige Aminosäuren enthalten, sowie die EF-Hand  $\text{■}$ , die sich als eine grundsätzliche Struktur bei  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinen herausgestellt hat.

Auch die  $\alpha_{1F}$ -Untereinheit besteht aus vier homologen Domänen, die aus jeweils fünf hydrophoben und einer amphipatischen (S4)  $\alpha$ -Helix zusammengesetzt sind. Dieses S4-Segment enthält an jeder dritten Position einen Arginin- oder Lysinrest, die ihm eine posi-

tive Ladung verleihen, und dient als Spannungsmesser. Bei positivem Membranpotential bewegt es sich nach außen und initiiert dadurch die Öffnung des Kanals (Hofmann *et al.*, 1999).

Einen Teil der Pore bildet die Verbindung von S5 und S6. Diese extrazelluläre Schleife (SS1-SS2) faltet sich in die Membran und beeinflusst neben der Permeationsgeschwindigkeit auch die Ionenselektivität des Kanals. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität beruht dabei auf spezifischen Eigenschaften der SS1-SS2-Region, die jeweils einen in allen Domänen (I-IV) und allen HVA-Kanälen konservierten Glutamatrest enthält (I: E330, II: E700, III: E1078, IV: E1372 nach  $\alpha_{1F}$ ). Diese Glutamatreste bilden eine hochaffine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle innerhalb der Pore, wobei jedoch nicht alle Glutamatreste gleichermaßen zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung beitragen. So hat E1078 in Domäne III einen größeren Effekt auf die Ionenselektivität und Permeation als die anderen Glutamatreste (Yang *et al.*, 1993). Zusätzlich stellen die Glutamatreste der Domänen I (E330) und III (E1078) Bindestellen für  $\text{H}^+$ -Ionen dar, die bei erniedrigtem extrazellulärem pH, wie er bei erhöhter neuronaler Aktivität oder Ischämie vorkommt, die Ionenpermeation durch den offenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal behindern (Chen und Tsien, 1997).

VDCCs werden durch Veränderungen des Membranpotentials reguliert. Verantwortlich für die Aktivierung ist zum einen die Verbindung zwischen S5 und S6 in Domäne I, die die Geschwindigkeit der Aktivierung bestimmt. Dabei ist die Aktivierungsgeschwindigkeit von  $\alpha_{1C}$  etwa fünfmal höher als die von  $\alpha_{1S}$  (Dirksen *et al.*, 1997). Zusätzlich tragen auch Sequenzen im Bereich IIIS5 bis IVS6 zur Aktivierung bei (Wang *et al.*, 1995). L-Typ Kanäle zeigen zwei Arten von Inaktivierung. Während die langsame Inaktivierung spannungsabhängig ist, ist die schnelle Inaktivierung eine Folge einströmender  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Die für die langsame spannungsabhängige Inaktivierung benötigten neun oder weniger Aminosäuren liegen in IS6 und dem flankierenden extrazellulären Anteil. Die Region, die die  $\beta$ -Untereinheit bindet, spielt dabei keine Rolle, obwohl die  $\beta$ -Untereinheit die Kinetik des Kanals signifikant beeinflusst (Zhang *et al.*, 1994). In der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit konnten zusätzliche, für die Inaktivierung wichtige Aminosäuren im intrazellulären C-terminalen Ende beobachtet werden (Wei *et al.*, 1994). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive Inaktivierung beruht auf einem negativen Feedback-Mechanismus und findet sich v. a. im Herzmuskel sowie in der glatten Muskulatur (Zong und Hofmann, 1996). Sie wird nur durch die  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit vermittelt und bedarf eines sog. IQ-Motivs am C-terminalen Ende. Bei dem IQ-Motiv handelt es sich um eine bestimmte Aminosäureabfolge (IQXXX<sub>n</sub>RGXXX<sub>n</sub>R), die jedoch nicht unverän-

derlich ist. So findet sich des Öfteren anstatt des Isoleucins an erster Position eine andere verzweigtkettige Aminosäure (Leucin, Valin), auch die Arginine sind manchmal durch ein Lysin oder Histidin ersetzt. Trotz des Mangels an strenger Konservierung besteht jedoch kein Zweifel, dass es sich bei dem IQ-Motiv um eine Sequenz handelt, die Calmodulin und andere ähnliche Proteine bindet. Dabei wird Calmodulin zuerst  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig an eine vom IQ-Motiv verschiedene Region gebunden und bindet dann  $\text{Ca}^{2+}$ . Dies erlaubt in der Folge die Interaktion mit dem IQ-Motiv, auf die eine schnelle Inaktivierung des Kanals folgt (Peterson *et al.*, 1999; Zühlke *et al.*, 1999). Aufgrund der ausschließlichen Expression von  $\alpha_{1F}$  in der Retina spielt dieser Mechanismus in dem die  $\alpha_{1F}$ -Untereinheit enthaltenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal wohl keine Rolle, so dass die für die Inaktivierung benötigten Strukturen wohl in IS6 zu finden sind.

Jedoch lässt sich auch in der Sequenz von  $\alpha_{1F}$  eine sog. EF-Hand identifizieren, die sich als grundsätzliche Struktur bei  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinen herausgestellt hat, obwohl noch keine Einigung im Bezug auf ihre Rolle erzielt werden konnte. Sie besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices von jeweils ca. zehn Aminosäuren, die durch eine nichthelicale Schleife voneinander getrennt sind, an der die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen binden (Babitch 1990; Regulla *et al.*, 1991). So lässt sich nach dem letzten Segment von Domäne IV am C-terminalen Ende des Proteins ein EF-Hand-Motiv erkennen (AS1450-1478 nach  $\alpha_{1F}$ ), das EF-Hand Charakteristika (Anfangs-E, I, G) und weitere für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung wichtige Kriterien wie drei saure Liganden und eine niedrige Anzahl von Serin- bzw. Threoninresten erfüllt.

Die  $\alpha_1$ -Untereinheit interagiert zudem mit einer Anzahl von Proteinen, wie den regulatorischen Untereinheiten, oder auch G-Proteinen, dem Ryanodinrezeptor oder Proteinen, die für die Fusion neurosekretorischer Vesikel mit der präsynaptischen Membran notwendig sind.

Die Coexpression der  $\alpha_1$ -Untereinheit mit der  $\beta$ -Untereinheit verändert die spannungsabhängigen und kinetischen Eigenschaften des Kanals und seine funktionelle Expression. Diese Effekte beruhen auf Konformationsänderungen in der Quartärstruktur, die durch die Interaktion beider Untereinheiten ausgelöst werden (Neely *et al.*, 1993). Die  $\beta$ -Untereinheit bindet dabei an die cytoplasmatische Verbindung zwischen Domäne I und II der  $\alpha_1$ -Untereinheit. Diese AID-Region ( $\alpha$ -Untereinheit-Interaktions-Domäne) liegt bei 395QQXXX<sub>n</sub>E412 (nach  $\alpha_{1F}$ ), wobei v. a. die Region 404YXXXI408 für die hochaffine Bindung der  $\beta$ -Untereinheit verantwortlich ist (De Waard *et al.*, 1996).

Im Skelettmuskel bedarf die Kopplung von Erregung und Kontraktion der Interaktion der  $\alpha_1$ -Untereinheit mit dem Ryanodinrezeptor Typ 1 (RyR-1). Diese Interaktion findet an der cytoplasmatischen Schleife zwischen den Domänen II und III von  $\alpha_{1S}$  statt und führt zu einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Reticulum (Tanabe *et al.*, 1990). Wichtig für die Aktivierung von RyR-1 sind dabei nur die Aminosäuren 671-690 (nach  $\alpha_{1S}$ ), die das essentielle Cluster, das aus dem RKRRK-Motiv besteht, enthalten (El-Hayek und Ikemoto, 1998). Dieses Motiv findet sich nur in der  $\alpha_{1S}$ -Untereinheit und ist nicht zwischen den anderen  $\alpha_1$ -Untereinheiten konserviert, so dass auch  $\alpha_{1F}$  nicht an den Ryanodinrezeptor Typ 1 binden und so eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Reticulum bewirken kann. Dies war jedoch auch nicht zu erwarten, da sich in der Retina kein sarkoplasmatisches Reticulum finden lässt und  $\alpha_{1F}$  bislang nur in der Retina nachgewiesen werden konnte.

Die Neurotransmitterfreisetzung war bislang eine Domäne der N- und P-Typ Kanäle. Eine wichtige Rolle bei der synaptischen Transmission spielt dabei die enge Nachbarschaft von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen mit neurotransmitterhaltigen Vesikeln. Die synaptischen Membranproteine Syntaxin, Synaptosom-assoziiertes Protein von 25 kDa (SNAP25) und vesikel-assoziiertes Membranprotein (VAMP) binden hierbei an Regionen zwischen den Domänen II und III von  $\alpha_{1A}$  und  $\alpha_{1B}$  (Leveque *et al.*, 1994). Eine ähnliche Interaktion von L-Typ Kanälen mit der Schleife zwischen den Domänen II und III konnte bislang nicht beobachtet werden.

Die Aktivität der nicht-DHP-sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle wird durch  $G_0$ -Typ G-Proteine reguliert. Die Bindung von  $G\beta\gamma$  an eine Region im Bereich der intrazellulären Schleife zwischen den Domänen I und II bedarf dabei der Sequenz QXXER, die innerhalb der  $\beta$ -Interaktionsstelle liegt (Zamponi *et al.*, 1997). L-Typ Kanäle haben an dieser Stelle eine QXXEE-Sequenz, die ihnen eine Interaktion mit G-Proteinen unmöglich macht. Damit lassen sie sich nicht durch G-Proteine in ihrer Aktivität beeinflussen.

$\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ werden dagegen durch cAMP-abhängige Phosphorylierung bzw. durch die Proteinkinase C reguliert. Im Herzen erhöht die cAMP-abhängige Phosphorylierung der  $\alpha_{1C}$ -Untereinheit den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch die L-Typ Kanäle, über die positiv inotrope Substanzen ihre Wirkung vermitteln, um ein Vielfaches, während die  $\alpha_{1S}$ -Untereinheit nicht in einem derartigen Ausmaß beeinflusst wird (Hartzell und Fischmeister, 1992). Der Mechanismus, mit dem diese Phosphorylierung in die Kinetik des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals eingreift, ist jedoch noch nicht geklärt. Eine wichtige Struktur stellt hierbei evtl. die cAMP-Kinase-Phosphorylierungsstelle bei Ser1928 (nach  $\alpha_{1C}$ ) dar (Dai *et al.*, 1999). Auch

die Proteinkinase C (PKC) reguliert den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch L-Typ Kanäle im Herzmuskel sowie in der glatten Muskulatur und in Neuronen. Die PKC-abhängige Regulierung wird dabei wahrscheinlich von Aminosäuren am N-terminalen Ende des Proteins vermittelt (Shistik *et al.*, 1998). Inwieweit die  $\alpha_{1F}$ -Untereinheit Angriffspunkt solcher Regulationsmechanismen ist, ist noch nicht geklärt.

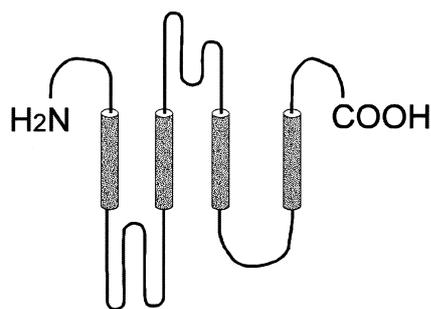
L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle sind Angriffspunkt verschiedener wichtiger Medikamente wie Dihydropyridine (DHP), Phenylalkylamine (PAA) und Benzothiazepine (BTZ), was sie von den anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen, die nicht dem L-Typ zuzurechnen sind, unterscheidet. So bezeichnet man ihre  $\alpha_1$ -Untereinheit auch als DHP-Rezeptor. Bis vor einigen Jahren war man der Ansicht, dass DHP an eine Region im Bereich der EF-Hand im C-terminalen, intrazellulären Ende des Proteins binden (Regulla *et al.*, 1991), heute geht man davon aus, dass DHP bevorzugt von der extrazellulären Seite des inaktivierten Kanals binden, wo sie durch die Lipiddoppelschicht fest gebunden werden. Der optimale Zugang liegt ca. 11-14 Å von der extrazellulären Oberfläche entfernt in einer hydrophoben Region. Schon 9,4 % der gesamten  $\alpha_1$ -Sequenz, nämlich IIS5, IIS6 mit der dazwischen liegenden Verbindung sowie IVS6 und die Schleife zwischen IVS5 und IVS6 reichen aus, um DHP-Sensitivität zu vermitteln (Grabner *et al.*, 1996). Die DHP-Bindung wird dabei durch acht für L-Typ Kanäle spezifische und zwei zwischen allen VDCC konservierten Aminosäuren vermittelt, die in IIS5, IIS6 sowie IVS6 liegen. Das gilt auch für die  $\alpha_{1F}$ -Untereinheit, die jedoch in einer dieser Aminosäuren von den anderen L-Typ Kanälen abweicht. An Aminosäureposition 1414 findet sich bei  $\alpha_{1F}$  ein Phenylalanin anstelle eines zwischen den  $\alpha_{1S}$ -,  $\alpha_{1C}$ - und  $\alpha_{1D}$ -Untereinheiten konservierten Tyrosinrests. Inwieweit dieser Aminosäureaustausch Auswirkungen auf die DHP-Sensitivität der  $\alpha_{1F}$ -Untereinheit hat, ist noch unklar. Bei diesem Tyrosinrest handelt es sich zudem um die einzige Aminosäure, die neben einem DHP-vermittelten Kanalblock auch eine Blockade durch PAA und BTZ vermitteln kann (Peterson *et al.*, 1996; Schuster *et al.*, 1996; Mitterdorfer *et al.*, 1996; Sinnegger *et al.*, 1997). Die Domänen IIS5, IIS6 und IVS6 liegen dabei in enger Nachbarschaft zueinander, mit der DHP-bindenden Domäne in Richtung Kanalpore orientiert. Allgemein anerkannt ist heute das *Domain-Interface-Modell*, gemäß dem die DHP-Rezeptorstelle an den Schnittpunkten von Domäne III und IV liegt (Catterall und Striessnig, 1992). Eine äußerst wichtige Rolle spielt jedoch auch IS6, das auf signifikante Weise zur hohen Affinität der DHP zu den  $\alpha_{1C}$ -Untereinheiten der Gefäßmuskulatur beiträgt und damit verhindert, dass die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle im Herzen blockiert werden (Lacinová und Hofmann, 1999).

Phenylalkylamine blockieren den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom von der intrazellulären Seite der Membran und beeinflussen ebenso wie Benzothiazepine, die von der extrazellulären Seite aus angreifen, durch allosterische Interaktion die DHP-Bindung. Wichtig für die durch PAA vermittelte Blockade sind Aminosäuren in IIS6 und IVS6 (Hockerman *et al.*, 1997). Zusätzlich spielen auch die beiden Glutamatreste in der SS2-Region der Domänen III und IV eine Rolle (E1078, E1372 nach  $\alpha_{1F}$ ), ebenso wie weitere Aminosäuren am cytoplasmatischen und extrazellulären Ende von IVS6, die neben der PAA auch BTZ binden und so ebenfalls Komponenten des Kanalblocks darstellen (Motoike *et al.*, 1999). So stellen IIS5, IIS6 und IVS6 „Hotspots“ im Bezug auf die Medikamenteninteraktion dar, da sie wichtige molekulare Strukturen für die DHP-, PAA- und BTZ-Bindung enthalten, zudem sind sie die Domänen, die als wichtigstes Entscheidungskriterium bei der Einteilung in DHP- bzw. nicht-DHP-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle herangezogen werden.

Die bereits bekannten  $\alpha_1$ -Untereinheiten sind jeweils mit verschiedenen regulatorischen Untereinheiten assoziiert. Ob auch  $\alpha_{1F}$  mit weiteren Untereinheiten coexprimiert wird, ist bislang unbekannt.

Die Coexpression der  $\alpha_1$ -Untereinheit mit den bereits bekannten  $\beta$ -,  $\alpha_2\delta$ - bzw.  $\gamma$ -Untereinheiten modifiziert die Aktivität der  $\alpha_1$ -Untereinheit.

Bei der  $\beta$ -Untereinheit handelt es sich um ein intrazelluläres Membranprotein (50-72 kDa).



**Abb. 17:**  $\beta$ -Untereinheit eines HVA- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals. Es handelt sich hierbei um ein intrazelluläres Membranprotein (modifiziert nach Lacinová und Hofmann, 1999).

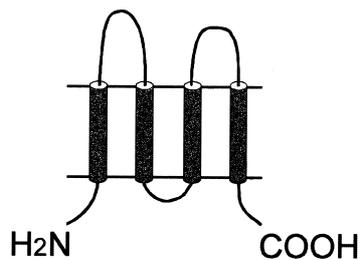
Die Interaktionsstelle mit der  $\alpha_1$ -Untereinheit ist zwischen den einzelnen  $\beta$ -Untereinheiten konserviert und liegt bei AS 215-245 (nach  $\beta_1$ ), zudem kann auch das N-terminale Ende der  $\beta$ -Untereinheit mit der  $\alpha_1$ -Untereinheit interagieren (Krizanova, 1996). Die Coexpression beider Untereinheiten steigert die DHP-Rezeptorfunktion der  $\alpha_1$ -Untereinheit um ein Vielfaches, beschleunigt die Aktivierung sowie Inaktivierung des Kanals, normalisiert die Amplitude des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms und stimuliert die funktionelle Expression von  $\alpha_1$  (De

Waard *et al.*, 1994). Wenigstens vier Gene für die  $\beta$ -Untereinheit sind bekannt, die für neun isoforme Proteine codieren, welche v. a. neuronal exprimiert werden.

**Tab. 10:**  $\beta$ -Untereinheiten der HVA-Kanäle

Gen	Untereinheit	Chromosom	Expression	Referenz
CACNB1	$\beta_1$	17q11.2-q22	Gehirn Skelettmuskel Herz	Williams <i>et al.</i> , 1992 Powers <i>et al.</i> , 1992
CACNB2	$\beta_2$	10p12	Gehirn Herz	Taviaux <i>et al.</i> , 1997 Hullin <i>et al.</i> , 1992
CACNB3	$\beta_3$	12q13	Gehirn	Hullin <i>et al.</i> , 1992
CACNB4	$\beta_4$	2q22-q23	Gehirn	Taviaux <i>et al.</i> , 1997 Castellano <i>et al.</i> , 1993

Die  $\gamma$ -Untereinheit stellt ein integrales Membranprotein (25 kDa) mit vier transmembranen Domänen und zwei extrazellulären Glykosylierungsstellen dar.



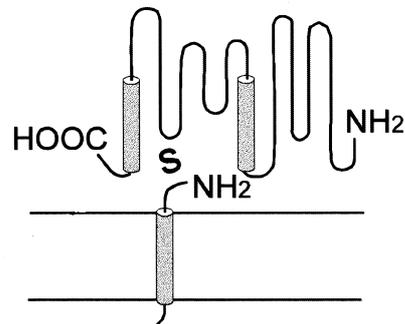
**Abb. 18:**  $\gamma$ -Untereinheit eines HVA- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals. Es handelt sich hierbei um ein integrales Membranprotein mit vier transmembranen Domänen und zwei extrazellulären Glykosylierungsstellen (modifiziert nach Lacinová und Hofmann, 1999).

Sie ist spezifisch für den Skelettmuskel. Kürzlich konnten jedoch zusätzliche  $\gamma$ -Untereinheiten im Gehirn sowie in weiteren Geweben entdeckt werden (Letts *et al.*, 1998; Klugbauer *et al.*, 1999b). Man kennt bislang fünf Gene, die für die  $\gamma$ -Untereinheit codieren.

**Tab. 11:**  $\gamma$ -Untereinheiten der HVA-Kanäle

Gen	Untereinheit	Chromosom	Expression	Referenz
CACNG1	$\gamma_1$	17q23	Skelettmuskel	Powers <i>et al.</i> , 1993
CACNG2	$\gamma_2$	22q13	Gehirn	Letts <i>et al.</i> , 1998
CACNG3	$\gamma_3$	-	Gehirn	Klugbauer <i>et al.</i> , 1999b
CACNG4	$\gamma_4$	-	Skelettmuskel	Klugbauer <i>et al.</i> , 1999b
CACNG5	$\gamma_5$	-	Skelettmuskel	Lacinová und Hofmann, 1999

Bei der  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit handelt es sich um ein glykosyliertes Membranprotein (125 kDa).



**Abb. 19:**  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit eines HVA- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals. Es handelt sich hierbei um ein glykosyliertes Membranprotein (modifiziert nach Lacinová und Hofmann, 1999).

Im Skelettmuskel wird das primäre Proteinprodukt des  $\alpha_2\delta$ -Gens posttranslational prozessiert, so dass ein  $\alpha_2$ -Protein und ein  $\delta$ -Protein entstehen. Die transmembrane  $\delta$ -Untereinheit verankert die extrazellulär liegende  $\alpha_2$ -Untereinheit durch Disulfidbrücken mit der Plasmamembran (Hofmann *et al.*, 1994). Die Coexpression von  $\alpha_2\delta$  mit  $\alpha_1$  und  $\beta$  beschleunigt die Aktivierung und Inaktivierung des Kanals und erhöht den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom (Klugbauer *et al.*, 1999c). Mit den beiden erst kürzlich identifizierten Genen für die  $\alpha_2\delta$ -Untereinheit sind heute folgende drei  $\alpha_2\delta$ -Gene bekannt:

**Tab. 12:**  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten der HVA-Kanäle

Gen	Untereinheit	Chromosom	Expression	Referenz
CACNA2D1	$\alpha_2\delta_1$	7q21-q22	Skelettmuskel	Powers <i>et al.</i> , 1994
			Herz	Williams <i>et al.</i> , 1992
CACNA2D2	$\alpha_2\delta_2$	-	Herz	Klugbauer <i>et al.</i> , 1999c
CACNA2D3	$\alpha_2\delta_3$	-	Gehirn	Klugbauer <i>et al.</i> , 1999c

### 4.3 Pathogenese von Ionenkanalerkrankungen

Es sind zahlreiche Erkrankungen identifiziert worden, die auf Mutationen in Genen beruhen, die für Ionenkanäle bzw. deren Untereinheiten codieren.

**Tab. 13:** Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>- Kanalerkrankungen

Erkrankung	Vererbung	Gen (Typ)	Chromosom	häufige Mutationen	Referenz
Cystische Fibrose	ar	<i>CFTR</i> (epithelialer Cl <sup>-</sup> -Kanal)	7q	ΔF508	Ackerman und Clapham, 1997
generalisierte Myotonie Becker	ar	<i>CLCN1</i> (skelettaler Cl <sup>-</sup> -Kanal)	7q35	D136G, F413C, R496S	Ackerman und Clapham, 1997
Dent'sche Erkrankung	xl	<i>CLCN5</i> (renaler Cl <sup>-</sup> -Kanal)	Xp11.22		Ackerman und Clapham, 1997
Thomsen's Myotonie	ad	<i>CLCN1</i> (skelettaler Cl <sup>-</sup> -Kanal)	7q35	D136G, G230E, P480L	Ackerman und Clapham, 1997
Liddle's Syndrom	ar	<i>ENaC</i> (epithelialer Na <sup>+</sup> -Kanal) α-Untereinheit β-Untereinheit γ-Untereinheit	12p 16p 16p	R564X, P616L, Y618H	Ackerman und Clapham, 1997
Hyperkalämische periodische Paralyse	ad	<i>SCN4A</i> (skelettaler Na <sup>+</sup> -Kanal)	17q23-25	T698M, T704M, M1585V, M1592V	Bulman, 1997
kongenitale Paramyotonie	ad	<i>SCN4A</i> (skelettaler Na <sup>+</sup> -Kanal)	17q23-25	V1293I, G1306V, T1313M, L1433R, R1448C, R1448H, V1589M	Bulman, 1997
Myotonie fluctuans, permanent, acetazolamid-sensitiv	ad	<i>SCN4A</i> (skelettaler Na <sup>+</sup> -Kanal)	17q23-25	S804F, G1306A, G1306E, I1160V	Bulman, 1997
Long-QT-Syndrom					
LQT1	ad	<i>KVLQT1</i> (kardialer „shaker-like“-K <sup>+</sup> -Kanal)	11p15.5	3 bp Deletion, G211R, L178F, V159M, T217I, A341V, G250E	Bulman, 1997
LQT2	ad	<i>HERG</i> (kardialer „eag-like“-K <sup>+</sup> -Kanal)	7q35-36	27 bp Deletion, A561V, N470D, I593R	Bulman, 1997
LQT3	ad	<i>SCNA5</i> (kardialer Na <sup>+</sup> -Kanal)	3p21-24	ΔKPQ1505-1507, N1325S, R1644H	Bulman, 1997
LQT4	ad		4q25-27		Bulman, 1997
Jerwell und Lange-Nielson-Syndrom	ar	<i>KVLQT1</i> (kardialer „shaker-like“-K <sup>+</sup> -Kanal)	11p15.5	1 bp Insertion, R555C, W305S	Bulman, 1997
familiäre persistente hyperinsulinämische Hypoglykämie	ar	<i>SURI</i> (Untereinheit des ATP-sensitiven K <sup>+</sup> -Kanals im Pankreas)	11p15.1	Verkürzung von NBD2	Ackerman und Clapham, 1997
Bartter Syndrom	ar	<i>KCNJ1 (ROMK1)</i> (ATP-abhängiger „inward-rectifier“-K <sup>+</sup> -Kanal)	11q24	1 bp Insertion, Y60X, S400R, W58X	Doyle und Stubbs, 1998

Mit der Klonierung der Gene für die  $\alpha_1$ - und  $\beta$ -Untereinheiten von VDCC konnten Mutationen in  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Genen als Ursache menschlicher genetischer Erkrankungen nachgewiesen werden.

**Tab. 14:**  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalerkrankungen

Erkrankung	Vererbung	Gen (Typ)	Chromosom	häufige Mutationen	Referenz
Hypokalämische periodische Paralyse	ad	<i>CACNA1S</i> (L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal)	1q31-32	R528H, R1239H	Bulman, 1997
		<i>SCN4A</i> (skelettaler $\text{Na}^+$ -Kanal)	17q23-25	R669H	Bulman, 1997
Episodische Ataxie					
EA1	ad	<i>KCNA1</i> („shaker-like“ $\text{K}^+$ -Kanal)	12p13	V408A, R239S, V174F, F249I	Bulman, 1997
EA2	ad	<i>CACNA1A</i> (P/Q-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal)	19p13	nt4073(delC), splice site Mutationen	Ophoff <i>et al.</i> , 1996
Familiäre hemiplegische Migräne	ad	<i>CACNA1A</i> (P/Q-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal)	19p13	R192Q, T666M, V714A, I1811L	Ophoff <i>et al.</i> , 1996
Veranlagung zur malignen Hyperthermie	ad	<i>CACNA1S</i> (L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal)	1q31-32	R1086H	Monnier <i>et al.</i> , 1997
		<i>RYR1</i> (Ryanodin $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal)	19q13.1	G341R, G2433R	Monnier <i>et al.</i> , 1997
Spinocerebelläre Ataxie (SCA6)	ad	<i>CACNA1A</i> (P/Q-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal)	19p13	CAG-Repeat	Zhuchenko <i>et al.</i> , 1997
NIDDM	ad	<i>CACNA1D</i> (L-Typ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal)	4p14.3	ATG-Repeat	Yamada <i>et al.</i> , 1995

So führen *missense* Mutationen im *CACNA1A*-Gen zur familiären hemiplegischen Migräne, einem seltenen, autosomal-dominanten Subtyp der Migräne mit Aura sowie ichtaler Hemiplegie und in einigen Fällen cerebellärer Atrophie. Mutationen, die eine verkürzte  $\alpha_{1A}$ -Untereinheit zur Folge haben, führen zur episodischen Ataxie Typ 2 (EA2), einer autosomal-dominanten paroxysmalen neurologischen Erkrankung mit anfallsartig auftretender Ataxie, migräneähnlichen Symptomen, Nystagmus sowie cerebellärer Atrophie (Ophoff *et al.*, 1996). *CACNA1A* enthält zudem einen polymorphen CAG-Repeat, der bei Patienten mit autosomal-dominanter spinocerebellärer Ataxie (SCA6), einer langsam progredienten Ataxie der Extremitäten mit Nystagmus und Dysarthrie, verlängert ist (21-27 CAG-Repeats statt normal 4-16 CAG-Repeats) und zur Purkinjenzell-Degeneration führt (Zhuchenko *et al.*, 1997). Auch das *CACNA1D*-Gen enthält in Exon 1 eine Sequenz von ungewöhnlichen ATG-Repeats (7x Methionin). Eine Verlängerung dieses Repeats um ein weiteres Methionin konnte bei einem japanischen Patienten mit NIDDM gefunden werden (Yamada *et al.*, 1995). Mit der Kartierung der hypokalämischen periodischen Paralyse, ei-

ner Erkrankung mit Schwächeanfällen in Verbindung mit erniedrigten  $K^+$ -Spiegeln, auf 1q31-32 konnten als Ursache Mutationen im *CACNAIS*-Gen nachgewiesen werden. Jedoch erwies sich diese Erkrankung schon bald als heterogen mit weiteren Mutationen im *SCN4A*-Gen (Bulman, 1997). Auch die Veranlagung zur malignen Hyperthermie, einer pharmakogenetischen Erkrankung mit Hyperthermie, progredienter Muskelsteifheit sowie Rhabdomyolyse, die durch Anästhetika wie Halothan oder Muskelrelaxantien wie Succinylchlorid ausgelöst wird, ist eine genetisch heterogene Erkrankung, die durch Mutationen im *CACNAIS*-Gen sowie im *RYR1*-Gen verursacht wird (Doyle und Stubbs, 1998).

Über die Pathogenese dieser durch Mutationen in den verschiedenen Genen für  $\alpha_1$ -Untereinheiten verursachten Erkrankungen kann in vielen Fällen nur spekuliert werden. So lässt auch die Polyglutaminverlängerung bei spinocerebellärer Ataxie (SCA6) mehrere zugrundeliegende Mechanismen vermuten. Am ehesten akzeptiert wird ein dominant-negativer Effekt beruhend auf der Triplett-Verlängerung, die mit der normalen Kanalfunktion interferiert, indem sie die Bindung an synaptische Proteine oder die Assoziation mit den akzessorischen Untereinheiten behindert. Daraus könnte eine aberrante Kanalfunktion mit einer ständigen Aktivierung als mögliche Folge resultieren (Zhuchenko *et al.*, 1997). Ein ähnlicher Mechanismus wird auch bei der episodischen Ataxie Typ 2 (EA2) vermutet, bei der die bislang gefundenen Mutationen zu einer verkürzten  $\alpha_1$ -Untereinheit führen, die nur aus den Domänen I, II und III S1 besteht, die wohl keinen funktionsfähigen  $Ca^{2+}$ -Kanal bilden können und so den Einbau des Kanals in die Plasmamembran negativ beeinflussen (dominant-negativer Effekt), oder instabil sind und zur Haploinsuffizienz führen (Ophoff *et al.*, 1996). Bei der familiären hemiplegischen Migräne dagegen geht man davon aus, dass es sich, ähnlich wie bei Mutationen im *SCN4A*-Gen bei hyperkalämischer periodischer Paralyse, um *gain-of-function*-Mutationen handelt, die zu einer inadäquaten Kanalfunktion führen (Ophoff *et al.*, 1996).

All diese Schwierigkeiten, die für die Erkrankung verantwortlichen pathophysiologischen Mechanismen zu identifizieren, beruhen größtenteils auch darauf, dass Ionenkanäle nur einen Teil des zellulären Signalweges darstellen und dass ihre Aktivität zudem durch andere Proteine reguliert wird, von denen einige die Struktur der Kanalproteine durch Phosphorylierung oder Änderung der Konformation modifizieren können. In die phänotypische Ausprägung von Erkrankungen, die durch Defekte in spannungsabhängigen Ionenkanälen bedingt sind, können zudem auch Mutationen oder externe Faktoren eingreifen, die die Expression von Proteinen, die in den Ionenmetabolismus involviert sind, wie Phosphatasen, Kinasen oder G-Proteine, beeinflussen (Doyle und Stubbs, 1998).

### 4.3.1 Pathogenese der CSNB2

Die pathophysiologischen Mechanismen, die für die Entstehung der inkompletten Form der CSNB verantwortlich sein könnten, sind auch nach der Klonierung des Krankheitsgens *CACNA1F* aufgrund Mangels an funktionellen Studien noch unbekannt.

Aufgrund der ERG-Befunde wurden diesbezüglich verschiedene Thesen über die Pathogenese aufgestellt. Sie reichten von einer gestörten Zapfenfunktion mit einem Missverhältnis der Transmitterfreisetzung (Langrova *et al.*, 1999; Miyake *et al.*, 1987b) über eine kombinierte Stäbchen-Zapfen-Dysfunktion sowie eine Störung in der apikalen Membran (Takahashi *et al.*, 1988) bis hin zu Defekten in Strukturen, die am Aufbau der b-Welle beteiligt sind (Boycott *et al.*, 1998b).

Mit dem Wissen, dass *CACNA1F* für die  $\alpha_1$ -Untereinheit eines L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals codiert, der in der inneren sowie in der äußeren Körnerschicht der Retina exprimiert wird, können einige dieser Theorien fallengelassen werden, während sich andere als wahrscheinlicher erweisen. Zu letzteren gehören v. a. solche, die als Ursache für die CSNB2 eine inadäquate Transmitterfreisetzung der Photorezeptoren (Hood und Greenstein, 1989) oder der Bipolarzellen vermuten, da  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bei der Freisetzung von Neurotransmittern eine wichtige Rolle spielen. Auf die Membrandepolarisierung hin kommt es innerhalb von Millisekunden zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, der zur Fusion der sekretorischen Vesikel mit der Zellmembran und schließlich zur Freisetzung des Vesikelinhalts führt. Entgegen früherer Aussagen, dass die Freisetzung der klassischen „schnellen“ Neurotransmitter nur von N- bzw. P-Typ Kanälen vermittelt wird und L-Typ Kanäle für die Freisetzung von Peptiden verantwortlich sind (Hofmann *et al.*, 1994), konnten in Untersuchungen an *Xenopus laevis*-sowie Tigersalamander-Retina  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ in den synaptischen Endigungen der Photorezeptoren sowie Bipolarzellen nachgewiesen werden, die zu einer auf die Membrandepolarisierung folgenden Glutamatfreisetzung führen (Schmitz und Witkovsky, 1997; Witkovsky *et al.*, 1997; Tachibana *et al.*, 1993; Maguire *et al.*, 1989; Heidelberger und Matthews, 1992).

Untersuchungen an der Retina von *Xenopus laevis* zeigten, dass Photorezeptoren Glutamat als Transmitter benutzen (Schmitz und Witkovsky, 1997). Bei gesättigtem Licht findet sich eine Grundfreisetzung von Glutamat, die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängig ist. Der tonische Glutamatstrom, der auf die Depolarisierung folgt und bei Dunkelheit sein Maximum erreicht, wird dagegen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen vom L-Typ gesteuert. Die Glutamatfreisetzung ist dabei proportional zur Aktivität des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals und somit abhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an

der präsynaptischen Endigung. Ob dafür eher die Stäbchen oder die Zapfen verantwortlich sind, wird im Augenblick noch kontrovers diskutiert. Zum einen soll jeder lichtabhängige Glutamatausstrom von den Stäbchen ausgehen und von der Stäbchenspannung abhängen (Witkovsky *et al.*, 1997). Doch auch in den Zapfen der Tigersalamander-Retina konnte ein L-Typ Kanal identifiziert werden. Hierbei handelt es sich jedoch um einen Kanal, der durch DHP nur inkomplett blockiert wird, aber z. T. auch durch  $\omega$ -Conotoxin GVIA (Wilkinson und Barnes, 1996). Somit weist dieser L-Typ-Kanal pharmakologische Eigenschaften ähnlich denen der  $\alpha_{1D}$ -Untereinheit auf. Auch bei der CSNB2 wird ein Missverhältnis der Transmitterfreisetzung aus den Zapfen als eine mögliche Ursache angesehen. Bislang wurden jedoch keine funktionellen oder pharmakologischen Untersuchungen an der  $\alpha_{1F}$ -Untereinheit unternommen, so dass eine Aussage, ob es sich bei der in den Zapfen exprimierten Isoform um die  $\alpha_{1F}$ -Untereinheit handeln könnte, noch nicht möglich ist. Das Ergebnis der Mutationssuche im *CACNA1F*-Gen deutet jedoch darauf hin, dass die Mutante, sei es, dass sie in den Stäbchen oder in den Zapfen oder in beiden exprimiert wird, funktionell verändert ist. Dadurch wird der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, der für die Glutamatfreisetzung bei Dunkelheit verantwortlich ist, beeinträchtigt. Glutamat ist wichtig, um die postsynaptischen Bipolarzellen adäquat zu stimulieren. Der niedrige Glutamatpegel würde den Bipolarzellen, die bei Lichteinfall depolarisieren, einen ständigen lichtadaptierten Zustand vermitteln und so zu einer fehlerhaften Informationsübertragung an der Synapse zwischen den Photorezeptoren und Bipolarzellen führen.

Auffallend bei Patienten mit CSNB2 ist die reduzierte b-Welle im Stäbchen-ERG und bei der Maximalantwort. Da die b-Welle das Potentialmaximum in der inneren Körnerschicht darstellt, das aufgrund der Aktivierung der Bipolarzellen und Müllerzellen aufgebaut wird, müssen auch diese Strukturen in die Überlegung miteinbezogen werden. Zwar finden sich auch in der Membran der Müllerzellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ, die durch den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die  $\text{K}^+$ -Kanalaktivität der Müllerzellen steigern und es diesen Zellen somit erleichtern, extrazelluläres  $\text{K}^+$  umzuverteilen, doch enthalten sie die  $\alpha_{1D}$ -Untereinheit (Puro *et al.*, 1996). Zudem ist v. a. die Aktivität der Bipolarzellen eng mit der b-Welle korreliert (Stockton und Slaughter, 1989). Auch in den Bipolarzellen konnten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ identifiziert werden, die sich nur in der terminalen Region von Bipolarzellen mit intakten präsynaptischen Endigungen finden lassen (Maguire *et al.*, 1989). Diese L-Typ Kanäle sind für die Freisetzung von Glutamat aus den Bipolarzellen verantwortlich, die auf Lichteinfall depolarisieren und so ein Membranpotential erreichen, bei dem der  $\text{Ca}^{2+}$ -

Einstrom rapide zunimmt (Heidelberger und Matthews, 1992). Die Freisetzung von Glutamat ist dabei biphasisch und besteht aus einer ersten Komponente mit raschem Beginn und einer zweiten, langsameren Komponente, die durch die Freisetzung von Glutamat aus den Reservevesikeln bedingt ist. Für die Freisetzung aus den Reservevesikeln ist ein verstärkter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom notwendig, der zudem beide Komponenten verschmelzen lässt, indem er die Mobilitätsrate aus den Reservevesikeln erhöht. So ist ein hoher Level an submembranem  $\text{Ca}^{2+}$  für die Aktivierung nötig (Gersdorff *et al.*, 1998). Bislang ist nicht bekannt, welche  $\alpha_1$ -Untereinheit der L-Typ Kanal enthält, der die ON-Bipolarzellen zur Freisetzung großer Mengen Glutamats innerhalb kurzer Zeit veranlasst. Sollte es sich hierbei um die  $\alpha_{1F}$ -Untereinheit handeln, könnte man auch hier eine inadäquate Glutamatfreisetzung als pathophysiologischen Mechanismus erwarten. Um eine der Hypothesen bestätigen zu können, müssen jedoch zunächst weitere Untersuchungen an der  $\alpha_{1F}$ -Untereinheit vorgenommen werden, zu denen u. a. pharmakologische Tests sowie funktionelle Studien gehören.

## 4.4 Mutationsanalyse im *CACNA1F*-Gen

### 4.4.1 *CACNA1F*-Mutationsanalyse bei Patienten mit CSNB2

In 19 der 21 untersuchten Familien mit CSNB2 konnten Veränderungen im codierenden Bereich des *CACNA1F*-Gens gefunden werden. Dass in zwei der untersuchten Familien (CSNBX-19, CSNBX-30) keine Mutationen entdeckt werden konnten, kann auf eine Vielzahl von Gründen zurückgehen. Zum einen können keine Aussagen über Promotor- und Intronbereiche, die nicht in den von den gewählten Primerpaaren abgedeckten Regionen liegen, gemacht werden, zum anderen liegt die Sensitivität der benutzten Methoden nicht bei 100 %. Handelt es sich innerhalb der Familie um einen Einzelfall ohne weitere Betroffene in der Verwandtschaft, wie es bei der Familie CSNBX-30 der Fall ist, kann der eindeutige Nachweis eines X-chromosomalen Erbgangs oft nicht erfolgen. In diesem Fall muss auch eine autosomal-rezessive Vererbung in Betracht gezogen werden.

Das Ergebnis dieser Arbeit lässt jedoch darauf schließen, dass *CACNA1F* das einzige Gen ist, das im mutierten Zustand zur inkompletten Form der CSNB führt. Die Identifikation dieses Gens stellt somit einen wichtigen Fortschritt hinsichtlich der Diagnostik dar. Zusätzlich kann Überträgerinnen die Möglichkeit der molekulargenetischen Diagnostik angeboten werden. Erschwert wird dies jedoch durch die Tatsache, dass es sich bei *CACNA1F* um

ein relativ großes Gen handelt und dass die Mutationen über das gesamte Gen verteilt sind. Zudem konnte keine Mutation identifiziert werden, die häufiger vorkommt, wie es z. B. bei der cystischen Fibrose der Fall ist. So konnten 17 verschiedene Mutationen nachgewiesen werden, von denen nur zwei doppelt auftraten. Dies veranlasst zur Annahme, dass in anderen CSNB2-Familien weitere, bislang nicht beschriebene Mutationen gefunden werden können und sich so die Anzahl der verschiedenen Mutationen noch weiter erhöhen wird.

In dieser Arbeit konnten neun *missense* Mutationen, sechs *nonsense* Mutationen und eine Insertion, die zu einem vorzeitigen Terminationscodon führt, sowie eine Deletion, die keine Leserahmenverschiebung zur Folge hat, entdeckt werden. Alle *missense* Mutationen, bis auf L849P in Exon 21, liegen in zwischen den  $\alpha_1$ -Untereinheiten der einzelnen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle vom L-Typ konservierten Regionen.

Wie stark sich eine pathogene Mutation als anomaler Phänotyp auswirkt, bestimmen mehrere Faktoren. Dazu gehören die Art der Mutation und wie sich die Expression des mutierten Gens ändert (Abnahme der Genexpression/Überexpression/ektopische Expression), der Umfang, in dem Aspekte des anomalen Phänotyps im heterozygoten Organismus ausgeprägt sind, der betroffene Zelltyp und der Anteil der betroffenen Zellen sowie bei einigen Erkrankungen der Elternteil, von dem die Mutation stammt. *Nonsense* Mutationen führen in der Regel zu gravierenden phänotypischen Veränderungen. Eine der möglichen Folgen von *nonsense* Mutationen ist die Verkürzung des Proteins, wobei dem Translationsprodukt C-terminale Sequenzabschnitte fehlen. Die genauen Auswirkungen auf die Genfunktion hängen dann von der Stabilität des Genprodukts, von der Länge der fehlenden Bereiche und von der Funktion der fehlenden Aminosäuren ab. Weitere Folgen können eine Instabilität der mRNA oder das Überspringen von Exons sein, wozu auch Deletionen führen können. Kommt es dabei nicht zu Rasterverschiebungen und sind die fehlenden Aminosäuren für die Funktion nicht unabdingbar, sollten die phänotypischen Auswirkungen weniger gravierend sein.

Schwierigkeiten bereitet es jedoch v. a. oft abzuschätzen, ob *missense* Mutationen eindeutig als pathogen einzustufen sind. Bei *missense* Mutationen lassen sich mitunter die pathogenen Varianten nur schwer von neutralen Mutationen unterscheiden. Auch in dieser Arbeit wurden einige *missense* Mutationen, die bei einzelnen Patienten, nicht jedoch bei 120 Kontrollchromosomen gefunden werden konnten, als Sequenzvarianten, die äußerst selten auch in der gesunden Allgemeinbevölkerung auftreten, eingestuft, nachdem in diesen Familien weitere, eindeutig pathogene *nonsense* Mutationen gefunden wurden, die die Genfunktion fast immer deutlich herabsetzen und zu einem verkürzten Protein führen.

Ob und inwieweit die nachgewiesenen *missense* Mutationen pathogen sind, ist somit noch ungewiss. Einige der *missense* Mutationen liegen dabei in für die Funktion und die Kinetik des Kanals möglicherweise wichtigen Strukturen. So findet der Austausch des apolaren Glycins an Position 369 gegen ein sauer hydrophiles Aspartat im hoch konservierten Bereich von IS6 statt, einem Segment, in dem die für die langsame, spannungsabhängige Inaktivierung benötigten Aminosäuren liegen (Zhang *et al.*, 1994). Die im Bereich von IIS5 und der Verbindung zu IIS6 liegenden Mutationen G1007R und R1049W betreffen eine Region, die bei der Vermittlung der DHP-Sensitivität eine wichtige Rolle spielt. Zudem liegt die Mutation R1049W im Bereich der sog. „Pore-loop“ nahe der für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Selektivität verantwortlichen SS1-SS2-Region und kann so evtl. neben der Permeationsgeschwindigkeit auch die Ionenselektivität beeinflussen. Gleiches gilt für den Austausch eines apolaren verzweigt-kettigen Leucins gegen ein positiv geladenes Histidin mit aromatischer Seitenkette an Position 1364. Diese Mutation liegt in unmittelbarer Nachbarschaft zur SS1-SS2-Region in der Schleife zwischen IVS5 und IVS6 und nimmt dadurch möglicherweise Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Dass sich mehrere *missense* Mutationen (C1488R, P1489R, 1497P) am C-terminalen Ende in der sich der EF-Hand anschließenden, zwischen den einzelnen  $\alpha_1$ -Untereinheiten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle hoch konservierten Region konzentrieren, für die bislang kein funktionelles Korrelat beschrieben wurde, weist evtl. darauf hin, dass diese Region Strukturen enthält, die für die Funktion oder Kinetik des Kanals wichtig sind.

Nach dem derzeitigen Stand ist keine deutliche Genotyp-Phänotyp Korrelation zu erkennen (E. Apfelstedt, pers. Mitteilung), das heißt, es ist noch ungewiss, in welchem Ausmaß die einzelnen Mutationen den Phänotyp beeinflussen. Dies liegt zum einen auch daran, dass auch innerhalb der Familien starke Variationen bzgl. des Phänotyps auftreten können. Eindeutig nachgewiesen werden konnte jedoch die Genotyp-Phänotyp-Korrelation zwischen Mutationen im *CACNA1F*-Gen und Patienten mit CSNB2, bei denen die Diagnose zuvor durch klinische und elektrophysiologische Methoden gestellt worden war.

In einer der in dieser Arbeit molekulargenetisch untersuchten Familien (CSNBX-09) war zuvor im *RPGR*-Gen, in dem bei Patienten mit Retinitis pigmentosa (RP3) Mutationen gefunden werden können, eine *missense* Mutation nachgewiesen worden. Es handelt sich um den nichtkonservativen Austausch eines Valins gegen ein Phenylalanin (V36F) in einer hoch konservierten *RPGR*-Domäne kurz vor der RCC1-homologen Region. Diese Mutation cosegregiert mit der Erkrankung in der Familie und konnte bei der SSCP-Analyse von 560 Kontrollchromosomen nicht entdeckt werden (Herrmann *et al.*, 1997). Klinisch und

elektrophysiologisch weist die Familie jedoch für die CSNB2 typische Merkmale auf. Die betroffenen Männer haben normale Fundi, eine ausgeprägte Myopie mit reduzierter Sehschärfe und ein eingeschränktes Dämmerungssehen. Die obligaten Überträgerinnen zeigen bei der Ophthalmoskopie keine retinalen Degenerationserscheinungen. Auch die ERG-Veränderungen weisen eindeutig auf den inkompletten CSNB-Typ hin. Mit dem Nachweis einer *nonsense* Mutation im Exon 46 des *CACNA1F*-Gens (R1816X) konnte eine weitere Mutation, die mit der Erkrankung in der Familie cosegregiert, gefunden werden. Dies lässt die zuvor identifizierte *missense* Mutation im *RPGR*-Gen als eine neutrale Variante bzw. einen sehr seltenen Polymorphismus erscheinen.

Bestätigt wird das Ergebnis dieser Arbeit durch die Analyse weiterer 31 Familien mit CSNB2 aus dem nordamerikanischen, dänischen und kanadischen Raum (Bech-Hansen *et al.*, 1998; Bech-Hansen *et al.*, 1999). Insgesamt konnten 15 verschiedene Mutationen im *CACNA1F*-Gen identifiziert werden. Dabei handelt es sich in 2/3 der Fälle um *nonsense* oder *frameshift* Mutationen, wobei nur bei zwei der Familien keine Mutationen entdeckt werden konnten. 15 dieser Familien stammen wohl aus einer *founder* Population von mennonitischen Einwanderern nach Westkanada und zeigen dieselbe *frameshift* Mutation in Exon 27 (nt3133(insC)). Diese Mutation konnte interessanterweise auch bei einer der in dieser Arbeit untersuchten Familie nachgewiesen werden (CSNBX-22).

**Tab. 15:** *CACNA1F*-Mutationen in Familien mit CSNB2\*

Exon	Mutation	Nukleotidaustausch	Konsequenz
2	R50X	nt148C→T	Arg→Stop, Pos. 50
2	R82X	nt244C→T	Arg→Stop, Pos. 82
9	D406(delC)	nt1218(delC)	<i>frameshift</i>
11	D463(delC)	nt1389(delC)	<i>frameshift</i>
19	E785V	nt2354A→T	Glu→Val, Pos. 785
21	R884X	nt2650C→T	Arg→Stop, Pos. 884
23	A917D	nt2750C→A	Ala→Asp, Pos. 917
27	L1045(insC)	nt3133(insC)	<i>frameshift</i>
30	I1213(delC)	nt3639(delC)	<i>frameshift</i>
33	R1288X	nt3862C→T	Arg→Stop, Pos. 1288
37	W1440X	nt4320G→A	Trp→Stop, Pos. 1440
41	del Exon 41		<i>splice site</i> Mutation

\* Daten aus Bech-Hansen *et al.*, 1998 und Bech-Hansen *et al.*, 1999

#### 4.4.2 *CACNA1F*-Mutationsanalyse bei Patienten mit ÅIED-verwandtem Phänotyp

Mit dem ÅIED-verwandten Phänotyp glaubte man, eine weitere X-chromosomale Augenkrankung gefunden zu haben, die sich trotz starker Ähnlichkeiten mit ÅIED und CSNB2 in einigen Aspekten von diesen beiden Erkrankungen zu unterscheiden schien (Carlson *et al.*, 1991). Anfänglich wurde dieser Erkrankung nur eine Familie zugerechnet. Die Betroffenen zeigten dabei einige mit ÅIED übereinstimmende Gemeinsamkeiten wie eine reduzierte Sehschärfe, Astigmatismus und eine gestörte Dunkeladaptation, jedoch konnten keine oder nur spärliche Hinweise auf den für ÅIED so typischen okulären Albinismus, Nystagmus oder gestörten Farbensinn gefunden werden. V. a. die Unterschiede im ERG, allen voran die b-Welle in der Maximalantwort, die bei ÅIED subnormal, bei der ÅIED-verwandten Form jedoch fast komplett unterdrückt war, verleiteten zur Annahme, dass es sich bei der ÅIED-verwandten Form um eine von der ÅIED verschiedene Erkrankung handelt. Der klinische Befund ließ zwar auch an die inkomplette Form der CSNB denken, jedoch konnten im ERG bei Patienten mit dem ÅIED-verwandten Phänotyp leichte Unterschiede zur CSNB2, wie eine reduzierte a-Welle und subnormale, aber noch vorhandene oszillatorische Potentiale, festgestellt werden (Carlson *et al.*, 1991).

Im Rahmen weiterer Untersuchungen wurden schließlich noch zwei weitere Familien (Rosenberg *et al.*, 1990; Glass *et al.*, 1993), die ursprünglich mit ÅIED diagnostiziert worden waren, ebenfalls der ÅIED-verwandten Form zugerechnet. Die ausgeprägten Gemeinsamkeiten zwischen der ÅIED-verwandten Form und CSNB2, welche die Erkrankungen kaum unterscheidbar machten, führten bald zu der Frage, ob es sich bei diesen Erkrankungen evtl. um verwandte Syndrome handeln könnte. Kopplungsstudien hatten zwar jeweils eine Kopplung auf Xp11 favorisiert (Glass *et al.*, 1993), jedoch konnte das Intervall für die ÅIED-verwandte Form nicht weiter eingegrenzt werden, so dass die Frage nach einer Allelität beider Erkrankungen offen blieb.

Um eine Allelität auszuschließen bzw. nachzuweisen, wurden in dieser Arbeit eine große Familie und ein sporadischer Patient mit ÅIED-verwandtem Phänotyp auf Mutationen im *CACNA1F*-Gen hin untersucht. Die schon in der Literatur beschriebene Familie (Carlson *et al.*, 1991) zeigte bis auf eine leicht reduzierte a-Welle im ERG, was eher für die klassische ÅIED typisch ist, klinische und elektrophysiologische Befunde, die gut mit der inkompletten Form der CSNB vereinbar sind. Der sporadische Patient war aufgrund eines hypopigmentierten Fundus mit der ÅIED-verwandten Form diagnostiziert worden. Zudem zeigte er

einen horizontalen Nystagmus, Strabismus und eine Blickhebeschwäche mit Aufblicksakaden.

In beiden Fällen konnten Mutationen im *CACNA1F*-Gen gefunden werden, die eine Co-segregation mit der Erkrankung in der Familie zeigten. Auch in den beiden anderen als ÅIED-verwandte Form eingestuften Familien (Glass *et al.*, 1993; Rosenberg *et al.*, 1990) sind inzwischen Mutationen im *CACNA1F*-Gen identifiziert worden (N. T. Bech-Hansen, pers. Mitteilung). Somit zeigen alle bislang beschriebenen Familien mit ÅIED-verwandtem Phänotyp Mutationen im *CACNA1F*-Gen. Dies bestätigt die schon zuvor vermutete Alleli-tät von CSNB2 und der ÅIED-verwandten Form. Sowohl die Mutationsbefunde wie auch die elektrophysiologischen und klinischen Befunde legen nahe, dass es besser gewesen wäre, die Familien mit der ÅIED-verwandten Form eher als CSNB2-verwandte Form zu klas-sifizieren. Die Tatsache, dass beide Erkrankungen phänotypisch und elektrophysiologisch kaum bzw. nicht zu unterscheiden sind und Mutationen in demselben Gen aufweisen, lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich um identische Erkrankungen handelt. Nun gilt es, die eingeführte Nomenklatur zu revidieren und das Symbol der ÅIED-verwandten Form in CSNB2 zu ändern.

#### 4.4.3 *CACNA1F*-Mutationsanalyse bei Patienten mit ÅIED

Die klassische ÅIED wurde lange Zeit als eine Variante des okulären Albinismus klassifi-ziert (OA2). Durch das Fehlen charakteristischer klinischer sowie elektrophysiologischer Befunde kam man jedoch von dieser Einteilung ab und änderte das Krankheitssymbol von OA2 in ÅIED (Mandel *et al.*, 1989). Mit der Kartierung in ein Intervall zwischen DXS7 und DXS72 auf Xp11.4-11.23 stellte sich die Frage, ob ÅIED und CSNB2 allelische Er-krankungen sein könnten, die durch Mutationen in demselben Gen verursacht werden.

Dies konnte jedoch durch die Analyse einer DNA-Probe eines Nachkommens der 1964 be-schriebenen Originalfamilie unwahrscheinlich gemacht werden. Die Sequenzierung aller 48 Exons des *CACNA1F*-Gens ließ keine Mutationen im codierenden Bereich des Gens er-kennen. Allerdings können Veränderungen in den intronischen Regionen oder in den Pro-motorbereichen nicht ausgeschlossen werden. Charakteristische Unterschiede in einigen klinischen sowie elektrophysiologischen Befunden unterstützen jedoch eher die Annahme, dass es sich bei CSNB2 und ÅIED um nichtallelische Erkrankungen handelt. So sind Stö-rungen des Farbensehens, Fundusalbinismums und Foveahypoplasie sowie eine Reduktion der a-Welle in der Maximalantwort, eine nur wenig unterdrückte b-Welle und subnormale,

aber entdeckbare oszillatorische Potentiale Befunde, die bei der ÄIED, nicht aber bei der CSNB2 erhoben werden können.

Somit kann man sehr wahrscheinlich von einer genetischen Heterogenität dieser beiden Erkrankungen ausgehen.

#### 4.4.4 *CACNA1F*-Mutationsanalyse bei Patienten mit CSNB1

Kopplungsstudien der letzten Jahre zeigten, dass es sich bei *x*/CSNB um eine heterogene Erkrankung mit unterschiedlichen Genorten für die komplette und inkomplette Form handelt (Bech-Hansen *et al.*, 1997; Boycott *et al.*, 1998b). Die molekulargenetische Analyse im für die inkomplette Form der CSNB verantwortlichen *CACNA1F*-Gens bei Patienten mit CSNB1 sollte diese Annahme bestätigen. Vier Patienten, die in klinischen sowie elektrophysiologischen Untersuchungen typische Charakteristika der CSNB1 aufwiesen, wurden auf Mutationen im *CACNA1F*-Gen hin untersucht. Nach Analyse aller 48 Exons konnte keine Mutation im codierenden Bereich des Gens gefunden werden. Somit konnte die genetische Heterogenität und das Vorhandensein zweier verschiedener Loci für CSNB1 und CSNB2 weiter bestätigt werden.

Bislang ist noch kein Krankheitsgen für CSNB1 bekannt. Das Intervall konnte jedoch in der letzten Zeit durch weitere Kopplungs- und Kartierungsversuche erheblich eingegrenzt werden. So machte es eine Kopplungsstudie in einer großen Familie mit CSNB1 (CSNBX-01) möglich, als neue distale Begrenzung des Intervalls den Marker DXS8042 zu identifizieren und die Kandidatenregion auf den Bereich zwischen DXS8042 und DXS228 auf Xp11.4 einzugrenzen (Maurer *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Weitere Kartierungsversuche konnten schließlich als neues Intervall die Region zwischen DXS1368 und DXS228 identifizieren. Bislang konnten zwei in diese Gegend kartierte Gene als Krankheitsgene ausgeschlossen werden. Zum einen wurde das *DFFRX*-Gen in Betracht gezogen, das nahe dem Marker DXS993 liegt. Es ist das menschliche Homolog zum *Drosophila faf*-Gen, welches für die Ausbildung von Fettfacetten (*fat facets*) verantwortlich ist. Neben seiner Rolle bei der Ausreifung der Oozyten bei *Drosophila* ist es wichtig für die normale Augenentwicklung und Ausbildung der Photorezeptoren. Wegen seiner Lage auf Xp11.4 wurde es als Kandidatengen für CSNB1 und COD1 in Betracht gezogen. Dies wurde jedoch für COD1 nach weiteren Feinkartierungen weitestgehend ausgeschlossen (Jones *et al.*, 1996). Auch die Sequenzierung der kompletten *DFFRX*-cDNA eines Betroffenen der

in diese Region gekoppelten Familie (CSNBX-01) ergab keine pathologischen Sequenzveränderungen (Maurer *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Ebenfalls ausgeschlossen werden konnte das  $\text{Ca}^{2+}$ -Serinkinase-Gen (*CASK*), das ebenfalls nach Xp11.4 kartiert werden konnte (Dimitratos *et al.*, 1998). Es codiert für eine membranassoziierte Guanylatkinase (MAGUK) mit ausgeprägter Homologie zu *Drosophila* Camguk (*Cmg*) und Ratten-*CASK*, die beide im Gehirn exprimiert werden und eine Rolle bei der synaptischen Transmission spielen. Zwei Erkrankungen mit Störungen der Sehfunktion liegen eng benachbart zu *CASK*. Zum einen die X-chromosomale Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (COD), eine angeborene progressive Erkrankung der Zapfen. Nach neuesten Erkenntnissen liegt der *CASK*-Genort im Kandidatenintervall von COD, so dass *CASK* als aussichtsreiches Kandidatengen für diese Erkrankung gilt. Zum anderen handelt es sich um die X-chromosomale optische Atrophie (*xIOPT*), eine progrediente Erkrankung mit verminderter Sehschärfe und beidseitiger Optikusatrophie. Jedoch liegt der *CASK*-Genort nicht mehr im Kandidatenintervall von *xIOPT*. Aufgrund dieser Daten galt das *CASK*-Gen auch als potentiell Kandidatengen für CSNB1. Mutationen im Maus-*CASK*-Gen führen jedoch bei Mäusen zu einer Veränderung der kraniofazialen Morphologie mit Ausbildung einer Gaumenspalte (Lavery und Wilson, 1998). Dies ist mit dem Phänotyp bei CSNB1 absolut nicht vereinbar, so dass nach weiteren potentiellen Kandidatengenen geforscht werden muss.

Einen ersten Ansatz dafür bietet das *no b-wave (nob)* Mausmodell (Pardue *et al.*, 1998). Diese Mausmutante zeigt mehrere für CSNB1 charakteristische ERG-Veränderungen, wobei die Struktur und der Aufbau der Retina histologisch normal erscheinen. So erhofft man sich, mit Hilfe dieser Mausmutante die der kompletten Form der CSNB zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen zu verstehen und das die Erkrankung verursachende Gen zu identifizieren. Zusätzlich gibt dieses Mausmodell Einblick in die der normalen synaptischen Transmission zugrundeliegenden Prozesse.

Um weitere mögliche Kandidatengene für die komplette Form der CSNB zu finden, werden derzeit intensive Bemühungen darauf verwendet, die Charakterisierung der Region voranzutreiben. Von der Sequenzierung dieser Region erhofft man sich, weitere retinal exprimierte ESTs zu identifizieren, die sich bei der Mutationssuche bei mit CSNB1 diagnostizierten Patienten als das für die komplette Form der CSNB verantwortliche Krankheitsgen erweisen. Möglicherweise handelt es sich dabei um Gene, die eine Bedeutung innerhalb kortikaler Strukturen oder bei dem Regelkreis zwischen Stäbchen und Zapfen haben, der dazu führt, dass die Stäbchen bei Tag durch die Zapfen gehemmt werden. So

könnte es sich bei dem grundlegenden Mechanismus auch hier um eine Art Dauerreiz mit konsekutiver Desensibilisierung, jedoch im Postrezeptorbereich, handeln.

#### 4.4.5 *CACNA1F*-Mutationsanalyse bei Patienten mit *x/CN*

Die Identifizierung des *CACNA1F*-Gens erlaubt es, retinale Störungen, die in dieselbe Region kartiert wurden, spezifisch auf Mutationen in diesem Gen zu testen. Bei der Region Xp11.4-11.3 handelt es sich dabei um eine Region, in der zahlreiche hereditäre Augenerkrankungen liegen bzw. vermutet werden, wie z. B. CSNB1, RP2, COD1, die Norrie-Erkrankung, ÅIED, die X-gekoppelte optische Atrophie (OA2) und der X-chromosomale kongenitale Nystagmus. Dieser erscheint zudem interessant, da Nystagmus auch ein Symptom der *x/CSNB* ist.

Wenig wahrscheinlich wurde die Annahme einer Allelität dieser beiden Erkrankungen mit der in dieser Arbeit erfolgten Untersuchung eines Patienten einer großen Familie mit *x/CN*. Eher auf eine Heterogenität hinweisend ist die Tatsache, dass keine Mutationen im *CACNA1F*-Gen gefunden werden konnten.

Weitere Kartierungsversuche der letzten Wochen unterstützen diese Annahme. So lokalisierte man das Gen für den X-chromosomalen, dominant vererbten kongenitalen Nystagmus, die häufigste Form dieser Erkrankung, in ein Intervall zwischen DXS8015 und DXS1003 auf Xp11.4-11.3 (Cabot *et al.*, 1999), welches CSNB2 ausschließt. Aus mehreren Gründen nimmt man jedoch an, dass es sich um ein defektes neuronales Gen handelt. Die Suche nach einer spezifischen neuroanatomischen Struktur erweist sich indessen als schwierig, da der Nystagmus evtl. eher aus einer Instabilität des okulomotorischen Systems als aus einem genau lokalisierbaren Defekt in der Sehbahn resultiert. Zudem konnte gezeigt werden, dass Patienten mit *x/CN* ausgeprägte Fixationsreflexe und stabile Augenfolgebewegungen mit einem normalen vestibulo-okulären Reflex haben, was zur Annahme veranlasste, dass *x/CN* durch eine Instabilität in den Efferenzen der extraokulären Muskeln, die degenerative Veränderungen in den Mitochondrien zeigen, bedingt ist (Dell'Osso *et al.*, 1992).

Interessanterweise konnte zur gleichen Zeit eine Kopplung des X-chromosomalen, dominant vererbten kongenitalen Nystagmus auch zwischen GATA172DO5 und DXS1192 auf Xq26-27 beschrieben werden (Kerrison *et al.*, 1999). Die Untersuchung zweier Kandidatengene führte jedoch zu keinem Ergebnis. Weder im *CDRI*-Gen (*cerebellar degeneration-related-gen*), das in den Purkinjezellen des Kleinhirns exprimiert wird und für ein

Antigen codiert, das Angriffspunkt von Autoantikörpern bei der paraneoplastischen cerebellären Degeneration mit Ataxie und Nystagmus ist, noch im *SOX3*-Gen, das im fetalen Gehirn exprimiert wird, konnten bei Patienten mit *x/CN* Mutationen gefunden werden.

Die Ursache für die Inkonsistenz dieser Kartierungsstudien ist unklar, so dass es möglicherweise zwei Loci für den idiopathischen kongenitalen Nystagmus auf dem X-Chromosom gibt. Klarheit wird jedoch erst die Klonierung der entsprechenden Krankheitsgene liefern.

Ein erster Ansatz für funktionelle Kandidatengenverfahren in Ergänzung zur Suche nach weiteren positionellen Kandidatengen sind Überlegungen, die von einem Defekt in einem Gen ausgehen, das wichtige Funktionen in den neuronalen Bahnen des Gehirns innehat. Dafür sprechen das bevorzugte Auftreten von Störungen im afferenten System, die Abnahme des Nystagmus beim Tragen von Kontaktlinsen sowie neurologische Ursachen bei der erworbenen Form des Nystagmus bei Erwachsenen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Bei der kongenitalen stationären Nachtblindheit (CSNB) handelt es sich um eine klinisch und genetisch heterogene Erkrankung, die durch eine seit Geburt vorhandene nichtprogredierende Nachtblindheit und verminderte Sehschärfe gekennzeichnet ist. Bei der x-gekoppelten Form (x/CSNB) sind zudem ein Nystagmus sowie Strabismus bei normalem Augenhintergrund beschrieben. Aus elektrophysiologischer und psychophysischer Sicht lassen sich dabei zwei Varianten unterscheiden. Eine Form, bei der keine Stäbchenfunktion mehr nachweisbar ist (CSNB1, komplette CSNB) sowie eine Form, bei der noch eine Reststäbchenfunktion erhalten ist (CSNB2, inkomplette CSNB). Der Genort für die inkomplette Form war vor Beginn dieser Arbeit zwischen die Marker DXS722 und DXS255 auf Xp11.23 gekoppelt worden. Im Rahmen eines Projektes von Arbeitsgruppen aus München und Jena konnten in dieser Region zahlreiche neue Gene identifiziert werden, u. a. das *CACNA1F*-Gen.

*CACNA1F* liegt auf den Cosmiden PO37 und MO111 und besteht aus 48 Exons mit einer codierenden Sequenz von 5901 Nukleotiden. Diese codieren für ein Protein von 1966 Aminosäuren Länge und einem Molekulargewicht von 219,5 kDa. Mit der Northern-Blot Hybridisierung ließ sich ausschließlich in retinalem Gewebe eine Bande nachweisen. Vergleichende Sequenzanalysen bestätigten die Annahme, dass *CACNA1F* für eine neue  $\alpha_1$ -Untereinheit eines transvers-tubulären, spannungsabhängigen, Dihydropyridin-sensitiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals vom L-Typ codiert. Aufgrund dieser Homologien und im Hinblick auf die Tatsache, dass als Pathogenese der CSNB2 eine fehlerhafte Neurotransmission vermutet wurde, wurde *CACNA1F* als Kandidatengen für CSNB2 in Betracht gezogen.

Ziel dieser Arbeit war es, der Frage nachzugehen, ob es sich bei *CACNA1F* um das bei CSNB2 mutierte Krankheitsgen handelt und ob sich die vermutete genetische Heterogenität von CSNB1 und CSNB2 eindeutig bestätigen lässt. Zudem sollte untersucht werden, ob es sich bei CSNB2 und der  $\Delta$ IED-verwandten Form, einer Augenerkrankung, die ausgeprägte klinische und elektrophysiologische Gemeinsamkeiten mit CSNB2 aufweist, um allelische Erkrankungen handelt. Die Identifizierung des *CACNA1F*-Gens erlaubt es zudem, weitere retinale Störungen, die in dieselbe Region kartiert wurden, spezifisch auf Mutationen in diesem Gen zu untersuchen, um eine Allelität auszuschließen bzw. zu bestätigen.

Zwei der zahlreichen Erkrankungen (ÅIED und  $x/CN$ ), die ebenfalls in der Region Xp11.4-11.3 liegen bzw. vermutet werden, wurden somit ebenfalls in diese Arbeit miteinbezogen. Die DNA von Indexpatienten mit inkompletter sowie kompletter  $x/CSNB$ , ÅIED-verwandtem Phänotyp, ÅIED sowie  $x/CN$  wurden mittels SSCP und Sequenzierung analysiert. In 21 Familien mit CSNB2 konnten 17 verschiedene Mutationen im *CACNA1F*-Gen bei 19 Patienten nachgewiesen werden. Es handelt sich hierbei um neun *missense* und sechs *nonsense* Mutationen sowie je eine Insertion und eine Deletion. Ein möglicher häufiger Polymorphismus wurde durch jeweils 120 Kontrollchromosomen weitestgehend ausgeschlossen. In jeder der untersuchten Familien zeigt die gefundene Mutation eine Cosegregation mit der Erkrankung in der Familie. Auch in den beiden Familien mit ÅIED-verwandtem Phänotyp konnten Mutationen im *CACNA1F*-Gen identifiziert werden. Im Gegensatz dazu ließ sich in vier Familien mit CSNB1 und bei der Originalfamilie mit ÅIED sowie einer großen Familie mit  $x/CN$  keine Mutation in der codierenden Sequenz des *CACNA1F*-Gens nachweisen.

Die pathophysiologischen Mechanismen, die für die Entstehung der CSNB2 verantwortlich sind, sind jedoch auch nach Klonierung des Krankheitsgens noch unbekannt. Das Ergebnis der Mutationssuche im *CACNA1F*-Gen deutet jedoch darauf hin, dass die Mutante, sei es, dass sie in den Stäbchen oder in den Zapfen oder evtl. sogar in beiden exprimiert wird, funktionell verändert ist. Dadurch wird der Einstrom von  $Ca^{2+}$ -Ionen beeinträchtigt, was evtl. zu einem zu niedrigen Glutamat Spiegel im Bereich der postsynaptischen Bipolarzellen führen könnte. Dadurch würde diesen ein ständig lichtadaptierter Zustand vermittelt, so dass es zu einer fehlerhaften Informationsübertragung an der Synapse zwischen den Photorezeptoren und Bipolarzellen kommen würde. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es sich bei dem bereits bekannten L-Typ Kanal in der terminalen Region von Bipolarzellen um die neu identifizierte  $\alpha_1$ -Untereinheit handelt. Auch in diesem Fall würde es sich um eine inadäquate Glutamatfreisetzung als pathophysiologischen Mechanismus handeln.

Das Ergebnis dieser Arbeit lässt somit die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei *CACNA1F* um das Gen handelt, welches im mutierten Zustand zur CSNB2 und zur ÅIED-verwandten Form führt, eine Tatsache, die ebenso wie die elektrophysiologischen und psychophysischen Befunde nahe legt, dass es sich bei diesen beiden Erkrankungen um identische Erkrankungen handelt, wobei man idealerweise die Familie mit der ÅIED-verwandten Form von Beginn an eher als CSNB2-verwandte Form hätte klassifizieren müssen. Eine Allelität von CSNB1, ÅIED und  $x/CN$  mit CSNB2 lässt sich im Gegensatz dazu nicht bestätigen.

Dies wird auch durch kürzlich vorangetriebene Kopplungsanalysen bestätigt. Für diese Erkrankungen wie auch eine Vielzahl weiterer in dieser Region gelegenen Augenerkrankungen müssen durch Klonierung und Sequenzierung weitere Kandidatengene identifiziert werden, die dann als Krankheitsgene bestätigt bzw. ausgeschlossen werden müssen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ackerman MJ, Clapham DE (1997). Ion channels – basic science and clinical disease. *N. Engl. J. Med.* **336**, 1575-1586
- Aldred MA, Wright AF (1991). PCR detection of existing and new polymorphism at the TIMP locus. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1165
- Aldred MA, Dry KL, Sharp DM, van Dorp DB, Brown J, Hardwick LJ, Lester DH, Pryde FE, Teague PW, Jay M, Bird AC, Jay B, Wright AF (1992). Linkage analysis in X-linked congenital stationary night blindness. *Genomics* **14**, 99-104
- Alitalo T, Kruse TA, Forsius H, Eriksson AW, de la Chapelle A (1991). Localization of the Åland Island eye disease locus to the pericentromeric region of the X chromosome by linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* **48**, 31-38
- Allet B, Jeppesen PGN, Katagiri KJ, Delius H (1973). Mapping the DNA fragments produced by cleavage of  $\lambda$  DNA with endonuclease RI. *Nature* **241**, 120-123
- Altherr MR, Wasmuth JJ, Seldin MF, Nadeau JH, Baehr W, Pittler SJ (1992). Chromosome mapping of the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene in mouse and human: tight linkage to the Huntington disease region (4p16.3). *Genomics* **12**, 750-754
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5350-5354
- Auerbach E, Godel V, Rowe H (1969). An electrophysiological and psychophysical study of two forms of congenital nightblindness. *Invest. Ophthalmol.* **8**, 332-345
- Babitch J (1990). Channel hands. *Nature* **346**, 321-322
- Bech-Hansen NT, Field LL, Schramm AM, Reedyk M, Craig IW, Fraser NJ, Pearce WG (1990). A locus for X-linked congenital stationary night blindness is located on the proximal portion of the short arm of the X-chromosome. *Hum. Genet.* **84**, 406-408
- Bech-Hansen NT, Moore BJ, Pearce WG (1992). Mapping of locus for X-linked congenital stationary night blindness (CSNB1) proximal to DXS7. *Genomics* **12**, 409-411
- Bech-Hansen NT, Pearce WG (1993). Manifestations of X-linked congenital stationary night blindness in three daughters of an affected male: demonstration of homozygosity. *Am. J. Hum. Genet.* **52**, 71-77

- Bech-Hansen NT, Pearce WG, Musarella MA, Weleber RG, Maybaum TA, Birch DG, Miyake Y, Boycott KM (1997). Evidence for genetic heterogeneity in X-linked congenital stationary night blindness. *Am. J. Hum. Genet.* **61** Suppl.A #1339
- Bech-Hansen NT, Boycott KM, Gratton KJ, Ross DA, Field LL, Pearce WG (1998). Localization of a gene for incomplete X-linked congenital stationary night blindness to the interval between DXS6849 and DXS8023 in Xp11.23. *Hum. Genet.* **103**, 124-130
- Bech-Hansen NT, Boycott KM, Maybaum TA, Naylor MJ, Sparkes RL, Pearce WG, and the CSNB Consortium, University of Calgary (1999). X-linked congenital stationary night blindness: characterization of mutations in the CSNB2 gene (CACNA1F) and efforts to identify the CSNB1 gene. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, Fort Lauderdale. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40** #2472
- Beckmann H, Su LK, Kadesch T (1990). TFE3: a helix-loop-helix protein that activates transcription through the immunoglobulin enhancer muE3 motif. *Genes Dev.* **4**, 167-179
- Bergen AAB, ten Brink JB, Riemsdag F, Schuurman EJM, Tijmes N (1995). Localization of a novel X-linked congenital stationary night blindness locus: close linkage to the RP3 type retinitis pigmentosa gene region. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 931-935
- Bergen AAB, ten Brink JB, Riemsdag F, Schuurman EJM, Meire F, Tijmes N, de Jong PTVM (1996). Conclusive evidence for a distinct congenital stationary night blindness locus in Xp21.1. *J. Med. Genet.* **33**, 869-872
- Berger W, van Duijnhoven G, Pinckers A, Smits A, Ropers HH, Cremers F (1995). Linkage analysis in a Dutch family with X-linked recessive congenital stationary night blindness (XL-CSNB). *Hum. Genet.* **95**, 67-70
- Boycott KM, Halley GR, Schlessinger D, Bech-Hansen NT (1996). A 2-Megabase physical contig incorporating 43 DNA markers on the human X chromosome at p11.23-p11.22 from ZNF21 to DXS255. *Genomics* **33**, 488-497
- Boycott KM, Zahorchak RJ, Summer CG, Boycott NP, Kotak V, Russell CG, Bech-Hansen NT (1998a). Construction of a 1.5-Mb bacterial artificial chromosome contig in Xp11.23, a region of high gene content. *Genomics* **48**, 369-372
- Boycott KM, Pearce WG, Musarella MA, Weleber RG, Maybaum TA, Birch DG, Miyake Y, Young RSL, Bech-Hansen NT (1998b). Evidence for genetic heterogeneity in X-linked congenital stationary night blindness. *Am. J. Hum. Genet.* **62**, 865-875

- Brandau O, Nyakatura G, Jedeke KB, Platzer M, Achatz H, Ross M, Murken J, Rosenthal A, Meindl A (1998). UHX1 and PCTK1: precise characterisation and localisation within a gene-rich region in Xp11.23 and evaluation as candidate genes for retinal diseases mapped to Xp21.1-p11.2. *Europ. J. Hum. Genet.* **6**, 459-466
- Bulman DE (1997). Phenotype variation and newcomers in ion channel disorders. *Hum. Mol. Genet.* **6**, 1679-1685
- Burge C, Karlin S (1997). Prediction of complete gene structure in human genomic DNA. *J. Mol. Biol.* **268**, 1-17
- Cabot A, Gerber S, Perrault I, Rozet JM, Ducroq D, Souied E, Munnich A, Kaplan J (1998). A gene for X-linked idiopathic congenital nystagmus (NYS1) maps to chromosome Xp11.4-11.3. *Am. J. Hum. Genet.* **63** (Suppl.) #1636
- Cabot A, Rozet JM, Gerber S, Perrault I, Ducroq D, Smahi A, Souied E, Munnich A, Kaplan J (1999). A gene for X-linked idiopathic congenital nystagmus (NYS1) maps to chromosome Xp11.4-p11.3. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 1141-1146
- Carlson S, Vesti E, Raitta C, Donner M, Eriksson AW, Forsius H (1991). Clinical and electroretinographic comparison between Åland Island eye disease and a newly found related disease with X-chromosomal inheritance. *Acta Ophthalmol.* **69**, 703-710
- Carr RE (1974). Congenital stationary nightblindness. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **72**, 448-487
- Castellano A, Wei X, Birnbaumer L, Perez-Reyes E (1993). Cloning and expression of a neuronal calcium channel  $\beta$  subunit. *J. Biol. Chem.* **268**, 12359-12366
- Catterall WA, Striessnig J (1992). Receptor sites for  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists. *TiPS* **13**, 256-261
- Chen XH, Tsien RW (1997). Aspartate substitutions establish the concerted action of P-region glutamates in repeats I and III in forming the protonation site of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *J. Biol. Chem.* **272**, 30002-30008
- Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976). Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* **127**, 1550-1557
- Chin LS, Li L, Ferreira A, Kosik KS, Greengard P (1995). Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9230-9234

- Coleman MP, Nemeth AH, Campbell L, Raut CP, Weissenbach J, Davies KE (1994). A 1.8-Mb YAC contig in Xp11.23: identification of CpG islands and physical mapping of CA repeats in a region of high gene density. *Genomics* **21**, 337-343
- Condie A, Eeles R, Borresen AL, Coles C, Cooper C, Prosser J (1993). Detection of point mutations in the p53 gene: comparison of single-strand conformation polymorphism, constant denaturant gel electrophoresis, and hydroxylamine and osmium tetroxide techniques. *Hum. Mut.* **2**, 58-66
- Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Perez-Reyes E (1998). Cloning and characterization of  $\alpha_{1H}$  from human heart, a member of the T-type  $Ca^{2+}$  channel gene family. *Circ. Res.* **83**, 103-109
- Dai S, Klugbauer N, Zong X, Seisenberger S, Hofmann F (1999). The role of subunit composition on prepulse facilitation of the cardiac L-type calcium channel. *FEBS Lett.* **442**, 70-74
- Dell'Osso LF, Vander Steen J, Steinman RM, Collewijn H (1992). Foveation dynamics in congenital nystagmus III. Vestibulo-ocular reflex. *Doc. Ophthalmol.* **79**, 51-70
- Derry JMJ, Barnard PJ (1992). Physical linkage of the A-raf-1, properdin, synapsin I, and TIMP genes on the human and mouse X chromosomes. *Genomics* **12**, 632-638
- Derry JMJ, Ochs HD, Francke U (1994). Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* **78**, 635-644
- Derry JMJ, Kerns JA, Francke U (1995). RBM3, a novel human gene in Xp11.23 with a putative RNA-binding domain. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 2307-2311
- Derry JMJ, Gormally E, Means GD, Zhao W, Meindl A, Kelley RI, Boy DY, Herman GE (1999). Mutations in a  $\Delta^8$ - $\Delta^7$  sterol isomerase in the tattered mouse and X-linked dominant chondrodysplasia punctata. *Nature Genet.* **22**, 286-290
- De Waard M, Pragnell M, Campbell KP (1994).  $Ca^{2+}$  channel regulation by a conserved  $\beta$  subunit domain. *Neuron* **13**, 495-503
- De Waard M, Scott VE, Pragnell M, Campbell KP (1996). Identification of critical amino acids involved in  $\alpha_1$ - $\beta$  interaction in voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels. *FEBS Lett.* **380**, 272-276
- Dimitratos SD, Stathakis DG, Nelson CA, Woods DF, Brynat PJ (1998). The location of human *CASK* at Xp11.4 identifies this gene as a candidate for X-linked optic atrophy. *Genomics* **51**, 308-309

- Diriong S, Lory P, Williams ME, Ellis SB, Harpold MM, Taviaux S (1995). Chromosomal localization of the human genes for  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$ , and  $\alpha_{1E}$  voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel subunits. *Genomics* **30**, 605-609
- Dirksen RT, Nakai J, Gonzalez A, Imoto K, Beam KG (1997). The S5-S6 linker of repeat I is a critical determinant of L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel conductance. *Biophys. J.* **73**, 1402-1409
- Dorp DB van, Eriksson AW, Delleman JW, van Vliet AGM, Collewijn H, van Balen ATM, Forsius HR (1985). Åland eye disease: no albino misrouting. *Clin. Genet.* **28**, 526-531
- Doyle JL, Stubbs L (1998). Ataxia, arrhythmia and ion-channel gene defects. *TIG* **14**, 92-97
- Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, Sandberg MA, Berson EL (1990). A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* **343**, 364-366
- Dryja TP, Berson EL, Rao VR, Oprian DD (1993). Heterozygous missense mutation in the rhodopsin gene as a cause of congenital stationary night blindness. *Nature Genet.* **4**, 280-283
- Dryja TP, Hahn LB, Reboul T, Arnaud B (1996). Missense mutation in the gene encoding the  $\alpha$  subunit of rod transducin in the Nougaret form of congenital stationary night blindness. *Nature Genet.* **13**, 358-360
- Dunlap K, Luebke JI, Turner TJ (1995). Exocytotic  $\text{Ca}^{2+}$  channels in mammalian central neurons. *TINS* **18**, 89-98
- Elenius V, Eriksson AW, Forsius H (1968). ERG in a case of X-chromosomal pigment deficiency of fundus in combination with myopia, dyschromatopsia and defective dark-adaption. In *The clinical value of electroretinography* (François J, ed.). Proceedings of the 5th ISCRG Symposium, Ghent, 1966. Basel/New York: S Karger AG, 369-377
- El-Hayek R, Ikemoto N (1998). Identification of the minimum essential region in the II-III loop of the dihydropyridine receptor  $\alpha_1$  subunit required for activation of skeletal muscle-type excitation-contraction coupling. *Biochemistry* **37**, 7015-7020
- Falls HF (1952). *Transact. Ophthalm. Soc. U. K.* **50**, 421-467
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13

- Fisher SE, Hatchwell E, Chand A, Ockenden N, Monaco AP, Craig IW (1995). Construction of two YAC contigs in human Xp11.23-p11.22, one encompassing the loci OATL1, GATA, TFE3, and SYP, the other linking DXS255 to DXS146. *Genomics* **29**, 496-502
- Fisher SE, Ciccodicola A, Tanaka K, Curci A, Desicato S, D'Urso M, Craig IW (1997). Sequence-based exon prediction around the synaptophysin locus reveals a gene-rich area containing novel genes in human proximal Xp. *Genomics* **45**, 340-347
- Forsius H, Eriksson AW (1964). Ein neues Augensyndrom mit X-chromosomaler Transmission. Eine Sippe mit Fundusalbinismus, Foveahypoplasie, Nystagmus, Myopie, Astigmatismus und Dyschromatopsie. *Klin. Monatsbl. Augenheilk.* **144**, 447-457
- François J (1979). Albinism. *Ophthalmologica (Basel)* **178**, 19-31
- Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW, Magrath IT, Knowles DM, Dalla-Favera R (1991). p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5413-5417
- Gal A, Schinzel A, Orth U, Fraser NA, Mollica F, Craig IW, Kruse T, Mächler M, Neugebauer M, Bleeker-Wagemakers LM (1989). Gene of X-chromosomal congenital stationary night blindness is closely linked to DXS7 on Xp. *Hum. Genet.* **81**, 315-318
- Gal A, Orth U, Baehr W, Schwinger E, Rosenberg T (1994). Heterozygous missense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase  $\beta$ -subunit gene in autosomal dominant stationary night blindness. *Nature Genet.* **7**, 64-68
- Geraghty MT, Brody LC, Martin LS, Marble M, Kearns W, Pearson P, Monaco AP, Lehrach H, Valle D (1993). The isolation of cDNAs from OATL1 at Xp11.2 using a 480-kb YAC. *Genomics* **16**, 440-446
- Gersdorff H von, Sakaba T, Berglund K, Tachibana M (1998). Submillisecond kinetics of glutamate release from a sensory synapse. *Neuron* **21**, 1177-1188
- Glass IA, Good P, Coleman M, Fullwood P, Giles MG, Lindsay S, Nemeth AH, Davies KE, Willshaw HA, Fielder A, Kilpatrick M, Farndon PA (1993). Genetic mapping of a cone and rod dysfunction (Åland Island eye disease) to the proximal short arm of the human X chromosome. *J. Med. Genet.* **30**, 1044-1050

- Grabner M, Wang Z, Hering S, Striessnig J, Glossmann (1996). Transfer of 1,4-dihydropyridine sensitivity from L-type to class A (BI) calcium channels. *Neuron* **16**, 207-218
- Hammerstein W, Lisch W (1985). Ophthalmologische Genetik aus „Bücherei des Augenarztes“ (Band 105), Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- Hardcastle AJ, David-Gray ZK, Jay M, Bird AC, Bhattacharya SS (1997). Localization of CSNBX (CSNB4) between the retinitis pigmentosa loci RP2 and RP3 on proximal Xp. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**, 2750-2755
- Hartzell HC, Fischmeister R (1992). Direct regulation of cardiac Ca<sup>2+</sup> channels by G proteins: neither proven nor necessary? *TiPS* **13**, 380-385
- Hayashi K (1991). PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl.* **1**, 34-38
- Hayashi K (1992). PCR-SSCP: A method for detection of mutations. *Genet. Anal. Tech. Appl.* **9**, 73-79
- Hayashi K, Yandell DW (1993). How sensitive is PCR-SSCP? *Hum. Mut.* **2**, 338-346
- Heidelberger R, Matthews G (1992). Calcium influx and calcium current in single synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons. *J. Physiol.* **447**, 235-256
- Helling RB, Goodman HM, Boyer HW (1974). Analysis of R-*EcoRI* fragments of DNA from lambdaoid bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. *J. Virol.* **14**, 1235-1244
- Hemmes GC (1924). Over hereditairen Nystagmus. Thesis: Utrecht (pub)
- Héon E, Musarella MA (1994). Congenital stationary night blindness: a critical review for molecular approaches. In *Molecular Genetics of Inherited Eye Disorders* (eds. Wright AF, Jay B). Harwood Academic Publishers, London
- Herrmann K, Meindl A, Brandau O, Wissinger B, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Meitinger T (1997). *RPGR* missense mutation in a family with X-linked congenital stationary night blindness (CSNB). 9. Jahrestag der Gesellschaft für Humangenetik, Innsbruck. *Med. Genetik* **1**, 106-107
- Hockerman GH, Peterson BZ, Sharp E, Tanada TN, Scheuer T, Catterall WA (1997). Construction of a high-affinity receptor site for dihydropyridine agonists and antagonists by single amino acid substitutions in a non-L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 14906-14911
- Hofmann F, Biel M, Flockerzi V (1994). Molecular basis for Ca<sup>2+</sup> channel diversity. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 399-418

- Hofmann F, Lacinová L, Klugbauer N (1999). Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **139**, 33-86
- Hogan K, Powers PA, Gregg RG (1994). Cloning of the human skeletal muscle  $\alpha_1$  subunit of the dihydropyridine-sensitive L-type calcium channel (CACNL1A3). *Genomics* **24**, 608-609
- Hood DC, Greenstein V (1990). Models of the normal and abnormal rod system. *Vision Res.* **30**, 51-68
- Huebner K, ar-Rushdi A, Griffin CA, Isobe M, Kozak C, Emanuel BS, Nagarajan L, Cleveland JL, Bonner TI, Goldsborough MD, Croce CM, Rapp U (1986). Actively transcribed genes in the raf oncogene group, located on the X chromosome in mouse and human. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3934-3938
- Hullin R, Singer-Lahat D, Freichel M, Biel M, Dascal N, Hofmann F, Flockerzi V (1992). Calcium channel  $\beta$  subunit heterogeneity: functional expression of cloned cDNA from heart, aorta and brain. *EMBO J.* **11**, 885-890
- Iles DE, Segers B, Weghuis DO Suijkerbuijk R, Mikala G, Schwartz A, Wieringa B (1994). Refined localization of the  $\alpha_1$ -subunit of the skeletal muscle L-type voltage-dependent calcium channel (CACNL1A3) to human chromosome 1q32 by *in situ* hybridization. *Genomics* **19**, 561-563
- Inglehearn C, Farrar J, Denton M, Gal A, Humphries P, Bhattacharya SS (1993). Evidence against a second autosomal dominant retinitis pigmentosa locus close to rhodopsin on chromosome 3q. *Am. J. Hum. Genet.* **53**, 536-537
- al-Jandal N, Farrar GJ, Kiang AS, Humphries MM, Bannon N, Findlay JB, Humphries P, Kenna PF (1999). A novel mutation within the rhodopsin gene (Thr-94-Ile) causing autosomal dominant congenital stationary night blindness. *Hum. Mutat.* **13**, 75-81
- Johnson DA, Gautsch JW, Sportsman JR, Elder JH. (1984). Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose. *Gene Anal. Tech.* **1**, 3
- Jones MH, Fulong RA, Burkin H, Chalmers IJ, Brown GM, Khwaja O, Affara NA (1996). The *drosophila* developmental gene fat facets has a human homologue in Xp11.4 which escapes X-inactivation and has related sequences on Yq11.2. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1695-1701

- Kerrison JB, Arnould VJ, Barmada MM, Koenekoop RK, Schmeckpeper BJ, Maumenee IH (1996). A gene for autosomal dominant congenital nystagmus localizes to 6p12. *Genomics* **33**, 523-526
- Kerrison JB, Vagefi MR, Barmada MM, Maumenee IH (1999). Congenital motor nystagmus linked to Xq26-q27. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 600-607
- Kishimoto M, Sakura H, Hayashi K, Akanuma Y, Yazaki Y, Kasuga M, Kadowaki T (1992). Detection of mutations in the human insulin gene by single-strand conformation polymorphisms. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **74**, 1027-1031
- Khouri G, Mets MB, Smith VC, Wendell M, Pass AS (1988). X-linked congenital stationary night blindness: review and report of a family with hyperopia. *Arch. Ophthalmol.* **106**, 1417-1422
- Klugbauer N, Marais E, Lacinová L, Hofmann F (1999a). A T-type calcium channel from brain. *Pflügers Arch* **437**, 710-715
- Klugbauer N, Specht V, Dai S, Hofmann F (1999b). Cloning of new  $\gamma$  subunits. (eingereicht)
- Klugbauer N, Lacinová L, Marais E, Hobom M, Hofmann F (1999c). Molecular diversity of the calcium channel  $\alpha_2\delta$  subunit. *J. Neurosci.* **19**, 684-691
- Knight JC, Grimaldi G, Thiesen HJ, Bech-Hansen NT, Fletcher CDM, Coleman MP (1994). Clustered organization of Krüppel zinc-finger genes at Xp11.23, flanking a translocation breakpoint at OATL1: a physical map with locus assignments for ZNF21, ZNF41, ZNF81 and ELK1. *Genomics* **21**, 180-187
- Kobayashi H, Baumbach L, Matisse TC, Schiavi A, Greenberg F, Hoffman EP (1995). A gene for a severe lethal form of X-linked arthrogryposis (X-linked infantile spinal muscular atrophy) maps to human chromosome Xp11.3-q11.2. *Hum. Mol. Genet.* **4**, 1213-1216
- Kolluri R, Tolia KF, Carpenter CL, Rosen FS, Kirchhausen T (1996). Direct interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with the GTPase Cdc42. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 5615-5618
- Kozak M (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* **15**, 8125-8148
- Kretz, K, Callen W, Hedden V (1994). Cycle sequencing. *PCR Methods Appl.* **3**, 107-112
- Krizanova O (1996). Structural implications in the function of L-type voltage-dependent calcium channels. *Gen. Physiol. Biophys.* **15**, 79-87

- Kwan SP, Hagemann TL, Blaese RM, Rosen FS (1995). A high-resolution map of genes, microsatellite markers, and new dinucleotide repeats from UBE1 to the GATA locus in the region Xp11.23. *Genomics* **29**, 247-252
- Lacinová L, Hofmann F. (1999). Voltage-dependent calcium channels. In *Heart Physiology and Pathophysiology 4<sup>th</sup> edition* (Sperelakis N, Kurachi Y, Terzic A, Cohen M, eds). Academic Press (im Druck)
- Langrova H, Friedbug C, Besch D, Zrenner E, Apfelstedt-Sylla E (1999). Abnormalities of the long flash (ON-OFF) ERG in congenital stationary nightblindness (CSNB) of the Schubert-Bornschein type. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, Fort Lauderdale. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**, #3801
- Laverty HG, Wilson JB (1998). Murine CASK is disrupted in a sex-linked cleft palate mouse mutant. *Genomics* **53**, 29-41
- Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS, Mori Y, Campbell KP, Frankel WN (1998). The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca<sup>2+</sup>-channel  $\gamma$  subunit. *Nature Genet.* **19**, 340-347
- Leveque C, el Far O, Martin-Moutot N, Sato K, Kato R, Takahashi M, Seagar MJ (1994). Purification of the N-type calcium channel associated with syntaxin and synaptotagmin. A complex implicated in synaptic vesicle exocytosis. *J. Biol. Chem.* **269**, 6306-6312
- Li Y, Bleeker-Wagemakers E, Artlich A, Orth U, Wright AF, Schinzel A, Gal A (1991). The locus for X-chromosomal congenital stationary night blindness is closely linked to TIMP in two families but not in a third one. *Cytogenet. Cell Genet.* **58**, 2075
- Lorenz B, Andrassi M, Miliczek KD (1996). Die inkomplette kongenitale stationäre Nachtblindheit (CSNB). Eine wichtige Differentialdiagnose des kongenitalen Nystagmus. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* **208**, 48-55
- Lubs HA, Chiurazzi P, Arena JF, Schwartz C, Traenebjaerg L, Neri G (1999). XLMR genes. Update 1998. *Am. J. Med. Genet.* **83**, 237-247
- Maguire G, Maple B, Lukasiewicz P, Werblin F (1989).  $\gamma$ -Aminobutyrate type B receptor modulation of L-type calcium channel current at bipolar cell terminals in the retina of the tiger salamander. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 10144-10147

- Mandel JL, Willard HF, Nussbaum RL, Romeo G, Puck JM, Davies KE (1989). Report of the committee on the genetic constitution of the X chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.* **51**, 384-437
- Marmor M, Zrenner E (1995). Standard for clinical electroretinography (1994 update). *Doc. Ophthalmol.* **89**, 199-210
- Maurer J, Pusch CM, Leal SM, Achatz H, Broghammer M, Meister K, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Meindl A, Wissinger B. Refined mapping of the complete type of X-linked congenital stationary night blindness to the region between DXS8042 (DXS1368) and DXS228 in Xp11.4 and exclusion of *DFFRX* as a candidate gene. (Manuskript in Vorbereitung)
- McKusick VA (1968). „Mendelian Inheritance in Man“, 2nd ed., S. 384, Johns Hopkins Univ. Press Baltimore
- McKusick VA (1980). Observations on three disorders peculiar to Finnish or Ålandic: ocular albinism, ornithinemia and Finnish amyloidosis. In *Population Structure and Genetic Disorders* (Eriksson AW, ed.), S. 559-565, Academic Press, New York
- Meindl A, Dry K, Herrmann K, Manson F, Ciccodicola A, Edgar A, Carvalho MRS, Achatz H, Hellebrand H, Lennon A, Migliaccio C, Porter K, Zrenner E, Bird A, Jay M, Lorenz B, Wittwer B, D'Urso M, Meitinger T, Wright A (1996). A gene (*RPGR*) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Nature Genet.* **13**, 35-42
- Michaud J, Brody LC, Steel G, Fontaine G, Martin LS, Valle D, Mitchell G (1991). Strand-separating conformational polymorphism analysis: efficacy of detection of point mutations in the human ornithine  $\delta$ -aminotransferase gene. *Genomics* **13**, 389-394
- Mikami A, Imoto K, Tanabe T, Niidome T, Mori Y, Takeshima H, Narumiya S, Numa S (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* **340**, 230-233
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 1215
- Mitterdorfer J, Wang Z, Sinnegger MJ, Hering S, Striessnig J, Grabner M, Glossmann H (1996). Two amino acid residues in the IIIIS5 segment of L-type calcium channels differentially contribute to 1,4-dihydropyridine sensitivity. *J. Biol. Chem.* **271**, 30330-30335

- Miyake Y, Kawase Y (1984). Reduced amplitude of oscillatory potentials in female carriers of X-linked recessive congenital stationary night blindness. *Am. J. Ophthalmol.* **98**, 208-215
- Miyake Y, Yagasaki K, Horiguchi M, Kawase Y, Kanda T (1986). Congenital stationary night blindness with negative electroretinogram: a new classification. *Arch. Ophthalmol.* **104**, 1013-1020
- Miyake Y, Horiguchi M, Ota I, Shiroyama N (1987a). Characteristic ERG flicker anomaly in incomplete congenital stationary night blindness. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **28**, 1816-1823
- Miyake Y, Yagasaki K, Horiguchi M, Kawase Y (1987b). ON- and OFF-responses in photopic electroretinogram in complete and incomplete types of congenital stationary night blindness. *Jpn. J. Ophthalmol.* **31**, 81-87
- Miyake Y, Horiguchi M, Terasaki H, Kondo M (1994). Scotopic treshold response in complete and incomplete types of congenital stationary night blindness. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 3770-3775
- Monnier N, Procaccio V, Stieglitz P, Lunardi J (1997). Malignant-hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the alpha 1-subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle. *Am. J. Hum. Genet.* **60**, 1316-1325
- Motoike HK, Bodi I, Nakayama H, Schwartz A, Varadi G (1999). A region in IVS5 of the human cardiac L-type calcium channel is required for the use-dependent block by phenylalkylamines and benzothiazepines. *J. Biol. Chem.* **274**, 9409-9420
- Mullis KB, Faloona FA, Scharf SJ, Saiki RK, Horn G, Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**, 263
- Mullis KB, Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 355-350
- Musarella MA, Weleber RG, Murphy WH, Young RSL, Anson-Cartwright L, Mets M, Kraft SP, Polemeno R, Litt M, Worton RG (1989). Assignment of the gene for complete X-linked congenital stationary night blindness (CSNB1) to Xp11.3. *Genomics* **5**, 727-737
- Musarella MA, Kirshgessner C, Trofatter J, Miyake Y, Degennaro L (1992). Assignment of the gene for incomplete congenital stationary night blindness (CSNB2) to

- proximal Xp. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **33**, #502
- Nagaraja R, MacMillan S, Kere J, Jones C, Griffin S, Schmatz M, Terrell J, Shomaker M, Jermak C, Hott C, Masisi M, Mumm S, Srivastava A, Pilia G, Featherstone T, Mazzarella R, Kesterson S, McCauley B, Railey B, Burough F, Nowotny V, d'Urso M, States D, Brownstein B, Schlessinger D (1997). X chromosome map at 75-kb STS resolution, revealing extremes of recombination and GC content. *Genome Res.* **7**, 210-222
- Neely A, Wei X, Olcese R, Birnbaumer L, Sterani E (1993). Potentiation by the  $\beta$  subunit of the ratio of the ionic current to the charge movement in the cardiac calcium channel. *Science* **262**, 575-578
- Noble KG, Carr RE, Siegel IM (1990). Autosomal dominant congenital stationary night blindness and normal fundus with an electronegative electroretinogram. *Am. J. Ophthalmol.* **109**, 44-48
- Nyakatura G, Platzer M, Drescher B, Hellebrand H, Strom T, Meindl A, Rosenthal A (1996). Xp11.23: Sequencing and analysis of 300 kb around the Synaptophysin (Syp) Gene. 7<sup>th</sup> X-Chromosome Workshop
- Oliva MM, Wu TC, Yang VW (1993). Isolation and characterization of a differentiation-dependent gene in the human colonic cell line HT29-18. *Arch. Biochem. Biophys.* **302**, 183-192
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, Eijk R van, Oefner PJ, Hoffman SMG, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, Ommen GJB van, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR (1996). Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the  $\text{Ca}^{2+}$  channel Gene CACNL1A4. *Cell* **87**, 543-552
- Orita MY, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K (1989a). A rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction. *Genomics* **5**, 874-879
- Orita MY, Iwahara H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989b). Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand-conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2755-2770
- Ozcelik T, Lafreniere RG, Archer BT, Johnston PA, Willard HF, Francke U, Sudhof TC (1990). Synaptophysin: structure of the human gene and assignment to the X chromosome in man and mouse. *Am. J. Hum. Genet.* **47**, 551-561

- Padgett RA, Grabowski PJ, Konarska MM, Seiler S, Sharp PA (1986). Splicing of messenger RNA precursors. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 1119-1150
- Pardue MT, McCall MA, LaVail MM, Gregg RG, Peachey NS (1998). A naturally occurring mouse model of X-linked congenital stationary night blindness. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**, 2443-2449
- Pearce WG, Reedyk M, Coupland SG (1990). Variable expressivity in X-linked congenital stationary night blindness. *Canad. J. Ophthalmol.* **25**, 3-10
- Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee JH (1998). Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* **391**, 896-900
- Peterson BZ, Tanada TN, Catterall WA (1996). Molecular determinants of high affinity dihydropyridine binding in L-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* **271**, 5293-5296
- Peterson BZ, DeMaria CD, Yue DT (1999). Calmodulin is the  $Ca^{2+}$  sensor for  $Ca^{2+}$ -dependent inactivation of L-type calcium channels. *Neuron* **22**, 549-558
- Pillers DM, Buist NRM, Hanna CE, Weleber R, Powell B, Magenis RE (1988). Congenital adrenal hypoplasia, glycerol kinase deficiency and Duchenne-type muscular dystrophy in association with ocular hypopigmentation in a boy with 46,del(X)(p21p21);Y. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.* **43** (Suppl) A65
- Pillers DM, Towbin JA, Chamberlain JS, Wu D, Ranier J, Powell BR, McCabe EB (1990). Deletion mapping of Åland Island eye disease to Xp21 between DXS67 (B24) and Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* **47**, 795-801
- Powers PA, Liu S, Hogan K, Gregg RG (1992). Skeletal muscle and brain isoforms of a  $\beta$ -subunit of human voltage-dependent calcium channels are encoded by a single gene. *J. Biol. Chem.* **267**, 22967-22972
- Powers PA, Liu S, Hogan K, Gregg RG (1993). Molecular characterization of the gene encoding the gamma subunit of the human skeletal muscle 1,4-dihydropyridine-sensitive  $Ca^{2+}$  channel (CACNLG), cDNA sequence, gene structure and chromosomal location. *J. Biol. Chem.* **268**, 9275-9279
- Powers PA, Scherer SW, Tsui LC, Gregg RG, Hogan K (1994). Localization of the gene encoding the alpha 2/delta subunit (CACNL2A) of the human skeletal muscle voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel to chromosome 7q21-q22 by somatic cell hybrid analysis. *Genomics* **19**, 192-193

- Pragnell M, De Waard M, Mori Y, Tanabe T, Snutch TP, Campbell KP (1994). Calcium channel  $\beta$ -subunit binds to a conserved motif in the I-II cytoplasmic linker of the  $\alpha_1$ -subunit. *Nature* **368**, 67-70
- Puro DG, Hwang JJ, Kwon OJ, Chin H (1996). Characterization of an L-type calcium channel expressed by human retinal müller (glial) cells. *Mol. Brain Res.* **37**, 41-48
- Race RR, Sanger R (1975). Blood groups in man. 6<sup>th</sup> ed. Blackwell Scientific, Oxford
- Rao VN, Huebner K, Isobe M, ar-Rushdi A, Croce CM, Reddy ESP (1989). Elk, tissue-specific ets-related genes on chromosomes X and 14 near translocation breakpoints. *Science* **244**, 66-70
- Rao VR, Cohen GB, Oprian DD (1994) Rhodopsin mutation G90D and a molecular mechanism for congenital night blindness. *Nature* **367**, 639-642
- Regulla S, Schneider T, Nastainczyk W, Meyer HE, Hofmann F (1991). Identification of the site of interaction of the dihydropyridine channel blockers nitrendipine and azidopine with the calcium-channel  $\alpha_1$  subunit. *EMBO J.* **10**, 45-49
- Riggs LA (1954). Electroretinography in cases of night blindness. *Am. J. Ophthalmol.* **38**, 70-78
- Rosenberg T, Schwartz M, Simonsen SE (1990). Åland eye disease (Forsius-Eriksson-Miyake syndrome) with probability established in a Danish family. *Acta Ophthalmol.* **68**, 281-291
- Rosenfeld PJ, McKusick VA, Amberger JS, Dryja TP (1994). Recent advances in the gene map of inherited eye disorders: primary hereditary diseases of the retina, choroid, and vitreous. *J. Med. Genet.* **31**, 903-915
- Ruether K, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E (1993). Clinical findings in patients with congenital stationary night blindness of the Schubert-Bornschein type. *German J. Ophthalmol.* **2**, 429-435
- Ruttum MS, Lewandowski MF, Bateman JB (1992). Affected females in X-linked congenital stationary night blindness. *Ophthalmology* **99**, 747-752
- Saiki RK, Scharf SJ, Faloona FA, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**, 487-491

- Sandberg MA, Pawlyk BS, Dan J, Arnaud B, Dryja TP, Berson EL (1998). Rod and cone function in the Nougaret form of stationary night blindness. *Arch. Ophthalmol.* **116**, 867-872
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
- Sarkar G, Hoon HS, Sommer SS (1992). Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic Acids Res.* **20**, 871-878
- Schindelhauer D, Hellebrand H, Grimm L, Bader I, Meitinger T, Wehnert M, Ross M, Meindl A (1996). Long-range map of a 3.5-Mb region in Xp11.23-22 with a sequence-ready map from a 1.1-Mb gene-rich interval. *Genome Res.* **6**, 1056-1069
- Schlesinger M, Mashal U, Levy J, Fishelson Z (1993). Hereditary properdin deficiency in three families of Tunisian Jews. *Acta Paediat.* **82**, 744-777
- Schmidt RF, Thews G (1995). Physiologie des Menschen (26. Auflage). Springer Verlag, Berlin
- Schmitz Y, Witkovsky P (1997). Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Neuroscience* **78**, 1209-1216
- Schubert G, Bornschein H (1952). Beitrag zur Analyse des menschlichen Elektoretinogramms. *Ophthalmologica* **123**, 396-413
- Schultz D, Mikala G, Yatani A, Engle DB, Iles DE, Segers B, Sinke RJ, Weghuis DO, Klöckner U, Wakamori M, Wang JJ, Melvin D, Varadi G, Schwartz A (1993). Cloning, chromosomal localization, and functional expression of the  $\alpha_1$  subunit of the L-type voltage-dependent calcium channel from normal human heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6228-6232
- Schuster A, Lacinová L, Klugbauer N, Ito H, Birnbaumer L, Hofmann F (1996). The IVS6 segment of the L-type calcium channel is critical for the action of dihydropyridines and phenylalkylamines. *EMBO J.* **15**, 2365-2370
- Schwahn U, Lenzner S, Juan D, Feil S, Hinzmann B, van Duijnhoven G, Kirschner R, Hemberger M, Bergen AAB, Rosenberg T, Pinckers AJLG, Fundele R, Rosenthal A, Cremers FPM, Ropers HH, Berger W (1998). Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2. *Nature Genet.* **19**, 327-332
- Schwartz M, Rosenberg T (1991). Åland eye disease: linkage data. *Genomics* **10**, 327-332

- Seino S, Chen L, Seino M, Blondel O, Takeda J, Johnson JH, Bell GI (1992a). Cloning of the  $\alpha_1$  subunit of a voltage-dependent calcium channel expressed in pancreatic  $\beta$  cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 584-588
- Seino S, Yamada Y, Espinosa R III, Le Beau MM, Bell GI (1992b). Assignment of the gene encoding the  $\alpha_1$  subunit of the neuroendocrine/brain-type calcium channel (CACNL1A2) to human chromosome 3, band p14.3. *Genomics* **13**, 1375-1377
- Sharp PA, Sugden B, Sambrook J (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12**, 3055
- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993). The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* **16**, 325-332
- Shistik E, Ivanina T, Blumenstein Y, Dascal N (1998). Crucial role of N terminus in function of cardiac L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channel and its modulation by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **273**, 17901-17909
- Sidhar SK, Clark J, Gill S, Hamoudi R, Crew AJ, Gwilliam R, Ross M, Linehan WM, Birdsall S, Shipley J, Cooper CS (1996). The t(X;1)(p11.2;q21.2) translocation in papillary renal cell carcinoma fuses a novel gene PRCC to the TFE3 transcription factor gene. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1333-1338
- Sieving PA, Frishman LJ, Steinberg RH (1986). Scotopic treshold response of proximal retina in cat. *J. Neurophysiol.* **56**, 1049-1061
- Sieving PA, Richards JE, Naarendorp F, Bingham EL, Scott K, Alpern M (1995). Dark-light: model for nightblindness from the human rhodopsin Gly-90->Asp mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 880-884
- Sinnegger MJ, Wang Z, Grabner M, Hering S, Striessnig J, Glossmann H, Mitterdorfer J (1997). Nine L-type amino acid residues confer full 1,4-dihydropyridine sensitivity to the neuronal calcium channel  $\alpha_{1A}$  subunit: role of L-type Met<sup>1188</sup>. *J. Biol. Chem.* **272**, 27686-27693
- Snutch TP, Tomlinson WJ, Leonard JP, Gilbert MM (1991). Distinct calcium channels are generated by alternative splicing and are differentially expressed in the mammalian CNS. *Neuron* **7**, 45-57
- Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517

- Starr TVB, Prystay W, Snutch TP (1991). Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5621-5625
- Stockton RA, Slaughter MM (1989). B-Wave of the electroretinogram: a reflection of ON bipolar cell activity. *J. Gen. Physiol.* **93**, 101-122
- Strom TM, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E, Hellebrand H, Lorenz B, Weber BHF, Wutz K, Gutwillinger N, Ruether K, Drescher B, Sauer C, Zrenner E, Meitinger T, Rosenthal A, Meindl A (1998). An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nature Genet.* **19**, 260-263
- Sun W, McPherson JD, Hoang DQ, Wasmuth JJ, Evans GA, Montal M (1992). Mapping of a human brain voltage-gated calcium channel to human chromosome 12p13-pter. *Genomics* **14**, 1092-1094
- Suzuki Y, Orita M, Shiraishi M, Hayashi K, Sekiya T (1990). Detection of *ras* gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene* **5**, 1037-1043
- Tachibana M, Okada T, Arimura T, Kobayashi K, Piccolino M (1993). Dihydropyridine-sensitive calcium current mediates neurotransmitter release from bipolar cells of the goldfish retina. *J. Neurosci.* **13**, 2898-2909
- Takahashi Y, Onoe S, Asamizu N, Mori T, Yoshimura Y, Tazawa Y (1988). Incomplete congenital stationary night blindness: electroretinogram c-wave and electrooculogram light rise. *Doc. Ophthalmol.* **70**, 67-75
- Tanabe T, Takeshima H, Mikami A, Flockerzi V, Takahashi H, Kangawa K, Kojima M, Matsuo H, Hirose T, Numa S (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**, 313-318
- Tanabe T, Beam KG, Adams BA, Niidome T, Numa S (1990). Regions of the skeletal muscle dihydropyridine receptor critical for excitation-contraction coupling. *Nature* **346**, 567-569
- Taviaux S, Williams ME, Harpold MM, Nargeot J, Lory P (1997). Assignment of human genes for  $\beta_2$  and  $\beta_4$  subunits of voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels to chromosomes 10p12 and 2q22-q23. *Hum. Genet.* **100**, 151-154
- Thomas M, Davis RW (1975). Studies on the cleavage of bacteriophage lambda DNA with *EcoRI* restriction endonuclease. *J. Mol. Biol.* **91**, 315-328
- Thorne HV (1966). Electrophoretic separation of polyoma virus DNA from host cell DNA. *Virology* **29**, 234-239

- Tremblay F, Laroche RG, de Becker I (1995). The electroretinographic diagnosis of the incomplete form of congenital stationary night blindness. *Vision Res.* **35**, 2383-2393
- Uberbacher EC, Mural RJ (1991). Locating protein-coding regions in human DNA sequences by a multiple sensor-neural network approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11261-11265
- Waardenburg PJ, Franceschetti A, Klein D (1961). Genetics and Ophthalmology. Vol. 1, Oxford: Blackwell (pub.)
- Waardenburg PJ, Eriksson AW, Forsius H (1969). Åland eye disease (syndroma Forsius-Eriksson). *Prog. Neuro-Ophthalmol.* **2**, 336-339
- Wang Z, Grabner M, Berjukow S, Savchenko A, Glossmann H, Hering S (1995). Chimeric L-type  $Ca^{2+}$  channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes reveal role of repeats III and IV in activation gating. *J. Physiol.* **486**, 131-137
- Wei X, Neely A, Lacerda AE, Olcese R, Stefani E, Perez-Reyes E, Birnbaumer L (1994). Modification of  $Ca^{2+}$  channel activity by deletions at the carboxyl terminus of the cardiac  $\alpha_1$  subunit. *J. Biol. Chem.* **269**, 1635-1640
- Weleber RG, Pillers AM, Powell BR, Hanna CE, Magenis E, Buist NRM (1989). Åland Island eye disease (Forsius-Eriksson Syndrome) associated with contiguous deletion syndrome at Xp21: similarity to incomplete congenital stationary night blindness. *Arch. Ophthalmol.* **107**, 1170-1179
- Westermeier R (1990). Elektrophoresepraktikum. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- White T (1940). Linkage and crossing-over in the human sex chromosomes. *J. Genet.* **40**, 403-437
- Wilkinson MF, Barnes S (1996). The dihydropyridine-sensitive calcium channel subtype in cone photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* **107**, 621-630
- Willard HF, Durfy SJ, Mahtani MM, Dorkins H, Davies KE, Williams BRG (1989). Regional localization of the TIMP gene on the human X chromosome: extension of a conserved synteny and linkage group on proximal Xp. *Hum. Genet.* **81**, 234-238
- Williams ME, Feldman DH, McCue AF, Brenner R, Velicelebi G, Ellis SB, Harpold MM (1992). Structure and functional expression of  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ , and  $\beta$  subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. *Neuron* **8**, 71-84
- Williams MA, Marubio LM, Deal CR, Hans M, Brust PF, Philipson LH, Miller RJ, Johnson EC, Harpold MM, Ellis SB (1994). Structure and functional

- characterization of neuronal  $\alpha_{1E}$  calcium channel subtypes. *J. Biol. Chem.* **269**, 22347-22357
- Wilson RK, Chen C, Avdalovic N, Burns J, Hood L (1990). Development of an automated procedure for fluorescent DNA sequencing. *Genomics* **6**, 626-634
- Witkovsky P, Schmitz Y, Akopian A, Krizaj D, Tranchina D (1997). Gain of rod to horizontal cell synaptic transfer: relation to glutamate release and a dihydropyridine-sensitive calcium current. *J. Neurosci.* **17**, 7297-7306
- Yamada Y, Masuda K, Li Q, Ihara Y, Kubota A, Miura T, Nakamura K, Fujii Y, Seino S, Seino Y (1995). The structures of the human calcium channel  $\alpha_1$  subunit (CACNL1A2) and  $\beta$  subunit (CACNLB3) genes. *Genomics* **27**, 312-319
- Yang J, Ellinor PT, Sather WA, Zhang JF, Tsien RW (1993). Molecular determinants of  $Ca^{2+}$  selectivity and ion permeation in L-type  $Ca^{2+}$  channels. *Nature* **366**, 158-161
- Zamponi GW, Bourinet E, Nelson D, Nargeot J, Snutch TP (1997). Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel  $\alpha_1$  subunit. *Nature* **385**, 442-446
- Zhang JF, Ellinor PT, Aldrich RW, Tsien RW (1994). Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels. *Nature* **372**, 97-100
- Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY, Lee CC (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the  $\alpha_{1A}$ -voltage-dependent calcium channel. *Nature Genet.* **15**, 62-69
- Zon LI, Tsai SF, Burgess S, Matsudaira P, Bruns GAP, Orkin SH (1990). The major human erythroid DNA-binding protein (GF-1): primary sequence and localization of the gene to the X chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 668-672
- Zong X, Hofmann F (1996).  $Ca^{2+}$ -dependent inactivation of the class C L-type  $Ca^{2+}$  channel is a property of the  $\alpha_1$  subunit. *FEBS Lett.* **378**, 121-125
- Zühlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H (1999). Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* **399**, 159-162

## 7 ANHANG

	1	11	21	31	41	50	
1	atgtcggaat	ctgaaggcgg	gaaagacacc	accccagagc	ccagtccagc	50	P15-P8-1
1	M--S--E--S	--E--G--G-	-K--D--T--	T--P--E--P	--S--P--A-	17	P15-P8-1
	51	61	71	81	91	100	
51	caatggggca	ggccctggtc	ccgaatgggg	gctgtgcccc	gggccccag	100	P15-P8-1
18	-N--G--A--	G--P--G--P	--E--W--G-	-L--C--P--	G--P--P--A	34	P15-P8-1
	101	111	121	131	141	150	
101	ctgtggaag	tgaaagcagt	ggggcatcag	gcctagggac	ccctaagcga	150	P15-P8-1
35	--V--E--G-	-E--S--S--	G--A--S--G	--L--G--T-	-P--K--R--	50	P15-P8-1
	151	161	171	181	191	200	
151	agaaaccagc	acagcaagca	caagacagt	gcagtggcca	gtgcccagcg	200	P15-P8-1
51	R--N--Q--H	--S--K--H-	-K--T--V--	A--V--A--S	--A--Q--R-	67	P15-P8-1
	201	211	221	231	241	250	
201	gtcacctcgg	gcactcttct	gcctcaccct	ggccaatcct	ctgcgacggt	250	P15-P8-1
68	-S--P--R--	A--L--F--C	--L--T--L-	-A--N--P--	L--R--R--S	84	P15-P8-1
	251	261	271	281	291	300	
251	cctgcatcag	catcgtggag	tggaagccct	tcgacatcct	catcctgctg	300	P15-P8-1
85	--C--I--S-	-I--V--E--	W--K--P--F	--D--I--L-	-I--L--L--	100	P15-P8-1
	301	311	321	331	341	350	
301	accatctttg	ccaactgcgt	ggccctggga	gtttacatcc	ccttcctcga	350	P15-P8-1
101	T--I--F--A	--N--C--V-	-A--L--G--	V--Y--I--P	--F--P--E-	117	P15-P8-1
	351	361	371	381	391	400	
351	ggacgactcc	aacactgccca	accacaacct	ggagcagggtg	gagtacgtat	400	P15-P8-1
118	-D--D--S--	N--T--A--N	--H--N--L-	-E--Q--V--	E--Y--V--F	134	P15-P8-1

	401	411	421	431	441	450	
401	tcttggtgat	tttctactgtg	gagacggtgc	tcaagatcgt	ggcctacggg	450	P15-P8-1
135	--L--V--I-	-F--T--V--	E--T--V--L	--K--I--V-	-A--Y--G--	150	P15-P8-1
	451	461	471	481	491	500	
451	ctgggtgctcc	accccagcgc	ctacatccgc	aatggctgga	acctactcga	500	P15-P8-1
151	L--V--L--H	--P--S--A-	-Y--I--R--	N--G--W--N	--L--L--D-	167	P15-P8-1
	501	511	521	531	541	550	
501	cttcatcatc	gtcgtggteg	ggctgttcag	cgttctgctg	gagcagggcc	550	P15-P8-1
168	-F--I--I--	V--V--V--G	--L--F--S-	-V--L--L--	E--Q--G--P	184	P15-P8-1
	551	561	571	581	591	600	
551	ccggacggcc	aggcgacgcc	ccgcacaccg	ggggaaagcc	aggaggcttc	600	P15-P8-1
185	--G--R--P-	-G--D--A--	P--H--T--G	--G--K--P-	-G--G--F--	200	P15-P8-1
	601	611	621	631	641	650	
601	gatgtgaagg	cattgagggc	gtttcgggtg	ctgcggccac	tgaggctggt	650	P15-P8-1
201	D--V--K--A	--L--R--A-	-F--R--V--	L--R--P--L	--R--L--V-	217	P15-P8-1
	651	661	671	681	691	700	
651	gtctggggtc	ccgagcctgc	acatagtgtc	caattccatc	atgaaggctc	700	P15-P8-1
218	-S--G--V--	P--S--L--H	--I--V--L-	-N--S--I--	M--K--A--L	234	P15-P8-1
	701	711	721	731	741	750	
701	tggtgccgct	gctgcacatt	gcactgctcg	tgctcttcgt	catcatcatt	750	P15-P8-1
235	--V--P--L-	-L--H--I--	A--L--L--V	--L--F--V-	-I--I--I--	250	P15-P8-1
	751	761	771	781	791	800	
751	tatgccatca	ttgggctcga	gctgttcctt	ggacgaatgc	acaagacgtg	800	P15-P8-1
251	Y--A--I--I	--G--L--E-	-L--F--L--	G--R--M--H	--K--T--C-	267	P15-P8-1
	801	811	821	831	841	850	
801	ctacttcctg	ggatccgaca	tggaagcgga	ggaggacca	tcgccctgtg	850	P15-P8-1
268	-Y--F--L--	G--S--D--M	--E--A--E-	-E--D--P--	S--P--C--A	284	P15-P8-1
	851	861	871	881	891	900	

851	cgtcttcggg	atcagggcgt	gcgtgcacgc	tgaaccagac	tgagtgcgcg	900	P15-P8-1
285	--S--S--G-	-S--G--R--	A--C--T--L	--N--Q--T-	-E--C--R--	300	P15-P8-1
901	911	921	931	941	950		
901	gggcgctggc	cagggcccaa	tggaggcatc	accaactttg	acaacttctt	950	P15-P8-1
301	G--R--W--P	--G--P--N-	-G--G--I--	T--N--F--D	--N--F--F-	317	P15-P8-1
951	961	971	981	991	1000		
951	cttcgccatg	ctgacagtct	tccagtgtgt	caccatggaa	ggctggaccg	1000	P15-P8-1
318	-F--A--M--	L--T--V--F	--Q--C--V-	-T--M--E--	G--W--T--D	334	P15-P8-1
1001	1011	1021	1031	1041	1050		
1001	atgtgctcta	ctggatgcaa	gatgccatgg	ggtatgaact	gccctgggtg	1050	P15-P8-1
335	--V--L--Y-	-W--M--Q--	D--A--M--G	--Y--E--L-	-P--W--V--	350	P15-P8-1
1051	1061	1071	1081	1091	1100		
1051	tactttgtga	gccttgtcat	ctttgggtcc	ttcttcgtcc	tcaaccttgt	1100	P15-P8-1
351	Y--F--V--S	--L--V--I-	-F--G--S--	F--F--V--L	--N--L--V-	367	P15-P8-1
1101	1111	1121	1131	1141	1150		
1101	gcttggcgtc	ctgagtgggg	agttctccaa	ggagagagag	aaagcgaaag	1150	P15-P8-1
368	-L--G--V--	L--S--G--E	--F--S--K-	-E--R--E--	K--A--K--A	384	P15-P8-1
1151	1161	1171	1181	1191	1200		
1151	ctcgcgggga	cttccagaag	cagcgggaga	agcagcagat	ggaggaagac	1200	P15-P8-1
385	--R--G--D-	-F--Q--K--	Q--R--E--K	--Q--Q--M-	-E--E--D--	400	P15-P8-1
1201	1211	1221	1231	1241	1250		
1201	ctgcggggct	acctggactg	gatcactcaa	gccgaagagc	tggacatgga	1250	P15-P8-1
401	L--R--G--Y	--L--D--W-	-I--T--Q--	A--E--E--L	--D--M--E-	417	P15-P8-1
1251	1261	1271	1281	1291	1300		
1251	ggaccctcc	gccgatgaca	accttgggcc	acagctggcc	gagctgacca	1300	P15-P8-1
418	-D--P--S--	A--D--D--N	--L--G--P-	-Q--L--A--	E--L--T--N	434	P15-P8-1
1301	1311	1321	1331	1341	1350		

---

1301 ataggaggcg tggacgtctg cgctggttca gtcattctac tcgctccaca 1350 P15-P8-1  
435 --R--R--R- -G--R--L-- R--W--F--S --H--S--T- -R--S--T-- 450 P15-P8-1  
  
1351 1361 1371 1381 1391 1400  
| | | | | |  
1351 cactccacca gcagccatgc cagcctccca gccagtgaca ccggttccat 1400 P15-P8-1  
451 H--S--T--S --S--H--A- -S--L--P-- A--S--D--T --G--S--M- 467 P15-P8-1  
  
1401 1411 1421 1431 1441 1450  
| | | | | |  
1401 gacagagacc caaggcgatg aggatgagga ggagggggct ctggccagct 1450 P15-P8-1  
468 -T--E--T-- Q--G--D--E --D--E--E- -E--G--A-- L--A--S--C 484 P15-P8-1  
  
1451 1461 1471 1481 1491 1500  
| | | | | |  
1451 gtacacgctg cctaaacaag atcatgaaaa ccagagtctg ccgccgcctc 1500 P15-P8-1  
485 --T--R--C- -L--N--K-- I--M--K--T --R--V--C- -R--R--L-- 500 P15-P8-1  
  
1501 1511 1521 1531 1541 1550  
| | | | | |  
1501 cgccgagcca accgggtcct tcgggcacgc tgccgtcggg cagtgaagtc 1550 P15-P8-1  
501 R--R--A--N --R--V--L- -R--A--R-- C--R--R--A --V--K--S- 517 P15-P8-1  
  
1551 1561 1571 1581 1591 1600  
| | | | | |  
1551 caatgcctgc tactgggctg tgctgttctg cgtcttctc aacacgttga 1600 P15-P8-1  
518 -N--A--C-- Y--W--A--V --L--L--L- -V--F--L-- N--T--L--T 534 P15-P8-1  
  
1601 1611 1621 1631 1641 1650  
| | | | | |  
1601 ccatcgcctc tgagcaccac gggcagcctg tgtggctcac ccagatccag 1650 P15-P8-1  
535 --I--A--S- -E--H--H-- G--Q--P--V --W--L--T- -Q--I--Q-- 550 P15-P8-1  
  
1651 1661 1671 1681 1691 1700  
| | | | | |  
1651 gagtatgcc acaaagtgtt gctctgtctg ttcacgggtg agatgcttct 1700 P15-P8-1  
551 E--Y--A--N --K--V--L- -L--C--L-- F--T--V--E --M--L--L- 567 P15-P8-1  
  
1701 1711 1721 1731 1741 1750  
| | | | | |  
1701 caaattgtac ggtctgggcc cctctgccta tgtgtcttcc ttcttcaacc 1750 P15-P8-1  
568 -K--L--Y-- G--L--G--P --S--A--Y- -V--S--S-- F--F--N--R 584 P15-P8-1  
  
1751 1761 1771 1781 1791 1800  
| | | | | |  
1751 gctttgactg ctttgtggtc tgtgggggca tctagagac caccttggtg 1800 P15-P8-1

585	--F--D--C-	-F--V--V--	C--G--G--I	--L--E--T-	-T--L--V--	600	P15-P8-1
	1801	1811	1821	1831	1841	1850	
1801	gaggtgggcg	ccatgcagcc	cttgggcatc	tcagtgtctc	gatgtgtgcg	1850	P15-P8-1
601	E--V--G--A	--M--Q--P-	-L--G--I--	S--V--L--R	--C--V--R-	617	P15-P8-1
	1851	1861	1871	1881	1891	1900	
1851	cctcctcagg	atctttaagg	tcaccagaca	ctgggcttct	ctgagcaatc	1900	P15-P8-1
618	-L--L--R--	I--F--K--V	--T--R--H-	-W--A--S--	L--S--N--L	634	P15-P8-1
	1901	1911	1921	1931	1941	1950	
1901	tgggtggcatc	cctgctcaat	tcaatgaaat	ccatcgcac	cttgtgtgctt	1950	P15-P8-1
635	--V--A--S-	-L--L--N--	S--M--K--S	--I--A--S-	-L--L--L--	650	P15-P8-1
	1951	1961	1971	1981	1991	2000	
1951	ctcctcttcc	tcttcatcat	tatcttctcc	ctgcttggca	tgcagctggt	2000	P15-P8-1
651	L--L--F--L	--F--I--I-	-I--F--S--	L--L--G--M	--Q--L--F-	667	P15-P8-1
	2001	2011	2021	2031	2041	2050	
2001	tgggggcaag	ttcaactttg	accagaccca	caccaagcga	agcacctttg	2050	P15-P8-1
668	-G--G--K--	F--N--F--D	--Q--T--H-	-T--K--R--	S--T--F--D	684	P15-P8-1
	2051	2061	2071	2081	2091	2100	
2051	acacgttccc	ccaggccctc	ctcactgtct	ttcagatcct	gacaggtgag	2100	P15-P8-1
685	--T--F--P-	-Q--A--L--	L--T--V--F	--Q--I--L-	-T--G--E--	700	P15-P8-1
	2101	2111	2121	2131	2141	2150	
2101	gactggaacg	tggtcatgta	tgatggatc	atggcatatg	gtggcccctt	2150	P15-P8-1
701	D--W--N--V	--V--M--Y-	-D--G--I--	M--A--Y--G	--G--P--F-	717	P15-P8-1
	2151	2161	2171	2181	2191	2200	
2151	cttcccagga	atgttggtgt	gcacttattt	catcattctc	ttcatctgtg	2200	P15-P8-1
718	-F--P--G--	M--L--V--C	--I--Y--F-	-I--I--L--	F--I--C--G	734	P15-P8-1
	2201	2211	2221	2231	2241	2250	
2201	gcaactacat	cctgttgaac	gtgtttcttg	ccattgctgt	ggacaacctg	2250	P15-P8-1
735	--N--Y--I-	-L--L--N--	V--F--L--A	--I--A--V-	-D--N--L--	750	P15-P8-1

	2251	2261	2271	2281	2291	2300		
2251	gccagtggag	atgcaggcac	tgccaaggac	aagggcgggg	agaagagcaa	2300	P15-P8-1	
751	A--S--G--D	--A--G--T-	-A--K--D--	K--G--G--E	--K--S--N-	767	P15-P8-1	
	2301	2311	2321	2331	2341	2350		
2301	tgagaaggat	ctcccacagg	agaatgaagg	cctgggtgcct	ggtgtggaga	2350	P15-P8-1	
768	-E--K--D--	L--P--Q--E	--N--E--G-	-L--V--P--	G--V--E--K	784	P15-P8-1	
	2351	2361	2371	2381	2391	2400		
2351	aagaggaaga	ggaggggtgca	aggaggggaag	gagcagacat	ggaggaggag	2400	P15-P8-1	
785	--E--E--E-	-E--G--A--	R--R--E--G	--A--D--M-	-E--E--E--	800	P15-P8-1	
	2401	2411	2421	2431	2441	2450		
2401	gaggaggagg	aagaagagga	agaagaggaa	gaagaggaag	aggggtgcagg	2450	P15-P8-1	
801	E--E--E--E	--E--E--E-	-E--E--E--	E--E--E--E	--G--A--G-	817	P15-P8-1	
	2451	2461	2471	2481	2491	2500		
2451	gggtgtggaa	ctcctgcagg	aagttgtacc	caaggagaag	gtggtaccca	2500	P15-P8-1	
818	-G--V--E--	L--L--Q--E	--V--V--P-	-K--E--K--	V--V--P--I	834	P15-P8-1	
	2501	2511	2521	2531	2541	2550		
2501	tccctgaggg	cagcgccttc	ttctgcctca	gccaaaccaa	cccgctgagg	2550	P15-P8-1	
835	--P--E--G-	-S--A--F--	F--C--L--S	--Q--T--N-	-P--L--R--	850	P15-P8-1	
	2551	2561	2571	2581	2591	2600		
2551	aagggctgcc	acaccctcat	ccaccatcat	gtcttcacca	atcttatcct	2600	P15-P8-1	
851	K--G--C--H	--T--L--I-	-H--H--H--	V--F--T--N	--L--I--L-	867	P15-P8-1	
	2601	2611	2621	2631	2641	2650		
2601	ggtgttcac	atcctcagca	gtgtgtccct	ggccgctgag	gaccccatcc	2650	P15-P8-1	
868	-V--F--I--	I--L--S--S	--V--S--L-	-A--A--E--	D--P--I--R	884	P15-P8-1	
	2651	2661	2671	2681	2691	2700		
2651	gagcccactc	cttccgcaac	catattctgg	gttacttcga	ttatgccttc	2700	P15-P8-1	
885	--A--H--S-	-F--R--N--	H--I--L--G	--Y--F--D-	-Y--A--F--	900	P15-P8-1	

	2701	2711	2721	2731	2741	2750		
2701	acctccattt	tcaactgtgga	gattctacta	aagatgacag	tgtttggggc	2750	P15-P8-1	
901	T--S--I--F	--T--V--E-	-I--L--L--	K--M--T--V	--F--G--A-	917	P15-P8-1	
	2751	2761	2771	2781	2791	2800		
2751	cttctcgcac	cgcggctcct	tctgcccgtag	ctggtttaaat	atggttgatc	2800	P15-P8-1	
918	-F--L--H--	R--G--S--F	--C--R--S-	-W--F--N--	M--L--D--L	934	P15-P8-1	
	2801	2811	2821	2831	2841	2850		
2801	tgctggtggt	cagtgtgtcc	ctcatctcct	ttggcatcca	ctccagcgcc	2850	P15-P8-1	
935	--L--V--V-	-S--V--S--	L--I--S--F	--G--I--H-	-S--S--A--	950	P15-P8-1	
	2851	2861	2871	2881	2891	2900		
2851	atctcgggtg	tgaagattct	gcgagtactc	cgagtactgc	ggcccctccg	2900	P15-P8-1	
951	I--S--V--V	--K--I--L-	-R--V--L--	R--V--L--R	--P--L--R-	967	P15-P8-1	
	2901	2911	2921	2931	2941	2950		
2901	agccatcaac	agggccaagg	gactcaagca	tgtggtgcag	tgtgtatttg	2950	P15-P8-1	
968	-A--I--N--	R--A--K--G	--L--K--H-	-V--V--Q--	C--V--F--V	984	P15-P8-1	
	2951	2961	2971	2981	2991	3000		
2951	tgccatccg	gaccatcgga	aacatcatga	ttgtcaccac	acttctgcaa	3000	P15-P8-1	
985	--A--I--R-	-T--I--G--	N--I--M--I	--V--T--T-	-L--L--Q--	1000	P15-P8-1	
	3001	3011	3021	3031	3041	3050		
3001	tttatgttcg	cctgcatcgg	ggtgcagctc	ttcaagggga	aattctacac	3050	P15-P8-1	
1001	F--M--F--A	--C--I--G-	-V--Q--L--	F--K--G--K	--F--Y--T-	1017	P15-P8-1	
	3051	3061	3071	3081	3091	3100		
3051	ctgcacggac	gaggccaaac	acaccctca	agaatgcaag	ggctccttcc	3100	P15-P8-1	
1018	-C--T--D--	E--A--K--H	--T--P--Q-	-E--C--K--	G--S--F--L	1034	P15-P8-1	
	3101	3111	3121	3131	3141	3150		
3101	tggtataccc	agatggagac	gtgtcacggc	ccctgggtccg	ggagcggctc	3150	P15-P8-1	
1035	--V--Y--P-	-D--G--D--	V--S--R--P	--L--V--R-	-E--R--L--	1050	P15-P8-1	
	3151	3161	3171	3181	3191	3200		

3151	tggggtcaaca	gtgattttcaa	ctttgacaat	gtccttttcag	ccatgatggc	3200	P15-P8-1
1051	W--V--N--S	--D--F--N-	-F--D--N--	V--L--S--A	--M--M--A-	1067	P15-P8-1
3201		3211		3221		3231	
3201	cctgttcact	gtctccacct	ttgaaggctg	gcctgcactg	ctatacaagg	3250	P15-P8-1
1068	-L--F--T--	V--S--T--F	--E--G--W-	-P--A--L--	L--Y--K--A	1084	P15-P8-1
3251		3261		3271		3281	
3251	ccatcgatgc	atatgcagag	gaccatggcc	ccatctataa	ttaccgtgtg	3300	P15-P8-1
1085	--I--D--A-	-Y--A--E--	D--H--G--P	--I--Y--N-	-Y--R--V--	1100	P15-P8-1
3301		3311		3321		3331	
3301	gagatctcag	tgttcttcat	tgtctacatc	atcatcattg	cgttcttcat	3350	P15-P8-1
1101	E--I--S--V	--F--F--I-	-V--Y--I--	I--I--I--A	--F--F--M-	1117	P15-P8-1
3351		3361		3371		3381	
3351	gatgaacatc	ttcgtgggct	tcgtcatcat	cactttccgt	gcccagggcg	3400	P15-P8-1
1118	-M--N--I--	F--V--G--F	--V--I--I-	-T--F--R--	A--Q--G--E	1134	P15-P8-1
3401		3411		3421		3431	
3401	agcaggagta	ccaaaactgt	gagctggaca	agaaccagcg	tcaatgtgtg	3450	P15-P8-1
1135	--Q--E--Y-	-Q--N--C--	E--L--D--K	--N--Q--R-	-Q--C--V--	1150	P15-P8-1
3451		3461		3471		3481	
3451	gaatatgccc	tcaaggccca	gccactccgc	cgttacatcc	ccaagaacct	3500	P15-P8-1
1151	E--Y--A--L	--K--A--Q-	-P--L--R--	R--Y--I--P	--K--N--P-	1167	P15-P8-1
3501		3511		3521		3531	
3501	gcatcagtat	cggtgtgtgg	ccactgtgaa	ctctgctgcc	tttgagtacc	3550	P15-P8-1
1168	-H--Q--Y--	R--V--W--A	--T--V--N-	-S--A--A--	F--E--Y--L	1184	P15-P8-1
3551		3561		3571		3581	
3551	tgatgttcct	gctcatcctg	ctcaacacag	ttgccctagc	catgcagcac	3600	P15-P8-1
1185	--M--F--L-	-L--I--L--	L--N--T--V	--A--L--A-	-M--Q--H--	1200	P15-P8-1
3601		3611		3621		3631	
3601						3641	
3601						3650	

3601	tatgagcaga	ctgctccctt	caactatgcc	atggacatcc	tcaacatggt	3650	P15-P8-1
1201	Y--E--Q--T	--A--P--F-	-N--Y--A--	M--D--I--L	--N--M--V-	1217	P15-P8-1
	3651	3661	3671	3681	3691	3700	
3651	cttcactggc	ctcttcacta	ttgagatggt	gctcaaaatc	atcgccttca	3700	P15-P8-1
1218	-F--T--G--	L--F--T--I	--E--M--V-	-L--K--I--	I--A--F--K	1234	P15-P8-1
	3701	3711	3721	3731	3741	3750	
3701	agcccaagca	ttacttcact	gatgcctgga	acacgtttga	cgctcttatt	3750	P15-P8-1
1235	--P--K--H-	-Y--F--T--	D--A--W--N	--T--F--D-	-A--L--I--	1250	P15-P8-1
	3751	3761	3771	3781	3791	3800	
3751	gtggtgggca	gcatagtgga	tattgccgtc	actgaagtca	ataatggtgg	3800	P15-P8-1
1251	V--V--G--S	--I--V--D-	-I--A--V--	T--E--V--N	--N--G--G-	1267	P15-P8-1
	3801	3811	3821	3831	3841	3850	
3801	ccaccttggc	gagagctctg	aggacagctc	ccgcatttcc	attaccttct	3850	P15-P8-1
1268	-H--L--G--	E--S--S--E	--D--S--S-	-R--I--S--	I--T--F--F	1284	P15-P8-1
	3851	3861	3871	3881	3891	3900	
3851	ttcgctctct	ccgagttatg	cggtctggtca	agcttctcag	taagggtgaa	3900	P15-P8-1
1285	--R--L--F-	-R--V--M--	R--L--V--K	--L--L--S-	-K--G--E--	1300	P15-P8-1
	3901	3911	3921	3931	3941	3950	
3901	gggatccgca	cattgctctg	gacattcatc	aagtccttcc	aggccttgcc	3950	P15-P8-1
1301	G--I--R--T	--L--L--W-	-T--F--I--	K--S--F--Q	--A--L--P-	1317	P15-P8-1
	3951	3961	3971	3981	3991	4000	
3951	ctatgtggct	cttctcatcg	caatgatatt	cttcatctat	gccgtcattg	4000	P15-P8-1
1318	-Y--V--A--	L--L--I--A	--M--I--F-	-F--I--Y--	A--V--I--G	1334	P15-P8-1
	4001	4011	4021	4031	4041	4050	
4001	gcatgcagat	gttcggcaag	gtggctcttc	aggatggcac	acagataaac	4050	P15-P8-1
1335	--M--Q--M-	-F--G--K--	V--A--L--Q	--D--G--T-	-Q--I--N--	1350	P15-P8-1
	4051	4061	4071	4081	4091	4100	
4051	cgaacaaca	acttcagac	ctttccacag	gctgtgctgc	ttctgttcag	4100	P15-P8-1

1351	R--N--N--N	--F--Q--T-	-F--P--Q--	A--V--L--L	--L--F--R-	1367	P15-P8-1
	4101	4111	4121	4131	4141	4150	
4101	gtgtgccact	ggtgaggcat	ggcaggagat	aatgcttgcc	agccttcccg	4150	P15-P8-1
1368	-C--A--T--	G--E--A--W	--Q--E--I-	-M--L--A--	S--L--P--G	1384	P15-P8-1
	4151	4161	4171	4181	4191	4200	
4151	gaaatcgggt	tgatcctgag	tctgacttcg	gccctgggta	agagtttacc	4200	P15-P8-1
1385	--N--R--C-	-D--P--E--	S--D--F--G	--P--G--E-	-E--F--T--	1400	P15-P8-1
	4201	4211	4221	4231	4241	4250	
4201	tgtggtagca	atthttgcat	cgctatttct	atcagcttct	tcatgctctg	4250	P15-P8-1
1401	C--G--S--N	--F--A--I-	-A--Y--F--	I--S--F--F	--M--L--C-	1417	P15-P8-1
	4251	4261	4271	4281	4291	4300	
4251	tgcttctctg	atcataaatc	tctttgtggc	tgtgatcatg	gacaactttg	4300	P15-P8-1
1418	-A--F--L--	I--I--N--L	--F--V--A-	-V--I--M--	D--N--F--D	1434	P15-P8-1
	4301	4311	4321	4331	4341	4350	
4301	attatctcac	cagagattgg	tccatcctgg	gccccatca	ccttgatgaa	4350	P15-P8-1
1435	--Y--L--T-	-R--D--W--	S--I--L--G	--P--H--H-	-L--D--E--	1450	P15-P8-1
	4351	4361	4371	4381	4391	4400	
4351	ttcaagagga	tctgggtctga	atatgaccct	ggggccaagg	gccgcatcaa	4400	P15-P8-1
1451	F--K--R--I	--W--S--E-	-Y--D--P--	G--A--K--G	--R--I--K-	1467	P15-P8-1
	4401	4411	4421	4431	4441	4450	
4401	acacttgat	gtggttgccc	tgctgagacg	tatccagccc	cctctgggat	4450	P15-P8-1
1468	-H--L--D--	V--V--A--L	--L--R--R-	-I--Q--P--	P--L--G--F	1484	P15-P8-1
	4451	4461	4471	4481	4491	4500	
4451	ttgggaagct	gtgcccacac	cgagtggcct	gcaagagact	tgtggcaatg	4500	P15-P8-1
1485	--G--K--L-	-C--P--H--	R--V--A--C	--K--R--L-	-V--A--M--	1500	P15-P8-1
	4501	4511	4521	4531	4541	4550	
4501	aacatgcccc	tcaactcaga	tgggacgggt	acattcaacg	ccacactctt	4550	P15-P8-1
1501	N--M--P--L	--N--S--D-	-G--T--V--	T--F--N--A	--T--L--F-	1517	P15-P8-1

	4551	4561	4571	4581	4591	4600		
4551	tgccctggtc	cggacatccc	tgaagatcaa	aacagaaggg	aacctggagc	4600	P15-P8-1	
1518	-A--L--V--	R--T--S--L	--K--I--K-	-T--E--G--	N--L--E--Q	1534	P15-P8-1	
	4601	4611	4621	4631	4641	4650		
4601	aagccaacca	ggagctgcgg	attgtcatca	aaaagatctg	gaagcggatg	4650	P15-P8-1	
1535	--A--N--Q-	-E--L--R--	I--V--I--K	--K--I--W-	-K--R--M--	1550	P15-P8-1	
	4651	4661	4671	4681	4691	4700		
4651	aaacagaagc	tgctagatga	ggtcatcccc	ccaccagacg	aggaggaggt	4700	P15-P8-1	
1551	K--Q--K--L	--L--D--E-	-V--I--P--	P--P--D--E	--E--E--V-	1567	P15-P8-1	
	4701	4711	4721	4731	4741	4750		
4701	caccgtgggc	aaattctacg	ccacatttct	gatccaggac	tatttccgca	4750	P15-P8-1	
1568	-T--V--G--	K--F--Y--A	--T--F--L-	-I--Q--D--	Y--F--R--K	1584	P15-P8-1	
	4751	4761	4771	4781	4791	4800		
4751	aattccggcg	gaggaaagaa	aaagggctac	taggcaacga	cgccgcccct	4800	P15-P8-1	
1585	--F--R--R-	-R--K--E--	K--G--L--L	--G--N--D-	-A--A--P--	1600	P15-P8-1	
	4801	4811	4821	4831	4841	4850		
4801	agcacctctt	ccgcccttca	ggctggtctg	cggagcctgc	aggacttggg	4850	P15-P8-1	
1601	S--T--S--S	--A--L--Q-	-A--G--L--	R--S--L--Q	--D--L--G-	1617	P15-P8-1	
	4851	4861	4871	4881	4891	4900		
4851	tcctgagatg	cggcaggccc	tcacctgtga	cacagaggag	gaggaagaag	4900	P15-P8-1	
1618	-P--E--M--	R--Q--A--L	--T--C--D-	-T--E--E--	E--E--E--E	1634	P15-P8-1	
	4901	4911	4921	4931	4941	4950		
4901	aggggcagga	gggagtggag	gaggaagatg	aaaaggactt	ggaaactaac	4950	P15-P8-1	
1635	--G--Q--E-	-G--V--E--	E--E--D--E	--K--D--L-	-E--T--N--	1650	P15-P8-1	
	4951	4961	4971	4981	4991	5000		
4951	aaagccacga	tggtctccca	gccctcagct	cgccggggct	ccgggatttc	5000	P15-P8-1	
1651	K--A--T--M	--V--S--Q-	-P--S--A--	R--R--G--S	--G--I--S-	1667	P15-P8-1	

	5001	5011	5021	5031	5041	5050		
5001	tgtgtctctg	cctgtcgggg	acagacttcc	agattcactc	tcctttgggc	5050	P15-P8-1	
1668	-V--S--L--	P--V--G--D	--R--L--P-	-D--S--L--	S--F--G--P	1684	P15-P8-1	
	5051	5061	5071	5081	5091	5100		
5051	ccagtgatga	tgacaggggg	actcccacct	ccagtcagcc	cagtgtgccc	5100	P15-P8-1	
1685	--S--D--D-	-D--R--G--	T--P--T--S	--S--Q--P-	-S--V--P--	1700	P15-P8-1	
	5101	5111	5121	5131	5141	5150		
5101	caggctggat	ccaacaccca	caggagaggc	tctggggctc	tcattttcac	5150	P15-P8-1	
1701	Q--A--G--S	--N--T--H-	-R--R--G--	S--G--A--L	--I--F--T-	1717	P15-P8-1	
	5151	5161	5171	5181	5191	5200		
5151	catcccagaa	gaaggaaatt	ctcagcccaa	gggaacccaa	gggcaaaaca	5200	P15-P8-1	
1718	-I--P--E--	E--G--N--S	--Q--P--K-	-G--T--K--	G--Q--N--K	1734	P15-P8-1	
	5201	5211	5221	5231	5241	5250		
5201	agcaagatga	ggatgaggaa	gtccctgatc	ggctttccta	cctagatgag	5250	P15-P8-1	
1735	--Q--D--E-	-D--E--E--	V--P--D--R	--L--S--Y-	-L--D--E--	1750	P15-P8-1	
	5251	5261	5271	5281	5291	5300		
5251	caggcagggg	ctccccctg	ctcagtcctt	ttgccacctc	acagagctca	5300	P15-P8-1	
1751	Q--A--G--T	--P--P--C-	-S--V--L--	L--P--P--H	--R--A--Q-	1767	P15-P8-1	
	5301	5311	5321	5331	5341	5350		
5301	gagatacatg	gatgggcacc	tggtaccacg	ccgccgtctg	ctgcccccca	5350	P15-P8-1	
1768	-R--Y--M--	D--G--H--L	--V--P--R-	-R--R--L--	L--P--P--T	1784	P15-P8-1	
	5351	5361	5371	5381	5391	5400		
5351	cacctgcagg	tcggaagccc	tccttcacca	tccagtgtct	gcagcgccag	5400	P15-P8-1	
1785	--P--A--G-	-R--K--P--	S--F--T--I	--Q--C--L-	-Q--R--Q--	1800	P15-P8-1	
	5401	5411	5421	5431	5441	5450		
5401	ggcagttgtg	aggatttacc	catcccaggc	acctatcatc	gtgggcgaaa	5450	P15-P8-1	
1801	G--S--C--E	--D--L--P-	-I--P--G--	T--Y--H--R	--G--R--N-	1817	P15-P8-1	
	5451	5461	5471	5481	5491	5500		

5451	ttcagggccc	aatagggctc	agggttcctg	ggcaacacca	cctcagcggg	5500	P15-P8-1
1818	-S--G--P--	N--R--A--Q	--G--S--W-	-A--T--P--	P--Q--R--G	1834	P15-P8-1
5501	5511	5521	5531	5541	5550		
5501	gtcggctcct	gtatgccccg	ctggttgg	tggaagaggg	cgcagcgggg	5550	P15-P8-1
1835	--R--L--L-	-Y--A--P--	L--L--L--V	--E--E--G-	-A--A--G--	1850	P15-P8-1
5551	5561	5571	5581	5591	5600		
5551	gaggggtacc	tcggcagatc	cagtggccca	ctgcgcacct	tcacctgtct	5600	P15-P8-1
1851	E--G--Y--L	--G--R--S-	-S--G--P--	L--R--T--F	--T--C--L-	1867	P15-P8-1
5601	5611	5621	5631	5641	5650		
5601	gcacgtgcct	ggaaccct	cggacccag	ccatgggaag	aggggcagtg	5650	P15-P8-1
1868	-H--V--P--	G--T--H--S	--D--P--S-	-H--G--K--	R--G--S--A	1884	P15-P8-1
5651	5661	5671	5681	5691	5700		
5651	ccgacagctt	ggtggaggct	gtgcttatct	cagagggctc	gggcctcttt	5700	P15-P8-1
1885	--D--S--L-	-V--E--A--	V--L--I--S	--E--G--L-	-G--L--F--	1900	P15-P8-1
5701	5711	5721	5731	5741	5750		
5701	gctcgagacc	cacgtttcgt	ggccctggcc	aagcaggaga	ttgcagatgc	5750	P15-P8-1
1901	A--R--D--P	--R--F--V-	-A--L--A--	K--Q--E--I	--A--D--A-	1917	P15-P8-1
5751	5761	5771	5781	5791	5800		
5751	gtgtcgcctg	acgctggatg	agatggacaa	tgctgccagt	gacctgctgg	5800	P15-P8-1
1918	-C--R--L--	T--L--D--E	--M--D--N-	-A--A--S--	D--L--L--A	1934	P15-P8-1
5801	5811	5821	5831	5841	5850		
5801	cacagggaac	cagctctctc	tatagcgacg	aggagtccat	cctctcccgc	5850	P15-P8-1
1935	--Q--G--T-	-S--S--L--	Y--S--D--E	--E--S--I-	-L--S--R--	1950	P15-P8-1
5851	5861	5871	5881	5891	5900		
5851	ttcgatgagg	aggacttggg	agacgagatg	gcctgcgtcc	acgccctctg	5900	P15-P8-1
1951	F--D--E--E	--D--L--G-	-D--E--M--	A--C--V--H	--A--L--*	1967	P15-P8-1
5901	5911	5921	5931	5941	5950		

---

5901 aattcccacc cctcccacaac tgctcaataa acctcctgcc ctcccctccc 5950 P15-P8-1

5951 5961 5971  
| | |

5951 cagcaggagg caggcatgga ccac 5974 P15-P8-1

---

**Abb. 20:** Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *CACNA1F*

**Tab. 16:** Primersequenzen und Amplifikationsbedingungen

Primer	Primersequenzen	bp	T <sub>m</sub>	Zyklen
Exon 1F	5'-ACAAACGTCCCATTGTCAC-3'	230	61°C	40
Exon 1R	5'-GCAATGGGTGGGTCAGAG-3'			
Exon 2F	5'-ATACCCTGTCCCTCCCTGAC-3'	343	59°C	35
Exon 2R	5'-CTCCTGGTACCCTGATGACC-3'			
Exon 3F	5'-GAGGTTCCCAAGGGAGTAGG-3'	247	64°C	35
Exon 3R	5'-GTCTGGCTGGAAGGAGTGAG-3'			
Exon 4F	5'-AGGAGCAGGTGGAGTACGTATTC-3'	180	60°C	35
Exon 4R	5'-GGTAGGAAGGCGACTAGGGT-3'			
Exon 5F	5'-ATCCCAAGGCCTGACCTC-3'	226	61°C	35
Exon 5R	5'-ACCCTCCACCTCCGACCT-3'			
Exon 6F	5'-CTTATTTCTGCCTCCCCCTC-3'	247	58°C	35
Exon 6R	5'-AGCATTGGATCTAGGAACCG-3'			
Exon 7F	5'-GCCTGCTTCGAAGCCCCAAG-3'	258	58°C	35
Exon 7R	5'-CTCTGTGCCACAGTCCAC-3'			
Exon 8F	5'-GGATGCATGCCTTTTCTCTC-3'	197	60°C	35
Exon 8R	5'-GTTTGCCAGGCACAAAGAAG-3'			
Exon 9F	5'-TAGCCCTCTATCCTCCTCCC-3'	271	61°C	35
Exon 9R	5'-GGAGGGCAGACCACATCTAA-3'			
Exon 10F	5'-AATTGTCCTTTCTCTCCCTGC-3'	130	62°C	35
Exon 10R	5'-CCTGGCTGGACCCCCACC-3'			
Exon 11F	5'-AGGTCCTGACCACTATCCCC-3'	186	62°C	35
Exon 11R	5'-GGACTTGAGTCAGGGTTTGG-3'			
Exon 12F	5'-TTTACGACACACCTCCCA-3'	143	60°C	35
Exon 12R	5'-ATCCAAAGGTCATGAGGGCT-3'			
Exon 13F	5'-AGGGCAGGCTTAGGTAGGTG-3'	259	62°C	40
Exon 13R	5'-AGAAGGAATAGGAGGGTG-3'			
Exon 14F	5'-GATCATCCCTGCCTCTCTCC-3'	275	62°C	35
Exon 14R	5'-CTTCCCCCTCCCCTAATAACA-3'			
Exon 15F	5'-AGCCTATTTGAGCCCAACCT-3'	297	60°C	35
Exon 15R	5'-ACCCATCCCATGGTCTCC-3'			

Exon 16F	5'-GAGCTCCACAGTGA CT TCCC-3'	228	64°C	35
Exon 16R	5'-ACCCTGCCTATAGACCACCC-3'			
Exon 17F	5'-GTGGTCTATAGGCAGGGTGC-3'	165	66°C	32
Exon 17R	5'-GACTGTGTTAGGGGTGGAGC-3'			
Exon 18F	5'-GTAGTGATCCCCCTTAGCCC-3'	152	59°C	35
Exon 18R	5'-ACAGGTAGTGGTGGGAGTGG-3'			
Exon 19F	5'-CCTCACCATTGATGA CT CCC-3'	149	60°C	35
Exon 19R	5'-TGTCTGCCTGAGCTCTTTCC-3'			
Exon 20F	5'-TTTTGCTTTTCTCTGGTGCC-3'	200	60°C	35
Exon 20R	5'-CTCACCCCCTGCCACTTC-3'			
Exon 21F	5'-TCAGGGCCAGAACTGTATCC-3'	249	60°C	35
Exon 21R	5'-GTCCCCTCAGCTCCTAGCTC-3'			
Exon 22F	5'-ATTTGACTGAGGAGGAAGCTG-3'	267	56°C	35
Exon 22R	5'-GGACTGGGGTCCCATTAGTC-3'			
Exon 23+24F	5'-TCCCCAGGTCTGAGTCTAGC-3'	349	63°C	40
Exon 23+24R	5'-GTCCTGTGGGTTTGGGTG-3'			
Exon 25+26F	5'-GTAGCCATATGCTTGGGTCG-3'	330	62°C	35
Exon 25+26R	5'-AGTCTTTGGGAGGGGTCCT-3'			
Exon 27F	5'-AACCTGTTTGCACATCCACA-3'	208	58°C	35
Exon 27R	5'-CTGCCTCATCCCCTGATAAA-3'			
Exon 28F	5'-ACCTGCCCCCACCTCTAC-3'	273	60°C	35
Exon 28R	5'-ACCATCCATAGGGGGTCAG-3'			
Exon 29F	5'-ATGCCCTGCCCTGGTATG-3'	223	59°C	35
Exon 29R	5'-ATAGGGTCAGGAGTCTGGCG-3'			
Exon 30F	5'-AATATTTGGTTGGGTGTGGC-3'	225	57°C	40
Exon 30R	5'-CCCAAGGAATTCATCCACTG-3'			
Exon 31F	5'-GACAGGGCACTGCTTTTCTC-3'	230	62°C	35
Exon 31R	5'-CAGGAGTAGGGAGGATGTGC-3'			
Exon 32F	5'-CTCACCTTGTTCATTTGGGC-3'	142	59°C	35
Exon 32R	5'-GGACATGGGAAAAGAAGCAG-3'			
Exon 33F	5'-AAATGCAA ACTGAGCATCCC-3'	284	57°C	35
Exon 33R	5'-ATTTGGAAATGGGTATGGCA-3'			

Exon 34F	5'-GACTGCATCTCCCAGTAGGC-3'	242	58°C	35
Exon 34R	5'-ATTCTTAACCCATCCCCTGC-3'			
Exon 35F	5'-GTAGGGGTGGCAGGTAGACA-3'	297	58°C	35
Exon 35R	5'-GTGGCAGGGGAGTGAGTAGA-3'			
Exon 36F	5'-GATGTAGCCCCTGGTGAGAA-3'	304	55°C	35
Exon 36R	5'-GGTGGTTGTGAGGAAATGGT-3'			
Exon 37F	5'-ACAGTGTTCTGCCCTTCACC-3'	272	62°C	35
Exon 37R	5'-TAATGAGATGCAGCAGTCGG-3'			
Exon 38F	5'-AGTGGTACCTCCCCAACTCC-3'	200	60°C	35
Exon 38R	5'-CCACCCTTGCCATGTGATAG-3'			
Exon 39F	5'-ACATTCGTTCTGCATACCC-3'	244	55°C	35
Exon 39R	5'-ATGAGTTTGCTCCTTGCACC-3'			
Exon 40F	5'-TCTTCCTATTGGCTCATGCC-3'	199	58°C	35
Exon 40R	5'-AGCGATCATCTGCCATTCAG-3'			
Exon 41F	5'-CCCTGTGTGATCTTGCCTTC-3'	196	58°C	35
Exon 41R	5'-CCATCCACACTAGGCCCTG-3'			
Exon 42F	5'-AAGTTCAGACCCTGAGCTGC-3'	244	60°C	35
Exon 42R	5'-CAATCAAGTTCCTGGGAGAG-3'			
Exon 43F	5'-GTGCATGCAAACTCAGTCC-3'	291	57°C	35
Exon 43R	5'-CTCAACTTCCTGCCTCCTGA-3'			
Exon 44F	5'-ATCTGGTCTGCCTAACGTGC-3'	204	62°C	35
Exon 44R	5'-CAGTTCCCACCCCTCCTC-3'			
Exon 45F	5'-GACTGTTTGTGCCCCATCTC-3'	265	56°C	35
Exon 45R	5'-TTCCCCAGATCTCTGTCCTG-3'			
Exon 46F	5'-CTGACATTGCTATTTGCCCC-3'	199	59°C	35
Exon 46R	5'-CATCTCTCCAGACCCCAGAC-3'			
Exon 47F	5'-AGCGGTGAGTCCTAGACCCT-3'	347	58°C	35
Exon 47R	5'-GACTCCTTTCCGTCCTCCTC-3'			
Exon 48F	5'-CGTGAACACTGATCCCACCT-3'	280	60°C	35
Exon 48R	5'-GAATTCAGAGGGCGTGGAC-3'			

## 8 DANKSAGUNG

Für die Möglichkeit der Erstellung dieser Dissertation an der Abteilung für Medizinische Genetik der Kinderklinik und Poliklinik im Dr. Von Haunerschen Kinderspital der Universität München danke ich Prof. Dr. Jan Murken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Alfons Meindl für die Überlassung dieses Themas, die umfassende Einführung in die Molekulargenetik und die zahlreichen Anregungen bei der Auswertung und Diskussion der Daten. Seine intensive und stets hilfsbereite Betreuung trug wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Dr. Tim Strom danke ich sehr für die intensive Mitbetreuung der Arbeit, für die wertvollen Diskussionen und sein offenes Ohr für alle Probleme.

Mein Dank gilt auch Dr. Eckart Apfelstedt-Sylla, Dr. Bernd Wissinger, Prof. Dr. med. Birgit Lorenz, Dr. Martin Hergersberg und Dr. H. J. Simonsz für die Auswahl der Patienten und die Mitarbeit an diesem Projekt.

Diese Arbeit wäre nicht zustande gekommen ohne die hervorragende Einarbeitung in die Methoden der Humangenetik durch die Mitarbeiter des molekulargenetischen Labors, die immer freundschaftliche Zusammenarbeit und die unter großem Einsatz erfolgte Unterstützung meiner Laborarbeit. V. a. Heide Hellebrand, Helene Achatz und Frau Dipl. Biol. Bettina Lorenz trugen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Für die vielen Aufmunterungen und die Unterstützung während der gesamten Doktorarbeit sowie für die konstruktive Kritik bei der Durchsicht des Manuskripts möchte ich meinem Freund Till danken.

## 9 ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Krisztina Wutz, geboren am 28.06.1975 in Budapest, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt habe und mich außer der angegebenen Hilfsmittel keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Diese hier vorgelegte Dissertation wurde von mir nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

München, den 28.01.2002

Krisztina Wutz

## 10 LEBENS LAUF

**Name:** Krisztina Wutz

**geboren:** am 28.6.1975 in Budapest/Ungarn

**Schulbildung:**

1981-1985	Grundschule, München
1985-1994	Thomas-Mann-Gymnasium, München
1994	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

**Studium:**

1994-2001	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
-----------	-------------------------------------------------------------------------

Doktorarbeit in der Abteilung Medizinische Genetik der Kinderklinik und Poliklinik im Dr. Von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Leitung: Prof. Dr. Jan Murken

Betreuung: Dr. rer. nat. Alfons Meindl

Thema: Molekulargenetische Untersuchung bei inkompletter kongenitaler stationärer Nachtblindheit (CSNB2)

**Berufsausbildung:** seit 5/2001

Ärztin im Praktikum
Medizinische Poliklinik der Universität München
Leiter: Prof. Dr. med. D. Schlöndorff