

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit  
Institut für Säugetiergenetik  
Neuherberg

**Ursachen erblicher Katarakte:  
Charakterisierung von Mutationen in den  $\alpha$ -Kristallin Genen  
bei Mensch und Maus**

Norman Klopp

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. J. Graw
2. Univ. Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 23.05.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 20.09.2000 angenommen.

## Erklärung

Diese Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. J. Graw betreut.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit versichere ich, daß die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

München, den 23.05.2000

Norman Klopp

Der Hauptteil dieser Arbeit wurde veröffentlicht:

Klopp, N.; Favor, J.; Löster, J.; Lutz, R.B.; Neuhäuser-Klaus, A.; Prescott, A.; Pretsch, W.; Quinlan, R.A.; Sandilands, A.; Vrensen, G.F.; Graw, J. (1998) Three murine cataract mutants (*Cat2*) are defective in different  $\alpha$ -crystallin genes.

*Genomics* **52**, 152-158.

Klopp, N.; Löster, J.; Graw, J. (2000) A nuclear and zonular cataract in the mouse (*Cat2<sup>nz</sup>*) is caused by a one bp deletion in the  $\beta$ -E-crystallin encoding gene.

*Genomics* eingereicht (06.04.2000)

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom April 1997 bis zum April 2000 an der GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Säugetiergenetik unter der Anleitung von Herrn *Prof. Dr. J. Graw* durchgeführt.

### **Danksagung**

Bei *allen Mitarbeitern* des Institutes, die ich während der letzten drei Jahren kennengelernt habe, möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Bei Herrn *Prof. Dr. Jochen Graw* möchte ich mich für die Überlassung des Themas, für die vielen anregenden Diskussionen und für die stete Unterstützung und Förderung bedanken. Herrn *Prof. Dr. Rudi Balling*, an dessen Institut die Arbeit durchgeführt wurde, danke ich für seine Hilfsbereitschaft und seine Anregungen.

Frau *Dr. Gabriele Möller* möchte ich besonders für ihre Unterstützung, die Diskussionen mit ihr sowie das mühevollen Korrekturlesen danken.

Meinen Mit-Doktoranden Frau *Dr. Christina Grimm*, Herrn *Johannes Lengler* und Herrn *Raimund Lutz* danke ich für die ergiebigen Diskussionen und dem vielen Spaß. Frau *Erika Bürkle*, Frau *Margret Bahnweg* und Frau *Monika Stadler* danke ich mich für die ausgezeichnete technische Betreuung und ein gutes Laborklima.

Herrn *Johannes Glöckner* danke ich besonders für seine Unterstützung und Hilfe in allen Computerfragen.

Bei Herrn *Dr. PD Jerzy Adamski*, Herrn *Dr. Josef Gerber*, Herrn *Dr. Jack Favor*, Herrn *Dr. Thomas Immervoll* und Frau *Dr. Jana Löster* möchte ich mich für ihre vielen Anregungen und ihre Unterstützung bedanken. Für Diskussionen und Hilfsbereitschaft möchte ich auch Frau *Dr. Barbara Angeletti*, Herrn *Martin Auer*, Herrn *Rainer Breitling*, Herrn *Henning Gohlke*, Herrn *Ralf Kist*, Frau *Antje Kratzeisen*, Herrn *Dr. Dirk Korthaus*, Frau *Daniela Laubner*, Herrn *Dr. Ralf Spörle* und Frau *Caroline Zentz* danken.

Herrn *Dr. Roy Quinlan* und Frau *Dr. Aileen Sandilands* danke ich für Betreuung und Diskussionen während eines Aufenthalts in Dundee (Scotland).

Zuletzt gilt mein Dank *meinen Eltern* sowie *meinen Freunden*, die für mich in den letzten drei Jahren viel Verständnis aufgebracht und mich stets unterstützt haben.

# INHALTSVERZEICHNIS

|  |           |
|--|-----------|
| <b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b> .....                                | <b>1</b>  |
| <b><u>SUMMARY</u></b> .....  | <b>2</b>  |
| <b><u>1 EINLEITUNG</u></b> .....                                   | <b>3</b>  |
| <b><u>1.1 Die Entwicklung der Augenlinse</u></b> .....             | <b>3</b>  |
| <u>1.1.1 Morphogenese der Augenlinse</u> .....                     | 3         |
| <u>1.1.2 Molekulare Faktoren der Augenentwicklung</u> .....        | 5         |
| <b><u>1.2 Die Kristalline der Augenlinsen</u></b> .....            | <b>6</b>  |
| <u>1.2.1 -Kristalline</u> .....                                    | 7         |
| <u>1.2.2 -/ -Kristallin-Superfamilie</u> .....                     | 8         |
| <u>1.2.3 -Kristalline</u> .....                                    | 8         |
| <u>1.2.4 S-Kristalline</u> .....                                   | 9         |
| <u>1.2.5 -Kristalline</u> .....                                    | 10        |
| <b><u>1.3 Cryg Mutationen und Katarakte</u></b> .....              | <b>14</b> |
| <b><u>1.4 Aufgabenstellung</u></b> .....                           | <b>18</b> |
| <b><u>2 MATERIAL</u></b> .....                                     | <b>19</b> |
| <u>2.1 Chemikalien und sonstige Reagenzien</u> .....               | 19        |
| <u>2.2 Enzyme und Antikörper</u> .....                             | 20        |
| <u>2.3 Geräte</u> .....  | 20        |
| <u>2.4 Puffer und Lösungen</u> .....                               | 21        |
| <u>2.5 Größenstandards</u> .....                                   | 21        |
| <u>2.6 Oligonukleotide</u> .....                                   | 22        |
| <u>2.7 Bakterienstämme</u> .....                                   | 22        |
| <u>2.8 Mäuse</u> .....   | 22        |
| <u>2.9 Verwendete Nukleinsäuren</u> .....                          | 23        |
| <u>2.9.1 Vektoren</u> .....  | 23        |
| <u>2.9.2 Humane DNA-Proben</u> .....                               | 23        |
| <u>2.10 Genomische DNA-Banken</u> .....                            | 23        |
| <u>2.11 Computerprogramme</u> .....                                | 24        |
| <b><u>3 METHODEN</u></b> .....                                     | <b>25</b> |
| <b><u>3.1 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren</u></b> ..... | <b>25</b> |
| <u>3.1.1 DNA-Isolierung aus Organen</u> .....                      | 25        |
| <u>3.1.2 DNA-Isolierung aus humanen Blutproben</u> .....           | 25        |
| <u>3.1.3 Plasmid-DNA Isolierung aus Bakterien</u> .....            | 25        |
| <u>3.1.4 DNA-Isolierung aus -Phagen</u> .....                      | 26        |
| <u>3.1.5 Reinigung von DNA aus Agarosegelen</u> .....              | 26        |
| <u>3.1.6 RNA-Isolierung aus Organen</u> .....                      | 27        |
| <u>3.1.7 Phenolextraktion</u> .....                                | 27        |
| <u>3.1.8 Ethanol-fällung</u> .....                                 | 27        |

|  |           |
|--|-----------|
| <u>3.1.9 Quantifizierung von Nukleinsäuren</u> .....   | 28        |
| <b><u>3.2 Molekularbiologische Methoden an Nukleinsäuren</u></b> .....   | <b>28</b> |
| <u>3.2.1 Gelelektrophoresen</u> .....  | 28        |
| <u>3.2.2 DNA-Silbernitratfärbung</u> .....   | 29        |
| <u>3.2.3 Restriktionsverdau von DNA</u> .....  | 30        |
| <u>3.2.4 Klonierung</u> .....  | 30        |
| <u>3.2.5 cDNA Erststrang-Synthese</u> .....  | 31        |
| <u>3.2.6 Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (SSCP)</u> .....  | 31        |
| <u>3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</u> .....   | 32        |
| <u>3.2.8 Durchsuchen von genomischen DNA-Banken</u> .....  | 34        |
| <u>3.2.9 Hybridisierungsverfahren (Southern-Blot)</u> .....  | 35        |
| <u>3.2.10 Sequenzierung</u> .....  | 37        |
| <b><u>3.3 Mikrobiologische Methoden</u></b> .....  | <b>37</b> |
| <u>3.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien</u> .....   | 37        |
| <u>3.3.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA</u> .....  | 37        |
| <u>3.3.3 Herstellung von Glycerinkulturen</u> .....  | 38        |
| <b><u>3.4 Proteinchemische Methoden</u></b> .....  | <b>38</b> |
| <u>3.4.1 Herstellung von Linsenextrakten</u> .....   | 38        |
| <u>3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung</u> .....   | 38        |
| <u>3.4.3 Fraktionierung von Linsenextrakten</u> .....  | 38        |
| <u>3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</u> .....   | 39        |
| <u>3.4.5 Herstellung polyklonaler Antiseren</u> .....  | 40        |
| <u>3.4.6 Western-Blot</u> .....  | 40        |
| <b><u>3.5 Morphologische und Histologische Methoden</u></b> .....  | <b>41</b> |
| <u>3.5.1 Organentnahme</u> .....   | 41        |
| <u>3.5.2 Gewebefixierung</u> .....   | 41        |
| <u>3.5.3 Herstellung von Plastikblöcken und -Schnitten</u> .....   | 42        |
| <u>3.5.4 Übersichtsfärbung</u> .....   | 42        |
| <u>3.5.5 Dokumentation</u> .....   | 42        |
| <b><u>4 ERGEBNISSE</u></b> .....   | <b>43</b> |
| <b><u>4.1 Übersicht der Phänotypen der <i>Cat2</i> Kataraktmutanten</u></b> .....                                | <b>43</b> |
| <b><u>4.2 Analyse der <i>Cryg</i> / <i>Cat2</i> Mutanten</u></b> .....   | <b>45</b> |
| <u>4.2.1 Systematischer Ansatz zur Überprüfung der <i>Cryg</i> Kandidatengene</u> .....                          | 45        |
| <u>4.2.2 Mutationen im <i>Cryga</i> Gen der Maus</u> .....   | 47        |
| <u>4.2.2.1 Charakterisierung der <i>Cryga</i><sup>Neu</sup> (<i>ENU-436</i>) Mutante</u> .....                   | 47        |
| <u>4.2.2.2 Analyse der <i>Cryga</i><sup>tol</sup> (<i>Cat2</i><sup>tol</sup> / <i>ENU-369</i>) Mutante</u> ..... | 51        |
| <u>4.2.3 Analyse der <i>Crygb</i><sup>nop</sup> (<i>Cat2</i><sup>nop</sup>) Mutante</u> .....                    | 54        |
| <u>4.2.4 Mutationen im <i>Cryge</i> Gen der Maus</u> .....   | 56        |
| <u>4.2.4.1 Analyse der <i>Cryge</i><sup>t</sup> (<i>Cat2</i><sup>t</sup>) Mutante</u> .....                      | 56        |
| <u>4.2.4.2 Analyse der <i>Cryge</i><sup>ns</sup> (<i>Cat2</i><sup>ns</sup>) Mutante</u> .....                    | 57        |
| <u>4.2.4.3 Charakterisierung der <i>Cryge</i><sup>nz</sup> (<i>Cat2</i><sup>nz</sup>) Mutante</u> .....          | 64        |
| <u>4.2.5 Untersuchung der <i>ENU-418</i> Mutante</u> .....   | 72        |
| <u>4.2.6 Sequenzunterschiede in den <i>Cryg</i> Genen der Maus</u> .....   | 73        |

|   |            |
|---|------------|
| <b><u>4.3 Übersicht über Mutationen in den <i>Cryg</i> Genen und deren Expression in der Maus</u></b> | <b>75</b>  |
| <b><u>4.4 Identifikation einer humanen Mutation im <i>CRYGA</i> Gen</u></b>                           | <b>77</b>  |
| <b><u>5 DISKUSSION</u></b>  | <b>84</b>  |
| <b><u>5.1 Die <math>\alpha</math>-Kristallin Mutationen</u></b>                                       | <b>84</b>  |
| <u>5.1.1 Untersuchungsmethoden zur Identifikation von <math>\alpha</math>-Kristallin Mutationen</u>   | 84         |
| <u>5.1.2 Mutationen in den <math>\alpha</math>-Kristallin Genen</u>                                   | 85         |
| <u>5.1.2.1 Polymorphismen der <math>\alpha</math>-Kristalline</u>                                     | 85         |
| <u>5.1.2.2 Ungeklärte Mutationen</u>  | 87         |
| <u>5.1.2.3 Identifizierte Mutationen und Mutagenese</u>   | 88         |
| <u>5.1.3 Charakterisierung der <i>Cryg</i> Genregion</u>  | 89         |
| <u>5.1.4 Zeitliche und räumliche Expression der <math>\alpha</math>-Kristalline</u>                   | 91         |
| <b><u>5.2 Konsequenzen der Mutationen auf die <math>\alpha</math>-Kristallinproteine</u></b>          | <b>93</b>  |
| <u>5.2.1 Kurze <math>\alpha</math>-Kristallin Peptide</u>   | 93         |
| <u>5.2.2 Aminosäureaustausche in den <math>\alpha</math>-Kristallinen</u>                             | 94         |
| <u>5.2.3 <math>\alpha</math>-Kristalline mit zerstörtem vierten „Griechischen Schlüssel“ Motiv</u>    | 97         |
| <u>5.2.4 Das <i>Cryge</i><sup>nz</sup>-Protein</u>  | 98         |
| <u>5.2.5 Mutierte <math>\alpha</math>-Kristalline sind toxisch für die Augenlinse</u>                 | 99         |
| <b><u>5.3 Kataraktentstehung durch mutierte <math>\alpha</math>-Kristalline</u></b>                   | <b>100</b> |
| <u>5.3.1 Verbindung zwischen der Expression mutierter Proteine und Katarakt-Phänotypen</u>            | 100        |
| <u>5.3.2 Veränderte Biochemie der Kataraktlinsen</u>  | 102        |
| <u>5.3.3 Veränderungen der Zellphysiologie in Kataraktlinsen</u>                                      | 104        |
| <b><u>5.4 Ausblick</u></b>  | <b>105</b> |
| <b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>  | <b>106</b> |
| <b><u>ANHANG</u></b>  | <b>117</b> |
| <b><u>A.1 Puffer und Lösungen</u></b>   | <b>117</b> |
| <u>Allgemeine Lösungen und Puffer</u>   | 117        |
| <u>Lösungen und Puffer für molekularbiologische Methoden</u>  | 117        |
| <u>Lösungen und Medien für mikrobiologische Methoden</u>  | 118        |
| <u>Lösungen und Puffer für proteinchemische Methoden</u>  | 119        |
| <u>Lösungen für histologische Methoden</u>  | 120        |
| <b><u>A.2 Liste der verwendeten Oligonukleotide</u></b>   | <b>120</b> |
| <b><u>A.3 Tabellen und Abbildungen</u></b>  | <b>124</b> |
| <b><u>ABKÜRZUNGEN</u></b>   | <b>129</b> |

## ZUSAMMENFASSUNG

Das Krankheitsbild Katarakt (Trübung der Augenlinse) ist eine der Hauptursachen für Erblindung. Erbliche Katarakte sind häufig die Folge von Mutationen in Strukturproteinen der Augenlinse. Mutanten der Maus, in denen die Augenlinse betroffen ist, stellen gute Modelle für die korrespondierenden humanen Erkrankungen dar. Die Neuherberger Sammlung von Kataraktmutanten enthält heute 203 Linien unabhängiger Herkunft mit verschiedenen Phänotypen. Die größte Allelie-Gruppe der Mutanten, mit dem Genort Symbol *Cat2*, ist auf das Chromosom 1 der Maus in die Nähe des  $\gamma$ -Kristallinclusters kartiert worden (*Cryg*). Die sechs  $\gamma$ -Kristalline (*Cryga*–*Crygf*) sind augenspezifische Strukturproteine der Augenlinse und daher Kandidaten für die Kataraktmutation. Nach phänotypischer Charakterisierung der Mutanten wurde der  $\gamma$ -Kristallingencluster mit einer PCR gestützten, systematischen Kandidatengenuntersuchung überprüft. Für fünf *Cat2* Mutanten konnten die jeweiligen Mutationen und für eine weitere das betroffene Gen identifiziert werden. Im zweiten Exon des *Cryga* Gens wurde eine A–G Transition für die *ENU-436* Mutante (umbenannt in *Cryga*<sup>1Neu</sup>) und eine T–C Transition der *ENU-369* Mutante (*Cryga*<sup>tol</sup>) gefunden. Das mutante Allel *Cat2*<sup>nop</sup> (*Crygb*<sup>nop</sup>) wird durch den Ersatz von 11 bp durch 4 bp im dritten Exon des *Crygb* Gens verursacht. Im *Cryge* Gen konnten drei Mutationen festgestellt werden: eine C–G Transversion im dritten Exon in der *Cat2*<sup>t</sup> Mutante (*Cryge*<sup>t</sup>), eine Deletion (>1,8 kb) bei der *Cat2*<sup>ns</sup> Mutante (*Cryge*<sup>ns</sup>) und eine 1 bp Deletion im zweiten Exon in der *Cat2*<sup>nz</sup> Mutante (*Cryge*<sup>nz</sup>). Die Transitionen in der *Cryga*<sup>1Neu</sup> sowie der *Cryga*<sup>tol</sup> Mutante führen zu Aminosäureaustauschen, die Veränderungen der  $\gamma$ -A-Proteinstruktur bewirken. Die Mutationen in der *Crygb*<sup>nop</sup> und der *Cryge*<sup>t</sup> Mutante führen zur Bildung eines vorzeitigen Stop-Codons, wodurch die Aminosäurekette des  $\gamma$ -Kristallins vor dem vierten „Griechischen Schlüssel“ Motiv abbricht. In der *Cryge*<sup>nz</sup> Mutante führt die Deletion zu einer Leserasterverschiebung und der Synthese eines 125 Aminosäuren langen Proteins mit 96 veränderten Aminosäuren. Dieses modifizierte  $\gamma$ -Kristallin sowie ein Abbauprodukt wurde in der Augenlinse durch Western-Blot nachgewiesen. Zur besseren Phäno-/Genotyp-Korrelation wurde die *Cryg* Expression mit RT-PCR während der Embryogenese untersucht. *Cryga*, *Cryge/f* werden schon ab E12.5, *Crygb*, *Crygc* und *Crygd* erst ab E14.5 exprimiert.

Eine Familie mit einer dominanten kongenitalen Katarakt wurde ebenfalls auf Mutationen in den vier exprimierten humanen  $\gamma$ -Kristallinen (*CRYGA*–*CRYGD*) untersucht. Es konnte eine Insertion im zweiten Exon des *CRYGA* Gens identifiziert werden, die jedoch nicht mit der Katarakt assoziiert ist. Die Mutation bewirkt einen vorzeitigen Stop in der Aminosäuresequenz. Für das resultierende kurze Peptid wird angenommen, daß es zu klein ist, um eine Katarakt zu verursachen. Die Mutation konnte nur bei zwei Familienmitgliedern festgestellt werden, jedoch nicht in weiteren 170 humanen Proben gesunder Probanden und wird daher als ein seltener Polymorphismus angesehen.

Die allelischen *Cat2* Mutanten stellen gute Modelle für Untersuchungen der Kataraktbildung dar. Die verschiedenen, durch mutierte *Cryg* Gene verursachte Phänotypen können teilweise durch Unterschiede in der Genexpression erklärt werden. Vermutlich spielen auch Abweichungen der Konformation verglichen zum Wildtyp-Protein eine zentrale Rolle in der Kataraktbildung. Aufgrund der Beobachtungen verschiedener Mausmutationen und dem humanen Polymorphismus, ist ein Effekt auf die Transparenz der Linse wahrscheinlich nur zu beobachten, wenn die Mutation zu einer Veränderung der konservierten Faltungseigenschaften der  $\gamma$ -Kristallin-Proteine führt.

## SUMMARY

Cataract (opacification of the eye lens) is one of the main causes of blindness. Congenital cataract are often the consequence of mutation in the proteins of the eye lens. Mouse mutants affecting the eye lens are excellent models for corresponding human disorders. The Neuherberg collection of cataracts contains up to now 203 lines of independent origin and distinct phenotypes. The largest allelic group of the mutants, with the locus symbol *Cat2*, was mapped to the murine chromosome 1 close to the  $\alpha$ -crystallin gene cluster (*Cryg*). The six  $\alpha$ -crystallins (*Cryga*–*Crygf*) are eye specific structural proteins and therefore candidates for the cataract mutation. After phenotypical characterisation of the mutants the entire  $\alpha$ -crystallin gene cluster was tested in a PCR based systematic candidate gene approach. For five *Cat2* mutant lines the mutation and for an additional mutant the affected gene could be identified. In the second exon of *Cryga* a A–T transition for the ENU-436 mutant (designated *Cryga*<sup>1Neu</sup>) and a T–C transition for the ENU-369 mutant (*Cryga*<sup>1ol</sup>) was found. The mutant allele *Cat2*<sup>nop</sup> (*Crygb*<sup>nop</sup>) is caused by a replacement of 11 bp by 4 bp in the third exon of *Crygb*. In *Cryge* three mutations were determined: A–C–G transversion in the third exon in the *Cat2*<sup>t</sup> mutant (*Cryge*<sup>t</sup>) and a deletion (>1,8 kb) in the *Cat2*<sup>ns</sup> mutant (*Cryge*<sup>ns</sup>) and a 1 bp deletion in the second exon in the *Cat2*<sup>nz</sup> mutant (*Cryge*<sup>nz</sup>). The transitions in the *Cryga*<sup>1Neu</sup> and the *Cryga*<sup>1ol</sup> mutants lead to amino acid exchanges, which affect the  $\alpha$ -protein structure. The mutations in the *Crygb*<sup>nop</sup> and the *Cryge*<sup>t</sup> mutant lead to the formation of in-frame stop codons and give rise to a truncated  $\alpha$ -crystallin lacking the fourth Greek-key motif. In the *Cryge*<sup>nz</sup> mutant the deletion leads to a frameshift and causes the synthesis of a 125 amino acids long protein with 96 changed amino acids at the C-terminus. The altered protein of 13 kDa and a decomposition product are present in the eye lens as demonstrated by Western-Blot analysis. For a better phenotype-/genotype correlation the *Cryg* expression was examined during embryogenesis by RT-PCR. The onset of expression is for *Cryga*, *Cryge/f* at E12.5 and for *Crygb*, *Crygc* and *Crygd* later at E14.5.

A family with a dominant congenital cataract was tested for mutations in the four human expressed  $\alpha$ -crystallin genes (*CRYGA*–*CRYGD*). An insertion in the second exon of the *CRYGA* gene was identified, which is not associated with the cataract. The mutation leads to the formation of a premature stop codon and to a short predicted peptide, which is suggested to be too small for induction of cataract formation. The mutation was only found in two family members but not in additional 170 human samples of healthy controls. Therefore, the mutation is suggested to be a rare polymorphism.

The allelic *Cat2* mutants are excellent models to study cataractogenesis. The various phenotypes affecting different *Cryg* genes might be explained by differences in gene expression. However, misfolding of the altered proteins might play also a central role in cataractogenesis. Based upon the various phenotypes of the mouse mutations and the human polymorphism, an effect on lens transparency is probably only observed if the mutation leads to an alteration of the conserved folding features of the  $\alpha$ -crystallins.

## 1 EINLEITUNG

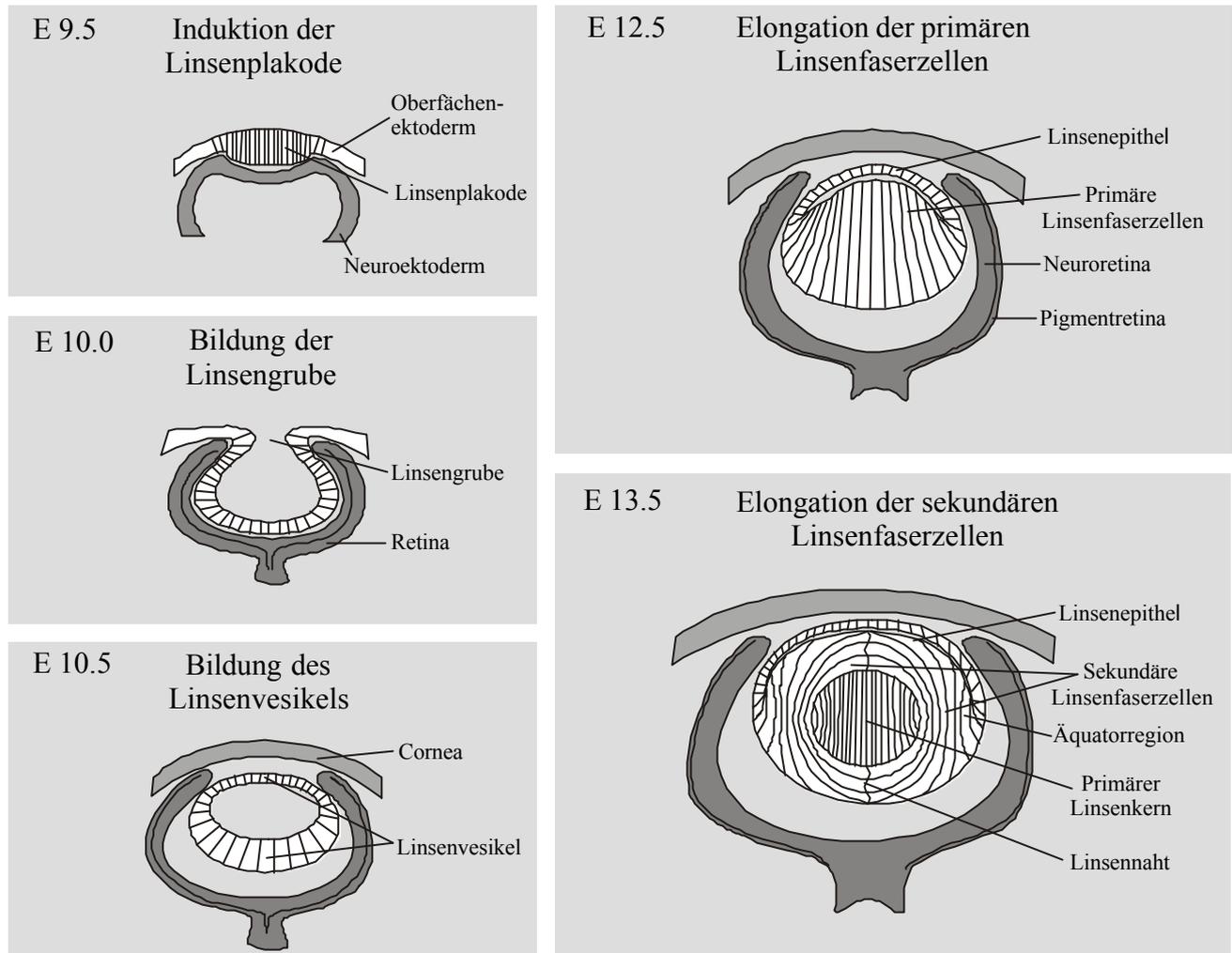
Die Trübung der Augenlinse (Katarakt) stellt weltweit die Hauptursache für Erblindung dar (1.3). Erbliche Katarakte sind eine der wichtigsten Gründe für Blindheit bei Kindern. Trotz dieser Tatsachen sind die Ursachen und die Mechanismen, die zur Kataraktbildung führen wenig verstanden. Diese Arbeit soll einen Beitrag zum besseren Verständnis von Erkrankungen der Augenlinse leisten.

### 1.1 Die Entwicklung der Augenlinse

#### 1.1.1 Morphogenese der Augenlinse

Die Entwicklung des Auges beginnt während der Embryogenese bereits vor der Schließung des Neuralrohres. Die paarige Augenanlage stülpt sich dabei aus der Wand des Vorderhirns (Prosenzephalon). Diese sogenannten Augenfurchen wachsen aus, bis das Oberflächenektoderm des Kopfes erreicht ist. An der Stelle des direkten Kontaktes induziert der Augenbecher eine Verdickung des Oberflächenektoderms, die Linsenplakode. Diese beginnt sich beim Menschen in der 4. Schwangerschaftswoche, bei der Maus am Tag 9.5 der Embryogenese (E9.5), von der Oberfläche her einzustülpen, um sich später als epitheliale Hohlkugel vollständig abzuschnüren. Aus diesem Linsenbläschen entwickelt sich allein aus den Zellen der Hohlkugel die komplette spätere Augenlinse. Die Cornea entwickelt sich aus dem Oberflächenektoderm, während das eingestülpte Neuroektoderm zur Retina wird, wobei sich der äußere Teil zur Pigmentretina und der innere Teil zur Neuroretina differenziert.

Die Differenzierung des Linsenvesikels beginnt mit der Elongation der Zellen, die dem Oberflächenektoderm abgewandt sind (posteriorer Pol). Diese primären Linsenfasern elongieren, bis sie Kontakt zu den epithelialen Zellen am anterioren Vesikelpol haben. Dadurch wird der Hohlraum des Vesikels vollständig ausgefüllt. Anschließend folgt das Auswachsen der sekundären Linsenfasern von der Äquatorregion des Linsenepithels. Die Elongation der sekundären Linsenfasern erfolgt in konzentrischen Ringen um den primären Linsenkern herum, bis sie aneinander treffen. Die Stelle, an der die sekundären Linsenfasern miteinander in Kontakt stehen, wird als Linsennaht bezeichnet. Sie beschreibt eine Y-Form und entsteht am anterioren und posterioren Linsenpol. Der letzte Schritt der Differenzierung der sekundären Linsenfasern ist der Abbau der Mitochondrien und des Zellkerns, wobei auch die nukleäre DNA der Zellen degradiert wird.



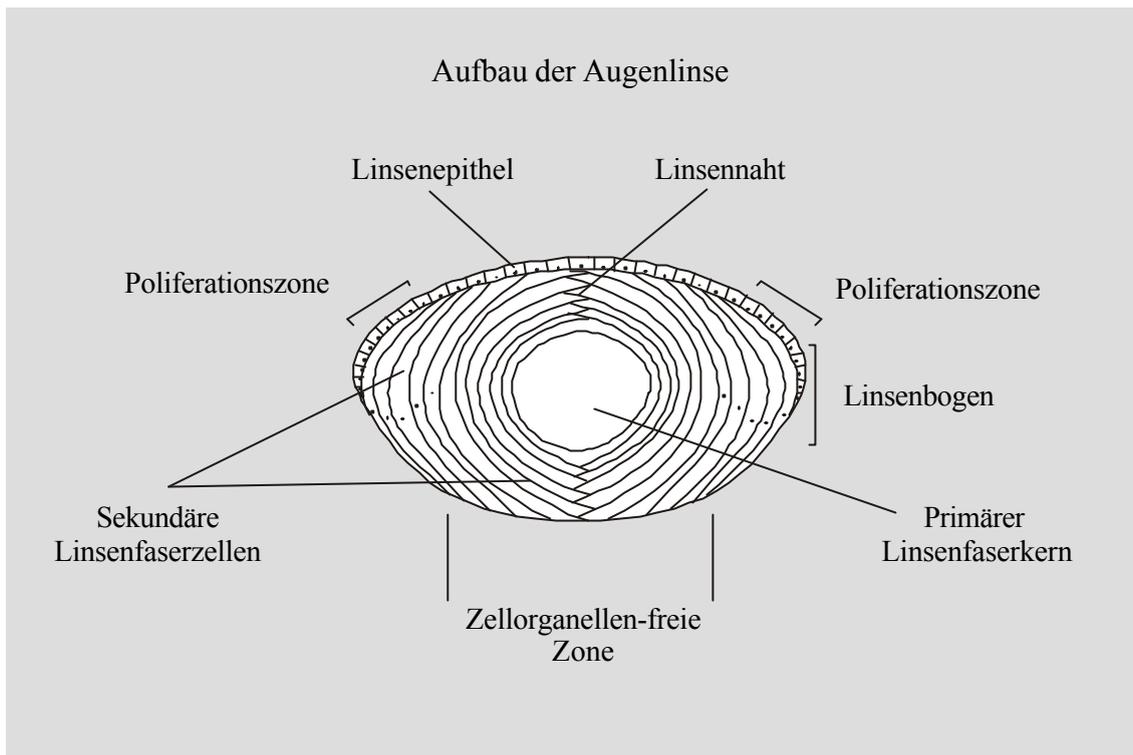
**Abbildung 1.1** Schematische Darstellung verschiedener Embryonalstadien der Augenentwicklung bei Wirbeltieren (verändert nach Graw, 1997).

Erläuterungen finden sich im Kapitel Morphogenese der Augenlinse (1.1.1).

Der Prozeß der Differenzierung der Linsenfaserzellen aus den teilungsfähigen epithelialen Zellen der Äquatorregion wird erst nach der Geburt beendet, beim Menschen etwa im 20. Lebensjahr, bei der Maus in der 3. Lebenswochen.

Durch diese Morphogenese entsteht ein transparentes Organ, das aus einem einschichtigen teilungsfähigen Linsenepithel und terminal differenzierten Linsenfaserzellen besteht. Einmal differenzierte Linsenfaserzellen müssen bis zum Tode Lichttransparenz gewährleisten, da sie nicht ersetzt oder abgebaut werden können. Auch können diese Zellen nach dem Abbau ihrer Zellorganellen keine weitere Biosynthese betreiben, um Schäden oder Fehlentwicklungen zu reparieren. Daher ist in den Linsenfaserzellen ein speziell optimiertes Proteinsystem zu finden, das diese andauernde Lichttransparenz und biochemische Stabilität hervorbringt.

Dieses System, inklusive seiner Entwicklung, ist aufgrund seiner Optimierung in der Evolution zwischen Mensch und Maus konserviert geblieben.



**Abbildung 1.2** Schematische Darstellung des Aufbaus der Augenlinse bei Wirbeltieren (nach Graw, 1997). Erläuterungen finden sich im Kapitel Morphogenese der Augenlinse (1.1.1).

### 1.1.2 Molekulare Faktoren der Augenentwicklung

Die unter 1.1.1 dargestellten morphogenetischen Prozesse werden durch verschiedene Transkriptionsfaktoren reguliert (zur Übersicht Graw, 1996; Graw, 1999a; Jean et al., 1998; Oliver und Gruss, 1997; Francis et al., 1999; Wawersik und Maas, 2000). Eine maßgebliche Rolle spielt hierbei die Signaltransduktion durch den Transkriptionsfaktor *Pax6*. In *Drosophila* konnte die Bildung ektopischer Augen durch die gerichtete Expression von *Pax6* in den Imaginalscheiben erzeugt werden. *Pax6* wurde deshalb als ein „master gene“ für die Augenentwicklung bezeichnet (Halder et al., 1995). Die Fähigkeit, eine ektopische Augenbildung in *Drosophila* zu induzieren, konnte auch für die Gene *so*, *eya* und *dac* gezeigt werden (Chen et al., 1997; Pignoni et al., 1997).

Durch die ektopische Expression von *Pax6* kann auch in Wirbeltieren, wie z.B. *Xenopus*, die ektopische Augenbildung induzieren werden (Chow et al., 1999). In einem vergleichbaren Experiment konnte für *Six3* die Fähigkeit zur Induktion ektopischer Augen im *Meddaka* Fisch nachgewiesen werden (Oliver et al., 1996). In der Maus ist *Pax6* u.a. während der Morphogenese der Augenlinsen und anschließend im Linsenepithel embryonal sowie postnatal exprimiert (Walther und Gruss, 1991). Eine Reihe anderer Transkriptionsfaktoren sind während der Augenentwicklung ebenfalls in der Linse zu finden. Diese schließt *Eyal*

(Bonini et al., 1997), *L-Maf* (Ogino und Yasuda, 1998), *Prox1* (Oliver et al., 1993; Tomarev et al., 1996, Wigle et al., 1999), *Pitx3* (Semina et al., 1997; Semina et al., 1998), *Six3* (Oliver et al., 1995) und *Sox1* (Kamachi et al., 1998) ein. *Pitx3* ist in der Linsenplakode und später im Linsenepithel exprimiert (Semina et al., 1997). Eine Deletion im Promotorbereich des Gens führt in der *aphakia* Maus zu einem Augenphänotyp (Semina et al., 2000). In dieser Mutante kann sich embryonal das Linsebläschen nicht von der Cornea ablösen, was einen Differenzierungsdefekt der Linse und die Degeneration des Auges zur Folge hat (Grimm et al., 1998). *L-Maf* und *Sox1* binden an Promotoren von linsenspezifischer Gene und aktivieren diese, darunter auch die  $\gamma$ -Kristallin Gene der Augenlinse. Das Fehlen von *L-Maf* oder von *Sox1* in der Maus hat eine Reduktion der Expression der  $\gamma$ -Kristalline und dadurch schwerwiegende Defekte zur Folge (Kamachi et al., 1995; Nishiguchi et al., 1998; Kawauchi et al., 1999; Kim et al., 1999; Ring et al., 2000). Vor kurzem konnte die Beteiligung von *Prox1* und *Six3* an der Regulation der  $\gamma$ -Kristallin-Expression gezeigt werden. Die Bindung an den  $\alpha$ -F-Kristallin Promotor bewirkt bei *Prox1* eine Aktivierung, bei *Six3* eine Reprimierung der Expression (Lengler, 2000).

Die Transkriptionsfaktoren regulieren in der terminalen Linsendifferenzierung die Expression von Strukturproteinen, insbesondere die Gene der augenspezifischen Kristallin-Familie.

## 1.2 Die Kristalline der Augenlinsen

Die Kristalline wurden 1893 von C.T. Mörner als wasserlösliche Strukturproteine der Augenlinse von Wirbeltieren beschrieben (Mörner, 1893). Nach Mörner werden die wasserlöslichen Linsenproteine in drei Fraktionen anhand ihres chromatophysikalischen Verhalten in  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kristalline eingeteilt. Diese hochspezialisierten Proteine gewährleisten, durch ihre Fähigkeit zu einer dichten Packung einen hohen Proteingehalt der Augenlinse. Der Wasseranteil beträgt in normalen Zellen 95%, während er in der Augenlinse auf 65-70% reduziert ist. Die Kristalline repräsentieren ca. 30-35% der gesamten Linsenmasse (Graw, 1997).

Die Kristalline gewährleisten die Brechkraft und die Transparenz der Augenlinse. Sie sind in den hochorganisierten Linsenfaserzellen zu finden und müssen daher die gesamte Lebensdauer des Organismus überstehen und stabil bleiben (1.1.1). Ein Verlust der Löslichkeit oder der Stabilität der Kristalline kann zu Kataraktbildung und Linsentrübung führen.

### 1.2.1 -Kristalline

Die -Kristalline haben mit 30% den Hauptanteil an den wasserlöslichen Linsenproteinen. Sie bilden große makromolekulare Komplexe, die sich aus zwei Untereinheiten, dem A-Kristallin (Gensymbol: *Cryaa*) und dem B-Kristallin (Gensymbol: *Cryab*) zusammensetzen. Diese sind zu 57% in der Aminosäuresequenz identisch (de Jong et al., 1993). Die -Kristalline sind in der Embryogenese die ersten exprimierten Kristalline. Das *Cryaa* ist bereits in den primären Linsenfaserzellen zu finden und wird in allen Linsenfaserzellen, die sich in der Äquatorregion bilden, hochreguliert. In der adulten Linse wird *Cryaa* in frühen elongierenden sekundären Faserzellen und im Linsenepithel synthetisiert (Robinson und Overbeek, 1996; Voorter et al., 1990). Das *Cryab* kommt wie das *Cryaa* hauptsächlich in der Linse vor, ist jedoch auch in einer Reihe anderer Organe in deutlichen Mengen zu finden (Dubin et al., 1991; Krausz et al., 1996; Dubin et al., 1989). In der Embryonalentwicklung konnte eine *Cryab* Expression außerhalb der Augenlinse im Myotom (E10.5) nachgewiesen werden (Benjamin et al., 1997).

Eine Funktion der -Kristalline ist die molekularer Chaperone. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, daß -Kristallin die Hitze-induzierte Aggregation von verschiedenen Enzymen und von -/ -Kristallinen verhindert sowie die von UV-Strahlung verursachte Proteinaggregation und Trübung von -Kristallinlösungen reduziert (Horwitz, 1992; Borkman et al., 1996; Wang und Spector, 1995). Die Chaperon-Aktivität in terminal differenzierten Linsenfaserzellen ist essentiell für die Transparenz der Linse, da eine Degradierung defekter Proteine nicht möglich ist. Dieses konnte *in vivo* durch die Ausschaltung des A-Kristallin-Gens bestätigt werden. Die *Cryaa*<sup>-/-</sup> Mutation führt zur Linsentrübung und zur Bildung von Einschlusskörpern aus B-Kristallin (Brady et al., 1997). Auch eine kürzlich identifizierte Punktmutation im *Cryaa* bei der *lop18* Maus führt zur Kataraktbildung (Chang et al., 1999). Eine humane Katarakt wurde ebenfalls beschrieben, verursacht durch eine *CRYAA*-Mutation, die einen Aminosäureaustausch zur Folge hat (Litt et al., 1998). Außerdem konnte *in vitro* die Bindung von A-Kristallin an eine Sequenz im *Cryge*-Promotor, dem DOTIS-Element, gezeigt werden (Pietrowski et al., 1994). Diese Interaktion des A-Kristallins ist abhängig von seiner Phosphorylierung (Pietrowski und Graw, 1997).

### 1.2.2 -/-Kristallin-Superfamilie

Die - und -Kristalline werden aufgrund ihrer Homologie und charakteristischen Proteinfaltung in einer gemeinsamen Familie zusammengefaßt. Diese -/-Kristallin-Superfamilie ist gekennzeichnet durch die Bildung von 4 antiparallelen -Faltblättern (die a,b,c und d Stränge), die sich zu einem Motiv anordnen, das als „Griechischer Schlüssel“ bezeichnet wird. Jedes „Griechische Schlüssel“ Motiv besteht aus etwa 40 Aminosäuren. Alle - und -Kristalline besitzen 4 der „Griechischen Schlüssel“ Motive, die in zwei Domänen organisiert sind (Blundell et al., 1981, Bax et al., 1990; Slingsby und Clout, 1999). Aufgrund dieser Organisation der Proteinstruktur wird davon ausgegangen, daß sich die -/-Kristalline während der Evolution in zwei Duplikationsschritten aus einem gemeinsamen Vorläufergen entwickelt haben. Als ein wahrscheinlicher Kandidat für das strukturelle Vorläuferprotein der Familie gilt das Hefe-Killer-Toxin aus *Williopsis mrakii* (WmKT) mit einer dreidimensionalen Struktur, die mit einer einzelnen -/-Kristallin-Domäne vergleichbar ist.

Ein weiterer Hinweis auf die Evolution der -/-Kristalline aus einem einzelnen „Griechischen Schlüssel“ Motiv kann von der genomischen Struktur der Gene abgeleitet werden. So wird in den -Kristallinen jedes einzelne „Griechische Schlüssel“ Motiv von einem separaten Exon codiert, hingegen werden bei den -Kristallinen zwei Motive einer Domäne von einem Exon codiert. Dieses unterstreicht den modularen Aufbau der -/-Kristalline aus einzelnen „Griechischen Schlüssel“ Motiven (Lubsen et al., 1988).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den - und -Kristallinen besteht in der Quartärstruktur der Proteine. So weisen die -Kristalline eine intramolekulare Domänenpaarung auf und kommen als Monomere vor. Die Domänen der -Kristalline hingegen interagieren intermolekular, was zur Bildung von Homo- oder Heterodimeren verschiedener -Kristalline führt, die sich außerdem noch zu größeren Multimer-Aggregaten zusammenlagern können (zur Übersicht Graw, 1997; Slingsby und Clout, 1999).

Ein Überblick über die Mitglieder der /-Kristallin-Superfamilie ist im Anhang Tab. A2 dargestellt.

### 1.2.3 -Kristalline

Die -Kristallin-Familie besteht aus 6 Genen (*Cryab1*, -2, -4 und *Crybb1*, -2, -3). Man teilt sie, je nach dem isoelektrischen Punkt der Proteine, in eher saure ( A) und eher basische ( B) Kristalline ein. Das *Cryab-1* codiert durch unterschiedliche Translationsstarts für das A1-

und das A3-Kristallin. Die Expression aller -Kristalline ist beschränkt auf die Augenlinse und die Retina. Sie beginnt bereits in frühen Entwicklungsstadien des Embryos und setzt sich bis nach der Geburt fort, wo auch das höchste Expressionsniveau erreicht wird. Das Molekulargewicht der 6 verschiedenen -Kristallin-Monomere liegt zwischen 22 und 28 kDa. Diese oligomerisieren und können als Octamere native Proteinkomplexe mit einer Größe bis zu ca. 200000 kDa bilden (Siezen et al., 1985). Posttranslationale Modifikationen der -Kristalline könnte bei der Bildung der Proteinkomplexe eine Rolle spielen. So konnte *in vivo* die Phosphorylierung des bovinen B1-Kristallins am Ser203 beobachtet werden (Kleiman et al., 1988). Bei allen basischen -Kristallinen liegt eine weitere wahrscheinliche Proteinkinase-C abhängige Phosphorylierungsstelle vor dem vierten „Griechischen Schlüssel“ (Zarbališ et al., 1996).

Die korrekte Faltung und Bildung großer Proteinkomplexe der -Kristalline ist vermutlich für die Transparenz der Augenlinse erforderlich. Eine Mutation im *Crybb2* Gen führt in der „Philly Maus“ zu einer progressiven Kataraktbildung. Diese dominante Katarakt wird durch eine 12 bp Deletion verursacht, welche zum Verlust von 4 Aminosäuren und damit zu einer Destabilisierung des 4. „Griechischen Schlüssel“-Motivs führt (Chambers und Russell, 1991). Kürzlich konnte außerdem in der *Cryba1<sup>pol</sup>* Mausmutante eine Mutation im *Cryba1* Gen identifiziert werden. Eine Punktmutation der „Splice-Akzeptor“-Stelle im Exon 6 des -Kristallin-Gens führt zur Ausbildung einer starken, progressiven Katarakt (Graw et al., 1999c). Mutationen in -Kristallin Genen konnten auch bei drei humanen Katarakten nachgewiesen werden. Eine G A Transition im *CRYBB2* Gen führt zu einem vorzeitigen Stop-Codon, wodurch ein verkürztes B2-Kristallin (51 Aminosäuren) synthetisiert wird, das für die Ausbildung der Katarakt verantwortlich gemacht wird (Litt et al., 1997). Eine weitere Mutation konnte im *CRYBB2* Gen nachgewiesen werden. Der Austausch C T hat ein Stop-Codon im Exon 6 zur Folge (Gill et al., 2000). In der dritten humanen Katarakt fehlen die Exons 3 und 4 in der mRNA des *CRYBA1* Gens (Kannabiran et al., 1998).

#### 1.2.4 S-Kristalline

Das S-Kristallin steht in der Evolution zwischen den - und -Kristallinen und kann als evolutionäres Bindeglied zwischen beiden Familien verstanden werden. Das S-Kristallin wurde früher als S-Kristallin zu den -Kristallinen gezählt. Anhand von Untersuchungen der Exon-/Intronstruktur des bovinen *Crygs* wurde es den -Kristallinen zugeordnet. Allerdings

ist das *Crygs* nicht Bestandteil des  $\gamma$ -Kristallin Genclusters, da es beim Menschen auf Chromosom 3 (van Rens et al., 1989) und bei der Maus auf Chromosom 16 liegt (Sinha et al., 1998). Die Expression des *Crygs* Gens ist bis zwei Tage nach der Geburt bei der Maus auf die Linse beschränkt, ist aber später auch zunehmend in der Retina nachweisbar. Vermutlich dient die retinale Expression einer Schutzfunktion gegen Lichtbestrahlung und Streß in der Netzhaut (Sinha et al., 1998). Das  $\gamma$ -S-Kristallin weist, wie die  $\alpha$ -Kristalline, eine intramolekulare Domänenpaarung auf und liegt als Monomer vor (Zarina et al., 1994). Eine wichtige Funktion des  $\gamma$ -S-Kristallins für die Löslichkeit der Kristalline konnte *in vitro* gezeigt werden. *Crygs* verlangsamt den Prozeß der Aggregation boviner  $\alpha$ -Kristalline und unterdrückt deren temperaturabhängige Phasenseparation (Liu et al., 1998). Dieses deutet auf eine wichtige Rolle des *Crygs* für die Aufrechterhaltung der Transparenz der Augenlinse hin. Dieses könnte *in vivo* durch die Auswirkungen einer Mutation im *Crygs* Gen überprüft werden. Die Maus Mutante *Opj* zeichnet sich durch die Ausbildung einer Katarakt aus und liegt in der chromosomalen Region des *Crygs* Gens (Everett et al., 1994; Kerscher et al., 1996). Das *Crygs* war daher ein guter Kandidat für die *Opj*-Mutation. Es konnte in der *Opj* Maus eine Mutation in der N-terminalen Domäne des  $\gamma$ -S-Kristallins identifiziert werden. Daher wird wahrscheinlich der *Opj* Katarakt durch ein verändertes  $\gamma$ -S-Kristallin Protein hervorgerufen (Wistow et al., 1998).

### 1.2.5 $\gamma$ -Kristalline

Die  $\gamma$ -Kristalline werden von 6 Genen (*Cryga* – *Crygf*) codiert, die bei der Ratte in einem Gencluster von 51 kb (den Dunnen et al., 1989), bei der Maus in einem von mehr als 80 kb Größe liegen (Quinlan et al., 1987). Das Gencluster wurde bei der Maus auf Chromosom 1 (30 cM) (Skow et al., 1988) und beim Menschen auf das Chromosom 2 (33-35q) kartiert (den Dunnen et al., 1985) (Abb. 1.4). Alle 6 Gene sind für Mensch und Maus beschrieben und weisen die gleiche genomische Organisation auf (Goring et al., 1992; Graw et al., 1991; Graw et al., 1993b). Ein typisches *Cryg* Gen besteht aus drei Exons; das erste Exon enthält 9 bp dem ein Intron mit einer Größe von 80-100 bp folgt. Das zweite Exon besteht aus 242 bp und wird durch ein Intron, dessen Größe zwischen 1 kb und 2 kb liegt, vom dritten Exon mit einer Größe von 273-276 bp getrennt (Abb. 1.3) (Graw et al., 1991; Graw et al., 1993b). Die Gene besitzen eine sehr hohe Ähnlichkeit in ihren kodierenden Nukleotidsequenzen. Die größten Divergenzen zwischen den paralogenen Genen (homologe Gene einer Spezies) sind im dritten Exon zu finden (Anhang Abb. A1) (Graw et al., 1993b). Das *Cryge* und das *Crygf* sind in der

codierenden Sequenz nahezu identisch und können durch RT-PCR nicht unterschieden werden. Die orthologen *Cryg* Gene, d.h. die homologen Gene verschiedener Spezies, sind ebenfalls stark konserviert. So besteht für das zweite und dritte Exon des *Crygc* und *Crygd* Gens zwischen Maus und Ratte eine Nukleotidsequenzidentität von 94,4 % bis 95,8%, bzw. zwischen Maus und Mensch eine von 83,3 % bis 83,7 % (Graw et al., 1993b). In der Aminosäuresequenz sind alle bekannten  $\gamma$ -Kristalline aus Säugetieren untereinander zu 35 % identisch. Innerhalb einer Art haben die  $\gamma$ -Kristalline zwischen 57 % bis 66 % Identität (Tab. A1). Der bemerkenswerteste Unterschied zwischen den orthologen Genen besteht in der Tatsache, daß beim Menschen nur vier der sechs  $\gamma$ -Kristalline aktiv sind. Das *CRYGE* und das *CRYGF* Gen werden nicht exprimiert, da sie keine oder mutierte Promotorelemente sowie vorzeitige Stop-Codons besitzen. Sie werden daher als Pseudogene angesehen (Meakin et al., 1987).

Die Expression von *Cryga* *Crygf* findet hauptsächlich in der Augenlinse statt. Die früheste Expression in der Maus konnte für *Cryga*, *Cryge* und *Crygf* im Embryonalstadium E12.5 mit Hilfe der RT-PCR gezeigt werden (Goring et al., 1992); mit *in situ* Hybridisierung wurden die ersten  $\gamma$ -Kristallin-Transkripte an E13.5 nachgewiesen (Santhiya et al., 1995). Mit Northern-Blots wurde die Expression von *Cryga*, *Crygd* und *Crygef* der Maus an E16.5 nachgewiesen (Goring et al., 1992). Die Expression der  $\gamma$ -Kristalline während der Embryogenese der Maus ist noch nicht detailliert untersucht worden, jedoch stehen genauere Daten zur Expression der einzelnen  $\gamma$ -Kristalline für die postnatale Entwicklung zur Verfügung. So erreicht die  $\gamma$ -Kristallinexpression in den ersten Wochen nach der Geburt ihr Maximum und nimmt dann ab. Besonders *Crygb* und *Crygc* sind postnatal exprimiert (Goring et al., 1992). Kürzlich konnte neben der Expression in der Augenlinse eine postnatale Expression der  $\gamma$ -Kristalline in der Retina beobachtet werden (Jones et al., 1999). Dabei wurden die Transkripte aller *Cryg* Gene sowie die entsprechenden Proteine zwischen der zweiten und der dritten Woche nach der Geburt nachgewiesen. Wie bei der Expression des *Crygs* Gens wird auch für übrigen  $\gamma$ -Kristalline eine anti-Streß Funktion in der Retina ab der Öffnung der Augenlider (P13-14) angenommen.

Die *Cryg* Gene kodieren für 175-176 Aminosäuren. Die Aminosäureabfolge zwischen den  $\gamma$ -Kristallinen ist stark konserviert. So besitzen die  $\gamma$ -Kristalline der Maus 62 % Sequenzidentität und das *Cryge* und das *Crygf* Gen sind auf Aminosäureebene sogar identisch (Graw et al., 1993b) (Anhang Abb. A1). Das Exon 1 kodiert für drei Aminosäuren und die Exons 2 und 3 für die beiden Domänen des Proteins. Ein  $\gamma$ -Kristallinmonomer (20 kDa), mit einem isoelektrischen Punkt von pH 7,0 - 8,6, bildet die typische Struktur der  $\gamma$ -Superfamilie aus.

Die Sekundärstruktur beinhaltet 16 antiparallele  $\beta$ -Faltblätter ( $\alpha 1-4$   $\beta 1-4$ ), die sich in der Tertiärstruktur zu 4 „Griechischen Schlüssel“ Motiven anordnen, die wiederum in 2 Domänen organisiert (Abb. 1.3) sind. Die Struktur der  $\beta$ -Kristalline ist seit längerem bekannt. Es liegen Röntgenstrukturanalysen für das bovine  $\beta$ -Kristallin (Blundell et al., 1981) (Wistow et al., 1983) (MMDB Id: 3168) und das bovine  $\beta$ -D-Kristallin (Sergeev et al., 1988) (MMDB Id: 4703) vor. Eine der Röntgenstrukturanalysen für das bovine  $\beta$ -F-Kristallin zeigt eine abweichende Struktur, mit jeweils nur drei  $\beta$ -Faltblättern im 2. sowie im 4. „Griechischen Schlüssel“ Motiv (Norledge et al., 1997) (MMDB Id: 8049).

Aufgrund der sehr konservierten Struktur sowie ihrer augenspezifischen Expression sind die  $\beta$ -Kristalline gute Kandidaten für Erkrankungen der Augenlinse.

**Abbildung 1.3 (Nächste Seite)** Schematische Darstellung der DNA- und Proteinorganisation eines  $\beta$ -Kristallins.

**A** Genomische Struktur der  $\beta$ -Kristalline, die drei Exons beinhaltet.

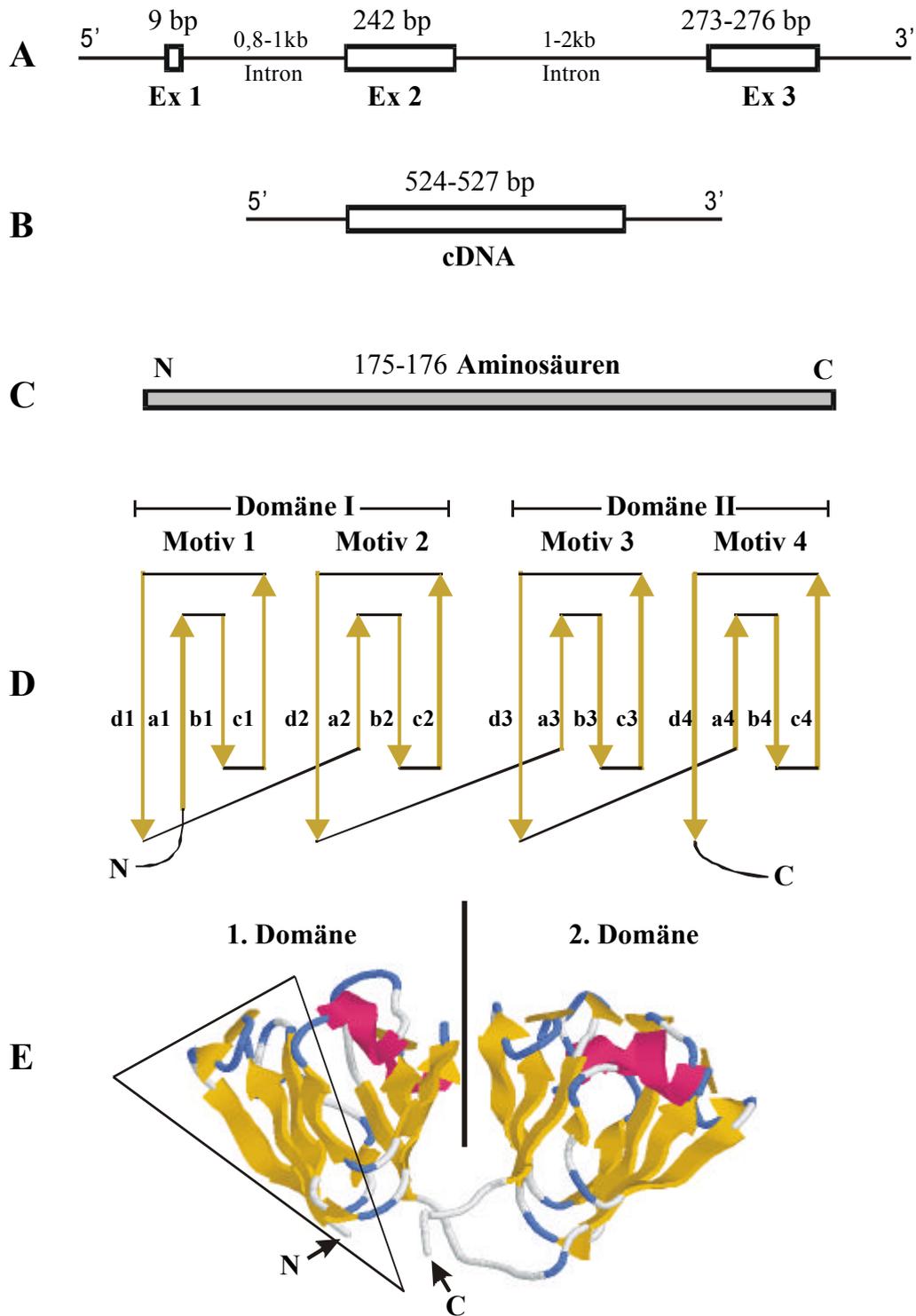
**B** cDNA der  $\beta$ -Kristalline mit einer Länge von 524-527 bp.

**C** Aminosäurekette der  $\beta$ -Kristalline aus 175-176 Aminosäuren.

**D** Schema der Proteinfaltungen eines  $\beta$ -Kristallins. Organisation in 2 Domänen, die je aus 2 „Griechischen Schlüssel“ Motiven gebildet werden, welche aus jeweils vier antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern ( $\alpha 1-4$   $\beta 1-4$ ) bestehen (als gelbe Pfeile dargestellt).

**E** Struktur eines monomeren  $\beta$ -Kristallins nach Swiss-Modell (<http://www.expasy.ch>) mit RasMol 2.6 dargestellt (2.11). Das erste „Griechische Schlüssel“ Motiv ist eingerahmt und die Einteilung der Proteindomänen ist eingezeichnet.

Gelb =  $\beta$ -Faltblatt, Rot =  $\alpha$ -Helix, Blau = Loop



### 1.3 Cryg Mutationen und Katarakte

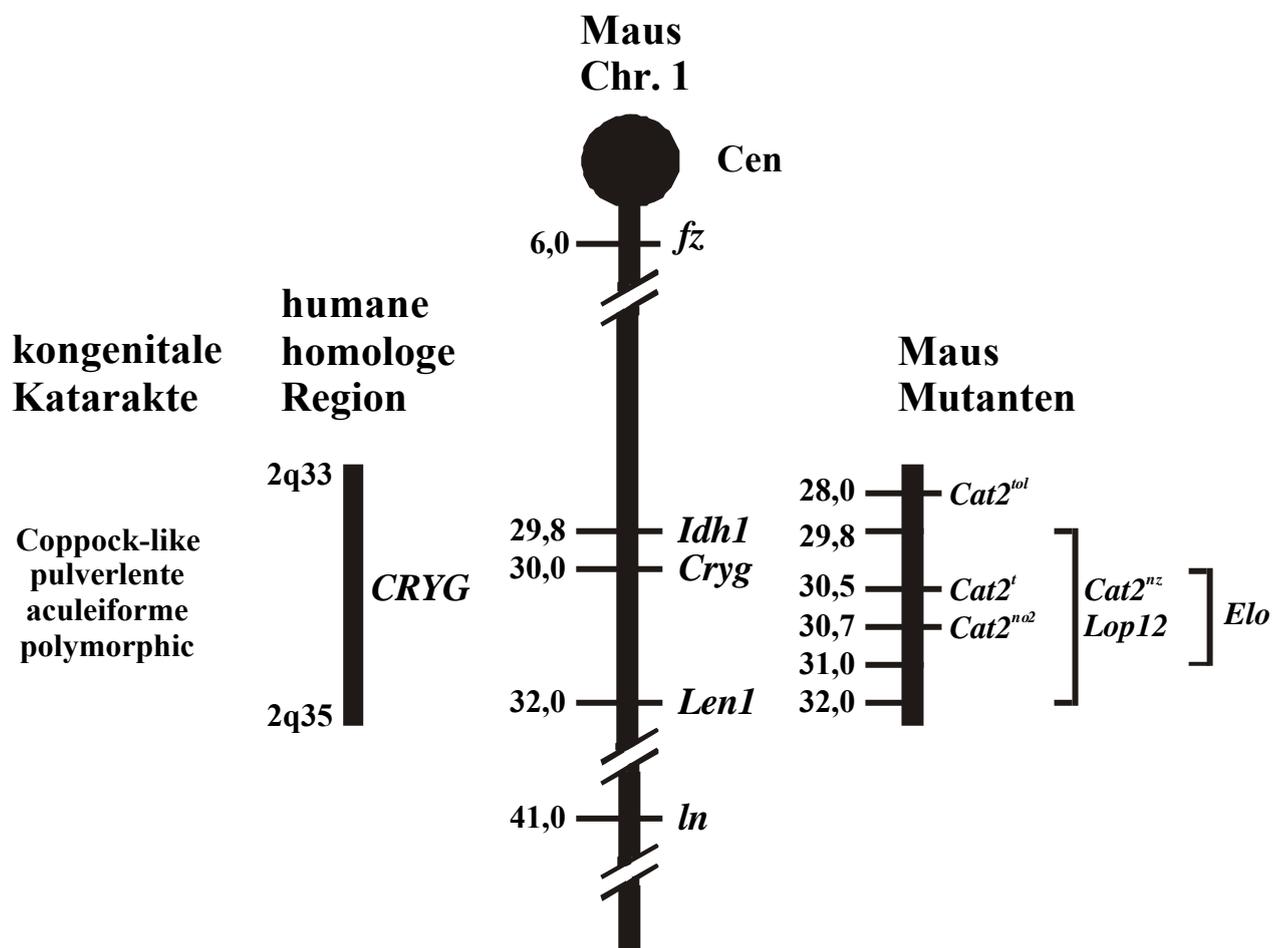
Das Krankheitsbild Katarakt (Trübung der Augenlinse bzw. „Grauer Star“) ist sehr heterogen und hat verschiedene Ursachen. Es kann zwischen erblichen und erworbenen Katarakten unterschieden werden. Für die Entwicklung von erworbenen Linsentrübungen gibt es eine Reihe von Riskofaktoren. So spielen Umweltfaktoren, wie UVB-Strahlung (Forker et al., 1997, Taylor, 1989), Ernährungsgewohnheiten, Traumata (Hodge et al., 1995), Alkohol und Nikotin (Moss et al., 1998), Diabetes (Swamy-Mruthinti et al., 1999), sowie die Nebenwirkungen der Einnahme von steroidhaltigen Medikamenten (Barenholtz, 1996) eine wichtige Rolle.

Angeborene bzw. erbliche Katarakte sind die Folge von Mutationen in Linsenproteinen oder Wachstumsfaktoren, die an der Augenentwicklung beteiligt sind. Es konnten verschiedene Genorte mit der Entstehung von erblichen Katarakten in Verbindung gebracht werden (Francis et al., 1999) (OMIM <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>). Für einige Gene, z.B die  $\alpha$ -Kristalline (1.2.3), war es möglich Mutation nachzuweisen, die die Bildung von Katarakten zur Folge haben.

Auch Mutationen in den  $\beta$ -Kristallinen sind ursächlich für die Kataraktentwicklung beim Menschen. Es konnten für drei Familien Mutationen in den Genen *CRYGC* und *CRYGD* identifiziert werden, die für das klinische Erscheinungsbild Katarakt verantwortlich sind (Stephan et al., 1999; Héon et al., 1999). Die hereditäre humane Coppock-ähnliche Katarakt (CCL) wurde in die Nähe des  $\beta$ -Kristallin Genclusters kartiert (2q33-35) (Lubsen et al., 1987). In der betroffenen Kataraktfamilie konnte ein Sequenzunterschied im Promotor des *CRYGE* Pseudogens identifiziert werden, der zur Aktivierung des Gens führt. Durch ein vorzeitiges Stop-Signal im Leserahmen führt die Expression der Pseudogens, zur Synthese eines verkürzten  $\beta$ -Kristallinproteins mit der Molekularmasse von 6 kDa (Brakenhoff et al., 1994). In einer neueren Untersuchung wurde allerdings nachgewiesen, daß die Mutation im Promotor des Pseudogens nicht mit der Kataraktenstehung assoziiert ist. Wahrscheinlich ist jedoch eine A  $\rightarrow$  C Transversion im zweiten Exon des *CRYGC* Gens, die zum Austausch eines Threonins gegen ein Prolin (T5P) an einer hochkonservierten Stelle des Proteins führt, die Ursache der Linsentrübung (Héon et al., 1999). Für zwei weitere humane Katarakte konnten Mutationen im *CRYGD* Gen verantwortlich gemacht werden, einem Gen, das beim Menschen stark exprimiert ist (Brakenhoff et al., 1990). Eine Punktmutation im zweiten Exon des *CRYGD* Gens führt durch den Austausch eines Arginins gegen ein Cystein (R14C) zu einer progressiven juvenilen pulverulenten (stachelförmigen) Katarakt (Stephan et al., 1999). Dieser

Austausch beeinträchtigt nicht die Proteinstabilität, sondern verändert die Thiol-abhängige Aggregation des mutierten  $\gamma$ -Kristallins, was mit der Kataraktentstehung in Verbindung gebracht wird (Pande et al., 2000). Die zweite humane Katarakt im *CRYGD* Gen ist eine aculeiforme (staubartige) Katarakt. Nach Kartierung auf Chromosom 2q33-35 (Héon et al., 1998) konnte eine Transition (G → A) im Exon 2 des *CRYGD* Gens identifiziert werden, die einen Austausch eines Arginins gegen ein Histidin (R58H) an einer konservierten Stelle des  $\gamma$ -Kristallins bewirkt (Héon et al., 1999).

Für eine weitere Familie mit autosomaler, dominanter, polymorpher, kongenitaler Katarakt (PCC) konnte die Mutation auf Chromosom 2q33-35 kartiert werden (Rogaev et al., 1996); die dem Krankheitsbild zugrunde liegende Mutation ist noch nicht identifiziert.



**Abbildung 1.4** Integrierte partielle genetische Karte des Mausechromosoms 1 und der homologen Region des Menschen.

Auf der linken Seite der schematischen Chromosomkarte sind die Abstände in cM vom Centromer angegeben: *fz* (*fuzzy*), *Idh1* (*isocitrat dehydrogenase*), *Cryg* (*g-crystallin*), *Len1* (*eye lens protein-1*), *ln* (*leaden*). Die Karte wurde aus verschiedenen Arbeiten, in denen  $\gamma$ -Kristallin Mutationen kartiert wurden zusammen gesetzt (Everett et al., 1994; Löster et al., 1994; Cartier et al., 1992; Smith et al., 2000; Stephan et al., 1999; Héon et al., 1999).

Aufgrund der zu geringen Anzahl der Familienmitglieder von Patienten ist es oft schwierig detaillierte genetische Untersuchungen, wie z.B. die Kartierung einer Katarakt durchzuführen. Daneben sind umfassende Analysen wegen schlechter Zugänglichkeit des Untersuchungsmaterials aus humanen Augenlinsen nicht möglich. Daher sind nur unzureichend Einblicke in die Mechanismen zu erreichen, die zur Entstehung und Entwicklung von Katarakten führen. Zum Erreichen eines besseren Verständnisses der Genetik und Pathologie der Kataraktentstehung wird daher die Maus als Modellsystem eingesetzt (Graw, 1999b). Sie ist von den Säugetieren das genetisch ausführlichste charakterisierte Modelltier und viele pathologische Veränderungen sind gut mit denen im Menschen vergleichbar. Daher wurde vor 20 Jahren am Institut für Säugetiergenetik der GSF ein systematischer Ansatz zur Erkennung und Sammlung von Kataraktmutanten der Maus nach Mutagenese etabliert (Kratochvilova und Ehling, 1979): Die Induktion von Mutationen durch die paternale Behandlung von Keimzellen mit Röntgen-,  $\gamma$ -Strahlung oder Ethylnitrosoharnstoff (ENU) (Ehling et al., 1982; Favor, 1999; Hrabe und Balling, 1998) mit anschließender Identifizierung von dominanten Kataraktmutanten durch die Untersuchung mit der Spaltlampe. Insgesamt konnte so die Neuherberger Kataraktmutanten Sammlung hergestellt werden, die heute ca. 203 unabhängige dominante Mutantenlinien mit unterschiedlichen Phänotypen beinhaltet. Innerhalb dieser Sammlung stellt die Gruppe der als *Cat2* bezeichneten allelischen Kataraktmauslinien die anzahlmäßig größte dar (Favor und Neuhäuser-Klaus, 2000). Fünf unabhängige und phänotypisch unterschiedliche Mutantenlinien wurden von (Kratochvilova und Favor, 1992) der allelischen *Cat2* Gruppe zugeordnet, zwei weitere von (Everett et al., 1994) und in einer neueren Arbeit 15 zusätzliche ENU induzierte Kataraktlinien (Favor und Neuhäuser-Klaus, 2000), so daß insgesamt 22 *Cat2* Mutantenlinien in der Neuherberger Kataraktsammlung existieren (Anhang Tab A3).

Die *Cat2* Mutanten zeigen eine unterschiedliche Ausprägung des Katarakt-Phänotyps, von einer zentralen Trübung bishin zur vollständigen Degeneration der Augenlinsen. Alle *Cat2* Phänotypen sind mit Mikrophthalmie assoziiert.

Die *Cat2* Mutanten haben einen autosomal dominanten Erbgang und wurden auf das Chromosom 1 (32cM) zwischen die Genorte *fuzzy* und *leaden* in die Nähe des  $\alpha$ -Kristallin Genclusters kartiert (Everett et al., 1994). In einer Feinkartierung konnte eine Rekombinante zwischen der *Cat2<sup>f</sup>* Mutante und dem *Isocitrate Dehydrogenase-1* Gen, und eine Rekombinante zwischen *Cat2<sup>f</sup>* Mutante und dem *Cryge* Gen unter 338 Nachkommen in einer Dreipunkt Rückkreuzung gefunden werden. Daraus ergibt sich ein genetischer Abstand zwischen den Genorten von  $0,3 \pm 0,3$  cM (Löster et al., 1994). Aufgrund der engen Kopplung der *Cat2*

Mutanten mit dem *Cryg* Genklusters erschienen die *Cryg* Gene als gute Kandidaten für *Cat2* Mutationen. Ein weiterer Hinweis für die Kandidatenbeziehung ist die reduzierte Menge an *Cryg* Transkripten in den Mutanten Augenlinsen (Santhiya et al., 1995). In unserem Labor konnte bis zu Beginn dieser Arbeit eine Deletion im 3'-Bereich der *Cryge* Gens in der *Cat2<sup>ns</sup>* Mutante und eine Kombination einer Deletion mit einer Insertion in der mRNA des *Crygb* Gens der *Cat2<sup>nop</sup>* Mutante nachgewiesen werden (J. Graw, persönliche Mitteilung).

In der Literatur sind zwei Kataraktmutanten der Maus beschrieben, bei denen Mutationen in den *Cryg* Genen nachgewiesen wurden. In der *Elo* Maus (eye lens obsolescence) wurde eine Deletion eines Basenpaares in der Mitte des letzten Exons des *Cryge* Gens festgestellt. Dieses führt, durch die Verschiebung des Leserasters zur Bildung eines verkürzten  $\gamma$ -Kristallins, dem der vierte „Griechische Schlüssel“ fehlt (Cartier et al., 1992). In einer neueren Arbeit wurde über eine Mutation im *Crygd* Gen für die *Lop12* Maus (lens opacity) berichtet. Eine G A Transition im dritten Exon erzeugt im Leseraster ein vorzeitiges Stop-Codon, welches die Synthese eines auf 156 Aminosäuren verkürzten Proteins zur Folge hat (Smith et al., 2000).

Die *Cat2* Mutanten der Neuberger Kataraktsammlung stellen eine ideale Möglichkeit dar, einen besseren Einblick in die Pathogenese von Katarakten zu bekommen, die durch Mutation in den  $\gamma$ -Kristallinogenen hervorgerufen werden. Zugleich sind die *Cat2* Mutanten der Maus geeignete Modelle für diesen Typ der humanen Katarakt, da Mutationen in den paralogenen Genen vergleichbare Krankheitsbilder zur Folge haben.

**Tabelle 1.1** Überblick über die bisher bekannten  $\gamma$ -Kristallin Mutanten der Maus

| Mutante                   | Art der Mutation | Gen          | Mutation                                 | Referenz                                      |
|---------------------------|------------------|--------------|--|---|
| <i>Elo</i>                | spontan          | <i>Cryge</i> | 1 bp Deletion Exon 3                     | Cartier et al., 1992;<br>Yoshiki et al., 1991 |
| <i>Lop12</i>              | spontan          | <i>Crygd</i> | Basenpaaraustausch<br>Exon 3             | Smith et al., 2000                            |
| <i>Cat2<sup>nop</sup></i> | spontan          | <i>Crygb</i> | 11 bp Deletion 4 bp<br>Insertion Exon 3* | J. Graw, persönliche<br>Mitteilung            |
| <i>Cat2<sup>ns</sup></i>  | spontan          | <i>Cryge</i> | Deletion im 3' Bereich<br>des Exons 3    | J. Graw, persönliche<br>Mitteilung            |

\* Mutation in genomischer DNA nicht bestätigt.

#### 1.4 Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit sollte die Identifikation und die Charakterisierung von Mutationen in den  $\gamma$ -Kristallin Genen der Maus und in den orthologen Genen des Menschen sein. Dieses sollte zu einem besseren Verständnis der Rolle von mutierten  $\gamma$ -Kristallinen auf die Kataraktentstehung dienen.

Hierzu sollte ein systematischer, PCR basierter Ansatz zur genspezifischen Untersuchung der  $\gamma$ -Kristallin Gene entwickelt werden. Mit diesem Ansatz sollten verschiedene *Cat2* Mutanten der Neuherberger Kataraktsammlung sowie eine Familie mit einer dominanten kongenitalen Katarakt auf molekularer Ebene untersucht werden.

Die bekannten Mutationen der Mutanten *Cat2<sup>nop</sup>* und *Cat2<sup>ns</sup>* sollten auf Gen-Ebene abgesichert und weiterführend analysiert werden. Für weitere molekulare Analysen der  $\gamma$ -Kristallin Gene auf katarakterzeugende Mutationen standen die *Cat2<sup>nz</sup>*, die *Cat2<sup>t</sup>*, die *Cat2<sup>tol</sup>*, die *ENU-436* und die *ENU-418* Mutanten zur Verfügung. Ziel war es, die  $\gamma$ -Kristallinegene auf mögliche Sequenzveränderungen zu untersuchen und die Mutationen, die für die Kataraktentstehung ursächlich sind, zu identifizieren.

Nach Identifikation der Mutation sollten die Phänotypen histologisch wie morphologisch charakterisiert werden, soweit dieses für die einzelnen Mutanten noch nicht durchgeführt worden war.

Eine molekulare Analyse schließt die Charakterisierung von Genen, Transkripten und den daraus translatierten Proteinen ein. Deshalb sollten nach Auffinden von Mutationen in  $\gamma$ -Kristallinenen auch Vorhersagen über den Einfluß dieser Mutationen auf deren Proteinstruktur getroffen werden und falls möglich ein Nachweis der mutierten Proteine sowie deren biochemische Untersuchung erfolgen. Der Proteinnachweis sollte über spezifischer Antikörper geschehen, die für diesen Zweck hergestellt werden sollten.

Für eine bessere Phänotyp-/Genotyp-Korrelation von Katarakt-Mutanten ist eine genauere Untersuchung der embryonalen Expression der  $\gamma$ -Kristalline notwendig. Diese ist bisher nur unzureichend in der Literatur beschrieben. Daher sollten die  $\gamma$ -Kristallin-Transkripte über spezifische mRNA Amplifikationen in verschiedenen Embryonalstadien analysiert werden.

Anhand von Untersuchungen bei der Maus können Rückschlüsse auf menschliche Mutationen gezogen werden. Daher sollte eine Familie mit einer dominanten kongenitalen Katarakt speziell auf Mutationen in den humanen *CRYG* Genen überprüft werden. Falls eine Mutation identifiziert würde, wäre die Verbreitung in der mitteleuropäischen Population zu untersuchen, um die Mutation gegenüber normalen humanen Polymorphismen abzusichern.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Chemikalien und sonstige Reagenzien

Alle Chemikalien, die hier nicht aufgeführt sind, wurden bei der Firma Merck, Darmstadt in Reinstform bestellt.

|   |   |
|---|---|
| Agarose   | Biozym, Hess. Oldendorf oder<br>GIBCO BRL, Eggenstein |
| Ampicillin  | Sigma, Deisenhofen                                    |
| Bacto-Tryptone  | Difco Laboratories, Detroit, USA                      |
| BSA (Rinderserum-Albumin)                               | GIBCO BRL, Eggenstein                                 |
| Coomassie Brilliant Blue G250                           | Serva, Heidelberg                                     |
| DNA aus Heringsspermien                                 | GIBCO BRL, Eggenstein                                 |
| DTT (Dithiothreitol)                                    | Sigma, Deisenhofen                                    |
| dNTP-Sets   | Pharmacia, Freiburg oder<br>Roth, Karlsruhe           |
| Ethidiumbromid (20 mg/ml)                               | Peqlab Biotechnologie, Erlangen                       |
| Glycogen  | Roche, Mannheim                                       |
| Immuno-Bed JB-4 plus                                    | Polyscience, Warrington, USA                          |
| Kanamycin   | Sigma, Deisenhofen                                    |
| Megaprime™ DNA Labeling Kit                             | Amersham Buchler, Heidelberg                          |
| Microspin™ S-300 HR Columns                             | Pharmacia, Freiburg                                   |
| Nucleobond AX (zur Plasmidisolierung)                   | Macherey-Nagel, Düren                                 |
| NucleoSpin Kit  | Macherey-Nagel, Düren                                 |
| PCR-TOPO Cloning Kit                                    | Invitrogen, NV Leek, Niederlande                      |
| Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol                        | Biomol, Hamburg                                       |
| Ponceau S   | Sigma, Deisenhofen                                    |
| Protein Assay Kit DC                                    | Bio-Rad, München                                      |
| Qiagen Lambda Midi Kit                                  | Qiagen, Hilden  |
| Qiagen Plasmid Midi/Maxi Kit                            | Qiagen, Hilden  |
| Radiochemikalien  | Amersham Buchler, Heidelberg                          |
| T-Primer First-Strand Kit                               | Pharmacia, Freiburg                                   |
| X-Gal (5-Brom-4Chlor-3-Indolyl-<br>-D-Galactopyranosid) | Peqlab Biotechnologie, Erlangen                       |

**2.2 Enzyme und Antikörper**

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| Restriktionsendonukleasen              | MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| T4-DNA-Ligase                          | Roche, Mannheim             |
| Taq-DNA-Polymerase                     | GIBCO BRL, Eggenstein       |
| Alkalische Phosphatase (AP)            | Roche, Mannheim             |
| RNaseA                                 | Sigma, Deisenhofen          |
| Protease E                             | Roth, Karlsruhe             |
| Proteinase K                           | Roche, Mannheim             |
| Ziege-anti-Kaninchen IgG, AP-gekoppelt | Roche, Mannheim             |

**2.3 Geräte**

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| Agarose-Gelelektrophorese-Apparatur   | GIBCO BRL, Eggenstein                          |
| Bakterien-Brutschrank                 | WT-Binder, Bottmingen, Schweiz                 |
| Bakterienschüttler                    | Infors, München                                |
| Binokulare:                           | Leica, Nussloch                                |
| MZ Apo für die Dokumentation          |  |
| Wild M8 für die Präparation           |  |
| Einweg-Mikro-Homogenisatorstempel     | W. Ebel Laboratoriumseinrichtungen,<br>Hamburg |
| Farbvideokamera HC2000                | Fuji Photo Film, Düsseldorf                    |
| Farbvideokamera Prog/Res/3008         | Jenoptik, Jena                                 |
| Farbvideokamera IMAC CCD 330          | Compulog Computer Systems,<br>Böblingen        |
| Geltrockner, Modell 583               | Bio-Rad, München                               |
| GeneAmp PCR-Systems 9600              | Perkin Elmer, Langen                           |
| Heitzblock Thermostat 5320            | Eppendorf, Hamburg                             |
| Mikroskope Axioplan und Axiophot      | Zeiss, Jena                                    |
| Mikrotom OmU3                         | C.Reichert, Österreich                         |
| Microplate Reader 3550-UV             | Bio-Rad, München                               |
| PAA-Gelelektrophorese-Apparatur       | Bio-Rad, München                               |
| Pulsfeld-Gelelektrophorese CHEF DRIII | Bio-Rad, München                               |
| Schwanenhalskaltlichtquelle KL 1500   | Leica, Nussloch                                |
| Stratalinker                          | Stratagene, Amsterdam, Niederlande             |

|  |                     |
|--|---------------------|
| Starblot II-S                          | Fröbe, Lindau       |
| Szintillationszähler Easicount 4000    | Scotlab, UK         |
| Tintenstrahldruckern Stylus Color 1520 | Epson, Düsseldorf   |
| Touch-Down-Thermocycler                | Hybaid, Heidelberg  |
| Zentrifugen:                           |                     |
| Kühltischzentrifuge Universlal 16R     | Hettich, Tuttlingen |
| Kühlzentrifuge RC-5B                   | Sorval, Bad Homburg |
| Tischzentrifuge Biofuge 13             | Heraeus, Hanau      |

## 2.4 Puffer und Lösungen

Eine Aufstellung mit der Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen befindet sich im Anhang (A.1).

## 2.5 Größenstandards

### *Proteinmarker*

Flukamarker #69813 (vorgefärbt): Macroglobulin 180 kDa, -Galactosidase 116 kDa, Fructose-6-phosphat-Kinase 84 kDa, Fumarase 48,5 kDa, Lactat-Dehydrogenase 36,5 kDa, Isomerase 26,6 kDa

Flukamarker ,69810: Albumin (Rinderserum) 67 kDa, Albumin (Hühnereiweiß) 45 kDa, Glyceraldehyd-3-Dehydrogenase 36 kDa, Carbohydrase 29 kDa, Trypsinogen 24 kDa, Trypsin-Inhibitor 20 kDa, -Lactalbumin 14 kDa

### *DNA-Standards*

Marker VIII / pUC Mix (MBI Fermentas): 1116 bp, 883 bp, 692 bp, 501 bp, 404 bp, 331 bp, 242 bp, 190 bp, 147 bp, 110 bp

Marker VIIIa pUC Mix (MBI Fermentas): 501 bp, 404 bp, 331 bp, 242 bp, 190 bp, 147 bp, 110 bp

Marker III / -DNA (MBI Fermentas): 21 kb, 4,9 kb, 4,2 kb, 3,5 kb, 2,0 kb, 1,9 kb, 1,5 kb, 1,3 kb, 0,8 kb

-PFGE Marker (NEB): 388 kb, 340 kb, 291 kb, 242 kb, 194 kb, 145,5 kb, 97 kb, 48,5 kb

## 2.6 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für PCR-Reaktionen (3.2.7) wurden in der AG BioDV am Institut für Säugetiergenetik der GSF von Herrn Utz Linzner hergestellt oder bei MWG-Biotech GmbH (Ebersberg) bestellt.

Eine Tabelle der verwendeten Oligonukleotide befindet sich im Anhang (A.2).

## 2.7 Bakterienstämme

Die folgenden *Escherichia coli*-Stämme wurden zur Vermehrung von Plasmid- und Phagen-DNA verwendet. Es wurde ausschließlich mit *E. coli* K12-Abkömmlingen gearbeitet.

|                     |   |
|---------------------|---|
| DH5                 | <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_k^- m_k^+$ ), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> ,<br>( <i>lacZYA-<math>\lambda</math>arbFV169</i> ), 80 <i>lacZ</i> M15  |
| DH10B               | F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> , ( <i>mrr-hsdRMS-mcrCB</i> ), 80 <i>lacZ</i> M15, <i>lacX74</i> ,<br><i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , $rpsL^-$ , <i>nupG</i>   |
| Top10F <sup>c</sup> | F <sup>c</sup> ( <i>lacI<sup>q</sup></i> , <i>Tn10</i> ( <i>tet<sup>r</sup></i> ), <i>mcrA</i> , ( <i>mrr-hsdRMS-mcrCB</i> ), 80 <i>lacZ</i> M15, <i>lacX74</i> ,<br><i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , ( <i>ara-leu</i> )7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> ; (Invitrogen) |
| C600 <i>hfl</i>     | <i>hflA</i> 150[chr.:TN10( <i>tet<sup>r</sup></i> )], <i>lacY1</i> , <i>leuB6</i> , <i>mcrA<sup>-</sup></i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>tonA21</i> ;<br>(Stratagene)   |

## 2.8 Mäuse

Alle verwendeten Mäuse stammen aus der Tierhaltung des GSF-Forschungszentrums.

Als Wildtyp-Kontroll-Mäuse wurden C3H/EL und (102/ELxC3H/EL)F1 Hybride verwendet. Die Mausmutanten (*Cryga*<sup>1Neu</sup>, *Cryga*<sup>tol</sup>, *Crygb*<sup>nop</sup>, *Cryge*<sup>t</sup>, *Cryge*<sup>ns</sup>, *Cryge*<sup>nz</sup> und *ENU-418*) befinden sich auf einem (102/ELxC3H/EL)F1 Hybrid Hintergrund. Diese Mauslinien werden in Bruder-Schwester Verpaarung gehalten.

Die *Crygb*<sup>nop</sup> sowie die *Cryge*<sup>ns</sup> Mutante traten spontan in (102/ELxC3H/EL)F0 Mäusen auf (Graw et al., 1984). Die *Cryge*<sup>t</sup> Mutante wurde in (102/ELxC3H/EL)F0 Mäusen nach paternalen Behandlung mit Röntgenstrahlung gefunden (Graw et al., 1986). Die *Cryga*<sup>1Neu</sup>, *Cryga*<sup>tol</sup> und *ENU-418* Mutationen wurden in Nachkommen ENU behandelte Mausmännchen festgestellt (Ehling et al., 1982) (Favor und Neuhäuser-Klaus, 2000). Die *Cryge*<sup>nz</sup> trat in (102/ELxC3H/EL)F0 Mäusen nach parental Behandlung mit  $\gamma$ -Strahlung auf (Kratochvilova und Ehling, 1979).

## 2.9 Verwendete Nukleinsäuren

### 2.9.1 Vektoren

**Tabelle 2.1** Verwendete DNA Vektoren

| Name                         | Größe<br>(Kb) | Verwendungszweck                              | Quelle  |
|------------------------------|---------------|---|---|
| pCR <sup>TM</sup> 2.1        | 3,9           | Klonierung von PCR-Produkten                  | Stratagene Europa<br>(Amsteram, Niederlande)  |
| pCR <sup>TM</sup> 2.1 TOPO   | 3,9           | Klonierung von PCR-Produkten                  | Invitrogen Corporation<br>(San Diego, Ca USA) |
| pBluescript <sup>TM</sup> KS | 3,0           | Subklonierungen, Klonierung von PCR-Produkten | Invitrogen Corporation<br>(San Diego, Ca USA) |
| pBeloBAC11                   | 7,4           | BAC-Klonierungsvektor                         | Genome Systems, Inc.<br>(St. Louis, USA)      |

### 2.9.2 Humane DNA-Proben

Blut von acht Mitgliedern einer Familie mit einer dominanten autosomalen Katarakt über vier Generationen wurde von Dr. G. Rudolph und Dr. T. Meitinger (Abteilung für medizinische Genetik, Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München) für genetische Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

170 humane DNA-Proben einer zufällig ausgewählten mitteleuropäischen Population wurden als Kontrollen von Dr. M. Wjst und Dr. T. Immervoll (GSF Institut für Epidemiologie) überlassen.

15 humane DNA-Proben einer indischen Familie mit Katarakten (Familie C132) wurden von Prof. Gopinath (University of Madras, Indien) zur Verfügung gestellt.

## 2.10 Genomische DNA-Banken

### *I-Phagen-Bank*

Die *I*-Phagen-Bank mit genomischer Maus DNA wurde von Dr. A. Reaume (Cephalon Inc., West Chester, Pennsylvania, USA) zur Verfügung gestellt. Diese DNA-Bank wurde wie im folgenden dargestellt aus genomischer DNA des Mausstamms 129/SV hergestellt und im Substitutionsvektor *-DASH<sup>TM</sup>II* angelegt. Die genomische DNA wurde dafür partiell mit *SauIII*A verdaut (Reaume et al., 1995). Der partielle Verdau garantiert eine Streuung der

Fragmente bezüglich der Lage im Genom und erlaubt die Einstellung der Fragmentgröße. Die genomischen DNA-Fragmente wurden in die *BamHI* Schnittstelle des Vektors inkloniert. Die *BamHI* Schnittstelle wurde dabei allerdings nicht regeneriert. Die Inserts können mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *Sall* oder *XbaI* aus dem Vektor herausgeschnitten werden.

### *BAC-Bank*

Die genomische BAC-Bank (baterial-artificiel-chromosom) DOWN TO THE WELL™ wurde von der Firma Genome Systems, Inc. (St. Louis, Missouri, USA) bezogen. Die Bank ist für die Suche von relevanten BACs mittels PCR-Reaktion (3.2.7) geeignet. Genomische DNA des Mausstamms 129/SV wurde mit *HindIII* partiell verdaut und in den „single-copy“-Vektor pBeloBAC11 kloniert. Die durchschnittliche Insertgröße beträgt 120 Kb. In dieser BAC-Bank ist das Mausgenom dreifach repräsentiert. Als Wirtstamm für die Vektorkonstrukte dient der *E.coli* DH10B Stamm.

## 2.11 Computerprogramme

Die Bedingungen für die Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) (3.2.1) wurden mit dem Programm „Chef Mapper“ der Fa. Bio-Rad (München) ermittelt.

Sequenzdaten wurde mit Hilfe des Vector NTI 4.0 oder Vector NTI Suite 5.5 (InforMax, Oxford, UK) bearbeitet. Sequenzvergleiche wurden mit dem AlignX Programm der Vector NTI Suite 5.5 (InforMax, Oxford, UK) oder ClustalX Programm (NCBI, Bethesda, USA) (Aiyar, 2000) durchgeführt.

Computergestützte Vorhersagen der Sekundärstruktur wurden mit SwissProt Programmen (PROSIT, TMpred, TopPred2, GOR4 und ProtScale) (<http://www.expasy.ch>) ermittelt.

Proteinmodellierung wurde mit dem Programm Swiss-Model 2.0 (<http://www.expasy.ch>) durchgeführt. Aufgrund der Homologien wurde die 3 dimensionale Röntgenstrukturanalyse für das bovine B-Kristallin (Blundell et al., 1981; Wistow et al., 1983) (MMDB Id: 3168) verwendet. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm RasMol 2.6 (R. Sayle, Glaxo Research, Greenford, UK).

## 3 METHODEN

### 3.1 Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

#### 3.1.1 DNA-Isolierung aus Organen

Organe, aus denen DNA isoliert wird, werden möglichst schnell nach der Präparation bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und gelagert. Bei der standardmäßigen Isolierung werden 2-3 cm Schwanzspitze oder ca. 1/4 Milz der Maus verwendet. Diese Gewebeprobe wird mit einer Schere in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zerkleinert. Davon werden 500  $\mu\text{l}$  TENS mit 10  $\mu\text{l}$  Proteinase K (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) und 25  $\mu\text{l}$  Protease E (10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) Lösung zugegeben. Die Gewebeprobe wird in der Enzymlösung über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  schüttelnd inkubiert und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA aus dem Überstand wird nach einer Phenolextraktion (3.1.7) und anschließender Ethanol-fällung (3.1.8) gewonnen.

#### 3.1.2 DNA-Isolierung aus humanen Blutproben

Humane Blutproben standen durch die Augenklinik der LMU München (2.9.2) zur Verfügung, aus denen genomische DNA isoliert wurde. 1 ml wurde zur Sicherheit bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren archiviert. Aus 4 ml EDTA versetztes Blut wurde mit dem PUREGENE® DNA Isolation Kit (Gentra Systems) die DNA nach Herstellervorschrift isoliert.

#### 3.1.3 Plasmid-DNA Isolierung aus Bakterien

Bakterienkulturen wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht in Selektivmedium (LB + geeignetem Antibiotikum, z.B. Ampicillin, Kanamycin) herangezogen. Die DNA der spätlogarithmischen Bakterienkultur wurde über Anionenaustausch-Chromatographie Säulen der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben gereinigt. Bei kleineren Bakterienkulturen (bis 5 ml) wurde der NucleoSpin Kit, für größere Plasmidmengen aus 50 bzw. 100 ml Kulturen die AX100- bzw. AX500-Säulen verwendet. Die so gereinigten Plasmide wurden u.a. direkt zur Sequenzierung verwendet (3.2.10).

Zum Testen von Ligationen wurde eine große Anzahl von 2 ml Über Nachtkulturen angesetzt. Zur raschen Isolierung der Plasmid-DNA wurde eine Minipreparation mit TENS-Lösung verwendet. Die Bakterienkultur wurde 30 sec. bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das

Bakteriensediment wurde anschließend in 100 µl TE mit 100 µg/ml RNaseA resuspendiert. Zur alkalischen Lyse wurden 300 µl TENS-Lösung zugegeben und geschüttelt, bis die Suspension viskos ist. Nach Zugabe von 150 µl 3 M NaAcetat (pH 5,2), wurde die Suspension 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Mit der Überstand wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt (3.1.8). Nach Resuspension in 50 µl TE konnte mit der Plasmid-DNA eine Restriktionsanalyse oder ein PCR-Reaktion durchgeführt werden.

#### 3.1.4 DNA-Isolierung aus $\lambda$ -Phagen

Eine Bakterienkultur wächst in LB-Medium (10 mM MgSO<sub>4</sub>) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5. Dem Medium wurde keine Maltose zugesetzt, weil sich die  $\lambda$ -Phagen an die Maltose-Rezeptoren der Bakterien heften und sich dadurch die DNA-Ausbeute verringert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (Universile 16 R, Hettich, Rotor: 1617; 5000rpm, 10 min, 4°C) und das Sediment in ½ Volumen 10 mM MgSO<sub>4</sub> aufgenommen. 400 µl der Bakteriensuspension wurde mit  $1 \cdot 10^5$  bis  $2 \cdot 10^5$  pfu (plaque forming units) des isolierten Phagen-Klons (3.2.8) für 20 min bei 37°C infiziert, anschließend auf LB-Agaroseplatten (14 cm) ausplattiert und bei 37°C bis zur annähernden Konfluenz inkubiert. Sowohl die untere wie die obere Schicht der verwendeten LB-Platten werden mit Agarose hergestellt, die für Elektrophorese geeignet ist (Biozym oder GIBCO BRL).

Die Platten werden mit 12 ml SM überschichtet und für zwei bis vier Stunden bei 4°C leicht geschwenkt. Das Lysat einer Agarplatte wurde mit 1 µl/ml Chloroform versetzt, um überlebende Bakterien abzutöten. Die Bakterientrümmen werden bei 8000 rpm, 20 min (Sorvall, Typ: RC-5B, Rotor: SA-600) vom Phagenlysatüberstand abgetrennt. Die DNA-Präparation erfolgte mit dem Qiagen Lambda Midi Kit nach Angaben des Herstellers.

#### 3.1.5 Reinigung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente werden aus einem mit Ethidiumbromid gefärbten Gel unter UV-Licht-Bestrahlung ausgeschnitten. Die Reinigung der Fragmente erfolgt mit dem DNA Purification Kit Prep-A-Gene® (Bio-Rad) nach Herstellerangaben. Die DNA bindet an eine flüssige SiO<sub>2</sub>-Matrix (Glasmilch) und kann nach einem Waschschriff mit H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer eluiert werden. Es sollte darauf geachtet werden, daß die Glasmilch nach dem Waschen vollständig trocknet, um eine bessere Elution zu gewährleisten. Die so gereinigten DNA-Fragmente wurden als Martize zur Herstellung von markierten Sonden oder zu Klonierungen eingesetzt. Wurden die DNA-Fragment zur direkten Sequenzierung verwendet, wurde noch eine

Ethanol-fällung mit Glycogen Co-Präzipitation angeschlossen (3.1.8). Die so gereinigten DNA wurde in einem kleinen Volumen von 10 µl resuspendiert und sequenziert (3.2.10).

### 3.1.6 RNA-Isolierung aus Organen

Gewebe, aus denen RNA isoliert wird, werden nach der Entnahme auf Eis gekühlt und möglichst schnell bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Alle Arbeiten erfolgen auf Eis. Je 50 µg Gewebe oder 8 Augenlinsen (P21) werden in einem autoklavierten Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem Einweg-Mikro-Homogenisatorstempel (W. Ebel Laboratorumseinrichtungen, Hamburg) homogenisiert. Die RNA wird mit 500 µl RNAzol<sup>TM</sup>B (Biozol) isoliert. Hierzu wird 500µl Chloroform zugeben und nach intensivem Mischen für 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 13000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wird die obere wäßrigen Phase des Überstandes abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die RNA wird durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol gefällt und mit 70% Ethanol (mit DEPC-Wasser) gewaschen. Das Präzipitat wird unter Vakuum getrocknet und zur Lagerung mit 70% Ethanol überschichtet und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

### 3.1.7 Phenolextraktion

Diese Methode wird zur Reinigung der DNA aus Restriktionsansätzen und aufgeschlossenen Gewebeproben verwendet. Zur Probe wird 1 Vol. einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben und gut gemischt. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 15 min bei RT) ist ein Phasentrennung in organische und wässrige Phase eingetreten. Die obere (wässrige) Phase wird abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wird je nach gewünschter Reinheit der DNA 2-3 mal wiederholt. Aus der sauberen wässrigen Phase wird die DNA mit Ethanol gefällt (3.1.8).

### 3.1.8 Ethanol-fällung

Die DNA wird mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat-Lösung und 3 Vol. absoluten Ethanol versetzt. Bei geringen Mengen DNA z.B. für PCR-Fragmente, die aus Agarosegelen gereinigt wurden (3.1.5), werden 20µg Glycogen als co-präzipitierendes Agens zugegeben. Nach Zentrifugation (30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit 13000 rpm) wird das Präzipitat mit 3 Vol. 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das gereinigte DNA-Präzipitat in einem Vakuum-

konzentrator (Eppendorf) getrocknet. Die DNA wird in TE-Puffer (pH 8,6) oder in autoklaviertem H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 3.1.9 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA- und RNA-Isolaten wurden, wenn ausreichende Mengen zur Verfügung standen, durch die photometrische Messung der Absorption bei 260 nm (Pharmacia, LKB Ultrospec III) bestimmt. Die Messung von 1,0 bei einer OD<sub>260</sub> entspricht für DNA 50 µg/ml und für RNA 40 µg/ml.

Stand kein ausreichendes Probenmaterial zur Verfügung, erfolgte eine Konzentrationsabschätzung über Agarosegele und einer Ethidiumbromid-Färbung (3.2.1). Hierbei dienten Verdünnungsreihen von Proben bekannter Konzentration als Abschätzungshilfen.

## 3.2 Molekularbiologische Methoden an Nukleinsäuren

### 3.2.1 Gelelektrophoresen

#### *Agarose-Gelelektrophorese von DNA*

DNA-Fragmente wurden in 0,8 bis 4 % igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarose (Biozym) wurde in 0,5 x bzw. 1 x TBE- oder 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Die Puffer dienten auch als Laufpuffer. Die DNA wurde mit 6 x Probenpuffer versetzt und in einem elektrischen Feld (20-120 V) für eine Stunde bis über Nacht aufgetrennt. Die Wanderungsstrecke der negativ geladenen DNA ist direkt proportional zum Logarithmus ihrer Größe. Durch die gleichzeitige Auftrennung von bekannten Größenstandards (linearisierte dsDNA) ist die Bestimmung der Fragmentgröße möglich. Die Darstellung der DNA Banden erfolgt durch die Färbung der DNA im Agarosegel mit einer Ethidiumbromidlösung (1µg/ml).

#### *Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)*

Die Pulsfeld-Gelelektrophorese wird zum Auftrennen großer DNA-Moleküle verwendet. Diese Wechselfeld-Gelelektrophorese findet Anwendung zur Auftrennung von BAC- und YAC-DNA, da mit einer herkömmlichen Gelelektrophorese in einem gleichgerichteten elektrischen Feld nur DNA-Moleküle bis zu einer maximalen Größe 30 kb aufgetrennt werden können. Bei der PFGE wird die Orientierung des elektrischen Feldes relativ zum Gel in vorgegebenen Zeitintervallen (Puls) immer wieder gewechselt. Hierdurch werden die DNA-Moleküle neu ausgerichtet, wodurch sich die Konformation ändert. Dies ermöglicht erst

die Migration sehr großer DNA-Moleküle in der Gelmatrix (Schwartz und Cantor, 1984). Für die PFGE wurde der CHEF DRIII der Firma Bio-Rad verwendet. Es wurde eine 1% SeaKem® Agarose (FMC BioProducts) mit 0,5 x TBE Gel eingesetzt und bei 14°C mit 2 l 0,5 x TBE durchgeführt. Mit dem Programm Chefmapper 1.1. (Bio-Rad) konnten folgende Laufbedingungen für BACs ermittelt werden:

|                    |            |
|--------------------|------------|
| Laufzeit           | 7 h 55 min |
| Initial Swith Time | 1 sec      |
| Final Swith Time   | 30 sec     |
| Gradient           | 6 V/cm     |

Die Darstellung der DNA Banden erfolgt durch die Färbung der DNA im Agarose mit einer Ethidiumbromidlösung (1µg/ml).

#### *Geldokumentation*

Nach 15 min Inkubation der Agarosegel mit dem interkalierendem Farbstoff Ethidiumbromid wird die DNA mit UV-Licht sichtbar. Hierzu wird das gefärbte Agarosegel auf einen UV-Transluminator (Firma) bei 360 nm gelegt, mit einer CCD-Videokamera aufgenommen und mit einem Thermodrucker dokumentiert. Mit dieser Methode liegt die Detektionsgrenze für DNA-Banden bei etwa 5 ng.

#### **3.2.2 DNA-Silbernitratfärbung**

Die Silberfärbung von Acrylamidgelen wird zum Nachweis geringer Mengen DNA benutzt. Da bis zu einer Untergrenze von etwa 500 pg DNA detektiert werden kann, ist die Methode sehr sensitiv (Dockhorn-Dworniczak et al., 1991).

Das Acrylamidgel (Pharmacia) wird 10 min in 10% Essigsäure fixiert. Anschließend wird 3 mal 2 min mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Es folgt eine Inkubation mit 0,1% Silbernitrat (w/v) / 0,0037% Formaldehyd (v/v) Lösung. Das Gel wird kurz mit H<sub>2</sub>O gespült. Die Entwicklung des Gels erfolgt unter optischer Kontrolle in 2,5% Natriumcarbonat / 0,0037% Formaldehyd / 0,01% Natriumthiosulfatlösung. Die Färbereaktion wird mit 5mM EDTA Lösung abgestoppt. Das gefärbte Gel wird gegen Reißen beim Trocknen in 5% Glycerinlösung (v/v) inkubiert. Anschließend wird das Gel an der Luft getrocknet.

### 3.2.3 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionsenzyme (DNA-Endonukleasen) wurden mit dem vom Hersteller gelieferten 10 x Reaktionspuffern verwendet. Pro  $\mu\text{g}$  zu spaltender DNA wurden, je nach Reinheit der DNA und dem Enzymalter 1 bis 3 U der Enzyme eingesetzt. Der Restriktionsverdau von Plasmiden wurde nach 1-2 Stunden durch die Zugabe von DNA-Probenpuffer abgestoppt. Die Restriktion von  $\lambda$ -DNA, BAC-DNA oder genomischer DNA erfolgte über 4 Stunden oder länger und wurde ebenfalls durch Probenpuffer gestoppt. Die Analyse der Reaktionsprodukte erfolgte mittels Gelelektrophorese (3.2.1).

### 3.2.4 Klonierung

#### *Dephosphorylierung von Vektoren*

Zur Verringerung der Religation von Klonierungsvektoren, d.h. Erhöhung der Ligations-effizienz, wurden die freien 5'-Enden linearisierter Vektoren dephosphoryliert. Dazu wurde im Anschluß an einen Restriktionverdau mit 1 U der alkalischen Phosphatase aus arktischen Garnelen (*P. borealis*) unter optimalen Reaktionsbedingungen 10 min bei „sticky-end“ 60 min bei „blunt-end“ DNA-Fragmenten inkubiert. Die alkalische Phosphatase wird anschließend durch Erhitzen bei 65°C für 15 min inaktiviert. Alternativ wurde der Ansatz über Agarosegelelektrophorese (3.2.1) aufgetrennt. Die Vektorbande wurde dann aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt (3.1.5).

#### *Ligation*

Die DNA-Ligation beschreibt allgemein die Verknüpfung einer 3'-OH- mit einer benachbarten 5'-Phosphat-Gruppe durch die Synthese einer Phosphodiesterbindung. Diese Reaktion wird durch eine DNA-Ligase mit ATP als Energielieferant katalysiert. Die Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  mit 1 U T4-DNA-Ligase und dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer über Nacht in einem Wasserbad bei 14°C durchgeführt. Im allgemeinen wurden pro Ligation 25 bis 50 ng des Vektors eingesetzt. Das Insert wurde in einem molaren Verhältnis von entweder 1:1 oder 3:1 zum Vektor zugesetzt.

#### *Herstellung von „T-tail Vektoren“*

Zur ungerichteten Klonierung von PCR-Produkten wurden durch Restriktionsverdau linearisierte pBluescript KS Plasmide (Stratagene) mit 3' Thymidinüberhängen versehen. Dieses wird mittels der terminale Desoxynukleotid-Transferase-Aktivität die Taq-Polymerase durch-

geführt. Dazu wurden 10 µg pBluescript KS mit *EcoRV* in einem Volumen von 20 µl verdaut. Im nächsten Schritt wird zu dem linearisierten „blunt ended“ Vektor 40 µl 5 mM dTTP (Roth) und 5 U Taq-DNA-Polymerase in einem Volumen von 100 µl gegeben. Das Anhängen der Thymidinreste an die DNA-Enden erfolgt bei 70°C für 2 Stunden. Anschließend wird die DNA durch Phenolextraktion (3.1.7) und Ethanol-fällung (3.1.8) gereinigt (Marchuk et al., 1991). Der so hergestellte „T-tail Vektor“ wird in Portionen von 25 ng bei -20°C gelagert.

#### *Klonierung von PCR-Produkten (TA-Cloning)*

Durch Taq-Polymerase erzeugten PCR-Produkte besitzen 3'-überhängende Adeninreste, da die terminale Desoxynukleotid-Transferase-Aktivität dieser Polymerase bevorzugt dATP anhängt. Diese PCR-Fragmente können zur direkten Ligation in einen „T-tail Vektor“ genutzt werden. PCR-Produkte wurden entweder in selbst hergestellte „T-tail Vektoren“ oder in pCR<sup>®</sup> 2.1 bzw. pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO (Invitrogen) kloniert. Beim pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO wird die Ligation durch eine DNA TOPO-Isomerase katalysiert und kann, im Gegensatz zu einer herkömmlichen Ligation (siehe oben), bei RT in 5 min durchgeführt werden.

#### **3.2.5 cDNA Erststrang-Synthese**

Die isolierte Total-RNA (3.1.6) wird mit dem Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde das T-Primed First-Strand Kit (Pharmacia) verwendet. Zu einem lyophilisierten Gemisch aus Oligo-d(T)-Primer und Reverser Transkriptase wird 5 µg Gesamt-RNA gegeben. Die Synthese erfolgt bei 37°C für eine Stunde. Anschließend wird das Reaktionsgemisch auf 200µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und in Aliquotes bei -20°C oder -80°C aufbewahrt. Für eine PCR-Reaktion wurde üblicherweise 2 µl einer 1:10 cDNA Verdünnung eingesetzt.

#### **3.2.6 Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus (SSCP)**

Eines der Hauptprobleme der molekularen Diagnostik stellt der Nachweis unbekannter Punktmutationen da. Viele Methoden sind zeitintensiv (wie Sequenzierung) oder benötigen besondere Apparaturen (wie denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese, DGGE) (Fischer und Lerman, 1983). Ein guter Kompromiß ist die SSCP-Methode (Orita et al., 1989), da sie einfach und schnell zu handhaben und außerdem leicht auswertbar ist.

In der SSCP-Methode werden PCR-Produkte in der Größe 100-600 bp in einem formamidhaltigem Puffer hitzedenaturiert und anschließend auf einem nichtdenaturierenden

Acrylamidgel aufgetrennt. Während der Wanderung durch das Gel bildet jeder der beiden DNA-Einzelstränge entsprechend seiner Sequenz eine spezifische Sekundärstruktur aus. Nach einer Silbernitrat-Färbung (3.2.2) lassen sich die Banden des PCR-Produktes erkennen. Ist die Sequenz durch eine Mutation verändert, hat dieses eine veränderte Sekundärstruktur zur Folge, die eine zum Wildtyp unterschiedliche Laufeigenschaft bedingt. Auf dem Gel ist dies durch eine Verschiebung der Banden oder Auftreten neuer Banden erkennbar.

Von einem PCR-Produkt werden 5 µl mit 10 µl eines denaturierenden Formamid-Puffers gemischt und für 10 min bei 95°C inkubiert. Im direkten Anschluß wird die Probe für 5 min auf Eis verwahrt. Von dieser Probe werden 8 µl auf ein kleines Acrylamidgel (Pharmacia) aufgetragen und bei 4°C für 30min bei 150 V und 30 min bei 600V durchgeführt. Anschließend wird ein DNA-Silberfärbung (3.2.2) angewendet.

### 3.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al., 1988) ist eine der wichtigsten Standardmethoden der Molekularbiologie geworden. Diese *in vitro* Methode erlaubt durch enzymatische Synthese die milliardenfache Vervielfältigung einzelner DNA-Moleküle. Amplifiziert wird ausgehend von zwei einander entgegengerichteten Oligonukleotiden (Primer), die als Startmoleküle für eine hitzestabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) dienen. Die Vervielfältigung wird durch die zyklische Wiederholung folgender Reaktion erreicht: Hitzedenaturierung der Ziel-DNA, Anlagerung der Primer und Synthese des komplementären Doppelstranges. Dieses führt zu einer exponentiellen Akkumulation der Ziel-DNA, deren Enden durch die 5' Enden der Primer definiert sind (Newton und Grainger, 1994). Normalerweise wurde folgendes PCR-Protokoll angewendet:

**Tabelle 3.1** Angewendetes PCR-Protokoll

| Zyklus | Reaktion                 | Dauer     | Temperatur | Wiederholungen |
|--------|--------------------------|-----------|------------|----------------|
| 1      | Denaturierung            | 2 min     | 94°C       | 1 x            |
| 2      | I Denaturierung          | 0,5-1 min | 94°C       | 25-40 x        |
|        | II Primer-Hybridisierung | 0,5-1 min | 50-62°C    |                |
|        | III Polymerisation       | 0,5-2 min | 72°C       |                |
| 3      | Polymerisation           | 10 min    | 72°C       | 1 x            |

Eine PCR-Reaktion enthielt üblicherweise die Ziel-DNA ( rekombinante Plasmid-DNA ca. 2 ng, genomische DNA bzw. cDNA ca. 20 ng); 0,2 mM NTP; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 x Taq-Puffer und 1-2 U Taq-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 20µl.

Bei RT-PCR-Reaktionen kann auf die Menge des eingesetzten cDNA-Templates normiert werden, mit Vergleichsreaktionen auf *GAPDH* (Acc. Nr.: M32599) oder *b-Actin* (Acc. Nr.: X032599). Hierbei sollten nicht mehr als 35 Wiederholungen verwendet werden, da sonst die Reaktion nicht mehr exponentiell verläuft.

Die PCR wurde auch zum direkten Testen von Bakterienkolonien auf die Anwesenheit rekombinanter Plasmide verwendet. Hierzu wurde eine einzelne Bakterienkolonie mit einer sterilen Pipettierspitze gepickt und in 100 µl Selektivmedium überführt. Zum Resuspendieren der Bakterien wurde die Suspension 30 min bei 37°C geschüttelt. Von dieser Suspension wurden 2 µl für die PCR-Reaktion verwendet. Der erste Denaturierungszyklus wurde auf 5 min verlängert, um die Bakterien zu lysieren und die Plasmide aus den Zellen freizusetzen.

Die Abschätzung der Hybridisierungstemperatur erfolgte mit dem Computerprogramm OligoEd (Dr. T. Werner, GSF Institut für Säugetiergenetik).

Die PCR-Reaktion wurde in einem Touch-Down-Thermocycler (Hybaid GmbH) oder in einer GeneAMP PCR System 9600 (Perkin-Elmer), bzw. einem RoboCycler<sup>®</sup> (Stratagene) durchgeführt.

### 3.2.8 Durchsuchen von genomischen DNA-Banken

#### *Durchsuchen einer I-Bank*

Der C600 hfl Bakterienstamm wurde als Wirtstamm für  $\lambda$ -Phagen auf LB-Selektivmedium ausplattiert und über Nacht angezogen. Eine Kolonie wurde in 50 ml LB-Medium, 10 mM  $MgSO_4$ , 0,2 % (w/v) Maltose bei 37°C bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 inkubiert. Die Bakterien wurden bei 5 krpm, 4°C abzentrifugiert (Hettich, Typ: Universal 16 R, Rotor: 1617). Das Sediment wurde in 25 ml 10 mM  $MgSO_4$  aufgenommen. 400  $\mu$ l Bakteriensuspension wurden mit etwa  $5 \cdot 10^4$  pfu für 20 min bei 37°C unter Schütteln infiziert. Dieser Ansatz wurde mit 7,5 ml Top-Agarose (48°C warm) gemischt und auf vorgewärmten LB-Agarplatten (14 cm) ausplattiert. Um ein zu schnelles Abkühlen des Top-Agars und damit die Klumpenbildung zu vermeiden, sollten alle Materialien und Geräte vorgewärmt sein. Die beimpften Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Eine anschließende Abkühlung der Platten auf RT ist nötig, damit sich der Top-Agar bei der Anfertigung von Filterabzüge nicht ablöst. Anschließend wurde die  $\lambda$ -Phagen-DNA auf eine Nylonmembran (PALL) übertragen: Die Nylonmembran wurde auf die Platte aufgelegt (2 min, Replika 4 min) und an drei Ecken markiert (um später positive Hybridisierungssignale zuordnen zu können). Daraufhin wurde der Filter mit der Rückseite für 5 min auf Whatmanpapier gelegt, das mit 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH getränkt wurde. Dies dient zum Aufbrechen der Phagen und zur Denaturierung der DNA. Die Neutralisierung erfolgt für 5 min auf Whatmanpapier, das mit 3 M Na-Acetat (pH 5,5) getränkt wurde. Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung (Stratagene) nach Hersteller-vorschrift mit dem Filter vernetzt. Anschließend erfolgt die Plaquehybridisierung (3.2.9).

Die Hybridisierungssignale wurden den entsprechenden Plaques zugeordnet. Diese Phagenplaques wurden aus der Originalkulturplatte ausgestochen und in 1 ml SM / 40  $\mu$ l Chloroform überführt und 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C unter schütteln eluiert. Von den  $\lambda$ -Phagen Suspensionen wurden zur Vereinzelung verschiedene Verdünnungen (1:25000, 1:125000, 1:625000) auf Bakterien ausplattiert, eine passende Verdünnung ausgewählt, Filterabzüge (siehe oben) hergestellt und hybridisiert (3.2.9). Es wurden isolierte positive Plaques gepickt und in 1 ml SM / 40  $\mu$ l Chloroform überführt. Die Phagensuspension kann direkt in eine PCR-Reaktion, oder zu einer DNA-Isolierung eingesetzt werden (3.1.4).

### *Durchsuchen einer BAC-Bank*

Die genomische BAC-Bank DOWN TO THE WELL™ der Firma Genome Systems wird mit einer geeigneten PCR-Reaktion durchgemustert. Die PCR-Reaktion sollte gut optimiert sein und in einem Gesamtvolumen von 12,5 µl mit 10 ng (entspricht 1 µl aus einem „WELL“) der Zielsequenz detektierbare Produkte ergeben. Die BAC-Bank besteht aus 92160 Klonen, deren DNA in 240 384er-Mikrotiterplatten gelagert werden. Diese Bank wird in verschiedenen Schritten getestet. Für das erste Durchmustern der Bank ist die DNA aller Klone in 35 Mikrotiterplatten gepoolt. Zunächst wird der „UPPER POOL“ durchsucht, um den entsprechenden „PLATE POOL“ und „DOWN TO THE WELL POOL“ zu identifizieren. Im nächsten Schritt wird der identifizierte „PLATE POOL“ durchsucht, um die entsprechende Mikrotiterplatte der BAC-Bank zu finden. Anschließend wird der gefundene „DOWN TO THE WELL POOL“ durchsucht. Damit werden die Koordinaten des Klons auf der 384er-Mikrotiterplatte der BAC-Bank identifiziert. Als Ergebnis des Durchsuchens der drei „Ebenen“ der BAC-Bank erhält man die Nummer der Mikrotiterplatte mit den Koordinaten des interessierenden BAC-Klons. Mit diesen Daten kann der identifizierte Klon als Stichkultur bei der Firma Genome Systems bestellt werden.

### **3.2.9** Hybridisierungsverfahren (Southern-Blot)

#### *Transfer von DNA auf Nylonmembran*

Der Transfer von DNA, die mit einem Restriktionsverdau gespalten wurde (3.2.3), auf eine Membran dient zu deren Immobilisierung. Das erlaubt anschließend die Identifizierung spezifischer DNA-Fragmente durch Hybridisierung mit markierten Sonden (Southern, 1975).

Nach der Auftrennung der DNA durch Elektrophorese und Dokumentation (3.2.1.) wird das Agarosegel zurechtgeschnitten. Für einen besseren Transfer von DNA-Fragmenten wurde das Gel für 15 min mit 0,25 M HCl auf einem Schüttler depuriniert. In PFGE-Gel aufgetrennte DNA wurde 30 min depuriniert. Nach kurzem Spülen mit H<sub>2</sub>O, erfolgt dann die Denaturierung der DNA durch Inkubation des Gels in 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl für 30 min. Der anschließende Transfer auf die Membran (Hybond N, Amersham-Pharmacia) wurde mit einem Kapillarblotverfahren in 20 x SSC-Puffer durchgeführt (Sambrook et al., 1989). Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung an die feuchte Membran fixiert (Stratalinker, Stratagene).

#### *Radioaktive Markierung von DNA-Sonden*

Zur Herstellung radioaktiver Sonden sollten nur DNA-Fragmente verwendet werden, die durch einen Restriktionsverdau aus einem Plasmid geschnitten (3.2.3) und über Agarosegele

gereinigt wurden (3.1.5). Die Markierung der DNA-Fragmente erfolgte mit [ $^{32}$ P]dCTP (Pharmacia Amersham) unter Verwendung des Megaprime™ DNA labeling systems (Pharmacia Amersham). Es wurden 100 bis 500 ng DNA als Matrize zur Markierung eingesetzt. Die Synthese der radioaktiven DNA-Sonde erfolgt nach Herstellerangaben mittels Zufalls-Primern und dem Klenow Fragment der DNA-Polymerase I.

Nicht eingebaute Nukleotide werden mit Microspin™ S-300 HR-Säulen (Pharmacia) nach Herstellerangaben abgetrennt. Der Einbau des radioaktiven Cytosins wurde durch das Messen der Zerfälle pro Minute (cpm) in 1  $\mu$ l des Markierungsansatzes mit Hilfe eines Szintillationszählers (Easicount 4000, Scotlab) ermittelt.

### *Hybridisierung*

Das Prinzip der Hybridisierung beruht auf der Basenpaarung komplementärer DNA-Sequenzen.

Die Membranen (s.o.), bzw. Filterabzüge (3.2.8) mit transferierter denaturierten DNA werden als erstes prähybridisiert, um die freien Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen. Dazu wurde die Membran für 1 Stunde bei 42°C unter hoch stringenten Bedingungen (5 x SSC, 5 x Denhardt's, 0,1 % Formamid, 1 mg/ml DNA aus Lachssperminen), oder unter niedrig stringenten Bedingungen (5 x SSC, 5 x Denhardt's, 0,1 % SDS, 35 % Formamid) inkubiert. Danach wurde die radioaktiv markierte DNA-Sonde (s.o.) hinzugefügt und bei 60°C (Membranen), bzw. 42°C (Filterabzüge) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die unspezifischen gebundenen Sonden durch Waschen unter hoch stringenten Bedingungen mit 0,1 x SSC, 0,1% SDS, bzw. niedrig stringenten Bedingungen mit 5 x SSC, 0,1 % SDS bei 42°C entfernt. Die Anzahl der Wiederholungen des Waschschrittes war abhängig von der gebundenen Radioaktivität auf dem Filter, die mit einem Handmonitor bestimmt wurde. Spezifische Sondenbindungen lagen bei einer Restaktivität von 30 – 50 cpm (Membranen), bzw. 20- 80 cpm (Filterabzüge) vor.

### *Autoradiographie*

Nach Beendigung des Waschvorgangs wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweiselt und in eine Expositionskassette (Amersham) zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodak X-OMAT) zwischen Verstärkerfolien gelegt. Die Exposition erfolgt bei -80°C. Die Dauer war abhängig von der Restaktivität der Filter und lag zwischen 1-5 Tagen. Die Röntgenfilme wurden in einem Filmentwickler (Agfa, CURIX60) entwickelt.

### 3.2.10 Sequenzierung

Sequenzierungen von Plasmiden oder gereinigten PCR-Fragmenten wurden von der Firma SequiServe (Vaterstetten) durchgeführt. Es wurde das Thermozyklus Verfahren mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Primern bzw. dNTPs durchgeführt und mit einem ABI 373 A Sequenzierautomaten (Applied Biosystems) aufgetrennt. Hierzu sind von einem 500bp PCR-Fragment 200 ng in einem Volumen von 10 µl notwendig.

## 3.3 Mikrobiologische Methoden

### 3.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur effizienten Aufnahme von Plasmid-DNA wurden hitzekompetente Bakterien hergestellt (Sambrook et al., 1989). Für die Herstellung wurde der *E.coli* Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Der Bakterienstamm wurde auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Hiervon wurde eine einzelne Kolonie über Nacht in 2 ml LB-Medium hochgezogen. Die Zellen wurden 1:100 in 50 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 weiter inkubiert, damit sich die Bakterien in der Log-Wachstumsphase befinden. Alle weiteren Schritte werden auf Eis durchgeführt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend 5 min bei 4500 rpm (Sorvall, Typ: RC-5B, Rotor: GSA) zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 16 ml TB1 resuspendiert, 15 min auf Eis inkubiert und nochmals sedimentiert. Dieses Bakteriensediment wurde in 4 ml TB2 resuspendiert, in 50 µl Portionen aliquotiert, auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 3.3.2 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA

Hitzekompetente Bakterienzellen (DH5 $\alpha$  oder Top10F $\alpha$ , Invitrogen) wurden 1 Stunde auf Eis aufgetaut. Zu den Zellen wurden 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol und die zu transformierende DNA (10 ng Plasmid-DNA oder 1-10 µl Ligationsansatz) gegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt (DH5 $\alpha$  für 2 min, Top10F $\alpha$  für 30 sec). Danach wurde der Transformationsansatz für 2 min auf Eis abgekühlt, mit 1 ml LB-oder SOC-Medium versetzt und für 30-60 min bei 37°C zur Expression der Resistenzproteine geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen des Transformationsansatzes auf Selektivmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Konnten Klonierungsansätze über β-Komplementation der Bakterien auf Rekombination überprüft

werden, so wurde die Agarplatten zusätzlich mit 1 mM IPTG (Roth) und 1 mg X-Gal (PeqLab) versehen.

### 3.3.3 Herstellung von Glycerinkulturen

Zur Herstellung von Stammkulturen wurde 0,75 ml einer über Nacht-Kultur von Bakterien einer Einzelkolonie mit gleichem Volumen sterilen Glycerins gründlich durchmischt. Diese Dauerkultur wurde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Von dieser Stammkultur können Aliquots z.B. mit einer sterilen Impföse zur Kultivierung in Nährmedien entnommen werden.

## 3.4 Proteinchemische Methoden

### 3.4.1 Herstellung von Linsenextrakten

Zu 8-10 Augenlinsen 3 Wochen alter Mäuse wird 0,5 ml des Homogenisierungspuffer gegeben. Anschließend wird in einem autoklavierten Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem Einweg-Mikro-Homogenisatorstempel (W. Ebel Laboratoriumseinrichtungen, Hamburg) homogenisiert.

### 3.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen von Linsenextrakten wird mit einem Lowry Test durchgeführt (Bio-Rad DC Protein Assay Kit). Dafür werden 5  $\mu\text{l}$  der Proteinlösung pro Bestimmung und eine Eichgerade von 0 bis 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  BSA benötigt. Die Quantifizierung erfolgt photometrisch mit der Messung der Absorption bei 750 nm in einem Bio-Rad Microplate Reader 3550-UV. Die Linsenextrakte werden 50  $\mu\text{l}$  Aliquots mit einer Konzentration von 4-5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  portioniert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.4.3 Fraktionierung von Linsenextrakten

Die Fraktionierung von Linsenextrakten dient zur Detektion und Darstellung von Proteinaggregationen in Kataraktlinsen (Gong et al., 1997). Die Linsenextrakte werden bei 15 krpm 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wird als 1. Fraktion ( $\text{H}_2\text{O}$  löslich) aufbewahrt, das Sediment wird in 0,5 ml Fraktionierungspuffer gelöst. Anschließend wird mit 15 krpm für

15 min zentrifugiert. Der Überstand als 2. Fraktion (NaOH löslich) aufbewahrt, mit dem Sediment wird dieser Schritt wiederholt (3. Fraktion). Dieses Sediment wird direkt in Laemmli-Puffer aufgenommen (4. Fraktion), der entweder mit 10 mM DTT oder mit 10 mM Jodacetamide versetzt wurde. Mit jeder Fraktion wird schließlich eine SDS-PAA-Gelelektrophorese durchgeführt.

#### 3.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese wird zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht benutzt. Die Proteine bzw. Linsenextrakte werden mit gleichen Volumen Laemmli-Puffer versetzt, für 5 min auf 100°C erhitzt, anschließend auf Eis abgekühlt. Die Anwesenheit des anionischen Tensids SDS führt zur Denaturierung und versieht die Proteine mit einer negativen Überschussladung. Danach werden die so behandelten Proteine entsprechend dem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli, 1970). 10-15 µl der so behandelten Proben werden auf einem SDS-haltigen Polyacrylamidgel bei 100 V aufgetrennt, bis der blauen Farbstoff des Probenpuffers aus dem Gel gelaufen ist. Als Größenstandard wird der vorgefärbte Marker #69813 (Fluka) oder #69810 (Fluka) verwendet.

**Tabelle 3.2** Zusammensetzung von SDS- Polyacrylamidgelen

|                            | 4% Sammelgel | 10% Trenngel | 12,5% Trenngel |
|----------------------------|--------------|--------------|----------------|
| 30% PAA-Stammlösung (29:1) | 0,67 ml      | 3,3 ml       | 4,1 ml         |
| M Tris/HCl, pH 6,8         | 0,67 ml      | 3,0 ml       | 3,0 ml         |
| 10% SDS                    | 0,1 ml       | 0,1 ml       | 0,1 ml         |
| 50% Glycerin               |              | 2,5 ml       | 2,5 ml         |
| TEMED                      | 20 µl        | 20 µl        | 20 µl          |
| APS 10%                    | 50 µl        | 50 µl        | 50 µl          |
| Wasser                     | 3,67 ml      | 1,0 ml       | 0,3 ml         |
| Gesamtvolumen              | 5,2 ml       | 10 ml        | 10 ml          |

Die Elektrophorese wird mit Kathodenpuffer (innen) und Anodenpuffer (außen) in einer Bio-Rad Mini-Protean II Gelkammer durchgeführt. Die Gele werden anschließend mit einer Essigsäure (zur Fixierung) Coomassie-Lösung angefärbt. Zur besseren Darstellung der

Banden wird der Hintergrund in einer Entfärbelösung verringert. Eine schnelle Durchführung der Färbung bzw. Entfärbung wird durch kurzes Aufkochen des PAA-Gels in Färbe-/Entfärbelösung erreicht. Die gefärbten Gel werden in Cellophan eingeschlagen und in einem Gelrockner (Biometra) getrocknet.

### 3.4.5 Herstellung polyklonaler Antiseren

Das polyklonale Antiserum gegen das Cryge<sup>nz</sup>-Protein wurde in Auftragsarbeit von Sigma-Genosys Ltd., London, UK hergestellt. Entsprechend der vorhergesagten Cryge<sup>nz</sup> Aminosäuresequenz wurde ein Peptid der Länge 15 AS (Aminosäure 91-105) synthetisiert. Dieses Peptid wurde für die Immunisierung von Kaninchen verwendet. Nach dreimaliger Immunisierung wurden die Blutseren gewonnen.

### 3.4.6 Western-Blot

Der Western-Blot wird zum Nachweis definierter Proteine durch spezifische Antiseren angewendet (Towbin et al., 1979). Bei der Western-Blot Analytik wird das zu untersuchende Proteingemisch (hier Linsenextrakt) zuerst durch ein SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine auf eine Protein-absorbierende Membran (Nitrocellulose bzw. PVDF, Bio-Rad) transferiert. Der Transfer wird mit einem Starblot II-S (Fröbe) mit 0,8 mA pro cm<sup>2</sup> Membran für 1 Stunde durchgeführt. Das Elektrobplotgerät wird vom negativen zum positiven Pol wie folgt beladen: 9 Filter (3 mm Whatman-Chromatographiepapier) in Transferpuffer 1 getränkt, das Proteingel, die Membran (beide mit Transferpuffer 2 benetzt), 3 Filter in Transferpuffer 2 und 6 Filter in Transferpuffer 3 getränkt. Nach dem Transfer wird zur optischen Kontrolle des Proteintransfers die Membran mit 1 x Ponceau-Lösung angefärbt und anschließend mit 1 x TBS entfärbt.

Zur Feststellung von spezifischen Proteinbanden wird zunächst der Hintergrund durch Inkubation mit Milchproteinen (5% Trockenmilchpulver in 1 x TBS) 1 Stunde bei RT blockiert. Dann wird die Membran mit dem gegen das zu identifizierende Protein gerichtet Antiserum (primärer Antikörper) in einer 1:100 bis 1:500 Verdünnung inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in 1 x TBS inkubiert man mit einem gegen den F<sub>c</sub>-Teil des primären Antikörpers gerichteten sekundären Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen IgG, AP-gekoppelt, Roche) in einer 1:1000 Verdünnung. Zur Anfärbung der markierten Banden ist an den sekundären Antikörper ein Enzym gekoppelt (Meerrettich-Peroxidase), welches ein zugesetztes Substrat (Diaminobenzidine, DBA) so modifiziert, daß ein unlöslicher Farbstoff

entsteht. Hierzu wird 2-5 min unter optischer Kontrolle die Membran mit frisch angesetzter DBA-Färbelösung inkubiert.

Um den Hintergrund der Färbung zu minimieren, können die Verdünnungen der Antiseren mit Wildtyp-Linsenextrakt (10 µg) für 10 min vorinkubiert werden.

### **3.5 Morphologische und Histologische Methoden**

#### **3.5.1 Organentnahme**

Die Organe wurden von frisch getöten Mäusen entnommen. Das Abtöten adulter Tiere erfolgte mit CO<sub>2</sub> oder durch cervikale Dislokation (Bruch des Genicks). Mäuse bis zu einem Alter von 21 Tagen wurden entweder decapitiert oder mit Ether getötet. Bei der Präparation von Mäusembryonen wurde zunächst der Uterus aus der trächtigen Maus herauspräpariert und in PBS überführt. Jeder Embryo wurde anschließend unter PBS durch Entfernen der Uteruswand und der embryonalen Hüllen (Chorion, Dottersack und Amnion) freipräpariert. Augenlinsen, die ab E 18.5 präpariert werden können, werden durch vorsichtiges Rollen über Kleenex-Papier von anderen Bestandteilen des Auges (Iris, Okularflüssigkeit) gereinigt und kurzfristig in PBS aufbewahrt. Die Grundlagen dieser Techniken sind im Handbuch „Manipulating the Mouse Embryo“ beschrieben (Hogan et al., 1994). Die embryonalen Stadien werden nach Kaufman datiert. Der Zeitpunkt der Kopulation und das Entwicklungstempo der Embryonen (auch innerhalb eines Wurfes) sind variabel (Kaufman, 1992). Der Mittag des Tages an dem morgens ein Vaginalpfropf festgestellt wurde, wird als Tag E 0,5 (embryonaler Tag) bezeichnet.

#### **3.5.2 Gewebefixierung**

Präparierte Augenlinsen, die für morphologische Analysen unter Stereolupen betrachtet oder fotografiert wurden, werden direkt (ohne Fixierung) unter PBS verwendet. Die Augenlinsen dürfen nicht unter Raumtemperatur gekühlt oder mechanisch deformiert werden, da dieses zu artifiziellen Trübungen führen kann.

Zur Herstellung von histologischen Schnitten wurden Augen verwendet, die in Carnoy-Lösung fixiert wurden. Die Augen wurden hierzu mit 1 ml Carnoy-Lösung überschichtet und 3 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend muß die Fixierungslösung entfernt werden und 4 mal 15 min mit 100% Ethanol gespült werden. Die so fixierten Augen können unter abs. Ethanol bei 4°C gelagert werden.

### 3.5.3 Herstellung von Plastikblöcken und -Schnitten

Mit Carnoy-Lösung fixierte Augen wurden mit dem JB-4™ Immuno-Bed Kit™ (Polyscience, Inc.) nach Herstellerangaben eingebettet. Vollständig ausgehärtet waren die Plastikblöcke nach ca. 2 Wochen. Die Blöcke wurden bei RT getrimmt und am Mikrotom (C.Reichert OmU3) mit einem Glasmesser auf eine Dicke von 2 µm geschnitten. Die Schnitte wurden vorsichtig auf mit Wasser benetzten Objektträger (Menzel-Gläser) überführt. Anschließend wurde das Wasser auf einer 50°C warmen Heizplatte verdampft, damit sich die Schnitte langsam strecken.

### 3.5.4 Übersichtsfärbung

Übersichtsfärbungen des Auges erfolgten durch die Färbung von 2 µm Plastikschnitte mit Methylenblau-basisches Fuchsin. Das Cytoplasma wird durch basisches Fuchsin, das Chromatin durch Methylenblau dargestellt. 100 µl der Färbelösung wurden auf jeden Objektträger aufgetragen und nach 30-60 sec Inkubation mit Wasser abgespült. Anschließend wurde 3 mal mit Wasser gewaschen. Die Schnitte wurden mit Eukitt überschichtet und durch ein Deckglas abgeschlossen.

### 3.5.5 Dokumentation

Für die Dokumentation von Augen und Augenlinsen wurden diese in PBS in 5 cm-Petrieschalen mit Auflichtbeleuchtung (Schwanenhalskaltlichtquelle, Leica, KL 1500) photographiert. Die Aufnahmen wurden am Binokular-Mikroskop (Leica, MZ Apo) mit einer digitalen Farbvideokamera (Fuji HC-2000 CCD) in PhotograbII-Programm (schwarz/weiß-Abgleich) durchgeführt.

Histologische Schnitte wurden unter einem Mikroskop (Zeiss, Axiophot) betrachtet und mit eine digitalen Farbvideokamera (Jenoptik, Prog/Res/3008) im KS100 Imaging System 3.0 Programm (Zeiss) dokumentiert.

Die digitalen Bilder wurden aufgrund des verlustfreien Komprimierungsformates als TIFF-Dokumente gespeichert und in das Adobe Photoshop-Programm 5.02 importiert. In diesem Programm wurden die Bilder weiter fototechnisch bearbeitet (teilweise Korrektur der Farbbalance/Farbsättigung). Anschließend werden die Aufnahmen mit Hilfe des Programms CorelDRAW 8.0 zusammengestellt und beschriftet. Die Bilddaten werden mit Tintenstrahldruckern (Epson Stylus Color 1520) in Fotoqualität auf Glossy Papier (Epson) gebracht.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Übersicht der Phänotypen der *Cat2* Kataraktmutanten

Augenlinsen von homozygoten *Cat2* Mutanten und C3H Wildtyp Mäusen wurden im Alter von 3 Wochen unter PBS entnommen und mit Hilfe eines Binokular (Leica) phänotypisch analysiert und dokumentiert. In diesem Alter hat die Katarakt ihre volle Penetranz erreicht. In Abb. 4.1 sind die reifen, adulten Kataraktlinsen im Vergleich zu C3H Wildtyp-Augenlinsen dargestellt.

Alle Augenlinsen zeigen eine leichte Trübung der Oberfläche. Diese Trübung tritt bei der Überführung der Linsen in PBS auf, auch bei der C3H Wildtyp Augenlinse und stellt einen Präparationsartefakt dar. Die Augenlinsen sind sehr empfindlich gegenüber mechanischen Beanspruchungen, wenn sie aus ihrer Augenumgebung entfernt werden. So führt z.B. schon leichter Druck mit der Pinzette während der Präparation der Augenlinse schnell zu deutlichen Druckstellen, die als punktuelle Trübungen sichtbar sind. Direkt während der Präparierung ist bei allen Augenlinsen noch eine klare Oberfläche erkennbar, und die Wildtyp Augenlinsen sind komplett durchsichtig.

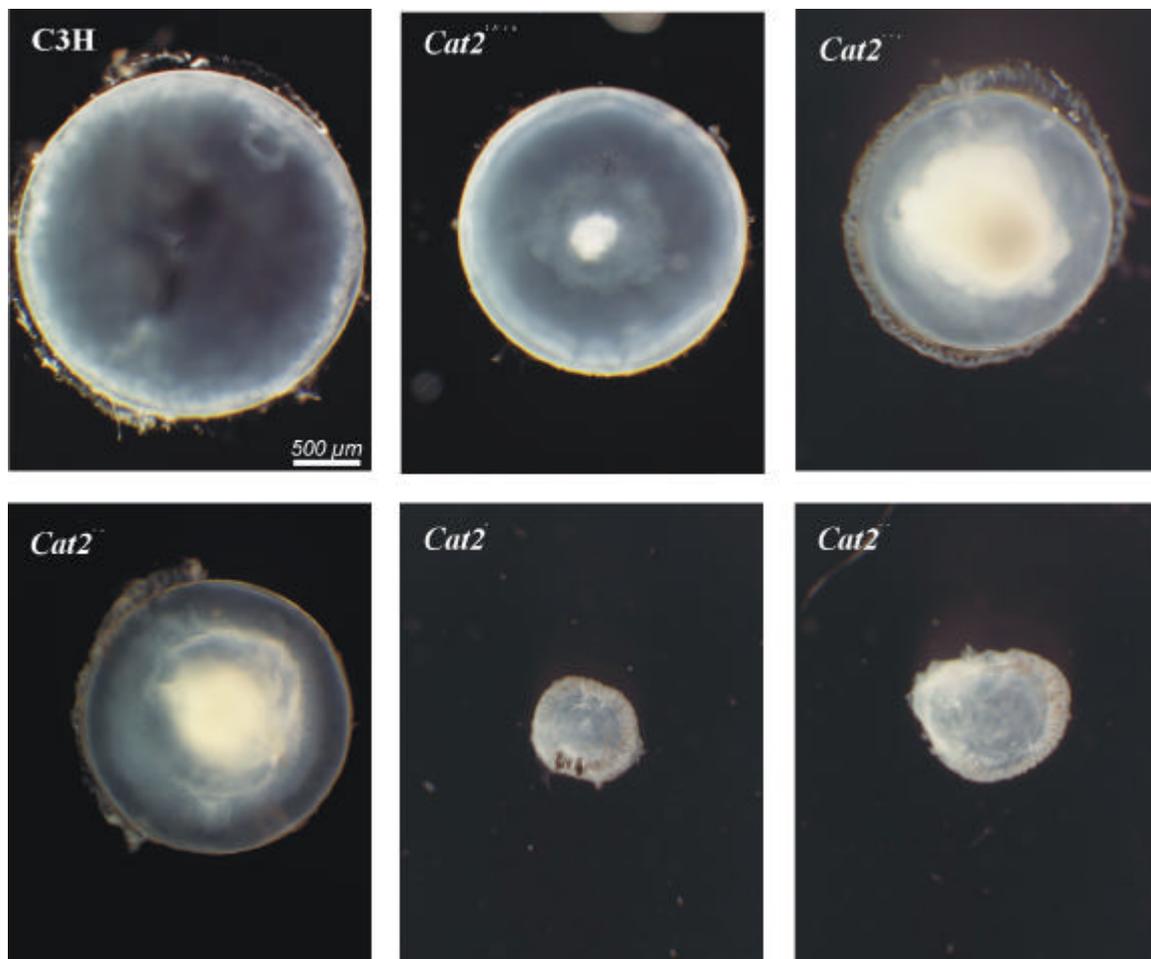
Die verschiedenen *Cat2* Mutanten zeigen unterschiedliche Phänotypen der Augenlinse (Abb. 4.1), abhängig von den zugrunde liegenden Mutationen, die in Kapitel 4.2 detailliert beschrieben sind.

Alle mutanten Augenlinsen sind im Vergleich zum Wildtyp kleiner. Dieser Phänotyp wird Mikrophthalmie genannt. Somit sind die *Cat2* Phänotypen mit Wachstumsstörungen in der Augenlinsenentwicklung gekoppelt. Die Mikrophthalmie ist am stärksten bei den Mutanten *Cat2<sup>f</sup>* und *Cat2<sup>ns</sup>* ausgeprägt, mit der Folge, daß die Augen dieser Mäuse kaum erkennbar sind. Die starken Mikrophthalmien lassen auf Störungen der Differenzierung der Linsenfaserzellen und auf degenerative Vorgänge in der Linse schließen. Die Entwicklung der Augenlinsen der *Cat2<sup>f</sup>* und *Cat2<sup>ns</sup>* ist soweit verändert, daß keine zentrale Trübung mehr ausgebildet wird. Im Gegensatz dazu sind die Wachstumsstörungen der Augenlinsen bei den übrigen dargestellten *Cat2* Mutanten nicht so deutlich. Für sie ist vielmehr die zentrale Trübung der Augenlinse charakteristisch. Dieser Kataraktkern erreicht seine volle Ausbildung erst mit 3 Wochen nach der Geburt (siehe auch Abb. 4.21) und ist von dem umgebenden Bereich der Augenlinse, der durchsichtig und somit morphologisch unverändert erscheint, mehr oder weniger scharf abgegrenzt.

Die zentrale Trübung ist in den drei *Cat2* Mutanten *Cat2<sup>1Neu</sup>*, *Cat2<sup>nop</sup>* und *Cat2<sup>nz</sup>* unterschiedlich stark ausgeprägt. Den schwächsten Phänotyp der untersuchten Mutanten, hat

die  $Cat2^{INeu}$  Mutante mit der kleinsten zentralen nukleären Katarakt. Im Bereich um den Kataraktkern ist eine Zone schwacher, diffuser Trübung erkennbar. Einen auffälligeren Phänotyp weisen die Mutanten  $Cat2^{nop}$  und  $Cat2^{nz}$  mit sich ähnlichen starken, zentralen Trübungen auf. Der leicht getrübbte Bereich der  $Cat2^{INeu}$  Mutante um den Kern ist bei den Mutanten  $Cat2^{nop}$  und  $Cat2^{nz}$  vollständig getrübt und gehört mit zum zentralen Kataraktkern. Bei der  $Cat2^{nz}$  ist der Kataraktkern deutlicher vom durchsichtigen Außenbereich abgegrenzt als bei der  $Cat2^{nop}$ . Die starken zentralen Trübungen in diesen Augenlinsen weisen auf deutliche pathologische Effekte in den Linsenfaserzellen hin.

Aufgrund der linsenspezifischen Phänotypen, bei denen Wachstums und Entwicklungsstörungen eine Rolle spielen, sind die Strukturproteine der Augenlinse gute Kandidaten für die zugrundeliegende Mutation.



**Abbildung 4.1** Augenlinsen verschiedener  $Cat2$  Kataraktmutanten 3 Wochen nach der Geburt. Im Vergleich ist eine C3H Wildtyp Augenlinse gezeigt.

## 4.2 Analyse der Cryg / Cat2 Mutanten

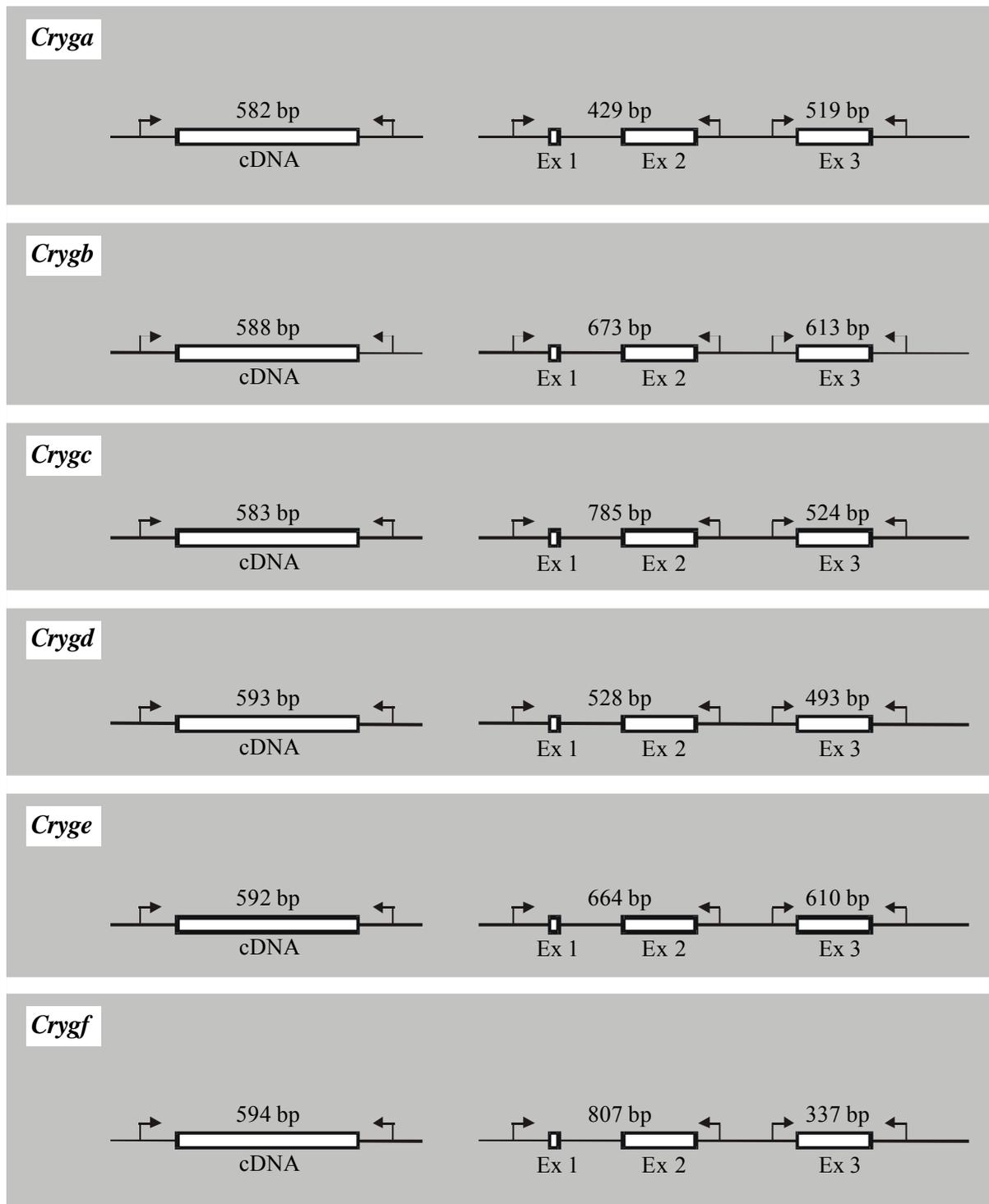
### 4.2.1 Systematischer Ansatz zur Überprüfung der Cryg Kandidatengene

Die *Cat2* Mutanten wurden auf das Chromosom 1 der Maus in die Nähe des  $\beta$ -Kristallingenclusters kartiert (Everett et al., 1994; Löster et al., 1994). Aufgrund dieser chromosomalen Lokalisation und der augenspezifischen Expression der  $\beta$ -Kristalline stellen diese gute Kandidatengene für die Mutationen die *Cat2* Phänotypen verursachen dar.

Daher wurde ein systematischer Ansatz zur Überprüfung der *Cryg* Kandidatengene entwickelt. Hierzu war es notwendig, die unterschiedlichen, hoch homologen *Cryg* Gene spezifisch zu amplifizieren und mittels SSCP Analyse (3.2.6) oder Sequenzierung (3.2.10) zu überprüfen.

Auf cDNA Ebene wurden die PCR-Primer in die 3'- und 5'- UTR's der mRNA der verschieden *Cryg* Gene gelegt, um eine spezifische Amplifikation der vollen Länge der codierenden Sequenz zu gewährleisten. Für die direkte Amplifikation der *Cryg* Gene aus genomischer DNA wurden die PCR-Primer in 3'- oder 5'-flankierende Bereiche der codierenden Sequenz, sowie in intronische Bereiche der Gene gelegt. Durch die Lage der Primer in nicht codierenden, weniger homologen Bereichen konnte eine spezifische Amplifikation aus genomischen Fragmenten erreicht werden, die jeweils auch die Splice-Akzeptor und die Splice-Donor Sequenzen umfaßten. Das Exon 1 wurde, aufgrund seiner geringen Größe (9 bp), zusammen mit dem Intron A und dem zweiten Exon amplifiziert (Klopp et al., 1998).

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde durch die Anwesenheit spezifischer Restriktionsschnittstellen und durch Sequenzierung überprüft. Die Lage der genspezifischen Primer sowie die Größe der amplifizierten PCR-Produkte ist in Abb. 4.2 schematisch dargestellt. Eine Liste der Primer und die Genbank Zugangsnummern (Acc. Nr.) der entsprechenden *Cryg* Gene ist im Anhang zu finden.



**Abbildung 4.2** Schematische Darstellung der Fragmente zur Amplifikation der *Cryg* Gene. Die Lage der genspezifischen Primer für die PCR-Reaktion ist mit Pfeilen dargestellt. Die Größe der PCR-Produkte ist für die genomische sowie für die cDNA angegeben. Ex = Exon

## 4.2.2 Mutationen im *Cryga* Gen der Maus

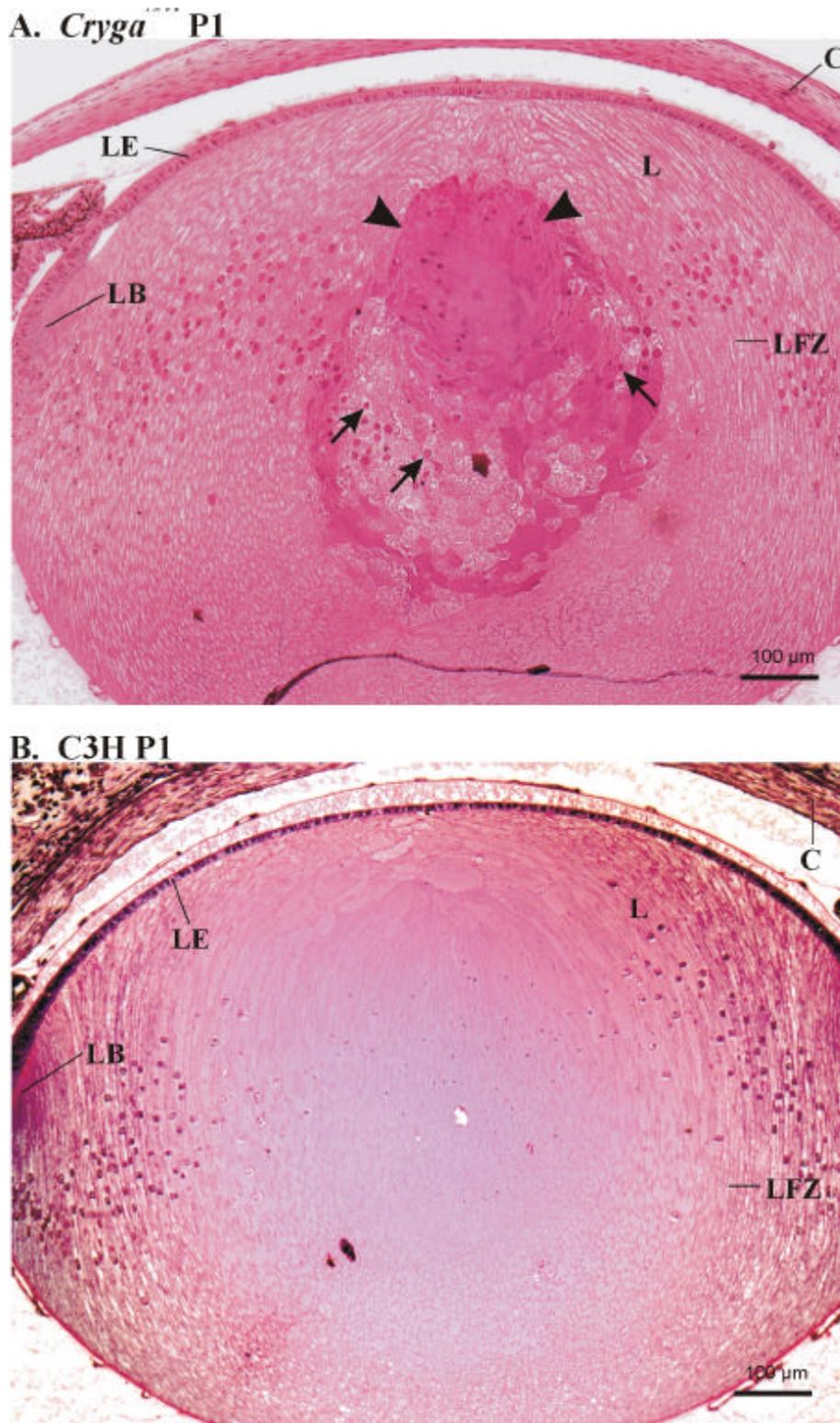
### 4.2.2.1 Charakterisierung der *Cryga*<sup>Neu</sup> (ENU-436) Mutante

Die *ENU-436* Mausmutante wurde nach paternaler Behandlung mit ENU gefunden. Durch Kreuzung mit der *Cat2*<sup>ro</sup> Mutante, einem weiteren Mitglied der *Cat2* Kopplungsgruppe (Kraochvilova und Favor, 1992) wurde die *ENU-436* Mutante als eine *Cat2/Cryg* Mutante charakterisiert (Favor und Neuhäuser-Klaus, 2000).

Die *ENU-436* weist 3 Wochen nach der Geburt eine kleine, zentrale Katarakt auf (4.1), die den schwächsten Phänotyp der untersuchten *Cat2* Mutanten darstellt. Diese Katarakt ist direkt nach der Geburt manifestiert. Auf histologischen Schnitten von Augenlinsen homozygoter, neugeborener Mutanten ist der Kataraktkern in der anterioren Hälfte der Linse gut erkennbar (Abb. 4.3). Die morphologische Trübung in diesem Bereich ist in Schnitten durch die Auflösung der zellulären Strukturen der Linsenfaser erkennbar. Die übrigen Faserzellen der Augenlinse sind angeschwollen, der Linsenbogen und das anteriore Linsenepithel erscheinen unverändert.

Die degenerativen Vorgänge haben einen deutlichen Effekt auf die Differenzierung der Augenlinse. So ist neben der Zerstörung der Linsenfaserstrukturen im zentralen Bereich eine unvollständige Degradation der Zellkerne dieser Zellen zu beobachten. Im Gegensatz zur Augenlinse des Wildtyps (C3H) sind in der *ENU-436* Mutante noch Zellkerne im zentralen Bereich sichtbar. Die Zellkerne in der Mutante liegen mehr anterior als in der Wildtyp Augenlinse, was auf eine veränderte Elongation und Lage der Linsenfaserzellen zueinander zurückzuführen ist. Dieses deutet auf eine fehlerhafte, nicht abgeschlossene, terminale Differenzierung der Linsenfaser hin.

Die veränderte Differenzierung, d.h. die degenerativen Vorgänge in den Linsenfaserzellen führen zu Wachstumsstörungen und Mikrophthalmie.

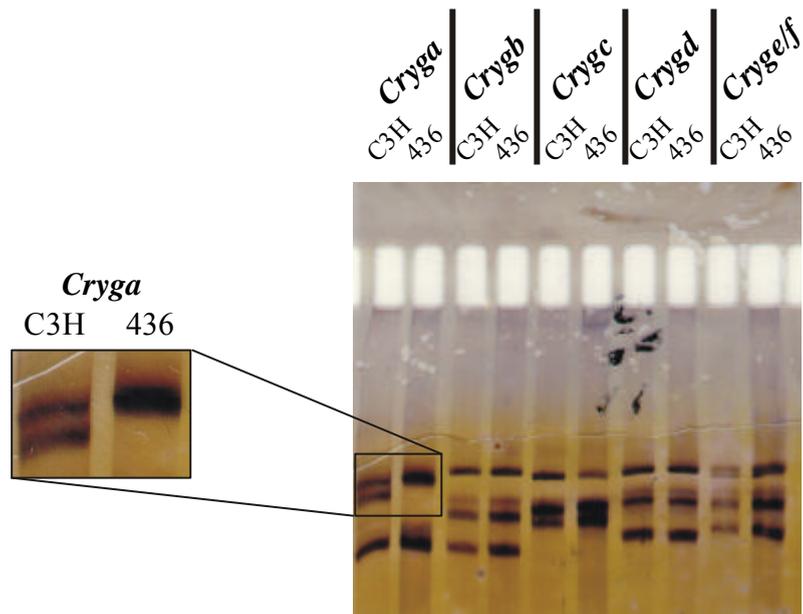


**Abbildung 4.3** **A** Augenlinse einer neugeborenen *Cryga*<sup>Neu</sup> Mutante (P1) im histologischen Schnitt (Methylenblau/Fuchsin Färbung). **B** Im Vergleich ist eine C3H Wildtyp-Augenlinse gezeigt.

Die Pfeilköpfe weisen auf den zentralen Kataraktkern. In diesem Linsenbereich sind nicht abgebaute Zellkerne sichtbar (Pfeile).

C = Cornea, L = Linse, LE = Linsenepithel LB = Linsenbogen, LFZ = Linsenfaserzellen

Zur molekularen Analyse der *ENU-436* Mutante wurden die *Cryg* Gene als Kandidaten für die Mutation getestet. Dazu wurden die cDNAs der  $\alpha$ -Kristalline in genspezifischen PCR-Reaktionen amplifiziert (4.2.1) und anschließend mit Hilfe der SSCP-Analyse (3.2.6) untersucht. Dabei wurde ein Unterschied zwischen den PCR-Produkten des Wildtyps (C3H) und der *ENU-436* Mutante in der cDNA des *Cryga* Gens festgestellt (Abb. 4.4.). Die cDNAs der übrigen  $\alpha$ -Kristalline waren in der SSCP-Analyse unverändert.



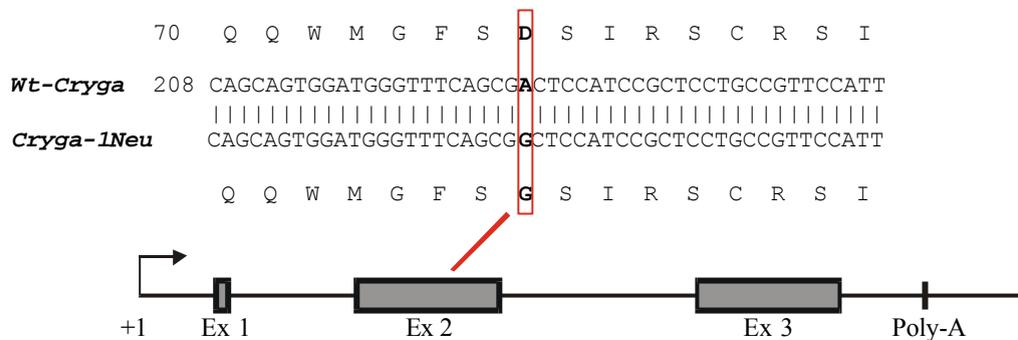
**Abbildung 4.4** SSCP-Analyse der *ENU-436* Kataraktmutante. Nichtdenaturierendes Acrylamidgel, gefärbt mit Silbernitrat. Aufgetragen wurden die denaturierten PCR-Produkte von  $\alpha$ -Kristallin cDNAs des Wildtyps (C3H) und der Mutante (436). Eine Bandenverschiebung, die auf einen Sequenzunterschied hindeutet, konnte nur in der *Cryga* cDNA festgestellt werden. Die Vergrößerung zeigt auf die Veränderung zwischen Wildtyp (2 Banden) und Kataraktmutante *ENU-436* (1 Bande).

Die in der SSCP-Analyse beobachtete Veränderung wurde, nach Klonierung der amplifizierten kompletten *Cryga* cDNA in den pCR2.1 Vektor, durch Sequenzierung genauer charakterisiert.

Dabei konnte eine Transition in der cDNA von A nach G an Position 230 der codierenden Sequenz im Exon 2 des *Cryga* Gens (Acc. Nr.: K02586) identifiziert werden (Abb. 4.5). Die Mutation in der Sequenz wurde durch die Untersuchung zweier verschiedener homozygoter *ENU-436* Tiere, in unabhängigen PCR-Reaktionen (4.2.1) und durch Sequenzierungen von genomischen DNA abgesichert. Die Transition an Position 230 wurde weder im C3H-Kontrollstamm, noch bei allen weiteren *Cat2* Mutanten nachgewiesen. Es wurden auch keine weiteren Unterschiede zwischen der C3H-Sequenz und der Mutantensequenz für den

codierenden Bereich des *Cryga* Gens gefunden. Jedoch wurde zur Genbank-Sequenz (Acc. Nr.: K02586) ein Sequenzunterschied gefunden, der unter 4.2.6 dargestellt ist.

Anhand der dargestellten Mutation im *Cryga* Gen wurde die mutante Mauslinie mit dem Allelsymbol *ENU-436* in *Cryga*<sup>1Neu</sup> umbenannt (Klopp et al., 1998).

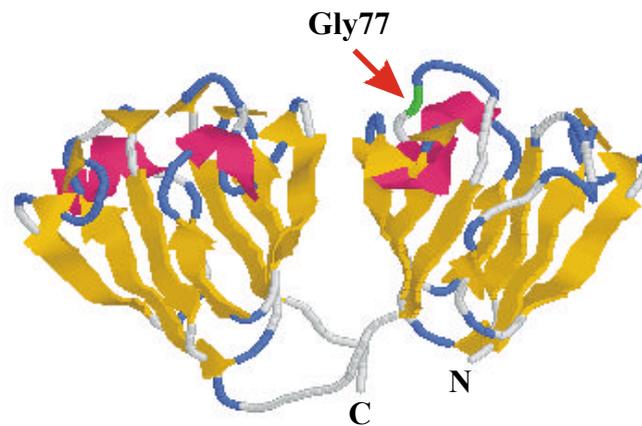


**Abbildung 4.5** Molekulare Analyse der *ENU-436/Cryga*<sup>1Neu</sup> Mutation.

Vergleich der DNA- und Aminosäuresequenzen von Wildtyp und Mutante. Die Transition A → G hat den Aminosäureaustausch Asp → Gly zur Folge. Die schematische Zeichnung zeigt die Lage der Mutation im Exon 2 des *Cryga* Gens.

Als Konsequenz des Basenpaaraustausches in der *Cryga*<sup>1Neu</sup> Mutante ergibt sich eine Veränderung an Aminosäure-Position 77 des A-Kristallinproteins. Dieser Austausch eines negativ geladenen Asparagins gegen ein neutrales Glycin (D77G) liegt an einer konservierten Stelle des Proteins (Anhang Abb. A1). Er befindet sich vor dem vierten  $\beta$ -Faltblatt (d2) im zweiten „Griechischen Schlüssel“ Motiv (Slingsby und Clout, 1999). Strukturell ist dieses der Übergang vom ersten zum zweiten „Griechischen Schlüssel“ des Proteins (Abb. 4.6). Computergestützte Vorhersagen zur Sekundärstruktur des mutierten Proteins mit dem zeigen eine Zunahme der Hydrophobizität mit dem Kyte & Doolittle Algorithmus (ExpASy Molecular Biology Server <http://www.expasy.ch>) an der veränderten Position. Der theoretische isoelektische Punkt nimmt von pH 7,0 für das Wildtyp A-Kristallin auf pH 7,5 zu. Dieses bedeutet eine veränderte Ladung des gesamten Proteins, was das Verhalten des A-Kristallins beeinflussen sein kann.

Das ausgetauschte Asparagin 77 gehört zu den stark konservierten negativ geladenen Aminosäuren in den  $\beta$ -Kristallinen (Norledge et al., 1997). Es ist bisher kein entsprechender Austausch in den  $\beta$ -Kristallinsequenzen der Säugetiere bekannt (Anhang Abb. A1). Die Konservierung der Aminosäure läßt auf wichtige eine Beteiligung an den Eigenschaften der  $\beta$ -Kristalline schließen.



**Abbildung 4.6** Strukturdarstellung des *Crya<sup>1Neu</sup>* Proteins nach Swiss-Modell (<http://www.expasy.ch>) mit RasMol 2.6. Die ausgetauschte Aminosäure (Glycin 77) ist grün markiert. Gelb =  $\beta$ -Faltblatt, Rot =  $\alpha$ -Helix, Blau = Loop

#### 4.2.2.2 Analyse der *Cryga<sup>tol</sup>* (*Cat2<sup>tol</sup>* / ENU-369) Mutante

Die ENU-369 Mutante wurde nach paternalen Behandlung mit ENU identifiziert. Sie ist durch eine totale Trübung der Augenlinse mit Vakuolisierungen charakterisiert (Ehling et al., 1982). Die Mutante wurde in einer Drei-Punkt Rückkreuzung mit 169 Tieren zwischen die Genorte *fuzzy* (*fz*) und *leaden* (*ln*) auf das Chromosom 1 der Maus in die Nähe des  $\beta$ -Kristallin-genclusters kartiert. Aufgrund ihrer Zugehörigkeit zur *Cat2* Kopplungsgruppe wurde sie in *Cat2<sup>tol</sup>* umbenannt (Everett et al., 1994).

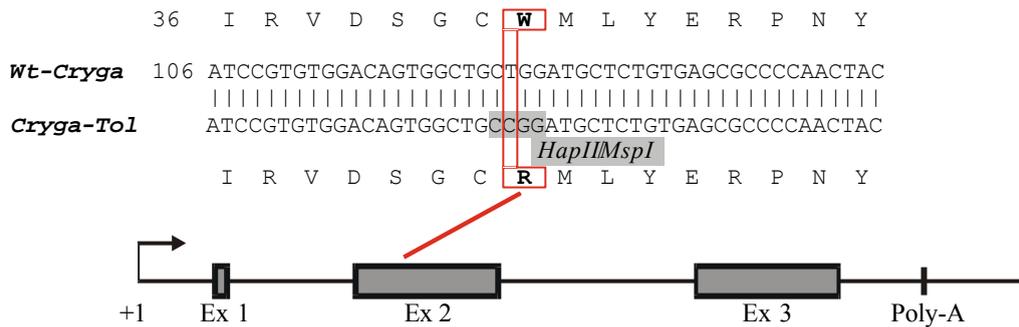
Zur molekularen Analyse der *Cat2<sup>tol</sup>* Mutante wurden die *Cryg* Gene als Kandidaten für die Mutation getestet. Es wurden dazu die cDNAs der  $\beta$ -Kristalline in genspezifischen PCR-Reaktionen amplifiziert (4.2.1) und sequenziert.

Dabei konnte eine Transition in der cDNA von T nach C an Position 127 der codierenden Sequenz im Exon 2 des *Cryga* Gens (Acc. Nr.: K02586) identifiziert werden (Abb. 4.7). Die Mutation in der Sequenz wurde durch die Untersuchung einer homozygoten *Cat2<sup>tol</sup>* Mutante mit einer genspezifisch PCR-Reaktion (4.2.1) und durch Sequenzierung von genomischer DNA abgesichert. Die Transition an Position 127 wurde weder im C3H Kontrollstamm, noch bei allen anderen *Cat2* Mutanten nachgewiesen. Weitere Sequenzunterschiede, die zum C3H-Kontrollstamm und zur Genbank gefunden wurden, sind unter 4.2.6 dargestellt. Die Mutation generiert eine neue *HpaII* Restriktionsschnittstelle (Restriktionsprodukte 308 bp und 121 bp)

(Abb. 4.7). Die Anwesenheit der neuen polymorphen Schnittstelle konnte in vier homozygoten Mutanten gezeigt werden. In sechs analysierten Wildtyp Inzuchtstämmen (C57Bl6, 129, C3H, Balb/c, DBA und JF1) fehlt die Schnittstelle (Abb. 4.8).

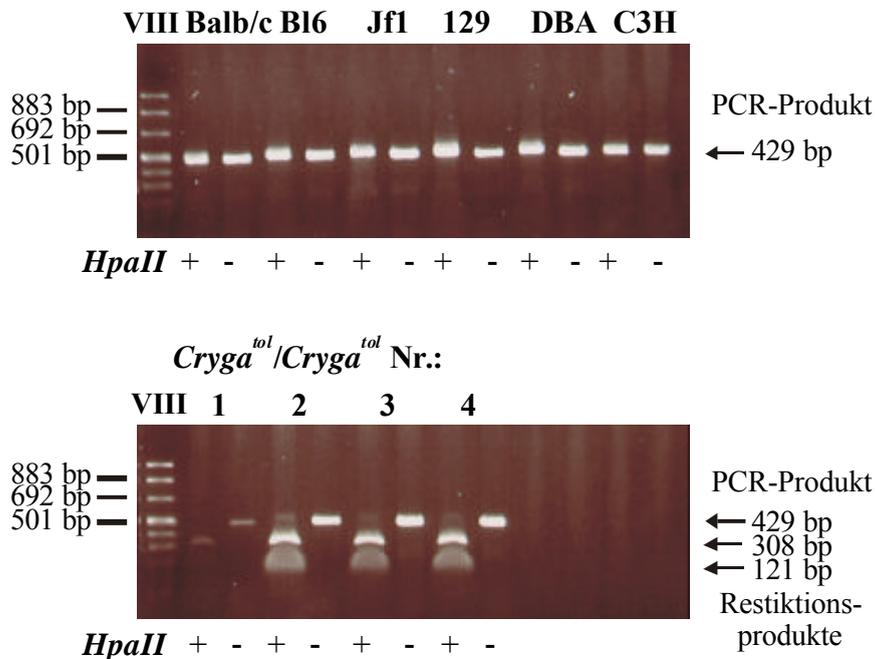
Anhand der dargestellten Mutation im *Cryga* Gen wird die mutante Mauslinie mit dem Allelsymbol *ENU-369/Cat2<sup>tol</sup>* in *Cryga<sup>tol</sup>* umbenannt.

Die T C Transistion hat den Aminosäureaustausch eines aromatischen Tryptophans an Position 43 gegen ein basisches Arginin (W43R) zur Folge (Abb. 4.7).



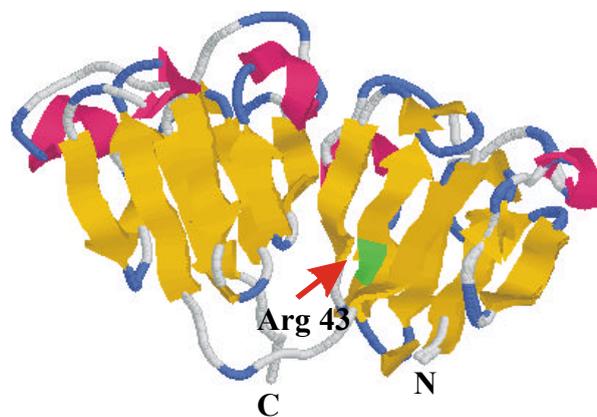
**Abbildung 4.7** Molekulare Analyse der *ENU-369/Cryga<sup>tol</sup>* Mutation.

Vergleich der DNA- und Aminosäuresequenzen von Wildtyp und Mutante. Die Transition T C hat den Aminosäureaustausch Trp Arg zur Folge. Die polymorphe *HpaII* Restriktionsschnittstelle ist grau unterlegt. Die schematische Zeichnung zeigt die Lage der Mutation im Exon 2 des *Cryga* Gens.



**Abbildung 4.8** Das Exon 2 des *Cryga* Gens wurde aus genomischer DNA amplifiziert (4.2.1). Die PCR Fragmente wurden auf einem Agarosegel (3.2.1) mit (+) oder ohne (-) *HpaII* Verdau analysiert. Die genomische DNA der Wildtyp-Stämme C57Bl6, 129, C3H, Balb/c, DBA und JF1, konnten nicht gespalten werden, jedoch DNA, die aus homozygoten *Cryga<sup>tol</sup>* Mutanten stammte.

Dieser Austausch eines aromatischen Tryptophans gegen ein basisches Arginin (W43R) liegt im ersten  $\beta$ -Faltblatt ( $\alpha 2$ ) des zweiten „Griechischen Schlüssels“ des  $\beta$ -A-Kristallinproteins (Abb. 4.9) (Slingsby und Clout, 1999). Das Tryptophan ist in allen  $\beta$ -Kristallinen der Maus (Graw et al., 1991), sowie bei Mensch, Ratte und Rind konserviert (Anhang Abb. A1). Computergestützte Vorhersagen zur Sekundärstruktur des mutierten Proteins mit Programmen des ExPASy Molecular Biology Servers (<http://www.expasy.ch>) zeigen eine Veränderung der  $\beta$ -Faltblattstruktur und der Hydrophobizität an der mutierten Position 43, mit Beeinflussung der  $\beta$ -Faltblattvorhersage über einen größeren Bereich (Position 39-50) erstrecken. Der theoretische isoelektrische Punkt verändert sich von pH 7,0 beim Wildtyp  $\beta$ -A-Kristallin auf pH 7,5 in dem mutierten Protein. Dieses bedeutet eine veränderte Ladung des gesamten Proteins, was sich vermutlich auf das Verhalten des  $\beta$ -A-Kristallins auswirkt. Aufgrund des Aminosäureaustausches (W43R) an einer konservierten Stelle des Proteins, der die Ladungsverhältnisse in einem  $\beta$ -Faltblatt, wie im gesamten Protein verändert, wird von einer Beeinträchtigung der Faltungseigenschaften des  $\beta$ -Kristallins durch die Mutation ausgegangen.



**Abbildung 4.9** Strukturdarstellung des *Crya<sup>tol</sup>* Proteins nach Swiss-Modell (<http://www.expasy.ch>) mit RasMol 2.6. Die ausgetauschte Aminosäure (Arginin 43) ist grün markiert. Gelb =  $\beta$ -Faltblatt, Rot =  $\alpha$ -Helix, Blau = Loop

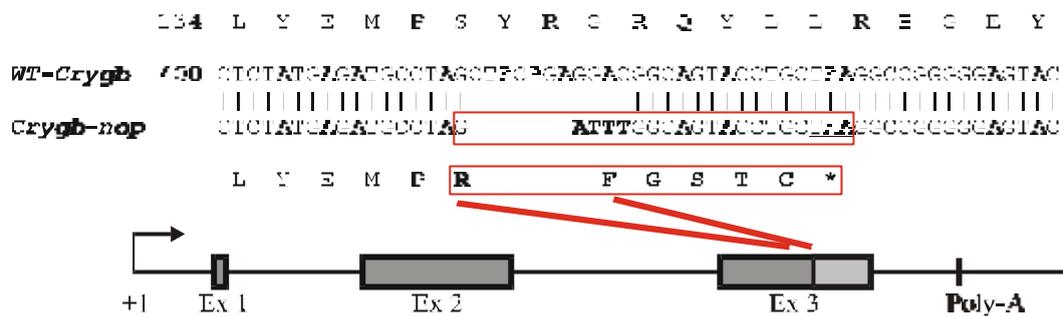
### 4.2.3 Analyse der *Crygb<sup>nop</sup>* (*Cat2<sup>nop</sup>*) Mutante

Die Mutante *Cat2<sup>nop</sup>* trat spontan in 102/ELxC3H/EL Mäusen auf (Graw et al., 1984). Sie hat homozygot eine starke zentrale Katarakt (Abb. 4.1.) und zeigt histologisch Vakuolisierungen, eine Degeneration der Faserzellen und einen unvollständigen Zellkernabbau im Kataraktkern. Der heterozygote Phänotyp ist etwas schwächer ausgeprägt. Es konnte für die Mutante eine reduzierte Menge an  $\beta$ -Kristallin Transkripten nachgewiesen werden (Graw et al., 1990b) (Santhiya et al., 1995). Aufgrund der Zuordnung der dominanten Mutante zu der *Cat2*-Kopplungsgruppe (Kratochvilova und Favor, 1992) und der Kartierung der Kopplungsgruppe in die Nähe des  $\beta$ -Kristallingenclusters (Everett et al., 1994), wurden diese als Kandidatengene für die Mutation getestet. Mit Hilfe von SSCP-Analyse und Sequenzierung konnte eine Mutation in der cDNA des *Crygb* Gens identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Mutation mit Hilfe genspezifischer Amplifikationen (4.2.1) auf genomischer Ebene bestätigt werden.

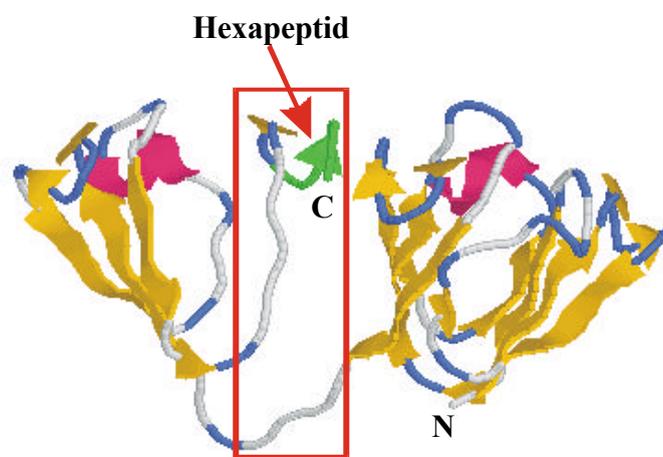
Im Exon 3 des *Crygb* Gens wurde eine Deletion von 11 Basenpaaren (Position 418-428 der codierenden Sequenz) (Acc. Nr.: Z22573) bei gleichzeitiger Insertion von 4 neuen Basenpaaren gefunden (Abb. 4.10). Die übrigen Sequenzen des dritten Exons des *Crygb* Gens entsprachen denen des C3H Wildtyps und denen der Datenbank (Acc. Nr.: Z22573).

Die Mutation führt zu einer Leserasterverschiebung, die ein vorzeitiges Stop-Codon im *Crygb* Gen zur Folge hat. Im Vergleich zum Wildtyp-Protein mit 175 Aminosäuren erfolgt ein Abbruch der Aminosäurekette bereits nach 144 Aminosäuren. Dem mutierten  $\beta$ -Kristallin-Protein fehlt somit der vierte „Griechische Schlüssel“. Dabei sind aber auch die Aminosäuren 139-144 gegenüber dem Wildtyp verändert (Abb. 4.11). Das neue entstandene Hexapeptid kann zur Herstellung eines spezifischen Antikörpers zur Erkennung des mutierten Proteins verwendet werden.

Die *Cat2<sup>nop</sup>* Mutante wurde anhand der Charakterisierung in *Crygb<sup>nop</sup>* umbenannt (Klopp et al., 1998).



**Abbildung 4.10** Molekulare Analyse der *Cat2<sup>nop</sup>/Crygb<sup>nop</sup>* Mutation. Vergleich der DNA- bzw. Aminosäuresequenzen von Wildtyp und Mutante. Die Deletion von 11 Basenpaaren und die Insertion von 4 neuen Basenpaaren führt zu einer Leserasterverschiebung. Das vorzeitige Stop-Codon (unterstrichen). Dieses hat den vorzeitigen Abbruch der Aminosäurekette nach 144 Aminosäuren zur Folge, wobei die Aminosäuren 139-144 in der Mutante gegenüber der Wildtyp-Sequenz verändert sind. Die schematische Zeichnung zeigt die Lage der Mutation im Exon 3 des *Crygb* Gens.



**Abbildung 4.11** Strukturdarstellung des *Cryb<sup>nop</sup>* Proteins nach Swiss-Modell (<http://www.expasy.ch>) mit RasMol 2.6. Das neu gebildete Hexapeptid ist grün markiert. Der Bereich in dem der vierte „Griechische Schlüssel“ fehlt, ist rot eingerahmt. Gelb = -Faltblatt, Rot = -Helix, Blau = Loop

#### 4.2.4 Mutationen im *Cryge* Gen der Maus

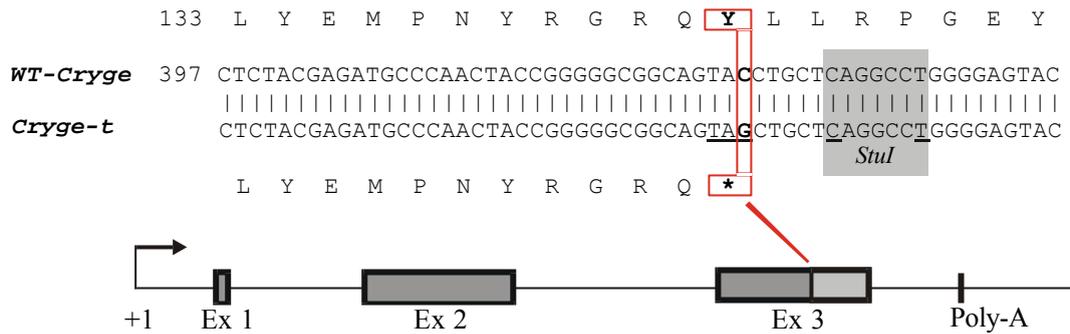
##### 4.2.4.1 Analyse der *Cryge*<sup>f</sup> (*Cat2*<sup>f</sup>) Mutante

Die *Cat2*<sup>f</sup> Mutante wurde in (102/ELxC3H/EL)F1 Mäusen nach paternaler Bestrahlung mit Röntgenstrahlung (2 x 5,1 Gy in einem 24h Intervall) gefunden (Graw et al., 1986). Sie ist durch eine starke Mikrophthalmie (Abb. 4.1) und eine vollständige Zerstörung der zellulären Organisation der Augenlinse charakterisiert. Dieser Phänotyp ist in homo- wie heterozygoten Mäusen gleich (Graw et al., 1990a) und stellt eine der stärksten Katarakte der *Cat2* Gruppe da. Die *Cat2*<sup>f</sup> Mutation wurde auf das Chromosom 1 der Maus zwischen die Genorte *fuzzy* und *leaden* kartiert (Everett et al., 1994). In einer Feinkartierung mit 338 Tieren wurde die Mutante in die Nähe des *Cryge* Gens (Abstand von 0,3±0,3 cM) lokalisiert (Löster et al., 1994). Hierbei wurde eine Rekombinate unter 338 Nachkommen zwischen einer stamm-spezifischen *StuI* Restriktionsschnittstelle in einem 335 bp PCR-Fragment, an der Position 438-444 des *Cryge* Gens (Abb. 4.6) und der *Cat2*<sup>f</sup> gefunden.

Zur molekularen Analyse der *Cat2*<sup>f</sup> Mutante wurden daher die *Cryg* Gene als Kandidaten für die Mutation getestet. Die SSCP-Analyse der  $\alpha$ -Kristallin cDNAs der Mutante zeigte keinen Unterschied zum Wildtyp. Jedoch wurde ein schwaches Signal für die *Crygef* cDNA beobachtet. Deshalb wurde die genomische DNA beider Gene spezifisch amplifiziert (4.2.1) und sequenziert. Im *Cryge* Gen wurde ein C G Basenpaaraustausch in Exon 3 an Position 432 der codierenden Sequenz (Acc. Nr.: X57855) identifiziert (Abb. 4.12.). Die Mutation wurde durch Untersuchung von vier homozygoten Tieren bestätigt. Die Transversion an Position 432 wurde weder im C3H Kontrollstamm, noch bei weiteren *Cat2* Mutanten nachgewiesen. Weitere Sequenzunterschiede die im *Crygf* Gen im Vergleich zum C3H Kontrollstamm, oder zur Genbank gefunden wurden, sind unter 4.2.6 dargestellt.

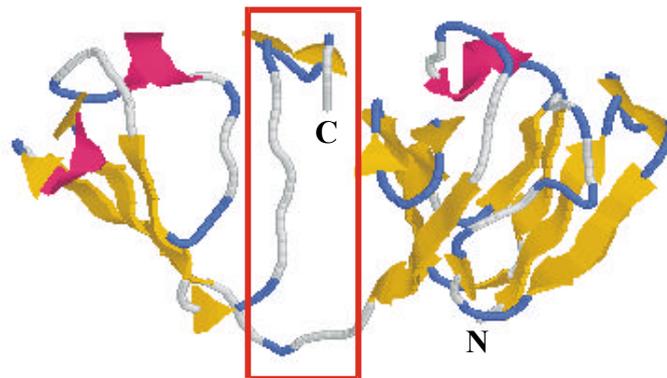
Die Transversion im Exon 3 des *Cryge* Gens erzeugt ein Stop-Codon im Leseraster der codierenden Sequenz, wodurch nach 143 Aminosäuren ein vorzeitiger Kettenabbruch und somit ein um 32 Aminosäuren verkürztes Protein vorhergesagt wird. Dieses führt zum Verlust des vierten „Griechischen Schlüssel“-Motivs im  $\alpha$ -E-Kristallin (Abb. 4.13).

Die *Cat2*<sup>f</sup> Mutante wurde nach der Zuordnung der Mutation zum  $\alpha$ -E-Kristallin Gen in *Cryge*<sup>f</sup> umbenannt (Klopp et al., 1998).



**Abbildung 4.12** Molekulare Analyse der *Cryge<sup>f</sup>* Mutation.

Vergleich der DNA- und Aminosäuresequenz von Wildtyp (C3H) und Mutante. Die Transversion C → G an Position 432 hat die Einführung eines vorzeitigen Stop-Codons (doppelt unterstrichen) im Leseraster zur Folge. Dieses führt zum Abbruch der Aminosäurekette nach 143 Aminosäuren. Die schematische Zeichnung zeigt die Lage der Mutation im Exon 3 des *Cryge* Gens. Die Position der *StuI* Schnittstelle ist grau unterlegt und die stammspezifischen Basenpaare sind unterstrichen.



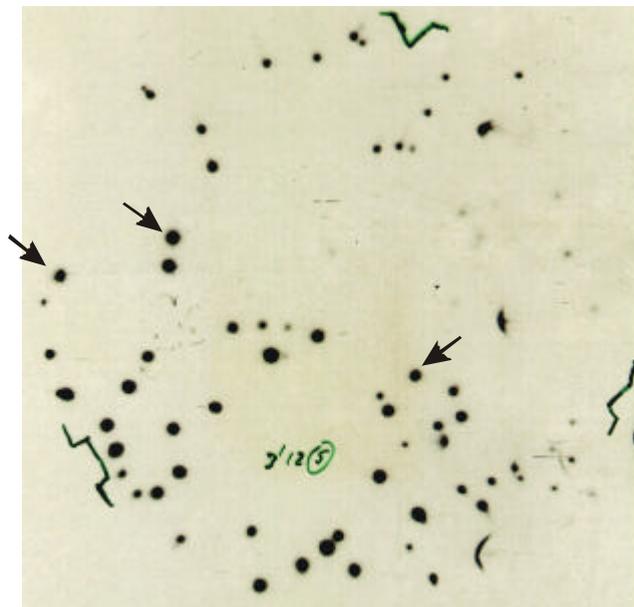
**Abbildung 4.13** Strukturdarstellung des *Cryge<sup>f</sup>* Proteins nach Swiss-Modell (<http://www.expasy.ch>) mit RasMol 2.6. Der Bereich, in dem der vierte „Griechische Schlüssel“ fehlt, ist rot eingerahmt. Gelb =  $\beta$ -Faltblatt, Rot =  $\alpha$ -Helix, Blau = Loop

#### 4.2.4.2 Analyse der *Cryge<sup>ns</sup>* (*Cat2<sup>ns</sup>*) Mutante

Die *Cryge<sup>ns</sup>* Mutante trat spontan in 102/ELxC3H/EL Mäusen auf (Graw et al., 1984). Der Phänotyp der homozygoten Mutanten ist durch eine starke Mikrophthalmie (Abb. 4.1) und Degeneration der Linsenfaserzellen charakterisiert. In heterozygoten Mäusen verursacht die Mutation eine anteriore Nahttrübung und die Schwellung des Linsenepithels. Daher ist die Ausprägung des Phänotyps dieser Mutante Gendosis-abhängig (Graw et al., 1989).

Die Mutante ist allelisch mit dem *Cat2/Cryg* Genort (Kratochvilova und Favor, 1992). Daher wurde zur molekularen Analyse der *Cat2<sup>ns</sup>* Mutante die *Cryg* Gene als Kandidaten für die Mutation getestet. Hierbei ist eine Deletion im Exon 3 des *Cryge* Gens (Acc. Nr.: X57855) identifiziert worden, deren Größe, bzw. dessen 3'-Ende bisher nicht näher bestimmt werden konnte (J. Graw, persönliche Mitteilung).

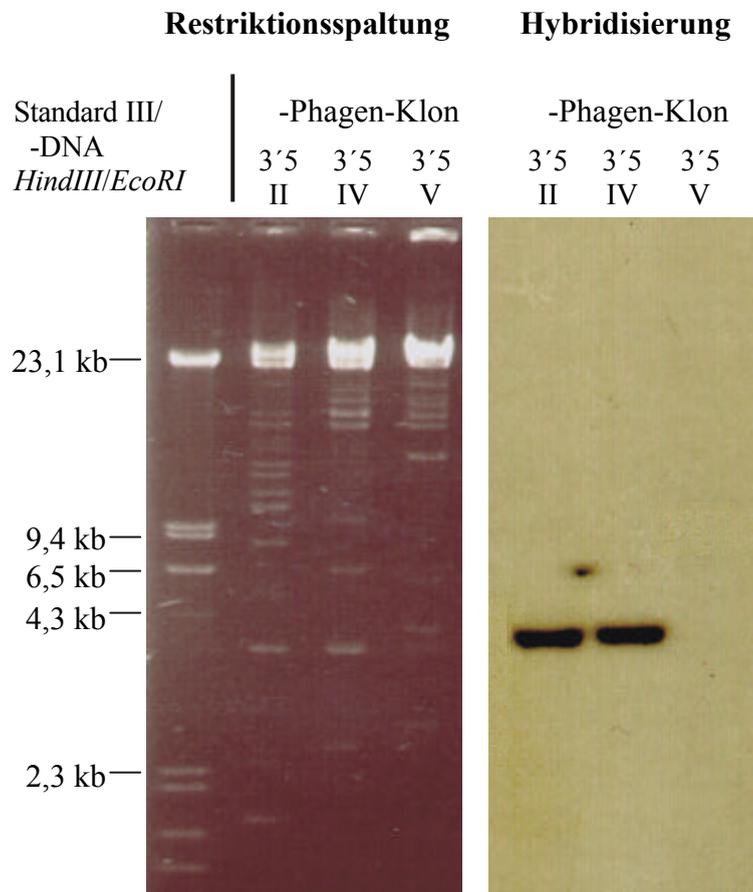
Aus dem 3'-untranslatierten Bereich des *Cryge* Gens standen für diese Bestimmung bisher auch für den Wildtyp keine ausreichenden Sequenzinformationen zur Verfügung. Daher wurde zunächst ein genomischer Plasmid-Subklon (PI-B1,5), der das Exon 3 des *Cryge* Gen trägt, sequenziert (Coban, 1990). So konnten zur Datenbank-Sequenz zusätzliche 981 bp aus diesem 3'-Bereich erhalten werden. Diese Sequenzinformation war jedoch nicht hinreichend, um die *Cryge<sup>ns</sup>* Deletion mittels PCR einzugrenzen. Weitere Sequenzinformationen wurden über das Durchmusterung einer genomischen Maus  $\lambda$ -Phagen Bank (3.2.8) erhalten. Dazu wurde ein 600 bp *XbaI/BamHI* Fragment aus den neuen 981 bp subkloniert und als Hybridisierungssonde im Southern-Blot eingesetzt (zur Übersicht Abb. 4.17). Es konnten drei positive  $\lambda$ -Phagen Klone nach 3 Selektionsrunden identifiziert werden.



**Abbildung 4.14** Durchmusterung einer genomischen  $\lambda$ -Phagen Bank.  
2. Selektionsrunde der Hybridisierung der  $\lambda$ -Phagen Bank mit einer Sonde aus dem 3'-Bereich des *Cryge* Gens. Die Pfeile zeigen auf positive Hybridisierungssignale.

Die identifizierten  $\lambda$ -Phagen-Klone wurden nochmals durch Southern-Blot rückgetestet. Dazu wurde die  $\lambda$ -Phagen-DNA mit dem Restriktionsenzym *XbaI* gespalten, im Agarosegel aufgetrennt und mit der 600 bp *XbaI/BamHI* Sonde hybridisiert. Zwei der drei  $\lambda$ -Phagen-Klone

zeigten positive Signale (Abb. 4.15) bei dieser Hybridisierung. So konnte ein 3 kb *XbaI*-Fragment identifiziert werden, das die vollständige *XbaI/BamHI* Sonde beinhaltet und somit im 3'-Bereich des *Cryge* Gens liegt. Dieses Fragment wurde in den Vektor pBluescript KS (Stratagene) über *XbaI*-Schnittstellen subkloniert (Plasmidklon: P2-X3).



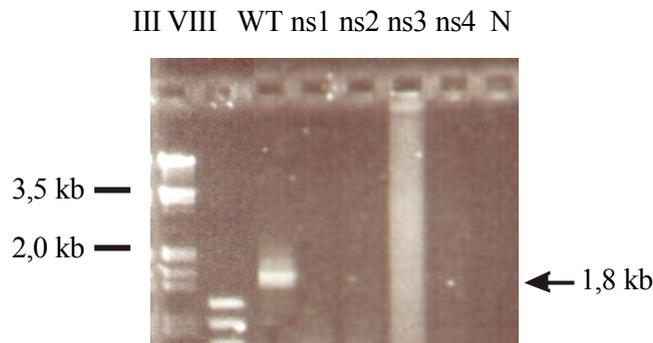
**Abbildung 4.15** Southern-Blot Analyse von drei -Phagen-Klonen.

Die DNA der -Phagen wurde mit *XbaI* gespalten und mit einer 600 bp *XbaI/BamHI* Sonde aus dem 3'-Bereich des *Cryge*-Gens hybridisiert. Bei zwei -Phagen Klonen wurde je ein 3 kb *XbaI*-Fragment detektiert.

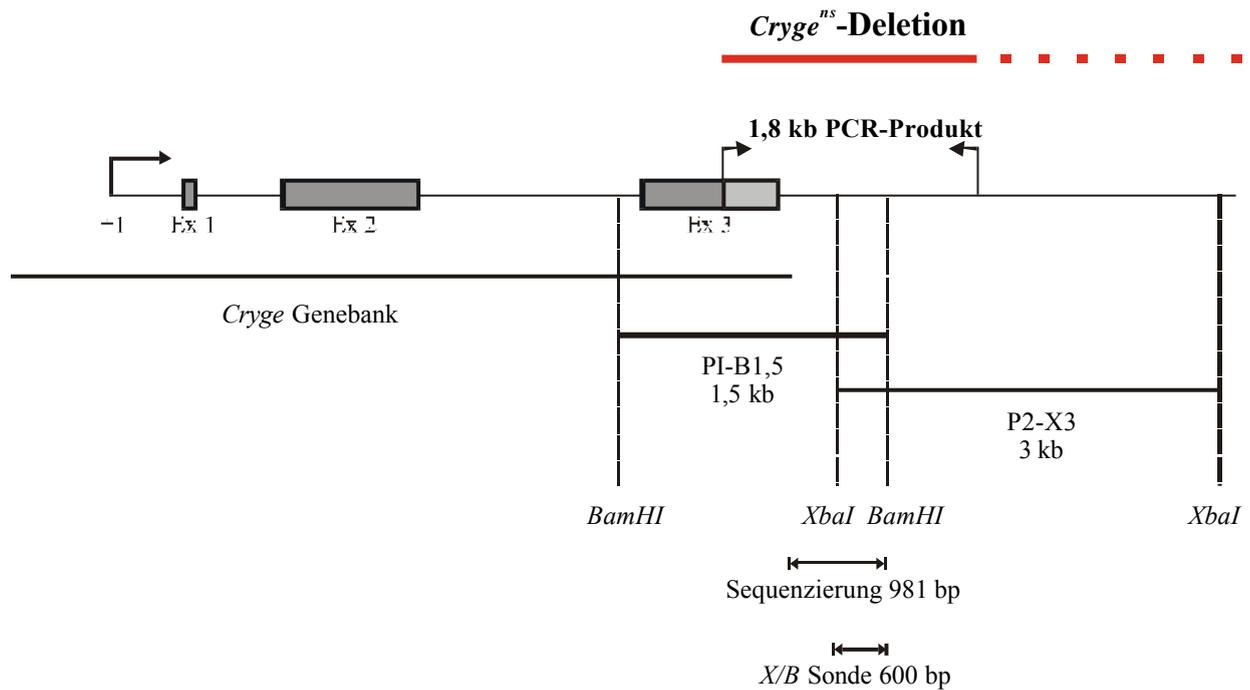
Das 3,0 kb Insert des P2-X3 Subklons wurde von beiden Seiten ansequenziert. Hierbei wurden die ursprünglichen 600 bp der Hybridisierungssonde wiedergefunden, d.h. 2,4 kb neue Sequenzinformation wurde durch die Klonierung erhalten. Die neue Sequenz der Maus weist eine hohe Homologie zum 3'-Bereich des *Cryge* Gens der Ratte (Acc. Nr.: M19359) auf, was ebenfalls die Zuverlässigkeit der neuen Sequenzinformation des P2-X3 Subklons belegt.

Mit den erhaltenen Sequenzen wurde die Untersuchung der *Cryge<sup>ns</sup>*-Deletion weitergeführt. Für PCR-Reaktionen wurden Primer gewählt, die 1,8 kb im 3'-Bereich amplifizieren sollten. Da in der PCR-Reaktion für den Wildtyp die gewünschte Bande nachgewiesen werden

konnte, für die Mutante jedoch nicht, muß die *Cryge<sup>ns</sup>*-Deletion größer als 1,8 kb sein. Der 3'-Bruchpunkt der Deletion konnte mit diesem Ansatz noch nicht bestimmt werden.



**Abbildung 4.16** PCR-Reaktion mit Primer aus dem 3'-Bereich des *Cryge* Gens. In einer PCR-Reaktionen mit Primern aus dem 3'-Bereich des *Cryge*-Gens konnte ein 1,8 kb Fragment für den Wildtyp amplifiziert werden. WT = genomische C3H-DNA; ns1-4 = genomische DNA aus 4 verschiedenen *Cryge<sup>ns</sup>* Mutanten; N = Negativkontrolle



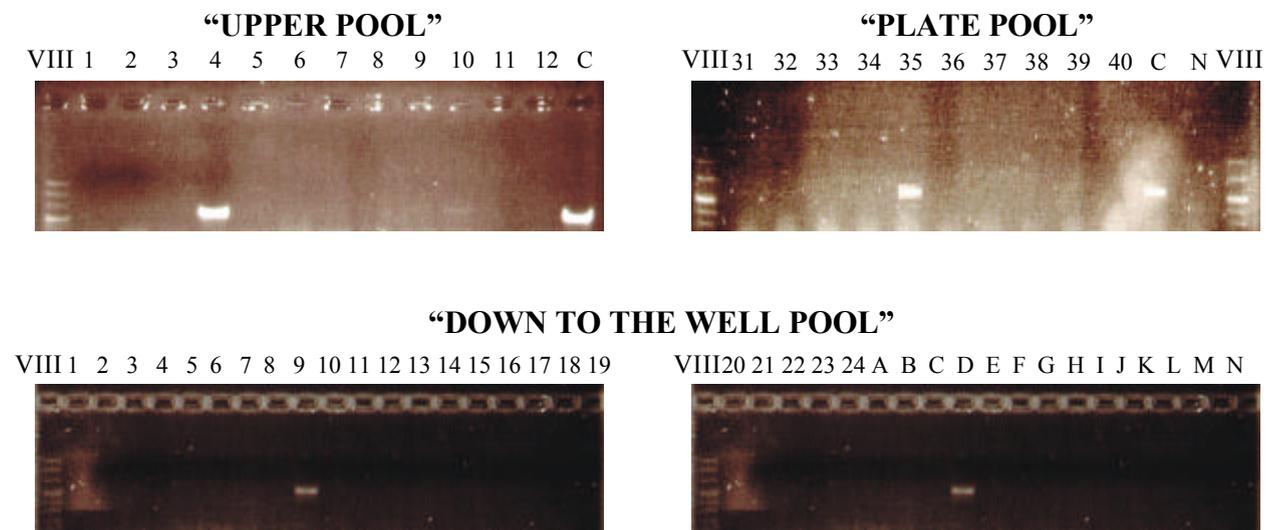
**Abbildung 4.17** Charakterisierung der *Cryge<sup>ns</sup>* Deletion. Die schematische Zeichnung zeigt die Lage der Deletion (rot) im Exon 3 und im 3'-Bereich des *Cryge* Gens und das amplifizierte 1,8 kb PCR-Produkt aus dieser Region. Unterhalb des genomischen Schemas sind die isolierten genomischen Klone (PI-B1,5 und P2-X3) und das *Cryge* nach Genebank (Acc. Nr.: X57855) dargestellt. Ebenfalls ist die Sequenzierung und die generierte *Xba*I/*Bam*HI Sonde die zur Isolierung des P2-X3 Klons verwendet wurde, eingezeichnet.

Die 3'-Region des *Cryge*-Bereichs war durch  $\lambda$ -Phagen noch nicht ausreichend charakterisiert, um den Gendefekt in der *Cryge<sup>ns</sup>* Mutante genau zu analysieren. Um weiterreichende

3'-Sequenzinformationen zu erhalten, wurden größere genomische BAC-Klone für diese Region gesucht. Ziel war auch, die vollständige Sequenzinformation über den gesamten *Cryg* Gencluster in einem BAC-Contig zur Verfügung zu haben für z.B. die Untersuchung der Lage der *Cryg* Gene der Maus zueinander.

Im Folgenden ist die Identifikation von BAC-Klonen aus einer Bank, die Inserts genomischer Maus DNA enthält (2.10), für die *Cryg* Region dargestellt.

Zur Identifizierung von BAC-Klonen wurde eine Bank der Firma Genome Systems DOWN TO THE WELL™ durchsucht (3.2.8). Die Suche wurde mit PCR-Reaktionen durchgeführt, in denen das *Cryga* Exon 3 und das *Crygf* Exon 1-2 amplifiziert wurde (4.2.1). Beispielhaft zeigt Abb. 4.18 PCR-Produkte für die Suche nach einem BAC-Klon, der das *Cryga* Exon 3 trägt.



**Abbildung 4.18** PCR-Suche nach einem für das *Cryga* Exon 3 positiven BAC-Klon.

Suche im „UPPER POOL“, Nr. 4 positiv Platten 31-40; „PLATE POOL“, Nr. 35 positiv Platte 35; „DOWN TO THE WELL“, Koordinaten Nr. 9 und D positiv Well 9 D:

BAC-Koordinaten = **35 9 D**

C = positiv Kontrolle (genomische C3H DNA); N = negativ Kontrolle; VIII = Standard VIII

Mit den PCR-Reaktionen konnten fünf Klone für die verschiedenen -Kristallingene identifiziert werden. Diese sind die in Tab. 4.1 aufgeführt. Für den BAC-Klon 179J war es trotz mehrmaliger Wiederholung der PCR-Reaktion nicht möglich, die vollständigen Koordinaten festzustellen.

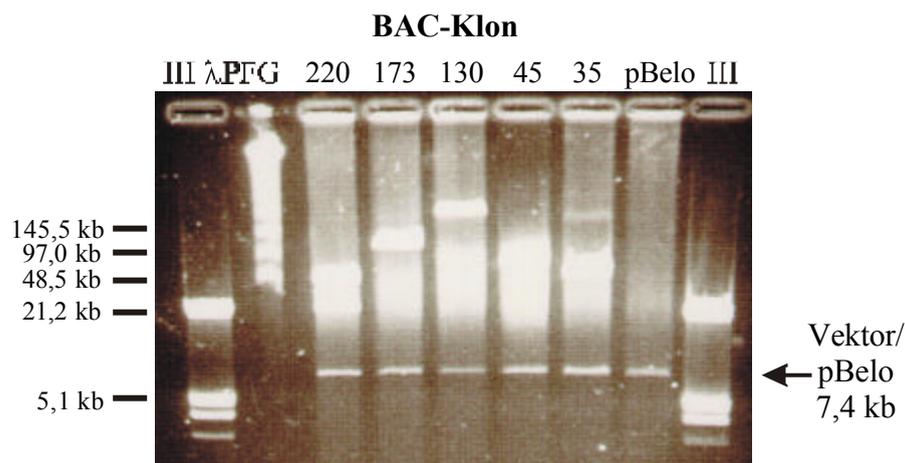
Für die Ratte ist gezeigt worden, daß alle -Kristallin Gene, bis auf das F-Kristallin Gen, in einem geschlossen Cluster liegen (den Dunnen et al., 1989). Es wurde daher geprüft, ob die Inserts der hier identifizierten BAC-Klone und damit die entsprechende genomische DNA der Maus neben *Cryga* und *Crygf* ebenfalls *Crygb* und *Cryge* tragen. Dazu wurden Exon 3 des

*Crygb* und Exon 1-2 des *Cryge* Gens durch PCR-Reaktion amplifiziert (4.2.1). Nur der über das *Cryga* Exon 3 PCR identifizierte BAC-Klon 35D9 war in diesem Test positiv.

**Tabelle 4.1** BAC-Klone, die über die aufgeführten PCR-Produkte identifiziert wurden.

| PCR-Amplifikate       | BAC-Klon Koordinaten       |
|-----------------------|----------------------------|
| <i>Crygf</i> Exon 1-2 | 45O6, 130G4, 173H21, 220P7 |
| <i>Cryga</i> Exon 3   | 35D9                       |

Die weitere Charakterisierung der identifizierten BAC-Klone schloß die Ermittlung der Größen der genomischen DNA Inserts ein. Dadurch ist die Bestimmung der Länge des *Cryg* Genintervalls möglich. Die Inserts wurden in einer *NotI* Restriktionsspaltung aus den Vektoren geschnitten und in einer Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) aufgetrennt (3.2.1).



**Abbildung 4.19** Größenbestimmung von BAC-Inserts. PFGE-Auftrennung von BAC-DNA nach *NotI*-Restriktionsverdau. Nach der Spaltung sind die Vektorbanden (7,4 kb) und die Inserts im Gel deutlich voneinander getrennt, so daß die Größen der Inserts leicht abgeschätzt werden können.

III = Standard III/ -DNA, PFG = -PFG Standard

**Tabelle 4.2** Ergebnis der BAC Größenbestimmung.

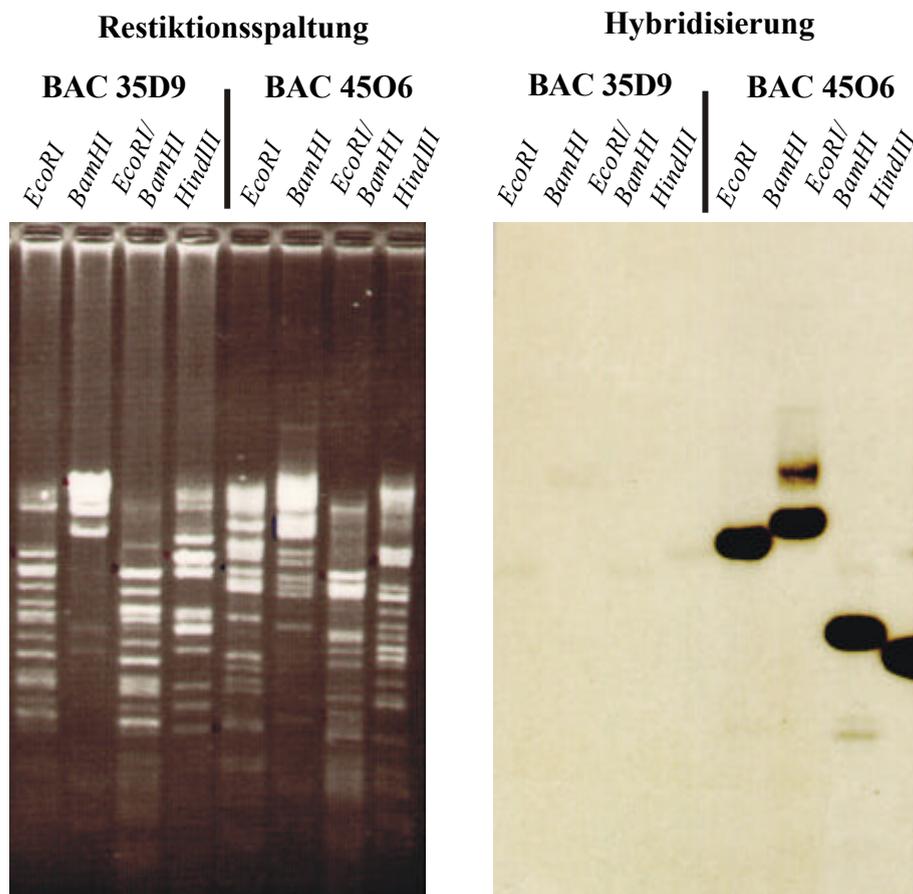
| BAC-Klon   | 45O6 | 130G4 | 173H21 | 220P7 | 35D9 |
|------------|------|-------|--------|-------|------|
| Größe (kb) | 100  | 200   | 100    | 70    | 100  |

Da die für *Crygf* Exon 1-2 positiven BAC- Klone (45O6, 130G4, 173H21 und 220P7) für die übrigen *Cryg* Gene negativ sind (s.u.) und die Klone eine Größe zwischen 70 und 200 kb haben, ist anzunehmen, daß das *Crygf* Gen in der Maus weiter als 25 kb, wie für die Ratte

gezeigt, vom A-E Kristallingencluster entfernt liegt (den Dunnen et al., 1989). Dieses bestätigt die Annahmen über die Größe und die genomische Struktur des  $\gamma$ -Kristallingenclusters der Maus von Quinlan et al., 1987.

Die Identität der nach dem Durchmustern von der Firma Genome Systems angeforderten BAC-Klone wurden mit einer weiteren Analysemethode überprüft. Da die BAC-Klone mit PCR-Reaktionen identifiziert wurden, bot sich die Überprüfung durch Hybridisierung (Southern-Blot) an. Als Sonde wurde das gesamte Exon 3 des *Cryge* Gens verwendet. Diese sollte, aufgrund der stark konservierten Sequenzhomologien, alle  $\gamma$ -Kristalline erkennen.

Mit dieser Sonde konnte ein Hybridisierungssignal auf dem BAC-Klon 4506 gefunden werden. Das bedeutet, daß zwar ein BAC-Klon positiv für ein  $\gamma$ -Kristallin war. Mit dem einzigem, in der PCR-Reaktion für *Cryga*, *Crygb* und *Cryge* positiven BAC-Klon (35D9) konnte jedoch keine Hybridisierung nachgewiesen werden.



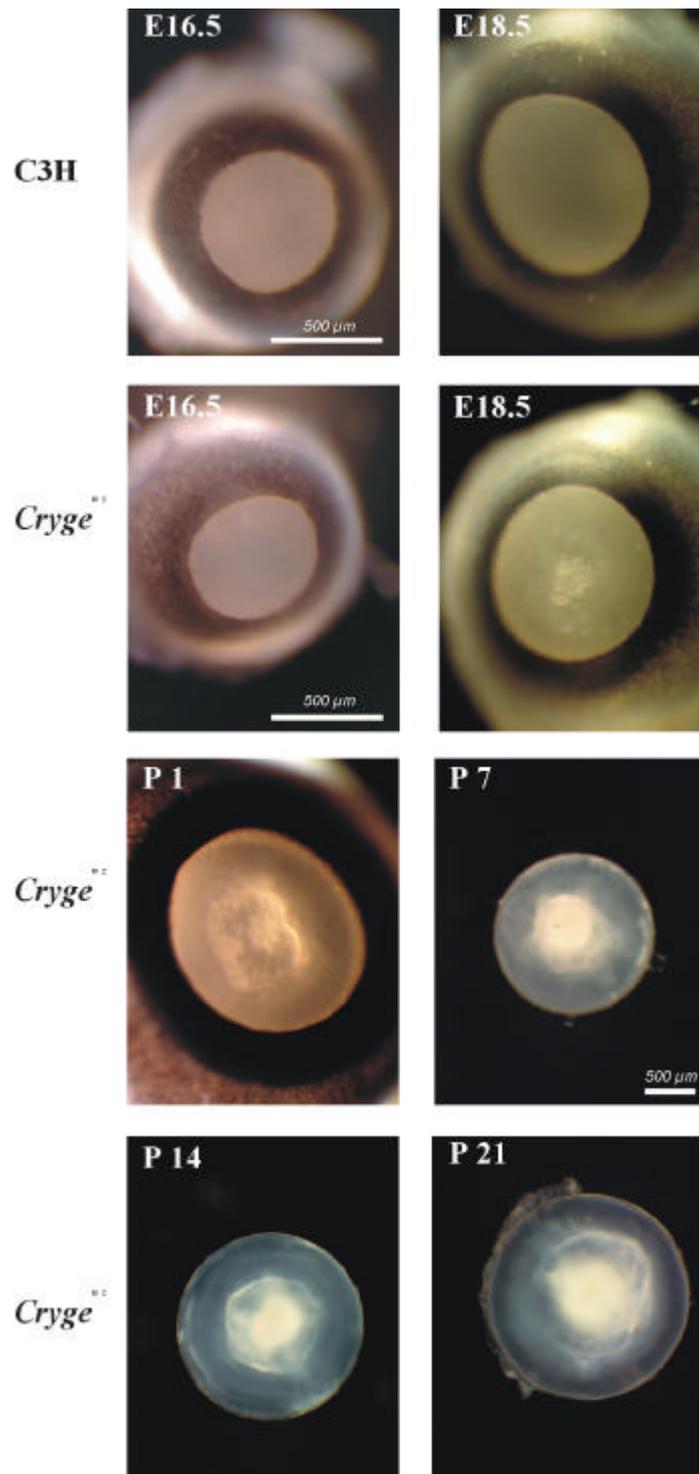
**Abbildung 4.20** Southern-Blot Analyse zweier BAC-Klone. Die BAC-Klone 35D9 und 4506 wurden durch Hybridisierung mit *Cryge* Exon 3 DNA getestet. Nur der BAC-Klon 4506 zeigte positive Signale.

Nach dem Ergebnis des Southern-Blots wurde die BAC-Klon DNA nochmals mittels PCR-Reaktion, wie unter 4.2.1 beschrieben, überprüft. Der gesendete Klon 35D9 war hier für keine der *Cryg* PCR-Reaktionen positiv. Damit stand aus dieser Bank kein BAC-Klon zur Verfügung, der das gesamte  $\gamma$ -Kristallingencluster repräsentiert. Die BAC-Klone 45O6 130G4, 173H21 und 220P7 tragen nur das *Crygf* Gen.

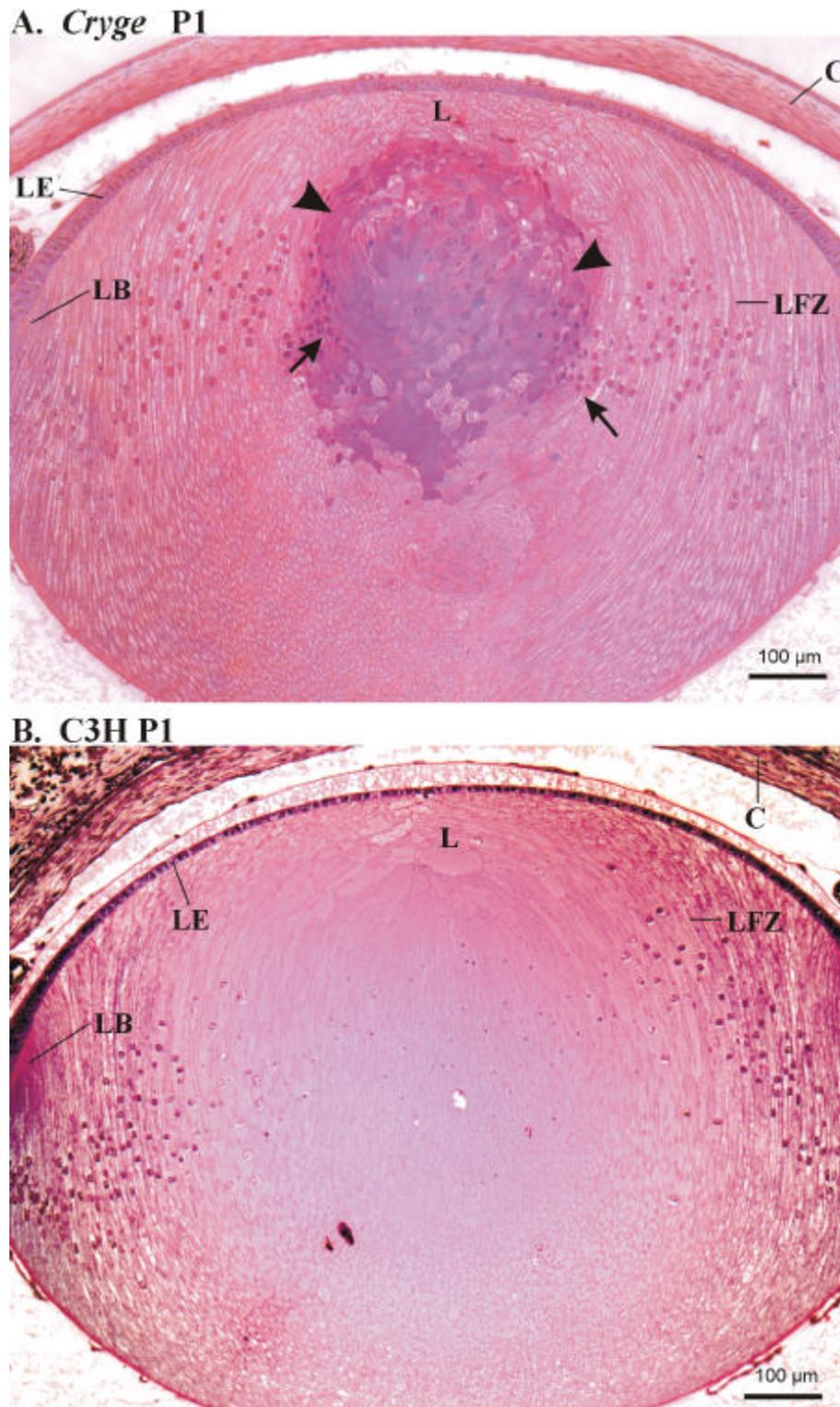
#### 4.2.4.3 Charakterisierung der *Cryge*<sup>nz</sup> (*Cat2*<sup>nz</sup>) Mutante

Die *Cat2*<sup>nz</sup> Mutante wurde nach paterntaler Behandlung von 102/ELxC3H/EL Mäusen mit 2 \*4,55 Gy <sup>137</sup>Cs -Strahlung in einem 24 h Intervall gefunden (Kratochvilova und Ehling, 1979). In einem Allelie-Test wurde die Mutante der *Cat2* Kopplungsgruppe zugeordnet (Kratochvilova und Favor, 1992). In einer Kopplungsanalyse mit 88 Tieren konnte die *Cat2*<sup>nz</sup> Mutante zwischen die Marker *fuzzy* (*fz*) und *leaden* (*ln*) auf Chromosom 1 der Maus in die Nähe des  $\gamma$ -Kristallinclusters kartiert werden (Löster et al., 1994).

Morphologisch sind die Augen der *Cat2*<sup>nz</sup> bis zum Embryonalstadium E 16.5 nicht vom Wildtyp zu unterscheiden (Abb. 4.21). Die Entwicklung der Katarakt beginnt um den Tag E 18.5 mit vielen kleinen Trübungskernen in der Mitte der Augenlinse. Die Kataraktentwicklung verläuft progressiv, so daß sich 3 Wochen nach der Geburt eine starke zentrale Katarakt ausgebildet hat. Mit diesem Phänotyp ist auch eine leichte Mikrophthalmie (4.1) und eine Desorganisation der Linsenfasern verbunden.



**Abbildung 4.21** Morphologische Entwicklung der *Cryge*<sup>nz</sup> Katarakt. In der *Cat2*<sup>nz</sup> Mutante beginnt die Entwicklung der Katarakt mit E 18.5. Drei Wochen nach der Geburt ist die Kataraktentwicklung mit der Ausbildung einer starken zentralen Katarakt abgeschlossen.



**Abbildung 4.22** A Augenlinse einer neugeborenen *Cryge*<sup>nz</sup> Mutante (P1) im histologischen Schnitt (Methylenblau/Fuchsin Färbung). B Im Vergleich ist eine Wildtyp-Augenlinse (C3H) gezeigt. Die Pfeilköpfe weisen auf den zentralen Kataraktkern hin. Im diesem Linsenbereich sind nicht abgebaute Zellkerne sichtbar (Pfeile).  
C = Cornea, L = Augenlinse, LE = Linsenepithel, LB = Linsbogen, LFZ = Linsenfaserzellen

Die Katarakt der *Cat2<sup>nz</sup>* Mutante ist nach der Geburt (P1) deutlich manifestiert. Auf histologischen Schnitten (Abb. 4.22) ist der anteriore Kataraktkern in der Linse gut erkennbar. Die morphologische Trübung in diesem Bereich stellt sich in Schnitten als Auflösung der normalen Strukturen der Linsenfaser dar. Die Zerstörung der zentralen Linsenfaser hat das Auslaufen des Zellmaterials zur Folge. Die übrigen Faserzellen der Augenlinse sind angeschwollen, der Linsenbogen und das anteriore Linsenepithel erscheinen unverändert.

Die degenerativen Vorgänge in den Faserzellen haben einen deutlichen Effekt auf die Differenzierung der Augenlinse. Neben der Zerstörung der Struktur im Zentrum der Augenlinse ist eine unvollständige Degradierung der Zellkerne von Linsenfaserzellen zu beobachten. Im Gegensatz zum C3H Wildtypstamm sind in der *Cat2<sup>nz</sup>* Mutante noch Zellkerne im zentralen Bereich der Augenlinse sichtbar. Die Zellkerne in der Mutante liegen mehr anterior als in der Wildtyp Augenlinse, was auf eine veränderte Elongation und Lage der Linsenfaserzellen zueinander zurückzuführen ist. Der unvollständige Zellkernabbau deutet auf eine gestörte terminale Differenzierung der Linsenfaserzellen hin, bei der die apoptotischen Prozesse nicht komplett abgeschlossen werden können.

Die veränderte Differenzierung, sowie die degenerativen Vorgänge in den Linsenfaserzellen führen zu Wachstumsstörungen und Mikrophthalmie des Auges.

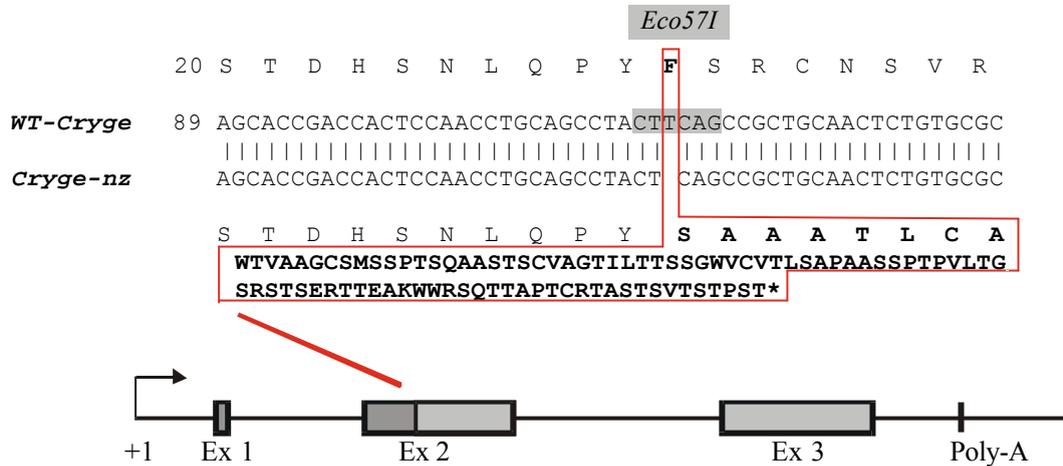
Zur molekularen Analyse der *Cat2<sup>nz</sup>* Mutante wurden die *Cryg* Gene als Kandidatengene getestet. Dazu wurden alle  $\alpha$ -Kristallin cDNAs in genomischen Fragmente in genspezifischen PCR-Reaktionen amplifiziert (4.2.1) und anschließend sequenziert. Hierbei konnte die Deletion eines Thymidins im Exon 2 des *Cryge* Genes (Acc. Nr.: X57855) an Position 89 der codierenden Sequenz identifiziert werden (Abb. 4.23). Die Mutation konnte in der genomischen DNA von vier verschiedenen Tieren bestätigt werden. Die Deletion an Position 89 wurde weder im C3H Kontrollstamm, noch bei allen weiteren untersuchten *Cat2* Mutanten nachgewiesen. Andere im Vergleich zum C3H Kontrollstamm wie zur Genbank die in den  $\alpha$ -Kristallinen gefunden Sequenzunterschiede sind unter 4.2.6 dargestellt.

Die Mutation zerstört eine *Eco57I* Restriktionsschnittstelle (Abb. 4.24). Der Verlust der *Eco57I* Schnittstelle ist in Abb. 4.23 dargestellt. In fünf homozygoten Mutanten fehlt die Schnittstelle, wohingegen sie in sechs verschiedenen hier getesteten Wildtyp Stämmen (C57Bl6, 129, C3H, Balb/c, DBA und JF1) noch anwesend ist (Restriktionsprodukte 491 bp und 173 bp).

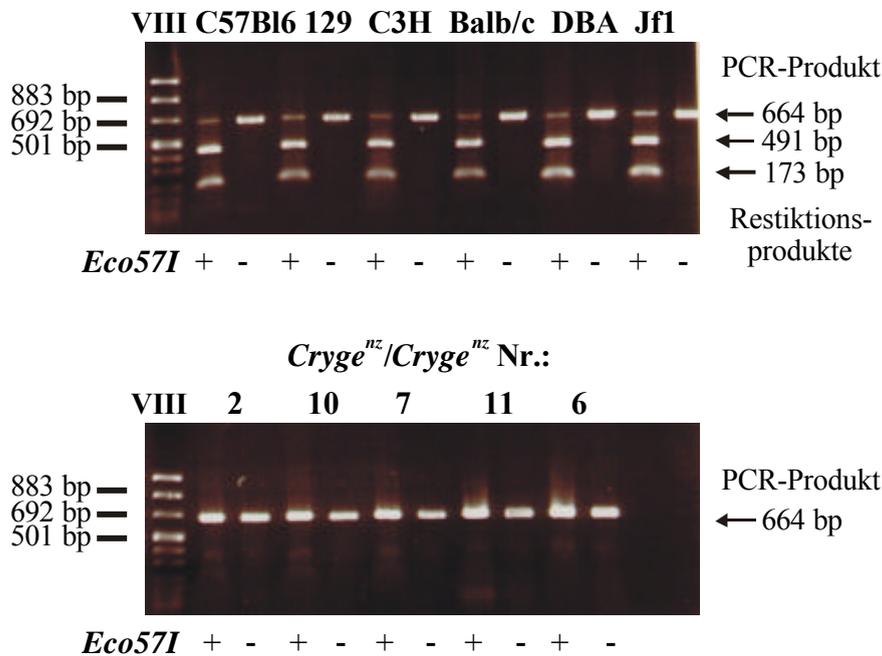
Die Deletion des Thymidins im 3'-Bereich des Exons 2 führt zu einer Leserasterverschiebung. Das anhand der mutierten DNA-Sequenz theoretisch resultierende Protein besteht N-terminal

aus dem Wildtyp E-Kristallin (29 Aminosäuren) und C-terminal aus 96 Aminosäuren, die keine Sequenzähnlichkeit mit dem E-Kristallin haben (Abb. 4.23).

Die *Cat2<sup>nz</sup>* Mutante wurde entsprechend der neuen Nomenklatur für die *Cat2* Mutanten in *Cryge<sup>nz</sup>* umbenannt (Klopp et al., 2000).

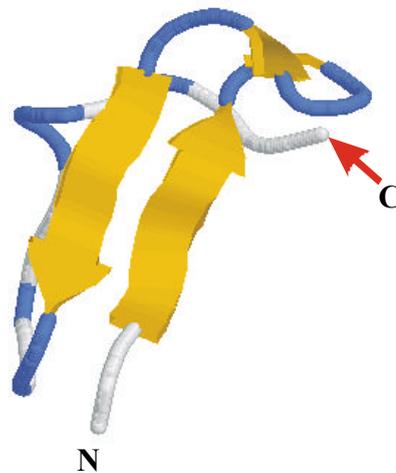


**Abbildung 4.23** Molekulare Analyse der *Cryge<sup>nz</sup>* Mutation. Vergleich zwischen von Wildtyp und Mutanten DNA- und Aminosäuresequenz. Die schematische Zeichnung zeigt die Lage der Mutation im Exon 2 des *Cryge* Gens. Die Deletion eines Thymidins hat die Verschiebung des Leserasters und die Zerstörung einer *EcoR57I* Restriktionsschnittstelle (grau unterlegt) zur Folge. Die mutierte DNA-Sequenz codiert für eine Peptidkette von 96 Aminosäuren.



**Abbildung 4.24** Das Exon 2 des *Cryge* Gens wurde aus genomischer DNA amplifiziert (4.2.1). Die PCR Fragmente wurden auf einem Agarosegel (3.2.1) mit (+) oder ohne (-) *EcoR57I* Verdau analysiert. Die genomische DNA der Wildtyp-Stämme (C57Bl6, 129, C3H, Balb/c, DBA und JF1) konnten gespalten werden (491 bp und 173 bp Produkt), jedoch nicht die DNA homozygoter *Cryge<sup>nz</sup>* Mutanten. Nach Angaben der Hersteller (MBI Fermentas) ist die Spaltung von DNA mit *EcoR57I* nie komplett.

Das abgeleitete E-Kristallin in der *Cryge*<sup>nz</sup> Mutante besteht aus 125 Aminosäuren und enthält noch die Wildtyp Proteinsequenz für die ersten drei  $\alpha$ -Faltblätter ( $\alpha 1$ - $\alpha 3$ ). Diese reichen nach der Strukturvorhersage mittels SwissModel 2.0 nicht für die Ausbildung des „Griechischen Schlüssel“-Motivs aus (Abb. 4.25). Die neue Peptidkette aus 96 Aminosäuren, die durch die Leserasterverschiebung entsteht, weist keine Homologien zu bekannten Proteinen in Datenbanken auf. Somit ist keine auf Homologien beruhende Vorhersage der Tertiärstruktur möglich. Das mutierte Protein hat ein kalkuliertes Molekulargewicht von 13 kDa und einen theoretischen isoelektrischen Punkt von pH 8,4 ( das Wildtyp E-Kristallin hat ein Molekulargewicht von 21 kDa und einen theoretischen isoelektrischen Punkt von pH 7,1). Computer gestützte Analysen zeigen aufgrund der Anwesenheit von 20 Serin und 21 Threonin Aminosäuren verschiedene potentielle Phosphorylierungsstellen für die Caseinkinase I und II, sowie für Proteinkinase A und Proteinkinase C (Programm: PROSITE <http://www.expasy.ch>). Die Analyse der Hydrophobizität des mutierten Proteins mit dem Kyte-Doolittle Algorithmus (<http://www.expasy.ch>) zeigt zwei hydrophobe Regionen (Anhang Abb. A2), die als Membran durchspannende Regionen angesehen werden können. Vorhersagen mit dem TMpred, wie dem TopPred2 Programm stellen ein Modell dar, in dem der N-Terminus im Cytosol zu finden ist, die erste Transmembran Domäne (Aminosäure 31-47) von innen nach außen und die zweite Transmembran Domäne (Aminosäure von 49-73) von außen nach innen verläuft. Das GOR4 Sekundärstruktur Vorhersage Programm (Garnier et al., 1996) berechnet eine  $\alpha$ -helikale Region (Aminosäure 49-73) für die erste angenommene N-terminale Transmembran Domäne. Für die übrigen Regionen wird angenommen, daß sie als random coil (57%) oder  $\beta$ -Faltblatt vorliegen.



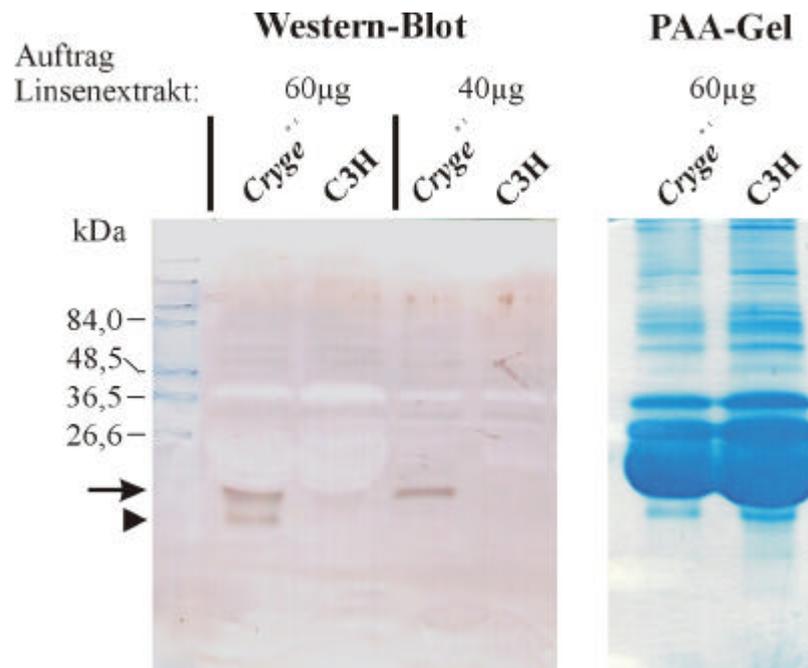
**Abbildung 4.25** Strukturdarstellung der ersten 29 Aminosäuren des *Cryge*<sup>nz</sup> Proteins nach Swiss-Modell (<http://www.expasy.ch>) mit RasMol 2.6. Drei  $\beta$ -Faltblätter des E-Kristallins werden nach der Vorhersage ausgebildet.

Gelb=  $\beta$ -Faltblatt, Rot=  $\alpha$ -Helix, Blau= Drehung

Experimentell wurde untersucht, ob das mutierte Protein in der Augenlinse der Mutante synthetisiert wird und wie stabil dieses Protein ist. Für den Nachweis des Proteins wurde kommerziell (Sigma-Genosys, London) in Kaninchen ein polyklonales Antiserum gegen eine hydrophile Domäne des Proteins, Aminosäure 91-105 (Anhang Abb. A2) hergestellt. Das Antiserum wurde im Western-Blot zur Untersuchung von wasserlöslichen Linsenextrakten aus *Cryge*<sup>nz</sup> und Wildtyp Mäusen verwendet (Abb. 4.26).

Für das mutierte E-Kristallin wird ein kalkuliertes Molekulargewicht von etwa 13,0 kDa erwartet. Im Linsenextrakt der *Cryge*<sup>nz</sup> Mutante konnte eine Proteinbande der Größe des mutierten Proteins (13 kDa) spezifisch nachgewiesen werden. Somit wurde gezeigt, daß das vorhergesagte mutierte E-Kristallin in der Augenlinse der Mutante tatsächlich exprimiert und synthetisiert wird.

Zusätzlich ist im Western-Blot eine zweite Bande bei 10 kDa, im 60  $\mu$ g Auftrag, unterhalb der mutanten Proteinbande sichtbar. Dieses läßt auf einen Abbau des mutierten E-Kristallins schließen.



**Abbildung 4.26** Western-Blot Analyse von *Cryge<sup>nz</sup>* und Wildtyp Linsenextrakten. Der Western-Blot wurde für *Cryge<sup>nz</sup>* und Wildtyp (C3H) mit jeweils 60 µg und 40 µg Linsenextrakt durchgeführt. Zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge wurden entsprechende Mengen in einem Polyacrylamid-Gel mit Coomassie Blue gefärbt. Der Pfeil weist auf das mutierte E-Kristallin (13,0 kDa) und der Pfeilkopf auf ein vermutliches Abbauprodukt (10,0 kDa).

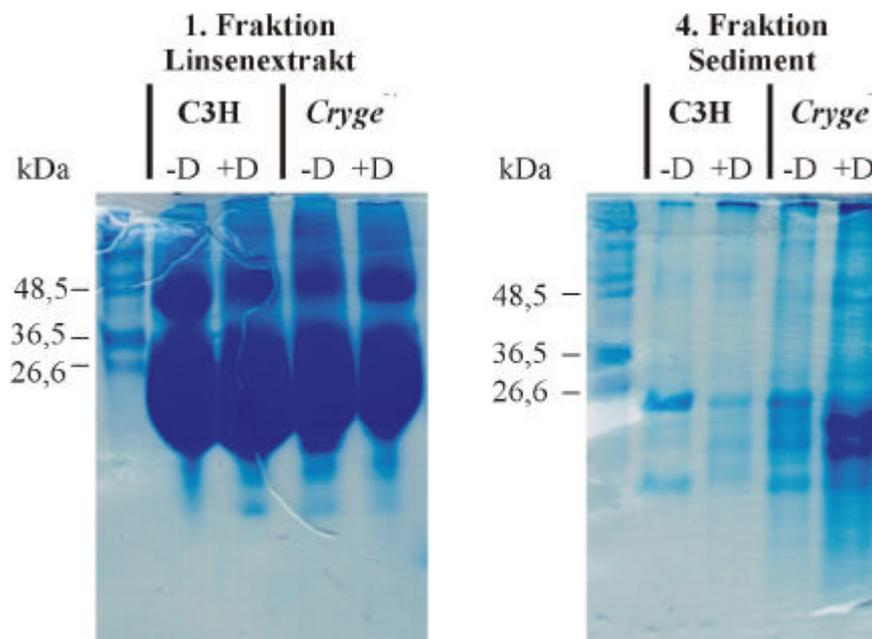
Nach Gong et al. 1997 führt ein verkürztes E-Kristallin zur Aggregation von Proteinen in der Augenlinse, mit Folge einer Kataraktbildung. Der Nachweis der Proteinaggregate wurde anhand der Fraktionierung von Linsenextrakten (3.4.3) gezeigt. Daher wurde die Methode von Gong et al. 1997 für den Nachweis von Proteinaggregaten in der Augenlinse der *Cryge<sup>nz</sup>* Mutante angewendet. Dieses sollte einen Hinweis auf den Mechanismus, der zur Kataraktbildung durch die Synthese des mutierten E-Kristallins führt, geben.

Die Fraktionierung wurde mit jeweils 40 µg Linsenextraktprotein von 3 Wochen alten Tieren durchgeführt. Deutliche Hinweise auf die im Vergleich zum Wildtyp generell geringere Löslichkeit der Linsenproteine in der *Cryge<sup>nz</sup>* Mutante gibt die Abbildung 4.27 wieder (2. und 3. Fraktion, d.h. Waschstreife mit NaOH, nicht unterschiedlich und deshalb ohne Abbildung).

Es sind in der 1. Fraktion der Fraktionierung (Anteil der wasserlöslichen Proteine) weniger Proteine in der mutanten Augenlinse, als in der Wildtyp Augenlinse zu finden. Außerdem sind in der mutanten Augenlinse deutlich mehr Proteine in der 4. Fraktion (unlösliche Protein Fraktion) sichtbar. Weiterhin zeigt sich ein Unterschied in der 4. Fraktion der Mutante. Hier ist mehr Protein sichtbar, wenn der Linsenextrakt mit 10 mM DTT behandelt wurde. Durch

die Behandlung mit DTT werden über Disulfid-Brücken gebildet Proteinaggregate aufgebrochen und wandern besser in Polyacrylamidgele ein.

Diese Befunde sind vergleichbar mit denen von Gong et al., 1997. Daher ist die Anreicherung von Proteinaggregaten in der *Cryge*<sup>nz</sup> Augenlinse indirekt nachgewiesen worden. Somit kann der Löslichkeitsunterschied zwischen Proteinen im Linsenextrakt der Mutante und des Wildtyps durch die Aggregation von Proteinen in der Augenlinse erklärt werden.



**Abbildung 4.27** Proteinfractionierung von *Cryge*<sup>nz</sup> und Wildtyp Augenlinsenextrakten. Je 40 µg Linsenextrakte wurden nach Gong et al., 1997 fraktioniert (3.4.3). Aliquots wurden mit (+D) DTT oder ohne (-D) DTT aufgetragen und mit Coomassie Blue gefärbt. Deutlich sind Unterschiede in den löslichen Fraktionen zwischen C3H und *Cryge*<sup>nz</sup> erkennbar. Auffällig ist die Anreicherung von Proteinen in der 4. Fraktion, besonders im DTT behandelten Auftrag der Mutante. (2. und 3. Fraktion ohne Abbildung)

#### 4.2.5 Untersuchung der *ENU-418* Mutante

Die *ENU-418* Mausmutante wurde nach paternaler Behandlung mit ENU gefunden. Sie hat einen nukleären und einer zonulären Katarakt. Nach einem Allelie-Test wurde die Mutante der *Cat2* Kopplungsgruppe zugeordnet (Favor und Neuhäuser-Klaus, 2000).

Daher wurden zur molekularen Analyse der *ENU-418* Mutante die *Cryg* Gene als Kandidaten für die Mutation getestet. Hierzu wurden alle  $\gamma$ -Kristalline der Maus aus genomischer DNA wie unter 4.2.1 geschrieben amplifiziert und anschließend direkt sequenziert.

Es konnten zwar Sequenzunterschiede festgestellt werden, von denen ist jedoch keine für die Ausbildung des Katarakt-Phänotyps verantwortlich. Keine der Veränderungen wirkt sich auf die Aminosäureabfolge aus, oder konnte auch in weiteren *Cat2* Stämmen mit einem zur *ENU-*

418 abweichenden Phänotyp beobachtet werden. Die festgestellten Sequenzunterschiede, die im Vergleich zum C3H Kontrollstamm und zu Genbank-Einträgen die in den  $\alpha$ -Kristallinen gefunden wurden und nicht für den Katarakt ursächlich sind, sind unter 4.2.6 dargestellt.

Da mit der hier durchgeführten Analyse keine Mutation in den  $\alpha$ -Kristallinen Genen für die *ENU-418* identifiziert werden konnte, können die codierenden Sequenzen sowie die Splice-Stellen als Kandidaten für die *ENU-418* Mutation ausgeschlossen werden. Somit müssen andere Kandidatengene und die nicht codierenden Sequenzen der  $\alpha$ -Kristalline (z.B. die Promotoren) untersucht werden.

#### 4.2.6 Sequenzunterschiede in den *Cryg* Genen der Maus

Bei der dargestellten detaillierten Untersuchung der Mutanten konnten verschiedene Sequenzunterschiede festgestellt werden, die nicht mit einer Kataraktentstehung in Verbindung gebracht werden können. Dieses ergibt sich aus der Tatsache, daß die Variationen entweder keine Auswirkung auf die Aminosäureabfolge haben, oder nur im Vergleich zur Genbank-Sequenz auftreten und im eigenen C3H-Kontrollstamm wiederzufinden sind. Im Folgenden wird sich auf die genomischen Sequenzen der C3H, *Cryga*<sup>1<sup>Neu</sup></sup>, *Cryge*<sup>nz</sup>, *ENU-418* Stämme und die cDNA Sequenzen der C3H, *Cryga*<sup>tol</sup>, *Cryge*<sup>nz</sup> Stämme bezogen. Die hier angegebenen Positionen beziehen sich zur besseren Vergleichbarkeit mit den entsprechenden Genbank-Einträgen auf deren Nummerierung.

Im *Cryga* Gen konnte ein Unterschied an Position 530 (A  $\rightarrow$  G Austausch) zur Datenbank-Sequenz identifiziert werden. Die Änderung des genetischen Codes hat keinen Aminosäureaustausch zur Folge (Tab 4.3 I). Der Unterschied wurde in C3H Mäusen und in vier *Cat2* Stämmen nachgewiesen.

Die meisten Unterschiede zum Genbank-Eintrag wurden im *Crygd* Gen gefunden. Hier steht in der Datenbank eine Sequenz eines cDNA-Klons von 1984 zur Verfügung. Zu dieser Sequenz wurden drei Variationen nachgewiesen. Ein A  $\rightarrow$  G Unterschied an Position 102 im Exon 2 führt zu einer Veränderung der Aminosäureabfolge H  $\rightarrow$  R (Tab. 4.3 II). Diese Änderung wurde in allen getesteten Stämmen gefunden und ein Vergleich der bekannten Sequenzen der Säugetiere (Anhang Abb. A1) zeigt an dieser Stelle ebenfalls Arginin. Daher scheint ein Fehler in der Datenbank-Sequenz möglich zu sein. Der zweite Unterschied ist ein Tausch von AG zu GA an Position 310/311 im Exon 3, der einen Valin/Methionin Austausch zur Folge hat (Tab. 4.3 III). Der Unterschied wurde in C3H Mäusen sowie in drei *Cat2* Stämmen nachgewiesen. Derselbe Austausch konnte auch für das humane *CRYGD* Gen

nachgewiesen werden (4.4). Der Vergleich der Aminosäuresequenzen (Anhang Abb. A1) zeigt, daß sowohl ein Valin als auch ein Methionin an dieser Stelle in den -Kristallinen vorkommen kann. Die dritte Variation zum *Crygd* der Datenbank ist ein A G Austausch an Position 495 im Exon 3, der zu einer Lysin/Arginin Veränderung führt. Diese Änderung wurde in allen getesteten Stämmen gefunden. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen (Anhang Abb. A1) zeigt, daß sowohl ein Lysin als auch ein Arginin an dieser Stelle in den -Kristallinen vorkommen kann.

**Tabelle 4.3** Übersicht der beobachteten Sequenzunterschiede in den Genen *Cryga*, *Crygd* und *Crygf* der Maus.

Die Unterschiede wurden zwischen den genannten Mausstämmen und den Genbank Einträgen gefunden. Die Positionen beziehen sich auf die Nummerierung in den jeweiligen Einträgen der Datenbank-Sequenzen.

|     | Gen          | Acc. Nr.: | Exon   | Mausstämmen   | Position | Variation     | Aminosäure |
|-----|--------------|-----------|--------|---|----------|---------------|------------|
| I   | <i>Cryga</i> | K02586    | Exon 2 | C3H, <i>Cryga</i> <sup>1Neu</sup> ,<br><i>Cryga</i> <sup>tol</sup> , <i>Cryge</i> <sup>nz</sup> ,<br><i>ENU-418</i> | 530      | caA caG       | Q          |
| II  |              |           | Exon 2 | C3H,  | 102      | cAc cGc       | H R        |
| III | <i>Crygd</i> | K02583    | Exon 3 | <i>Cryga</i> <sup>tol</sup> ,<br><i>Cryge</i> <sup>nz</sup> ,<br><i>ENU-418</i>                                     | 310/311  | caAGtg caGAtg | QV Q<br>M  |
| IV  |              |           | Exon 3 |   | 495      | aAg aGg       | K R        |
| V   | <i>Crygf</i> | K02584    | Exon 3 | <i>Cryge</i> <sup>nz</sup> ,<br><i>ENU-418</i>  | 442      | ctC ctG       | L          |
| VI  |              |           | Exon 3 |   | 448      | ccT ccA       | P          |

Zwei Variationen konnten im *Crygf* Gen identifiziert werden, die keine Auswirkung auf die Aminosäureabfolge haben (Tab 4.3 V/VI) und beide im *Cryge* Gen als eine polymorphe *StuI* Restriktionsschnittstelle (Abb. 4.12) beschrieben wurden (Cartier et al., 1992). Durch den C G Austausch an Position 442 und den T A Austausch an Position 448 wird die *StuI* Restriktionsschnittstelle in den Mutanten *Cryge*<sup>nz</sup> und *ENU-418* zerstört. Jedoch wurden die beiden Austausche nicht im C3H-Kontrollstamm und der *Cryge*<sup>t</sup> Mutante beobachtet. In diesen Stämmen ist somit die *StuI* Restriktionsschnittstelle auch im *Crygf* Gen vorhanden. Hierdurch konnte demonstriert werden, daß die *StuI* Restriktionsschnittstelle nicht nur im

*Cryg* Gen stammspezifisch ist, wie von Cartier et al. 1992 beschrieben, sondern auch stamm-spezifisch im *Crygf* Gen ist.

### 4.3 Übersicht über Mutationen in den *Cryg* Genen und deren Expression in der Maus

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die molekularen Grundlagen für vier *Cat2* Mutationen aufgeklärt und für eine weitere bestätigt. Damit ist für insgesamt sechs der *Cat2* Mutanten der Neuherberger Katraktsammlung die Zuordnung der Mutationen zu einem -Kristallingene bekannt (Tab. 4.4).

**Tabelle 4.4** Übersicht über die *Cryg* / *Cat2* Mutanten

| mutiertes Gen | Mutanten-Bezeichnung       |                                 | Mutation                                     | Protein                                     |                 | Phänotyp homozygot         |
|---------------|----------------------------|---------------------------------|--|---|-----------------|----------------------------|
|               | alt                        | neu                             |  | Vorhersage                                  | Nachweis        |                            |
| <i>Cryga</i>  | <i>ENU-436</i>             | <i>Cryga</i> <sup>INEU *1</sup> | Transition (A G) Exon 2                      | Aminosäure-austausch (D77G)                 |                 | Schwache zentrale Katarakt |
|               | <i>ENU-369</i>             | <i>Cryga</i> <sup>tol</sup>     | Transition (T C) Exon 2                      | Aminosäure-austausch (W43R)                 |                 | Totale Linsentrübung *5    |
| <i>Crygb</i>  | <i>Cat2</i> <sup>nop</sup> | <i>Crygb</i> <sup>nop *1</sup>  | 11bp Deletion<br>4 bp Insertion<br>Exon 3 *3 | Fehlen des 4. „Griechischer Schlüssels“     | Western-Blot *4 | Starke zentrale Katarakt   |
| <i>Cryge</i>  | <i>Cat2</i> <sup>ns</sup>  | <i>Cryge</i> <sup>ns</sup>      | Deletion Exon 3 *3<br>> 1,8 kb               |   |                 | Mikrophthalmie *6          |
|               | <i>Cat2</i> <sup>t</sup>   | <i>Cryge</i> <sup>t *1</sup>    | Transversion (C G) Exon 3                    | vorzeitiger Kettenabbruch                   |                 | Mikrophthalmie             |
|               | <i>Cat2</i> <sup>nz</sup>  | <i>Cryge</i> <sup>nz *2</sup>   | Deletion 1bp Exon 2<br>Frameshift            | verkürztes Protein mit 96 neuen Aminosäuren | Western-Blot    | Starke zentrale Katarakt   |

\*1 Klopp et al., 1998

\*2 Klopp et al., 2000

\*3 Identifiziert von J. Graw

\*4 Lutz, 2000

\*5 Ehling et al., 1982

\*6 Graw et al., 1984

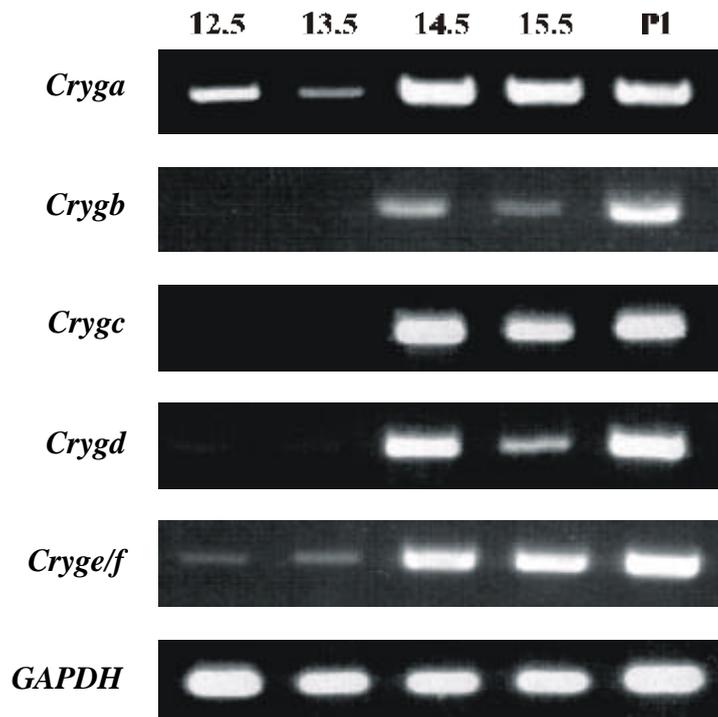
Zwei Mutanten wurden phänotypisch analysiert (4.2.2.1 und 4.2.4.3). Für eine Mutante konnte in dieser Arbeit die Synthese und der Abbau des mutierten Proteins gezeigt werden

(4.2.4.3). Insgesamt ist für zwei *Cryg* Mutanten nachgewiesen worden, daß veränderte - Kristallin Proteine synthetisiert werden (4.2.3 und 4.2.4.3).

Um die Korrelation von Genotyp und Phänotyp der Mutanten besser zu verstehen, ist es notwendig, neben der Mutation auch die Expression der Gene zu kennen. So können die Expressionsmuster Hinweise auf die unterschiedliche Ausprägung der Phänotypen, die durch ähnliche Mutationen in den verschiedenen *Cryg* Genen (z.B. *Crygb<sup>nop</sup>* und *Cryge<sup>t</sup>*) hervorgerufen geben werden. Da die morphologischen Veränderungen in den mutanten Augenlinsen sich bereits während der Embryogenese bilden (Abb. 4.21), ist eine genaue Kenntnis der pränatalen Expression der -Kristallingene erforderlich. Jedoch ist die Expression der -Kristallingene während der Embryonalentwicklung der Maus in der Literatur nur unzureichend beschrieben.

Daher war es sinnvoll, die -Kristallinexpression der Maus zu untersuchen. Eine Expressionsstudie mittels Northern Blot ist aufgrund der hohen Homologie der -Kristalline auf DNA Ebene genspezifisch nicht möglich. Somit wurde die cDNA der *Cryg* Gene jeweils in voller Länge mit genspezifischen PCR-Reaktionen über 35 Zyklen aus verschiedenen Geweben embryonaler Stadien amplifiziert (4.2.1). Eine RT-PCR-Reaktion für *GAPDH* wurde als Standard verwendet, um auf die Menge eingesetzten cDNA-Templates zu normieren (Abb. 4.28).

Es konnte keine *Cryg* Genexpression in den Stadien E 10.5 und E 11.5 beobachtet werden (ohne Abbildung). Die erste Expression der -Kristalline konnte an E 12.5 für das *Cryga* Gen und die *Crygef* Gene nachgewiesen werden. Die Expression der Gene *Crygb*, *Crygc* und *Crygd* beginnt mit E14.5, d.h. zwei Tage später als bei *Cryga* und *Crygef*. Die Genexpression aller -Kristalline bleibt danach für den Rest der Embryogenese konstant und konnte in gleicher Intensität bei Neugeborenen festgestellt werden.



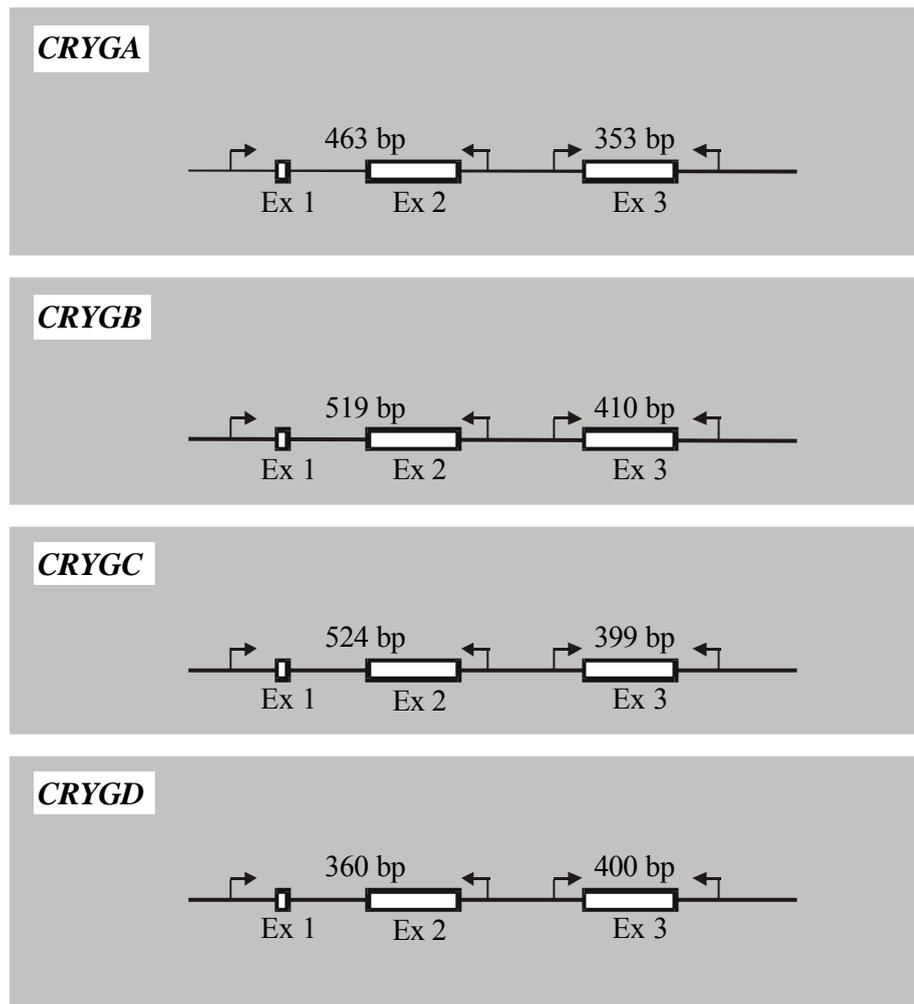
**Abbildung 4.28** Analyse der  $\alpha$ -Kristallin Genexpression in der Maus. PCR-Amplifikation der Vollen-Länge-cDNA je  $\alpha$ -Kristallin Gen. Die cDNA von *GAPDH* wurde als Standard mitamplifiziert. Die Analyse zeigt den unterschiedlichen Beginn der *Cryg*-Genexpression während der embryonalen Entwicklung.

#### 4.4 Identifikation einer humanen Mutation im *CRYGA* Gen

Blutproben einer Familie mit einer Katarakt über 4 Generationen wurde von der Augenklinik der Ludwig-Maximilians Universität München (Dr. Rudolph) zur Verfügung gestellt. Die Familie war zu klein, um die Mutation zu kartieren. Aufgrund des Familienstammbaums (Abb. 4.32) ist ersichtlich, daß der Erbgang autosomal dominant ist und die Patienten heterozygot für die Mutation sind. Da der Erbgang und das klinische Erscheinungsbild der Katarakt eine Mutation in den Kristallin Genen vermuten ließ, wurden die humanen  $\alpha$ -Kristalline im Rahmen dieser Arbeit als Kandidaten überprüft.

Dazu wurde aus den Blutproben genomische DNA isoliert und die exprimierten *CRYG* Gene (*CRYGA* *CRYGD*) untersucht. Auf die Analyse von *CRYGE* und *CRYGF* wurde verzichtet, da diese Pseudogene als nicht exprimiert gelten. Da kein Augenlinsenmaterial zur Verfügung steht und somit die Herstellung von cDNA nicht möglich ist, erfolgt die Untersuchung durch direkte Sequenzierung von PCR-Produkten der genomischen *CRYG* Fragmenten. Hierzu wurde ein systematischer Ansatz zur Amplifikation der humane *CRYG* Kandidatengene entwickelt, der spezifisch für die unterschiedlichen, hoch homologen *CRYG* Gene ist. Deshalb wurde die PCR-Primer in 3'- oder 5'-flankierende Bereiche, sowie in intronische Bereiche der Gene gelegt. Durch die Lage der Primer in nicht codierenden Bereichen

wurden auch die Splice-Akzeptor- und die Splice-Donor-Sequenzen mitvervielfältigt. Das Exon 1 wurde aufgrund seiner geringen Größe (9 bp) zusammen mit dem Intron A und dem zweiten Exon amplifiziert. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde durch Sequenzierung überprüft. Die Lage der genspezifischen Primer und die Größe der amplifizierten PCR-Produkte sind in Abb. 4.29 schematisch dargestellt. Eine Liste der Primer und der Genbank Zugangsnummern der entsprechenden *Cryg* Gene ist im Anhang angegeben.



**Abbildung 4.29** Schematische Darstellung der Lage der Fragmente zur Amplifikation der exprimierten *CRYG* Gene (*CRYGA*–*CRYGD*).

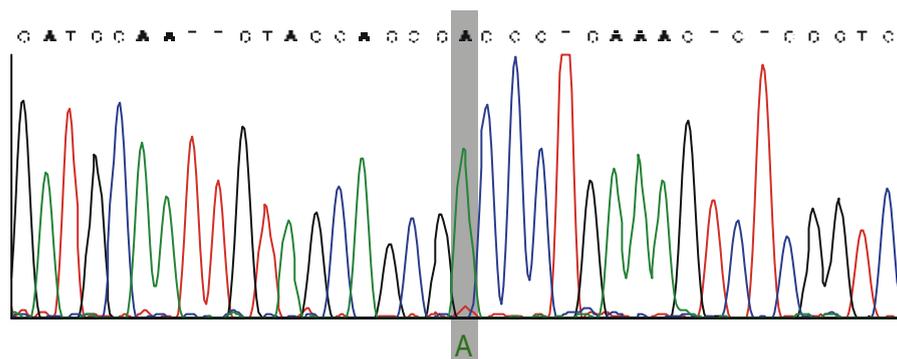
Die Lage der genspezifischen Primer für die PCR-Reaktion ist mit Pfeilen dargestellt. Die Größe der PCR-Produkte ist für die genomischen sowie für die cDNA angegeben. Ex = Exon

Da die Patienten heterozygot für die Mutation sind, können letztere, insbesondere Basenaustausche, durch das Auftreten von Mischsequenzen identifizieren werden. Um diese feststellen zu können, wurden die genomischen PCR-Produkte der exprimierten *CRYG* Gene

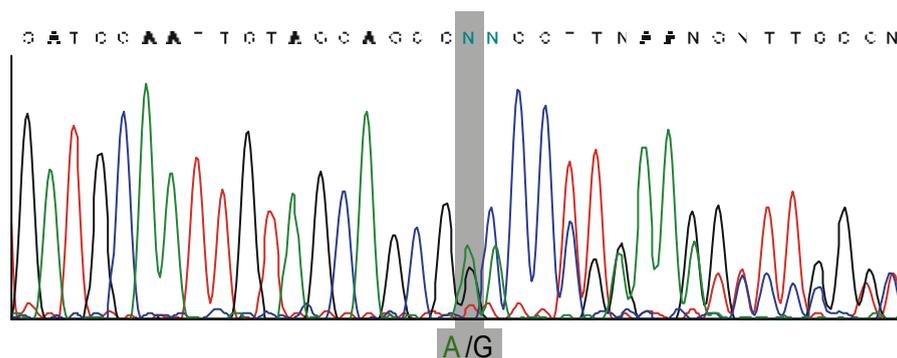
(*CRYGA* *CRYGD*) direkt sequenziert. Im Folgenden sind die Positionen der Sequenzunterschiede nach den in Klammern genannten Datenbank-Einträgen nummeriert.

Es konnte eine Mischsequenz im *CRYGA* Gen Exon 2 (Acc. Nr.: M17315) nachgewiesen werden. Die Mutation ist eine Insertion eines Cytosins an Position 252 der Datenbank-Sequenz, erkennbar in der Gegenstrang-Sequenzierung als überlappendes G und A Signal (Abb. 4.30).

Proben Nr.: 12656



Proben Nr.: 12659



**Abbildung 4.30** Sequenz-Chromatogramme des *CRYGA* Gens Exon 2 (Gegenstrang-Sequenzierung). Das Chromatogramm der DNA-Probe Nr.: 12659 zeigt eine Mischsequenz durch eine Insertion eines Cytosins (Guanin im Gegenstrang) an.

Drei weitere Sequenzunterschiede zur Datenbank, die nicht als Mischsequenzen (d.h. homozygot) vorlagen, konnten ebenfalls festgestellt werden. Im *CRYGA* Gen Exon 3 führt eine T C Transversion an Position 196 (Acc. Nr.: M17316), zu einem Austausch eines Lysins zu einem Prolin. Dieses stellt keine Veränderung des Proteins da, welche sich stark auswirken sollte, da die übrigen humanen -Kristalline und alle -Kristalline der Maus, Ratte und des Rinds an dieser Stelle ebenfalls ein Prolin besitzten (Anhang Abb. A1). Der Sequenzunterschied im *CRYGB* Gen an Position 2437 (Acc. Nr.: M19364) der von Héon et al. (1999) beschrieben wurde, konnte nicht bestätigt werden. Zwei Sequenzunterschiede konnten im *CRYGD* Gen gefunden werden. An Position 286 (Acc. Nr.: K03005) konnte ein T C

Austausch identifiziert werden, der keine Auswirkung auf die Aminosäurekette hat und von Héon et al. (1999) auch als SNP (Single Nucleotide Polymorphism) beschrieben wurde. An Position 92/93 (Acc. Nr.: K03006) wurde ein AG zu GA Austausch festgestellt. Hierdurch wird ein Valin durch ein Methionin ersetzt. Derselbe Austausch wurde im *Crygd* Gen der Maus (siehe 4.2.6.) gefunden. Da dieser Sequenzunterschied nicht als Mischsequenz vorliegt und aus den bei der Maus genannten Gründen, wird kein Zusammenhang mit dem Katarakt gesehen.

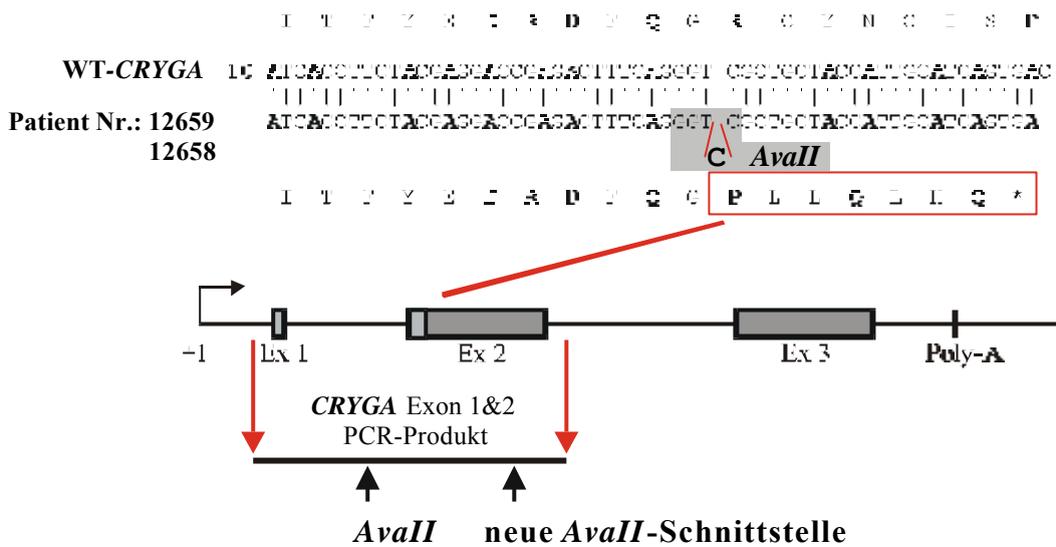
Da alle hier beschriebenen Sequenzunterschiede homozygot auftreten, die Kataraktträger jedoch genotypisch sind, kann keiner der Austausche für das Krankheitsbild verantwortlich sein.

**Tabelle 4.5** Übersicht der beobachteten Sequenzunterschiede in den Genen *CRYGA* und *CRYGD* im Vergleich zu den entsprechenden Genbank-Einträgen.

| -Kristallinen | Acc. Nr.:      | Position | Variation     | Aminosäure             |
|---------------|----------------|----------|---------------|------------------------|
| <i>CRYGA</i>  | Exon2 (M17315) | 252      | C Insertion   | Leserasterverschiebung |
|               | Exon3 (M17316) | 196      | cTt cCt       | L P                    |
| <i>CRYGD</i>  | Exon2 (K03005) | 286      | taT taC       | Y                      |
|               | Exon3 (K03006) | 92/93    | caAGtg caGAtg | QV QM                  |

Anders als die zuletzt beschriebenen Sequenzunterschiede, wirkt sich die Insertion eines Cytosins im Exon 2 des *CRYGA* Gens entscheidend auf die A-Kristallinstruktur aus. Die Insertion an Position 43 der codierenden Sequenz erzeugt eine Verschiebung und Veränderung des Leserasters. Da die Mutation im 5'-Bereich des Exons 2 liegt, würde laut codierender Sequenzabfolge anstelle des 174 Aminosäuren langen A-Kristallins nur ein kurzes Peptid von 20 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 4,5 kDa gebildet. Dieses würde aus 13 Aminosäuren des *CRYGA* Proteins und 7 neuen Aminosäuren bestehen. Die Anzahl der ursprünglichen *CRYGA* Aminosäuren reicht nicht mehr zur Bildung des ersten „Griechischen Schlüssel“-Motivs aus. Aufgrund der zu geringen Größe läßt sich mit SwissModel 2.0 keine Struktur darstellen.

Die Insertion des Cytosins läßt eine neue *AvaII*-Restriktionsschnittstelle im *CRYGA* entstehen. Im PCR-Produkt des mutierten Exon 1–2 Bereichs des *CRYGA* Gens liegen zwei *AvaII*-Schnittstellen. Dieses kann zur molekularen Diagnostik des mutierten *CRYGA* Allels verwendet werden.



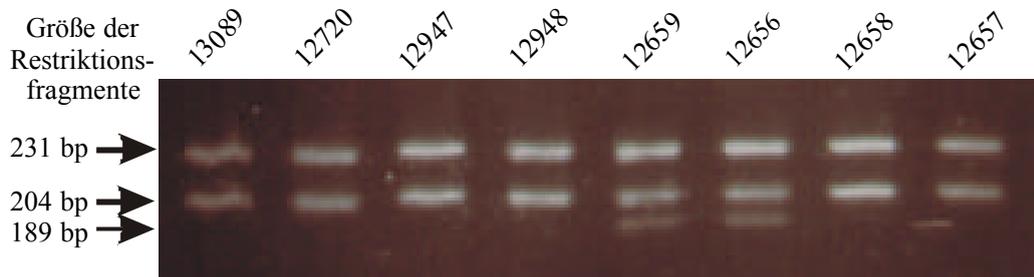
**Abbildung 4.31** Sequenzanalyse des *CRYGA* Gens Exon 2.

Im Exon 2 des *CRYGA* Gens wurde die Insertions eines Cytosins identifiziert. Die Mutation führt zu einer Leserasterverschiebung. Daraus wird die Bildung eines Peptids mit einer Länge von 20 Aminosäuren abgeleitet. Zusätzlich entsteht durch die Insertion eine neue *AvaII*-Schnittstelle, die zur Diagnostik eingesetzt wurde.

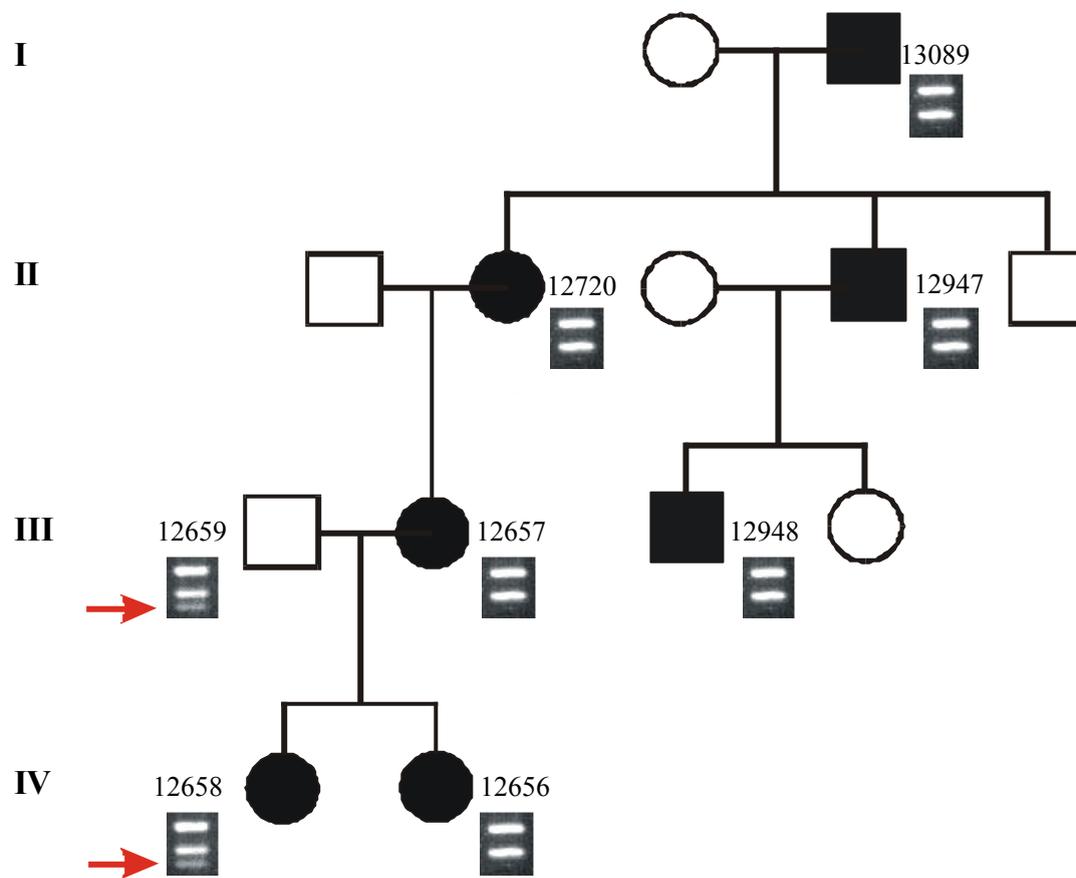
Die molekulare Diagnostik wurde zur Analyse der gesamten Familie verwendet. Dazu wurden PCR-Produkte von Exon 1 - 2 des *CRYGA* Gens mit *AvaII* gespalten. Durch die Restriktion entstehen bei Vorliegen des Wildtyp Allels zwei Produkte (231 und 204 bp) und durch die neue *AvaII*-Schnittstelle beim mutierten Allel drei Produkte (231, 189 und 42 bp). Bei Trennung der Spaltprodukte in einem Agarosegel wird die Mutation in heterozygoten Proben durch das zusätzliche Auftauchen einer zusätzlichen Bande von 189 bp erkennbar.

Mit dieser Diagnostik konnte das mutierte Allel des *CRYGA* Gens bei zwei Familienmitgliedern (Nr.: 12659 und Nr.: 12658) festgestellt werden. Da nicht alle an Katarakt erkrankten Familienmitglieder dieses Allel tragen und das Familienmitglied Nr.: 12659 mit dem mutierten Allel keine Katarakt ausgebildet hat, kann es sich bei der beschriebenen Mutation nur um einen Restriktionslängenpolymorphismus handeln, der nicht für die Kataraktbildung verantwortlich ist.

**A. Familienmitglieder**



**B. Stammbaumanalyse**



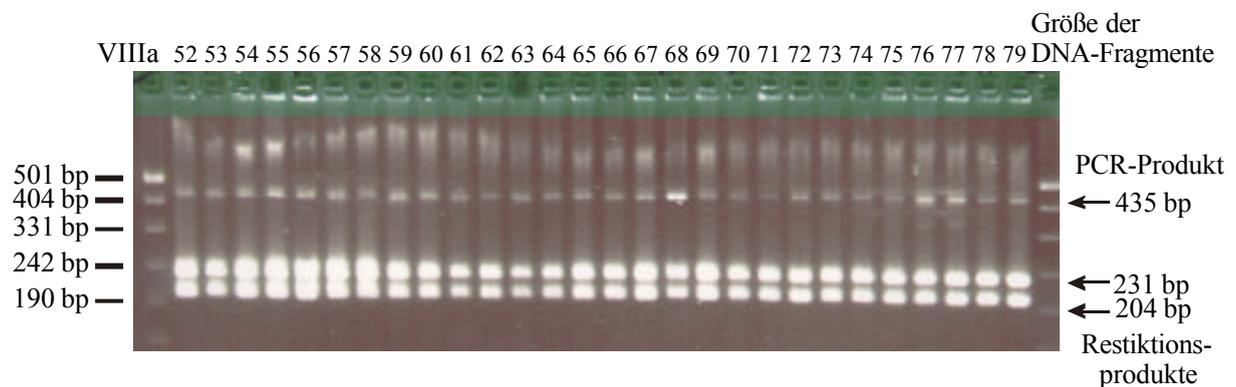
**Abbildung 4.32** Restriktionsanalyse von *CRYGA* Exon 1-2 PCR-Produkten der kongenitalen Kataraktfamilie.

**A** Auftrennung der *AvaII*-Restriktionsprodukte im Agarosegel.

**B** Stammbaum der Katarakt-Familie, zur besseren Übersicht mit den Resultaten der Diagnostik dargestellt.

Die Analyse zeigt den Polymorphismus sowohl in erkrankten als auch in gesunden Familienmitgliedern.

Da es sich bei der Insertion im *CRYGA* Gen um eine Mutation handelt, die sich klinisch nicht auswirkt, lag die Vermutung nahe, sie könnte in der humanen Population weit verbreitet sein. Um dies zu testen, wurden 170 humane DNA-Proben einer zufällig ausgewählten mitteleuropäischen Population und 15 humane DNA-Proben einer indischen Familie (Familie C132; Prof. Gopinath) mit der molekularen Diagnostik wie oben beschrieben untersucht. In keiner der Proben konnte der neue Restriktionslängenpolymorphismus festgestellt werden. Dieses läßt vermuten, daß die hier beschriebene Mutation im *CRYGA* ein seltener humaner Polymorphismus ist.



**Abbildung 4.33** Diagnostik des *CRYGA* Restriktionslängenpolymorphismus. 170 Humane DNA Proben wurden auf die Insertion eines Cytosins in das *CRYGA* Gen getestet. Nach PCR-Amplifikation des *CRYGA* Exons 1-2 wurde eine *AvaII*-Restriktionsspaltung durchgeführt. Es konnten nur Banden mit 231 und 204 bp Länge, wie im ursprünglichen *CRYGA* Gen, beobachtet werden. Beispielhaft sind 28 (Nr.: 52-79) der 170 getesteten Proben gezeigt.

## 5 DISKUSSION

Die  $\gamma$ -Kristalline sind an der Differenzierung der Linsenfaserzellen und der funktionsfähigen Bildung der Augenlinse beteiligt. In dieser Arbeit konnten fünf Mutationen in verschiedenen  $\gamma$ -Kristallin Genen identifiziert werden. Es handelt sich dabei um Punktmutation oder Deletionen in den codierenden Sequenzen, die zur Expression veränderter  $\gamma$ -Kristalline führen. Die Mutationen haben auf Proteinebene entweder den Austausch konservierter Aminosäuren oder das Fehlen des vierten der für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kristalline charakteristischen „Griechischen Schlüssel“ Motive zur Folge. Die Expression mutierter Kristalline ist für den Kataraktphänotyp mit Mikrophthalmie und Trübung der Augenlinse verantwortlich. Beobachtet werden unterschiedliche Ausprägungen der Katarakte. Hierfür wird ein unterschiedliches Faltungs- und Löslichkeitsverhalten der mutierten  $\gamma$ -Kristalline verantwortlich gemacht, das zur Aggregation und falscher Lokalisation in der Zelle führt.

### 5.1 Die $\gamma$ -Kristallin Mutationen

#### 5.1.1 Untersuchungsmethoden zur Identifikation von $\gamma$ -Kristallin Mutationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sieben *Cat2* Mutanten der Neuherberger Kataraktsammlung bearbeitet. Für sechs Mutanten konnten Mutationen im *Cryga*, *Crygb* und *Cryge* Gen festgestellt werden. Mutationen im *Crygc*, *Crygd* und im *Crygf* Gen sind bisher nicht identifiziert. Da sich jedoch noch 16 weitere *Cat2* Mutanten in der Neuherberger Kataraktsammlung befinden, ist anzunehmen, daß insgesamt für jedes *Cryg* Gen eine Mutante vorhanden ist. Zum Testen der  $\gamma$ -Kristallin Gene dieser Mutanten wurde ein PCR-basierter systematischer Ansatz zur Überprüfung der *Cryg* Kandidatengene entwickelt (4.2.1). Dieser Ansatz kann bei der Analyse weiterer Mutanten in der folgenden Art angewendet werden. Dabei wird zunächst routinemäßig die cDNA der *Cryg* Gene durch Sequenzierung untersucht. Sequenzunterschiede werden mit genomischen PCR-Amplifikaten weiter verifiziert. Eine erste Charakterisierung auf cDNA-Ebene ist sinnvoll, da auch gleichzeitig die Stärke der Expression der *Cryg* Gene abgeschätzt werden kann. Mögliche Mutationen im Promotorbereich oder in Splicestellen könnte sich in einer Veränderung der Transkript-Menge oder -Größe eines *Cryg* Genes widerspiegeln. Das *Cryge* und das *Crygf* Gen werden routinemäßig direkt auf genomischer Ebene überprüft werden, da aufgrund der hohen Homologie keine genspezifische Unterscheidung ihrer cDNA Fragmente möglich ist. Bei einer direkten Sequenzierung von *Crygef* cDNA PCR-Produkten könnte es schwierig sein Sequenzunterschiede

festzustellen, da sie möglicherweise als undeutliche Mischsequenzen auftreten oder nur eines der beiden Gene repräsentiert ist.

Die standardmäßige Untersuchung der Gene durch Sequenzierung ist sicherlich der Vorzug vor der SSCP-Analyse zugeben. Diese Methode ist weniger zeitaufwendig und kostengünstiger bei großen Probenmengen als Sequenzierungen. Jedoch wurde mittels SSCP-Untersuchung der *Cryge<sup>f</sup>* Mutante kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt, obwohl später mittels Sequenzierung eine Punktmutation identifiziert werden konnte (4.2.4.1). Dieses ist ein weiteres Beispiel, dafür daß nicht alle unbekanntem Sequenzunterschiede durch die SSCP-Analyse darstellbar sind. Da die festgestellten SSCP-Unterschiede ohnehin über Sequenzierung bestätigt werden müssen, ist es sinnvoll, die relativ kleinen *Cryg* Gene routinemäßig direkt zu sequenzieren.

Mit der vorgeschlagenen standardisierten Untersuchung der *Cryg* Gene ist es möglich, durch die Sequenzierung von acht genspezifischen PCR-Produkten die  $\gamma$ -Kristalline als Kandidaten für die *Cat2* Mutationen vollständig zu überprüfen.

Es war notwendig eine direkte routinemäßige Untersuchungsmethode durch Sequenzierung der *CRYG* Gene für humane Proben zu etablieren. In der untersuchten humanen Kataraktfamilie konnte mit der Methode keine Mutation in den  $\gamma$ -Kristallinen identifiziert werden. Diese Familie war außerdem zu klein für eine Kartierung der Katarakt. Solche Familien mit zu geringer Mitgliederzahl und einer dominanten Katarakt gibt es in der Praxis häufiger. Von der Augenklinik der Ludwig-Maximilians Universität München (Dr. Rudolph) werden zwei weitere solcher Familien für genetische Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Für diese Familien ist es sinnvoll als Kandidatengene alle Kristallingene ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -) mit einem PCR-basierten systematischen Ansatz zu überprüfen.

## 5.1.2 Mutationen in den $\gamma$ -Kristallin Genen

### 5.1.2.1 Polymorphismen der $\gamma$ -Kristalline

In dieser Arbeit wurden die *Cryg* Gene unterschiedlicher *Cat2* Mutanten und des C3H-Kontrollstamms sequenziert. Hierbei konnten verschiedene Sequenzunterschiede festgestellt werden (4.2.6). Besonders häufig wurden Unterschiede zur *Crygd* Sequenz der Genbank nachgewiesen. Diese Sequenz wird deshalb als fehlerhaft betrachtet und sollte korrigiert werden. Auffällig ist, daß der AG GA Austausch sowohl bei der Maus als auch beim Menschen (4.4) auftrat. Dieser Austausch wurde in einer anderen Untersuchung humaner  $\gamma$ -

Kristalline nicht bestätigt (Héon et al., 1999). Da es sich bei dem resultierenden Aminosäureaustausch von Met Val um einen nicht konservierten handelt (Tab. 5.1), kann von einem natürlichen Polymorphismus ausgegangen werden. Ebenfalls kann aufgrund der Konserviertheit des Lys Arg Austausches an Position 163 der -Kristalline, hierfür ein natürlicher Polymorphismus der Maus angenommen werden (Tab. 5.1). Die Konsequenzen beider Aminosäureaustausch werden unter 5.2.2 diskutiert.

Im Gegensatz dazu wird der festgestellte Leu Pro Austausch des humanen *CRYGA* Gens aufgrund der Konserviertheit des Prolins an dieser Position als Fehler in der Genbank-Sequenz angesehen. Das gleiche gilt auch für den Austausch His Arg an Position 32 des *Crygd* Gens (Tab. 5.1). Hier ist in allen -Kristallin Sequenzen der Säugetiere das nachgewiesene Arginin konserviert.

**Tabelle 5.1** Konservierte Aminosäureaustausche der -Kristalline.  
Die Konservierung der Austausche wurde nach dem Sequenzvergleich im Anhang Abb. A1 beurteilt.

| Gen          | Exon   | Position (AS) | Aminosäureaustausch | Konservierte Aminosäure | Annahme        |
|--------------|--------|---------------|---------------------|-------------------------|----------------|
| <i>CRYGA</i> | Exon 3 | 149           | Lys Pro             | Pro                     | Sequenzfehler  |
| <i>CRYGD</i> | Exon 3 | 100           | Val Met             | Val / Met               | Polymorphismus |
| <i>Crygd</i> | Exon 2 | 32            | His Arg             | Arg                     | Sequenzfehler  |
|              | Exon 3 | 100           | Val Met             | Val / Met               | Polymorphismus |
|              | Exon3  | 163           | Lys Arg             | Lys / Arg               | Polymorphismus |

Es konnte in dieser Arbeit auch ein seltener humaner Polymorphismus, die Insertion einer Base in das *CRYGA* Gen, die zu einem vorzeitigen Stop-Codon führt, bestimmt werden. Bisher sind drei Basenpaaraustausche in humanen -Kristallinen beschrieben worden (Stephan et al., 1999) (Héon et al., 1998). Inwieweit hier die Mutation die Stabilität der mRNA beeinflusst, wie es in den *Cat2* Mutanten der Maus mit einem vorzeitigem Translations-Stop-Codon (*Crygb<sup>nop</sup>*, *Cryge<sup>t</sup>* und *Cryge<sup>mz</sup>*) überprüft werden konnte, läßt sich bei Menschen experimentell nicht überprüfen, da kein Linsenmaterial zur Verfügung steht. Jedoch wird für Säugetiere durch Studien an Transkripten des -Globingens angenommen, daß mRNA's mit vorzeitigem Translations-Termination-Codons durch sogenanntes NMD (nonsense-mediated mRNA decay) abgebaut werden, wenn das Codon 50-55 Nukleotide 5'-

von dem 3'-Ende des Exons liegt (Hentze und Kulozik, 1999) (Nagy und Maquat, 1998). Da das durch die Insertion erzeugte Stop-Codon an Position 56 des Exons 2 (Gesamtlänge 242 bp) liegt, beträgt der Abstand zum 3'-Ende des Exons 186 bp. Somit kann von der Stabilität der mutierten *CRYGA* mRNA ausgegangen werden.

### 5.1.2.2 Ungeklärte Mutationen

Der 3'-Bruchpunkt der Deletion in der *Cryge<sup>ns</sup>* Mutante konnte in der vorliegenden Arbeit noch nicht festgestellt werden. Es konnte gezeigt werden, daß der Bereich der Deletion größer als 1,8 kb sein muß. Über die Größe der Deletion können somit keine Annahmen getroffen werden. Aufgrund fehlender 3'-Sequenzinformationen war es noch nicht möglich, einen spezifischen Bereich der cDNA des *Cryge* Gens der Mutante zu amplifizieren. Es ist daher noch offen, ob das mutierte Gen in der Maus exprimiert und damit ein verändertes Protein erzeugt wird. Vorausgesagt werden kann aber schon, daß dem mutanten Protein das 4. "Griechische Schlüssel"-Motiv fehlen würde. Der Phänotyp der *Cryge<sup>ns</sup>* Mutante ist vergleichbar mit dem einer Mutante ohne vierten "Griechische Schlüssel" (5.2.3). Zur Aufklärung der Deletion der *Cryge<sup>ns</sup>* Mutante könnte eine neue Methode zur Klonierung genomischer DNA außerhalb bekannter Sequenzen mit Hilfe linearer Amplifikation mit einem bekannten 5'-PCR-Primer angewendet werden (Rudi et al., 1999). Ansonsten sollte die, in dieser Arbeit angewendete Strategie der Isolierung von Klonen aus genomischen DNA Banken, um zusätzliche 3'-Sequenzinformationen für PCR-Reaktionen zu erhalten, weiter verfolgt werden.

Offen bleibt die Art der Mutation, die in der *ENU-418* Mutante zu Kataraktbildung führt. Zwar konnten Sequenzunterschiede identifiziert werden, jedoch ist keiner der für den Kataraktphänotyp verantwortlich. Die codierenden Bereiche der *Cryg* Gene konnten als Kandidatenbereiche ausgeschlossen werden, da Sequenzierungen auf genomischer Ebene keine Abweichungen vom Wildtyp aufwiesen. Von den Mutanten stand bisher nicht genügend Linsenmaterial homozygoter Tiere zur Verfügung, das zur Herstellung von cDNA ausreichen würde. Somit konnte die Expression der  $\alpha$ -Kristalline mittels PCR-Reaktionen noch nicht überprüft werden. Es könnte sich bei der Mutation in der *ENU-418* Mutante um eine Sequenzveränderung im Promotorbereich eines *Cryg* Genes handeln. Eine solche Mutation ist bisher für die  $\alpha$ -Kristallin noch nicht beschrieben worden. Es ist leicht vorstellbar, daß eine verstärkte, oder vorzeitige Expression eines  $\alpha$ -Kristallins den Proteingehalt der Linsenfasern verändert und zur Ausbildung einer Katarakt führt. Ebenfalls hätte die ektopische Expression von  $\alpha$ -Kristallinen, z.B. im Linsenepithel, wahrscheinlich starke Auswirkungen

auf die Differenzierung. Die Promotorbereiche der *Cryg* Gene sollten daher als Kandidatenbereiche für die Mutation in der *ENU-418* getestet werden. Als ein weiteres Kandidatengen sollte das *Cryba2* Gen in dieser Mutante überprüft werden. Sowohl die Lokalisation des Gens auf Chromosom 1 40,8 cM (Mouse Committee Report 2000), als auch die Ähnlichkeit des Katarakt Phänotyps zu den diagnostizierten mutierten  $\alpha$ -Kristallin Mutanten (1.2.3) deuten auf das *Cryba2* Gen als möglichen Kandidaten hin. Der Allelie-Test der *ENU-418* Mutante sowie die Kartierung des *Cryba2* Gens können ungenau sein, so daß auch aufgrund dieser Daten eine bessere Kandidatenbeziehung besteht als bisher angenommen.

### 5.1.2.3 Identifizierte Mutationen und Mutagenese

Ethylnitrosoharnstoff (ENU) ist ein alkylierendes Agens und eines der stärksten Mutagene für die Herstellung von mutanten Mäusen (Russell et al., 1979) (Favor et al., 1990b) (Favor et al., 1990a). Durch die Alkylierung von Basen werden Fehlpaarungen erzeugt, die zu Basenpaaraustauschen hauptsächlich an A/T Positionen führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei, durch ENU-Mutagenese gezeugte Mutanten (*Cryga*<sup>1Neu</sup>, *Cryga*<sup>tol</sup> und *ENU-418*) untersucht. Bei zwei von ihnen konnten Transitionen identifiziert werden. Beide Transition wurden wie erwartet an A/T Positionen gefunden (*Cryga*<sup>tol</sup> T/A C/G und *Cryga*<sup>1Neu</sup> A/T G/C) (Tab. 5.2). Beide Mutationen sind somit in Übereinstimmung mit der chemischen Reaktion von ENU. In einem spezifischen „Lokus-Test“ wurde bei 23 von 27 mit ENU induzierten Mutationen Basenpaaraustausche gefunden (Favor, 1999). Somit sind die identifizierten Mutationen auch in Übereinstimmung mit dem erwarteten Basenpaaraustausch durch ENU als Mutagen.

In dieser Arbeit konnten auch zwei durch Strahlung induzierte Mutationen identifiziert werden (Tab. 5.2). So führte die Behandlung mit  $\gamma$ -Strahlung bei der *Cryge*<sup>nz</sup> Mutante zu der Deletion eines Basenpaares. Diese stimmt mit der Beobachtung überein, daß ionisierende Strahlung hauptsächlich Minideletionen von einem Basenpaar erzeugen (Ono et al., 1999). Bei der zweiten durch Strahlung erzeugten Mutante, der *Cryge*<sup>t</sup>, wurde hingegen die Transversion einer Base gefunden (C/G G/C). Diese Mutation könnte auch spontan aufgetreten sein. Generell werden bei Mutagenese Experimenten mit Strahlung zu geringer Häufigkeit auch andere Mutationen, als Deletionen gefunden (Ono et al., 1999).

Weiterhin konnten zwei spontane Mutationen in den *Cryg* Genen identifiziert werden (Tab. 5.2). Eine Deletion von 11 bp bei gleichzeitiger Insertion von 4 bp in der *Crygb*<sup>nop</sup> Mutante und eine größere Deletion im 3'-Bereich des *Cryge* Gens bei der *Cryge*<sup>ns</sup> Mutante (4.2.4.2).

Weitere spontane Mutationen in *Cryg* Genen sind in der Literatur beschrieben (Tab. 5.2). So konnte für die *Cryge<sup>elo</sup>* Mutante eine Deletion eines Basenpaars im *Cryge* Gen und für die *Crygd<sup>Lop12</sup>* Mutante ein Basenpaaraustausch im *Crygd* Gen dokumentiert werden (Cartier et al., 1992) (Smith et al., 2000).

**Tabelle 5.2** Art der Mutationen der *Cryg* Mutanten der Maus.

| Art der Mutation | Mutante                      | Mutation                        | Referenz                   |
|------------------|------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| ENU              | <i>Cryga<sup>INeu</sup></i>  | T/A C/G                         | 4.2.2.1 Klopp et al., 1998 |
|                  | <i>Cryga<sup>tol</sup></i>   | A/T G/C                         | 4.2.2.2                    |
| Strahlung        | <i>Cryge<sup>nz</sup></i>    | 1 bp Deletion                   | 4.2.4.3 Klopp et al., 2000 |
|                  | <i>Cryge<sup>t</sup></i>     | C/G G/C                         | 4.2.4.1 Klopp et al., 1998 |
| Spontan          | <i>Crygb<sup>nop</sup></i>   | 11 bp Deletion / 4 bp Insertion | 4.2.3 Klopp et al., 1998   |
|                  | <i>Crygd<sup>Lop12</sup></i> | G/C A/T                         | Smith et al., 2000         |
|                  | <i>Cryge<sup>elo</sup></i>   | 1 bp Deletion                   | Cartier et al., 1992       |
|                  | <i>Cryge<sup>ns</sup></i>    | Deletion > 1,8 kb               | 4.2.4.2                    |

Das Auftreten von vier spontanen Mutationen sowie von vier induzierten Mutationen in den *Cryg* Genen lassen diese als einen „Hot Spot“ für Mutationen erscheinen. Dieses wird auch unterstützt durch die große Anzahl allelischer *Cat2* Mutanten (22), die größte allelische Gruppe in der Neuhäuser Kataraktsammlung (Favor und Neuhäuser-Klaus, 2000) (Anhang Tab. A3), die weitere mögliche Mutationen in den *Cryg* Genen tragen. Eine Ursache hierfür ist vermutlich, daß sich Austausche in der konservierten Aminosäureabfolge der  $\beta$ -Kristalline fast immer in Veränderungen der Proteineigenschaften auswirken, wodurch Katarakte leicht induziert werden können.

### 5.1.3 Charakterisierung der *Cryg* Genregion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten für sechs *Cat2* Mutanten Mutationen in  $\beta$ -Kristallin Genen bestimmt werden. Somit ist der *Cat2* Genort mit dem  $\beta$ -Kristallin Gencluster identisch. Der genetische Abstand zwischen dem *Cat2* und *Cryg* Genort, der nach Maus Komitee Report (2000) (<http://www.informatics.jax.org/ccr>) ein cM (*Cat2* 31 cM und *Cryg* 32 cM) beträgt, ist

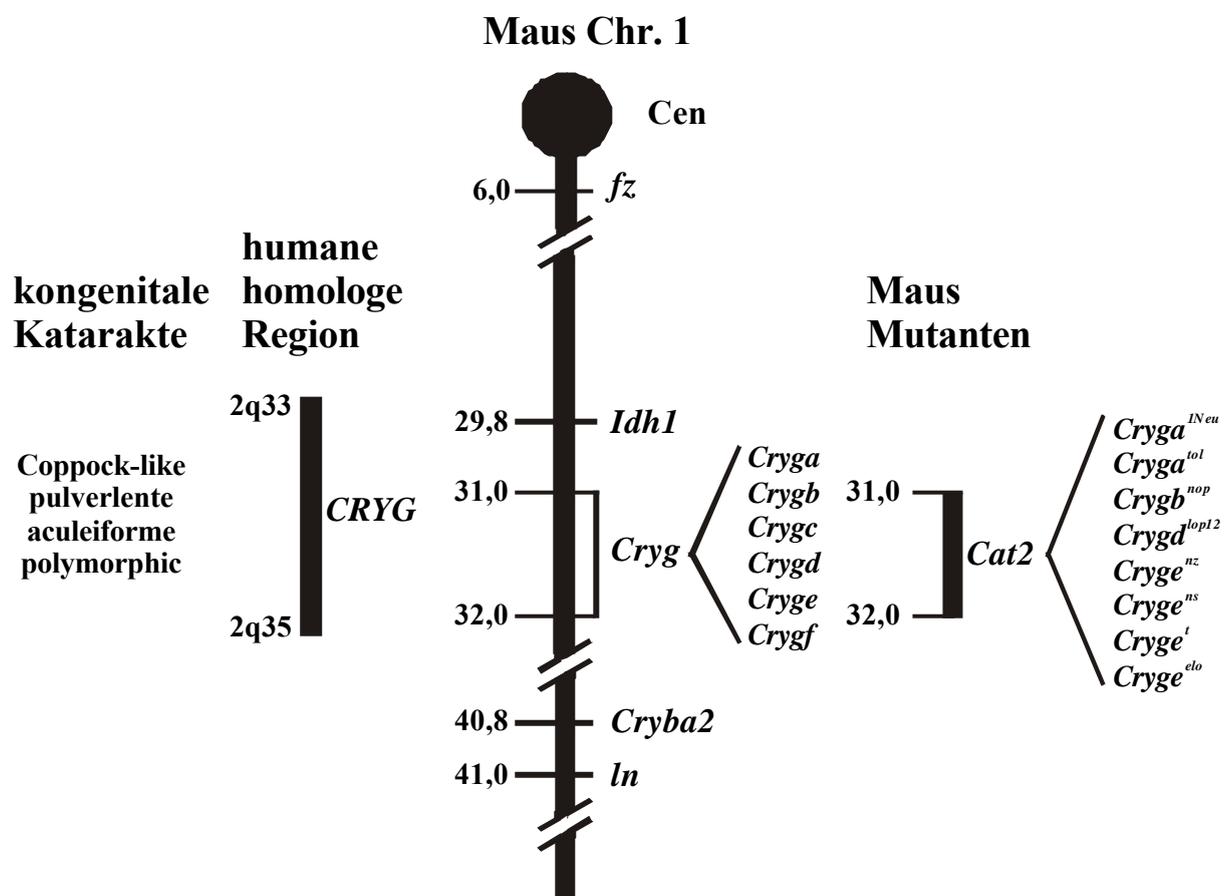
demnach hinfällig. Da für die Ratte eine physikalische Größe des Genclusters von 51 kb gezeigt wurde und bei der Maus von einer Größe von mehr als 80 kb ausgegangen werden muß, ist eine genetische Unterteilung des Genclusters in centi Morgan nur schwer möglich. Daher sollten die in den *Cryg* Genen defekten *Cat2* Mutanten in einem Genort zusammengefaßt werden. Eine Trennung der *Cat2* Genorte, durch genetische Abstände zu flankierenden Markern (*fz*, *Idh* und *ln*), wie in Abb. 1.4 dargestellt, ist aufgrund der engen physikalischen Kopplung der Gene unzulässig. Eine veränderte Karte für diese Genregion ist in Abb. 5.1 dargestellt. Anzumerken ist, daß noch nicht eindeutig geklärt werden kann, ob sich die *Cryg* Gene bei 31 cM oder 32 cM befinden, da in verschiedenen Rückkreuzungssysteme unterschiedliche Kartierungsergebnisse erhalten wurden. Ein standardisiertes System mit gleichen flankierenden Markern könnte eingesetzt werden, um in einer Rückkreuzung sowohl die *Cryg* wie die mutanten *Cat2* Genorte zu kartieren.

In einer Feinkartierung mit 338 Tieren wurde die *Cryge*<sup>f</sup> Mutante in die Nähe des *Cryge* Gens, mit einem Abstand von  $0,3 \pm 0,3$  cM kartiert. Hierbei wurde eine Rekombinate unter 338 Nachkommen zwischen einer stammspezifischen *StuI* Restriktionsschnittstelle an Position 438-444 im *Cryge* Gen gefunden (Löster et al., 1994). Eine Transversion an Position 432 dieses Gens konnte identifiziert werden (4.2.4.1). Daher kann entweder von einer Rekombination zwischen der *StuI* Restriktionsschnittstelle und der Transversion oder von einem Diagnose Fehler ausgegangen werden. Problematisch bei der Diagnose der polymorphen *StuI* Schnittstelle ist (in C3H Stamm vorhanden, in AKR Stamm nicht (Cartier et al., 1992)), daß hierfür ein 335 bp PCR-Produkt als Ausgangsmaterial verwendet wurde, welches wahrscheinlich nicht nur das *Cryge*, sondern auch das *Crygf* Gen repräsentiert. Da bei der *Cryge*<sup>f</sup> Mutante in beiden Genen die stammspezifische *StuI* Restriktionsschnittstelle vorhanden ist (siehe auch 4.2.6), besteht die Möglichkeit, daß eine Rekombinante zwischen der *Cryge*<sup>f</sup> Mutante und dem in der Nähe liegenden *Crygf* Gen diagnostiziert wurde.

Zur Aufklärung der genauen Lage der *Cryg* Gene im Gencluster, sowie zur Bestimmung dessen Größe, ist die Sequenzierung dieser Genregion in der Maus notwendig. Die Charakterisierung der *Cryg* Genregion ist ebenfalls sinnvoll für die eventuelle Herstellung von transgenen Mäusen, wie z.B. die Einführung einer Null-Mutation für ein *Cryg* Gen oder das für gesamte Gencluster. Hierfür ist ein geschlossenes BAC-Contig hilfreich. Für die Etablierung eines Contigs für die *Cryg* Genregion könnten die unter 4.2.4.2 gezeigten BAC-Klone (45O6, 130G4, 173H21 und 220P7), die für das *Crygf* Gen positive sind, den Ausgangspunkt bilden. Dieser BAC-Klone sind jedoch nicht für *Cryga-f* Gen positiv, d.h. die

Lage des *Crygf* Gens bleibt weiterhin unklar. Das Gen ist jedoch sicherlich weiter als die bisher bei der Ratte gezeigten 25 kb vom Cluster entfernt.

Einen schnellen Fortschritt für eine vollständige Sequenz der hier interessierenden Genregion ist für den Menschen im Rahmen der Humanen Genomprojektes (HUGO) zu erwarten. Bereits jetzt befindet sich eine 19,4 Mb große Sequenz (Acc. Nr.: AC013409) in der htgs (unfinished high throuhput genomic sequence) Genbank (NCBI), die Sequenzhomologien zu allen humane *CRYG* Genen besitzt. Möglicherweise steht somit in näherer Zeit die Sequenz für den menschlichen  $\alpha$ -Kristallin Gencluster zur Verfügung, von dem aus weitere Rückschlüsse auf die entsprechenden Mausequenzen gezogen werden können.



**Abbildung 5.1** Überarbeitete, partielle, genetische Karte des Mauschromosoms 1 und der homologen Region des Menschen.

Auf der linken Seite der schematischen Chromosomenkarte sind die Abstände in cM vom Centromer angegeben: *fz* (*fuzzy*), *Idh1* (*Isocitrat Dehydrogenase*), *Cryg* ( $\alpha$ -*crystallin*), *ln* (*leaden*). Der Karte wurde der Maus Komitee Report (2000) für Chromosom 1 und verschiedene Arbeiten, in denen  $\alpha$ -Kristallin Mutationen kartiert wurden zugrunde gelegt (Everett et al., 1994; Löster et al., 1994; Cartier et al., 1992; Smith et al., 2000; Stephan et al., 1999; Héon et al., 1999).

#### 5.1.4 Zeitliche und räumliche Expression der $\alpha$ -Kristalline

Die Analyse der Expression der  $\alpha$ -Kristalline während der Embryogenese gibt Hinweise auf ihre Rolle während der Entwicklung der Augenlinse. Rückschlüsse daraus können bei der

Analyse der Kataraktbildung verwendet werden. Am Tag 12.5 der Embryogenese konnten als erstes  $\gamma$ -Kristallin Transkripte von *Cryga* und *Crygef* nachgewiesen werden (4.3). Da an E10.5 und E11.5 keine *Cryg* mRNA's gefunden worden, ist damit der Start der  $\gamma$ -Kristallin Expression mit E12.5 bestimmt worden. Die Expression von *Cryga*, *Cryge* und *Crygf* an E12.5 ist auch von (Goring et al., 1992) mit RT-PCR gezeigt worden; mit *in situ* Hybridisierung konnten bei der Maus die ersten  $\gamma$ -Kristallin Transkripte an E13.5 nachgewiesen werden (Santhiya et al., 1995).

Die Expression aller *Cryg* Gene ab Tag E14.5, konnte zum erstenmal in dieser Arbeit gezeigt werden. Die Transkription bleibt anschließend bis zur Geburt unverändert. Somit kann für alle *Cryg* Mutanten eine Manifestation des Phänotyps vor der Geburt vermutet werden. Die Expression der übrigen *Cryg* Gene wurde von Goring et al. 1992 erst mit E16.5 untersucht. Sie konnten die Expression von *Cryga*, *Crygb* und *Crygd* mit E16.5 und von *Crygc* mit P10 belegen. Widersprüchlich zwischen der Arbeit von Goring et al. 1992 und der hier vorliegenden Arbeit ist somit die pränatale Expression des *Cryg* Gens. Diese Frage sollte im Detail experimentell geklärt werden, jedoch scheint es unwahrscheinlich, daß eines der extrem homologen *Cryg* Gene einen wesentlich späteren Expressionsbeginn besitzen sollte als alle anderen.

Beachtenswert ist, daß von acht *Cryg* Mutationen, bei denen das betroffene Gen identifiziert wurde, vier das *Cryge* Gen und zwei das *Cryga* Gen betreffen. Der Expressionsbeginn des *Cryga* und des *Cryge* Gens liegt deutlich vor dem der anderen *Cryg* Gene (4.3). Bei den entsprechenden Mutanten kann sich der Phänotyp schon früh manifestieren und einen schweren Phänotyp entwickeln - auch bei geringen Defekten der  $\gamma$ -Kristalline. Spät exprimierte Gene wirken sich phänotypisch vermutlich weniger stark aus. Möglicherweise ist die Augenlinse in ihrer frühen Differenzierung auch sensitiver gegen veränderte Strukturproteine, als in älteren Stadien. Daher kann davon ausgegangen werden, daß Mutationen im *Cryga* und im *Cryge* Gen in neu identifizierten *Cat2* Mutanten, weiterhin überrepräsentiert sein werden.

Für eine genaue Betrachtung des Einflusses der Expression in Hinblick auf die Kataraktbildung, sollte die Bestimmung der Expression der *Cryg* Gene in den betroffenen Mutanten auf quantitativer Ebene erfolgen. Bis jetzt konnte in verschiedenen Arbeiten eine reduzierte Menge an  $\gamma$ -Kristallin Transkripten festgestellt werden (Quinlan et al., 1987; Graw et al., 1990b; Santhiya et al., 1995). Zu klären bleibt, ob dieser Prozeß einen Primäreffekt aufgrund der Synthese mutierter  $\gamma$ -Kristalline darstellt, oder ein sekundärer Effekt der Kataraktentstehung ist, der die gesamte Zellphysiologie betrifft.

Einer näheren Untersuchung bedarf auch die Expression der  $\gamma$ -Kristalline in der Retina, wie bei (Jones et al., 1999) beschrieben. Unterstützt wird das Vorhandensein einer Expression in diesem Gewebe auch durch die Isolation eines EST's aus humaner Retina (Acc. Nr.: AA457298) mit hoher Homologie zum humanen *CRYGC* Gen. Jedoch konnte bisher kein Unterschied zwischen der Retina der *Cryg* Mutanten und dem C3H-Kontrollstamm beobachtet werden. Da die Expression der  $\gamma$ -Kristalline in der Retina nur in späten Entwicklungsstadien nachgewiesen wurde und für sie dort eine anti-Stress-Funktion angenommen wird (Jones et al., 1999), ist ein Phänotyp nicht unbedingt zu erwarten. Es ist empfehlenswert, eine retinale Expression der *Cryg* Gene *in situ* mittels Hybridisierung oder Immunohistochemie zu analysieren, da eine präparative Trennung der Retina von der Linse vor allem bei der Maus nur unzureichend durchführbar ist. Bei der sensitiven Methode der RT-PCR könnte eine schwache Kontamination des Retinamaterials mit Linsenmaterial zu falsch positiven Ergebnisse führen.

## 5.2 Konsequenzen der Mutationen auf die $\gamma$ -Kristallinproteine

### 5.2.1 Kurze $\gamma$ -Kristallin Peptide

Eine Mutation im *CRYGA* Gen, die vermutlich zur Synthese eines kurzen  $\gamma$ -Kristallin Peptids führt, konnte bei einer menschlichen Katarakt-Familie nachgewiesen werden (4.4). Die Mutation ist allerdings nicht mit der Kataraktentstehung assoziiert und wird als ein seltener Polymorphismus angesehen. Für Expression der menschlichen  $\gamma$ -Kristalline sind zum Hauptteil das *CRYGC* und das *CRYGD* Gen verantwortlich (Brakenhoff et al., 1990). Für beide Gene konnten Mutationen, die zu Katarakten führen, belegt werden (1.3). Nur zu einem geringen Anteil ist das *CRYGA* Gen an der  $\gamma$ -Kristallin-Expression im Menschen beteiligt. Es könnte auch vermutet werden, daß die Expression des verkürzten *CRYGA* Proteins, dessen mRNA als stabil angenommen wird (5.1.2), in Heterozygoten zu gering ist, um eine Katarakt zu induzieren.

Die Aktivierung des *CRYGE* Pseudogens und die daraus resultierende Synthese eines 6 kDa Peptids wurde für den Coppock-ähnlichen Katarakt als ursächlich angenommen (Brakenhoff et al., 1994). Jedoch konnte die beschriebene Mutation, die zur Aktivierung des Pseudogens führt als normaler Polymorphismus identifiziert werden, da sie in 23% aller untersuchten Probanden auftrat (Héon et al., 1999). Somit wurde nachgewiesen, daß die Synthese eines kleinen  $\gamma$ -Kristallin Peptids keine Kataraktbildung bewirkt. In Analogie dazu wird für den in dieser Arbeit gefundenen humanen Polymorphismus davon ausgegangen, daß zwar die

Synthese eines A-Kristallin-Peptids von 4,5 kDa Größe stattfindet, jedoch keine Katarakt erzeugt. Entweder ist dessen Expression verglichen mit den übrigen -Kristallinen in der Augenlinse zu gering, oder das Peptid ist so klein, daß es schnell abgebaut wird und dadurch keine toxischen Effekte auf die Augenlinse hat. Andererseits konnte mit dem Cryge<sup>nz</sup>-Protein, bzw. seinem Abbauprodukt, das bis jetzt kleinste veränderte Protein, das eine Katarakt erzeugt, mit einem Molekulargewicht von 13 kDa. bzw. 10 kDa nachgewiesen werden. Es kann deshalb angenommen werden, daß ein mutiertes -Kristallin eine Molekularmasse von ca. 10 kDa aufweisen muß, um einen toxischen Effekt auf die Augenlinse zu haben, der zu Kataraktentstehung führt.

Für die Maus sind vergleichbare Mutationen nicht bekannt, da die Synthese kleiner -Kristallin-Peptide scheinbar auch in der Augenlinse der Maus keinen Phänotyp erzeugt.

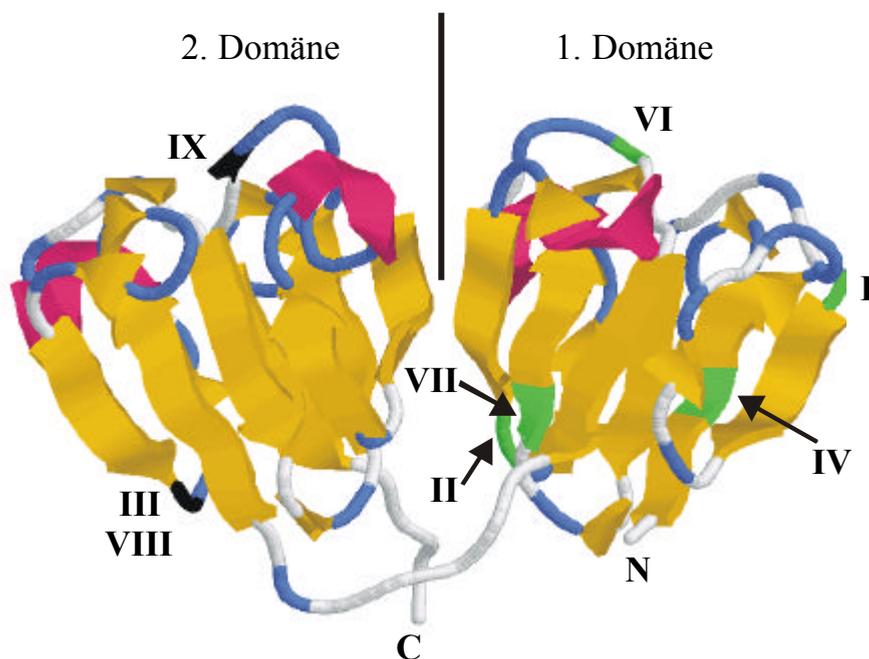
### 5.2.2 Aminosäureaustausche in den -Kristallinen

Bei der detaillierten Untersuchung der -Kristallinsequenzen konnten in dieser Arbeit 5 Sequenzunterschiede festgestellt werden, die im Vergleich zur Genbank-Einträgen zu Austauschen in der Aminosäureabfolge führen und wahrscheinlich nicht auf fehlerhafte Genbank-Sequenzen beruhen (5.1.2). Zwei dieser Austausche sind, ebenso wie drei weitere in der Literatur beschriebene, für Kataraktentstehung verantwortlich (1.3).

Die drei Aminosäureaustausche, die nicht mit einer Katarakt in Verbindung stehen (die Austausche in Tab. 5.3 Nr. III und VIII sind in der Aminosäureabfolge identisch), liegen in der 2. Domänen der Proteine. Diese Domäne wird vom Exon 3 codiert und ist weniger stark zwischen den Spezies konserviert als die 1. Domäne der -Kristalline (Anhang Tab. A1). Die beiden Positionen, an denen die Austausche zu finden sind, sind nicht konserviert und die jeweils ausgetauschte Aminosäure findet sich auch in den anderen -Kristallinen wieder (Tab. 5.1). Die Austausche haben vermutlich wenig Einfluß auf die Sekundär- und Tertiärstruktur, da beim Austausch Val Met (Tab. 5.3 III und IX) eine unpolare und bei Lys Arg (Tab 5.3 IX) eine basische Aminosäure erhalten bleibt. Somit können die beiden Austausche als „erlaubt“ bezeichnet werden. Die 2. Domäne kann aufgrund der beobachteten Austausche und der geringeren Konserviertheit als variabler und unempfindlicher gegenüber Veränderungen bezeichnet werden, als die 1. Domäne. Außerdem sind alle dokumentierten Aminosäureaustausche in der 1. Domäne mit Katarakten assoziiert, die vermutlich durch Veränderungen der Proteineigenschaften verursacht werden.

**Tabelle 5.3** Aminosäureaustausche in den  $\gamma$ -Kristallinen

|             | Gen          | Position (AS) | Aminosäure-<br>austausch | Phänotyp | Referenz                   |
|-------------|--------------|---------------|--------------------------|----------|----------------------------|
| <b>I</b>    | <i>CRYGD</i> | 14            | Arg Cys                  | Katarakt | Stephan et al., 1999       |
| <b>II</b>   |              | 58            | Arg His                  | Katarakt | Héon et al., 1999          |
| <b>III</b>  |              | 100           | Val Met                  |          | 4.4                        |
| <b>IV</b>   | <i>CRYGC</i> | 5             | Thr Pro                  | Katarakt | Héon et al., 1999          |
| <b>VI</b>   | <i>Cryga</i> | 77            | Asp Gly                  | Katarakt | 4.2.2.1 Klopp et al., 1998 |
| <b>VII</b>  |              | 43            | Trp Arg                  | Katarakt | 4.2.2.2                    |
| <b>VIII</b> | <i>Crygd</i> | 100           | Val Met                  |          | 4.2.6                      |
| <b>IX</b>   |              | 163           | Lys Arg                  |          | 4.2.6                      |

**Abbildung 5.2** Positionen der Aminosäureaustausche in der  $\gamma$ -Kristallinstruktur

Strukturdarstellung eines Wildtyp  $\gamma$ -Kristallinproteins nach Swiss-Modell (<http://www.expasy.ch>) mit RasMol 2.6. Die ausgetauschten Aminosäuren, die Katarakte verursachen (nach Tab. 5.3. Nr.: **I**, **II**, **IV**, **VI**, **VII**) sind grün und die keine Katarakt verursachen (nach Tab. 5.3. Nr.: **III**, **VIII**, **IX**) sind schwarz markiert. Die Einteilung der Proteindomänen ist eingezeichnet. Erläuterungen siehe Text.

Gelb =  $\beta$ -Faltblatt, Rot =  $\alpha$ -Helix, Blau = Loop

Der Austausch eines negativ geladenen Asparagins gegen ein neutrales Glycin (D77G) (Tab. 5.3 VI) hat in der *Cryga*<sup>1Neu</sup> Mutante eine Katarakt zur Folge. Dieser Austausch liegt in dem Übergang (Loop) zum vierten  $\beta$ -Faltblatt (d2) des zweiten „Griechischen Schlüssel“ Motivs (4.2.2.1). Dieser Übergangsbereich besitzt im Molekül viele Freiheitsgrade und außerdem sind für das Asparagin 77 keine intramolekulare Wechselwirkungen bekannt (Norledge et al., 1997). Somit wird, von einer minimalen Änderung der Proteinstruktur durch die Mutation ausgegangen. Die Auswirkungen der Mutation könnte durch Strukturanalysen von rekombinant exprimiertem Protein mittels CD (Circulardichorismus), NMR (Nuclear Magnetic Resonance-Spektroskopie), oder Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden.

Unterstützt wird die Annahme einer kaum betroffenen Proteinstruktur durch Untersuchungen der Sekundär- und Tertiärstruktur des R14C Austausches (Tab. 5.3 I) mit CD. Hier konnte belegt werden, daß der Aminosäureaustausch keine Strukturänderungen zur Folge hat (Pande et al., 2000). Da die Mutante jedoch an der Oberfläche durch den Austausch ein Cystein trägt, wird eine Thiol-vermittelte Aggregation als Ursache für die Katarakt angesehen. D.h., es sind wohl nicht nur falsch gefaltete  $\beta$ -Kristallin-Monomere, die Katarakte erzeugen, sondern auch veränderte Monomer-Monomer-Wechselwirkungen.

Der D77G-Austausch der *Cryga*<sup>1Neu</sup> Mutante befindet sich an einer stark konservierten Position des Proteins (s. Anhang, Abb. A1). Im Wildtyp-Protein wird die Position von einer negativ geladenen Aminosäure eingenommen. Dieses geht möglicherweise ionische intermolekulare Wechselwirkungen mit anderen Linsenproteinen ein, die z.B. wichtig für die richtige Anordnung der  $\beta$ -Kristalline in der Linsenfaserzelle sind. Durch den Tausch des Asparagins zu einem neutralen Glycin erhöht sich die Hydrophobizität an der Proteinoberfläche, was auch in computergestützten Vorhersagen zur Sekundärstruktur gezeigt werden konnte (4.2.2.1). Denkbar wäre eine Veränderung der normalen Protein-Protein-Wechselwirkungen, verbunden mit der Zerstörung der optimalen Packung der Linsenproteine und der Trübung der Augenlinse als Folge.

Der Austausch eines aromatischen Tryptophans gegen ein basisches Arginin (W43R) (Tab. 5.3 VI) führt in der *Cryga*<sup>tol</sup> Mutante ebenfalls zur Bildung einer Katarakt. Das ausgetauschte Tryptophan liegt im ersten  $\beta$ -Faltblatt (a2) des zweiten „Griechischen Schlüssel“ Motivs des A-Kristallinproteins (4.2.2.2). Computergestützte Vorhersagen (Hydrophobizität und  $\beta$ -Faltblattstruktur) deuten bei Austausch des Tryptophans auf eine Veränderung der Sekundärstruktur an dieser Position im Protein hin. Daher kann, im Gegensatz zu den Austauschen D77G und R14C, auch von einer Änderung der Proteinfaltung, ausgegangen werden. Dieses

bedarf jedoch noch der experimentellen Überprüfung, z.B. durch Strukturuntersuchungen rekombinanter Kristalline mittels CD oder NMR.

Die von Héon et al. 1999 beschriebene humane Mutation T5P im *CRYGC* Gen, die zur Coppock-ähnlichen Katarakt führt, hat wie der Austausch in der *Cryga<sup>tol</sup>* Mutante, einen Austausch in einem  $\beta$ -Faltblatt zur Folge. Dieser liegt im ersten  $\beta$ -Faltblatt des ersten „Griechischen Schlüssels“ (a1). Da die beiden betroffenen Gene, das *CRYGC* Gen beim T5P und das *Cryga* Gen beim W3R Austausch, stark exprimiert werden (Brakenhoff et al., 1990) (4.3), könnte die *Cryga<sup>tol</sup>* Maus Mutante als eine Modell für den Coppock-ähnlichen Katarakt verwendet werden.

### 5.2.3 $\beta$ -Kristalline mit zerstörtem vierten „Griechischen Schlüssel“ Motiv

In dieser Arbeit konnten zwei Mutanten (*Crygb<sup>nop</sup>* und *Cryge<sup>t</sup>*) identifiziert werden, bei denen das vierte „Griechischen Schlüssel“ Motiv aufgrund der Mutationen fehlt (4.2.3 und 4.2.4.1). Bei der bereits beschriebenen *Cryge<sup>elo</sup>* Mutante ist das vierte „Griechischen Schlüssel“ Motiv ebenfalls nicht vorhanden (Cartier et al., 1992). Vor kurzem wurde eine Mutation für die *Crygd<sup>Lop12</sup>* Mutante beschrieben, die zum Verlust des letzten  $\beta$ -Faltblatts des vierten „Griechischen Schlüssel“ Motivs im D-Kristallin führt (Smith et al., 2000). Deshalb kann auch bei dieser Mutante von einer starken strukturellen Veränderung im vierten „Griechischen Schlüssel“ des Proteins ausgegangen werden.

Es sind bis jetzt keine vergleichbaren menschlichen Mutationen bekannt.

**Tabelle 5.2** Mutanten der Maus mit  $\beta$ -Kristallinen mit zerstörten vierten „Griechischen Schlüssel“

| Maus Mutante                 | Kristallinprotein | Aminosäuren | codierte $\beta$ -Faltblätter* | Quelle                     |
|------------------------------|-------------------|-------------|--------------------------------|----------------------------|
| <i>Crygb<sup>nop</sup></i>   | B                 | 144         | 13 (a1 a4)                     | 4.2.3 Klopp et al., 1998   |
| <i>Crygd<sup>Lop12</sup></i> | D                 | 156         | 15 (a1 c4)                     | Smith et al., 2000         |
| <i>Cryge<sup>elo</sup></i>   | E                 | 145         | 12 (a1 d3)                     | Cartier et al., 1992       |
| <i>Cryge<sup>t</sup></i>     | E                 | 143         | 13 (a1 a4)                     | 4.2.4.1 Klopp et al., 1998 |

\* Einteilung der  $\beta$ -Faltblätter nach (Slingsby und Clout, 1999), siehe auch Abb. Anhang A1.

Aus der Synthese der verkürzten Proteine resultieren relativ stabile  $\gamma$ -Kristalline mit Molekulargewichten von 16–17 kDa. Diese konnten mit spezifischen Antikörpern in Linsenextrakten der *Crygb<sup>nop</sup>* (Klopp et al., 1998) und der *Cryge<sup>elo</sup>* Mutante (R. Quinlan, persönliche Mitteilung) nachgewiesen werden. Das *Crygb<sup>nop</sup>* sowie das *Cryge<sup>elo</sup>* Protein konnten auch in der Augenlinse mittels Immunohistochemie beobachtet werden (Lutz, 2000; R. Quinlan, persönliche Mitteilung). Daher wir davon ausgegangen, daß diese Proteine stabil in der Augenlinse vorliegen. Der Nachweis des *Cryge<sup>t</sup>*-Proteins in der *Cryge<sup>t</sup>* Mutante steht noch aus, kann aber mit einem polyklonalen  $\gamma$ -Kristallin Antiserum im Western-Blot durchgeführt werden. In der *Crygd<sup>Lop12</sup>* Mutante konnten, mit polyklonalen  $\gamma$ -Kristallin Antikörpern, Abbauprodukten der Größe 14 und 16 kDa gezeigt werden (Smith et al. 2000). Ein spezifischer Abbau der mutierten  $\gamma$ -Kristalline konnte, anders als in der *Crygd<sup>Lop12</sup>* Mutante, in den *Crygb<sup>nop</sup>* und *Cryge<sup>elo</sup>* Mutanten nicht beobachtet werden. Weitere Experimente mit spezifischen Antikörpern müssen darüber Aufschluß geben, ob es sich bei den Abbauprodukten wirklich um Fragment der mutierten  $\gamma$ -D-Kristallins handelt.

Offen ist die Frage bezüglich der Faltung der 2. Domäne der verkürzten  $\gamma$ -Kristalline. Die Faltung ist durch das Fehlen, bzw. die Zerstörung des "Griechischen Schlüssel"-Motivs vermutlich stark betroffen. Bis jetzt ist noch ungeklärt, wie und in welchem Ausmaß die Proteinkonformationen und die Protein-Protein-Wechselwirkungen durch die Verkürzung beeinflußt werden. Strukturuntersuchungen rekombinanter Proteine mittels CD, NMR oder Röntgenstrukturanalyse sowie die computergestützte Analyse (z.B. mit dem Programm "WHAT IF", CMBI, Nijmegen) könnten Hinweise darauf geben.

Die Proteine ohne das vierte „Griechische Schlüssel“ Motiv besitzen noch die vollständige 1. Domäne der  $\gamma$ -Kristalline, was diesen Proteinen eine hohe Stabilität in der Augenlinse verleiht. Da die Proteine jedoch nicht mehr ihre ursprüngliche Gesamtstruktur haben, könnten sie toxische Effekte in Form der Kataraktbildung in der Augenlinse haben.

#### 5.2.4 Das *Cryge<sup>nz</sup>*-Protein

Für die *Cryge<sup>nz</sup>* Mutante konnte die Synthese eines veränderten  $\gamma$ -Kristallins mit einem Molekulargewicht von 13 kDa nachgewiesen werden (4.2.4.2). Dieses Protein unterscheidet sich stark von den vorher beschriebenen  $\gamma$ -Kristalline Mutanten. Es wird aufgrund computergestützter Vorhersagen davon ausgegangen, daß N-terminal nur die ersten drei  $\gamma$ -Faltblätter (a1-c1) gebildet werden, was vermutlich nicht einmal zur Faltung eines korrekten „Griechischen Schlüssel“ Motivs ausreicht. Der zusätzliche C-terminale Bereich des Proteins, dessen

Aminosäureabfolge durch eine Leserasterverschiebung entsteht (96 Aminosäuren), zeigt keine Homologie zu bekannten Proteinen. Daher sind zur Tertiärstruktur Vorhersagen nicht möglich. Für die Sekundärstruktur konnten mit SwissProt Programmen (<http://www.expasy.ch>) zwei mögliche Transmembran Domänen vorhergesagt werden, dieser Befund bedarf jedoch noch einer experimentellen Überprüfung, denn bis jetzt konnte das Protein nur in löslichen Fraktionen von Linsenextrakten nachgewiesen werden.

Mittels Western-Blot konnte auch ein Abbauprodukt des Cryge<sup>nz</sup>-Proteins mit einem Molekulargewicht von 10 kDa beobachtet werden. Somit sind nicht alle synthetisierten mutierten Proteine in der Kataraktlinse stabil. Offen ist, wie der Abbau des Proteins durchgeführt wird. Die Aminosäureabfolge enthält eine Spaltstelle für die bakterielle Endopeptidase LysC (Jekel et al., 1983) (EC 3.4.21.50). Ob die Endopeptidase die Spaltstelle im Cryge<sup>nz</sup>-Protein benutzt, könnte mit rekombinant exprimierten Protein *in vitro* getestet werden. Falls eine Spaltung beobachtet wird, könnte man postulieren, daß eine eukaryontische Endopeptidase mit einer vergleichbaren Aktivität am Proteinabbau in der Augenlinse beteiligt ist. Nach wie vor bleibt jedoch unklar, ob der Abbau spezifisch oder unspezifisch ist.

Aufgrund des völlig veränderten nz-Proteins sind die Erkenntnisse, die aus den Analysen der übrigen Cryg Mutationen gewonnen wurden, nur schwer auf die Cryge<sup>nz</sup> Mutante übertragbar.

### 5.2.5 Mutierte $\gamma$ -Kristalline sind toxisch für die Augenlinse

Bisher konnten, wie in dieser Arbeit und in der Literatur beschrieben, ausschließlich Mutationen in den  $\gamma$ -Kristallinen nachgewiesen werden, die die Expression veränderter Proteine zur Folge haben. Es ist jedoch noch keine Null-Mutation für die  $\gamma$ -Kristalline, d.h. das vollständige Fehlen aller  $\gamma$ -Kristallinproteine, bekannt. Aus diesem Grund, sowie dem ähnlichen Expressionsmuster und der starken Konserviertheit der  $\gamma$ -Kristalline läßt vermuten, daß das Fehlen einzelner  $\gamma$ -Kristalline keine Katarakt erzeugt, denn u. U. kompensieren die verbleibenden fünf  $\gamma$ -Kristallin-Gene der Maus den Ausfall des betroffenen  $\gamma$ -Kristallins. Eine Null-Mutation der  $\gamma$ -Kristalline wäre jedoch sehr hilfreich für die Ermittlung der genauen Funktion dieser Proteine in der Linsenfaserzelle. Um diese Mutation zu erhalten, müßte der gesamte Gencluster ausgeschaltet werden. Das Cre/lox-System ließe dabei ein örtliches und/oder zeitliches Ausschalten der Proteinexpression zu und könnte parallel zu einem klassischen "Knockout" des Genclusters durchgeführt werden (Li et al., 1996). Momentan ist dieses Experiment noch nicht durchführbar, da die Genregion noch nicht vollständig charakterisiert ist (4.2.4.2 und 5.1.3).

Alle bekannten pathologischen Veränderungen der Augenlinse, die ursächlich durch Mutationen in  $\alpha$ -Kristallinen hervorgerufen werden, stehen im Zusammenhang mit der Expression veränderter Proteine. Daher sollten die mutierten Proteine ab einer Größe von 10 kDa (5.2.1) durch eine Art von „gain of function“ als toxisch für die Augenlinse angesehen werden. Um die Toxizität der veränderten  $\alpha$ -Kristallin-Proteine nachzuweisen und damit einen besseren Einblick in die Mechanismen der Kataraktentstehung zu bekommen, bietet sich die Generierung transgener Mausmodelle als weiteres Experiment an. So könnte untersucht werden, ob die zusätzliche Expression eines  $\alpha$ -Kristallins ohne viertes „Griechische Schlüssel“ Motiv, z.B. das Crygb<sup>nop</sup> Protein, oder die eines  $\alpha$ -Kristallins mit einem Aminosäureaustausch, z.B. das CRYGD Protein mit dem R58H Austausch (als Modell für den aculeiformen Katarakt) ausreicht, um eine Katarakt zu erzeugen. Zusätzlich könnte ein Reportergen, wie z.B. *GFP* oder *lacZ* mit dem transgenen Konstrukt eingebracht werden, um einen Nachweis der Expression des Transgens zu haben. Es könnte für dieses Konstrukt der  $\alpha$ -Kristallinpromotor verwendet werden, von dem gezeigt ist, daß er in transgenen Mäusen ausreichend für eine linsenspezifische Expression ist (Goring et al., 1987). Für das Reportergen *lacZ* ist gezeigt, daß es in der Linse exprimiert keine Katarakt erzeugt (Gong et al., 1998). Es werden zwar alle Katarakte mit Mutationen in den  $\alpha$ -Kristallinen durch veränderte toxische Proteine hervorgerufen, jedoch sind auch zwei Mutationen in den  $\alpha$ -Kristallinen bekannt, die nicht zu Kataraktentstehung führen (5.2.1). In diesen beiden Fällen werden vermutlich nur kleine Peptide mit einem Molekulargewicht von 4,5-6,0 kDa synthetisiert (bei *CRYGE* Reaktivierung nachgewiesen). Diese sind entweder nicht hinreichend toxisch, oder können abgebaut werden, um einen pathologischen Effekt auf die Augenlinse zu haben.

### 5.3 Kataraktentstehung durch mutierte $\alpha$ -Kristalline

Die detailliertesten Untersuchungen der Physiologie von Kataraktlinsen sind bisher bei der Maus durchgeführt worden. Besonders das zahlreiche Auftreten verschiedener  $\alpha$ -Kristallin-Mutanten ermöglicht die Aufklärung der Zusammenhänge zwischen der Expression mutierter Proteine und der Kataraktbildung.

#### 5.3.1 Verbindung zwischen der Expression mutierter Proteine und Katarakt-Phänotypen

Die mutanten Augenlinsen weisen alle den Phänotyp der Mikrophthalmie auf. Die *Cryg* Phänotypen sind daher mit Wachstumsstörungen in der Augenentwicklung insgesamt ge-

koppelt. Die unterschiedliche Ausprägung der pathologischen Effekte gründet auf der Art der Mutation und damit auf die Natur des veränderten Proteins sowie auf den Zeitpunkt des Beginns der Expression während der Embryogenese.

Die Diskussion der *Cryga<sup>tol</sup>* und *Cryge<sup>ns</sup>* Phänotypen wäre verfrüht, da für die *Cryga<sup>tol</sup>* Mutante bisher keine detaillierte morphologische und histologische Untersuchungen durchgeführt wurden und die dem *Cryge<sup>ns</sup>* Phänotyp zugrunde liegenden Mutation noch nicht identifiziert werden konnte (4.2.4.2). Auf die Diskussion wird daher an dieser Stelle verzichtet.

Die frühe Expression (E12.5) eines leicht veränderten A-Kristallins führt in der *Cryga<sup>1Neu</sup>* zu einer kleinen zentralen Katarakt (Abb. 4.1 und 4.2). Hier handelt es sich um den schwächsten Phänotyp, der durch *Cryg* Mutationen erzeugt wird. In den *Crygb<sup>nop</sup>* und *Crygd<sup>lop12</sup>* Mutante werden bis 3 Monate nach der Geburt vergleichbare Phänotypen beobachtet. Beide Mutanten haben eine starke zentrale Katarakt (Abb. 4.1) (Graw et al., 1990b; Smith et al., 2000). In beiden Mutanten werden  $\gamma$ -Kristalline exprimiert, bei denen die Faltung des 4. „Griechischen Schlüssel“ Motivs stark beeinträchtigt ist. Der Beginn der Expression liegt bei Tag E14.5. Die ersten histologischen Veränderungen sind in der *Crygb<sup>nop</sup>* Mutante ab dem Stadium E15.5 zu beobachten (Lutz, 2000). Die frühe Expression des *Cryge* Gens (E12.5) führt in Abhängigkeit der Art der Mutation und damit von der Toxizität des veränderten Proteins zu unterschiedlichen Phänotypen. In der *Cryge<sup>t</sup>* und *Cryge<sup>elo</sup>* Mutanten bewirkt die Synthese von  $\gamma$ -Kristallinen ohne vierten „Griechischen Schlüssel“ die Ausprägung einer sehr starken Katarakt. Die Entwicklung der Augenlinsen der *Cryge<sup>t</sup>* und *Cryge<sup>elo</sup>* Mäuse ist soweit gestört, daß nicht einmal eine zentrale Trübung ausgebildet wird, da die Linsenfaserzellen frühzeitig degenerieren (Graw et al., 1990a) (Oda et al., 1980). In der *Cryge<sup>t</sup>* Mutante ist die erste pathologische Veränderung am Tag E14.5 durch die verminderte Elongation der primären Linsenfaserzellen erkennbar (Lutz, 2000). In der *Cryge<sup>nz</sup>* Mutante führt die frühe Synthese (E12.5) eines völlig veränderten  $\gamma$ -Kristallins zu einer starken zentralen Katarakt (Abb. 4.1), vergleichbar mit dem Phänotyp der *Crygb<sup>nop</sup>* Mutante. Die ersten morphologischen Veränderungen dieser Mutante konnten am Tag E18.5 beobachtet werden. Die *Cryge<sup>nz</sup>* Mutante weist, verglichen mit den beiden anderen *Cryge* Mutanten (*Cryge<sup>t</sup>* und *Cryge<sup>elo</sup>*) einen verhältnismäßig schwachen Kataraktphänotyp auf, d.h. geringe Toxizität des veränderten Proteins, vermutlich aufgrund der geringen Stabilität.

Aus den oben genannten Gründen wird folgender Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp für die Mutanten angenommen:

Frühe Expression + stark toxische Proteine **P** starke Katarakt (*Cryge<sup>t</sup>* und *Cryge<sup>elo</sup>*)

Späte Expression + stark toxische Proteine **P** Katarakt (*Crygb<sup>nop</sup>* und *Crygd<sup>Lop12</sup>*)

Frühe Expression + schwach toxische Proteine **P** Katarakt (*Cryge<sup>ns</sup>*)

Frühe Expression + schwach toxische Proteine **P** schwache Katarakt (*Cryga<sup>1Neu</sup>*)

Hieraus läßt sich ableiten, daß die Toxizität eines Proteins den größeren Einfluß auf den Schweregrad einer Katarakt hat, als der Beginn der Expression im Embryo. Somit ist anzunehmen, daß z.B. eine Mutation in *Cryga* Gen, die das Fehlen des vierten „Griechischen Schlüssel“ Motivs zur Folge hätte eine schwere Katarakt, mit dem der *Cryge<sup>t</sup>* Mutante vergleichbar verursacht, wohingegen eine Mutation im *Crygb* oder im *Crygd* Gen, die einen Aminosäureaustausch zur Folge hätte eine schwache oder keine Katarakt erzeugen würde.

Die aus den Daten gefolgerte Toxizität der mutierten -Kristalline, bedarf einer genauen proteinbiochemischen Untersuchung. Dieses schließt die Aufklärung der Proteinfaltungen sowie des biochemischen Verhaltens der Proteine ein. Hieraus sollten detailliert Hinweise auf den pathologischen Mechanismus erhalten werden, der zu Katarakten führt.

### 5.3.2 Veränderte Biochemie der Kataraktlinsen

Bei den Kataraktmutatanten konnten im Rahmen dieser Arbeit proteinchemische Veränderungen in den betroffenen Augenlinsen nachgewiesen werden.

Für die *Crygb<sup>nop</sup>*, die *Cryge<sup>t</sup>* und die *Cryge<sup>ns</sup>* Mutanten wurden einige biochemische Veränderungen der Augenlinse bereits beschrieben (Graw et al., 1984; Graw et al., 1989; Graw et al., 1990a; Graw et al., 1990b). Gezeigt wurde ein veränderter osmotischer Status, verursacht durch die Abnahme des Gehalts an wasserlöslichen Proteinen und an Glucose. Daneben wurde eine Verringerung der glycolytischen Enzymaktivitäten und damit einhergehend eine Abnahme des ATP-Gehalts festgestellt sowie die Zunahme Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase Aktivität.

Mit Abnahme der Menge an löslichen Proteinen wurde außerdem eine Verringerung der DNase-Aktivität beobachtet (Graw und Liebstein, 1993a; Graw, 1999b). Letzteres deutet darauf hin, daß die terminale Differenzierung der Linsenfaserzellen, in deren Zuge beim Abbau von Zellkernen (1.1.1) DNase benötigt wird, stark beeinträchtigt ist.

Zwar ist der Gesamtzusammenhang zwischen Katarakt und veränderter Linsenphysiologie bzw. Proteinchemie noch nicht geklärt, deutlich ist aber, wie oben schon erwähnt, daß die Wasserlöslichkeit der Proteine eine Rolle spielt. Vermutlich ist die Katarakt der in dieser Arbeit beschriebenen *Cryge<sup>nz</sup>* Mutante, auf die verringerte Löslichkeit des mutierten E-Kristallins zurückzuführen. Hinweise auf eine erhöhte Aggregationsneigung in der *Cryge<sup>nz</sup>* Augenlinse gab das Experiment der Fraktionierung der Linsenproteine (4.2.4.3). Nachzuweisen bleibt, ob sich die Aggregate ausschließlich aus mutiertem E-Kristallin zusammensetzen, oder ob an der Aggregatbildung andere Linsenproteine beteiligt sind. Diese Untersuchung kann mit Hilfe von Antikörpern im Western-Blot erfolgen.

Aggregationen in der Linse können auch durch kovalente Wechselwirkungen vermittelt werden. So wurden bei Untersuchungen der Eigenschaften des durch die Mutation R14C (Tab. 5.3. I) veränderten D-Kristallins mittels rekombinant exprimierter Proteine die Ausbildung von Disulfid-verbundenen Oligomeren beobachtet. Im Wildtyp findet man nur über Disulfidbrücken gekoppelte Dimere. Diese Thiol-vermittelte Aggregation wird als Ursache für die pulverulente Katarakt angesehen (Pande et al., 2000). Die vermehrte Formation von Disulfidbrücken kann zur Abnahme von oxidiertem Glutathion in der Linse führen. Dieses konnte für heterozygote *Crygb<sup>nop</sup>* Augenlinsen nachgewiesen werden (Graw et al., 1984).

Anzunehmen ist, daß auch eine veränderte ionische Zusammensetzung der Proteinoberfläche Aggregation begünstigt. Denkbar wäre es, daß in der Augenlinse der *Cryga<sup>1Neu</sup>* durch den Austausch D77G die Einführung des Glycins zu vermehrten hydrophoben Wechselwirkungen und in Folge zu Aggregatbildung führt.

In den Augenlinsen von *a<sub>3</sub>Connexin* „Knockout“ Mäusen wurde eine Katarakt festgestellt verbunden mit der Bildung von Proteinaggregaten, die als Ursache für die Linsentrübung angesehen werden. Der Gendefekt liegt zwar nicht in einem  $\gamma$ -Kristallin, die Aggregationen werden dennoch mit einem 11 kDa  $\gamma$ -Kristallin-Spatprodukt in Verbindung gebracht (Gong et al., 1997). Die Stärke der dadurch verursachten Linsentrübung ist von der Menge des  $\gamma$ -Kristallin-Staltprodukts abhängig. Dieses konnte durch die Verwendung verschiedener Stammhintergründe der *a<sub>3</sub>Connexin* „Knockout“ Mäuse ermittelt werden (Gong et al., 1999).

Veränderte, toxische  $\gamma$ -Kristalline führen somit zu Veränderungen der Zellphysiologie und Differenzierung der Augenlinse, an denen möglicherweise die Formation von Proteinaggregaten beteiligt ist.

### 5.3.3 Veränderungen der Zellphysiologie in Kataraktlinsen

Katarakt wird vermutlich durch die Störung eines weiten Spektrums von Funktionen der Augenlinsen hervorgerufen.

Offenbar ist ein unvollständiger Zellkernabbau in Linsenfaserzellen ein gemeinsames pathologisches Merkmal von Kataraktlinsen, die durch Mutationen in den *Cryg* Genen hervorgerufen werden. So wurde in der vorliegenden Arbeit eine unvollständige Degradation der Zellkerne in den Linsenfaserzellen der *Cryge<sup>nz</sup>* und der *Cryga<sup>INeu</sup>* anhand von histologischen Untersuchungen beobachtet (4.2.1 und 4.2.4.3). Ein verminderter Zellkern- und DNA-Abbau konnte mittels TUNEL (terminal transferase-mediated dUTP nick end labeling) Assay auch für die *Crygb<sup>nop</sup>* und die *Cryge<sup>t</sup>* gezeigt werden. Durch Untersuchung apoptotischer Prozesse konnte der unvollständige Abbau der Zellkerne mit der Expression der Tumorsuppressorgens *Bax* in den Kataraktlinsen in Verbindung gebracht werden (Lutz, 2000).

Toxische  $\beta$ -Kristalline werden für die Formation von Amyloid-ähnlichen Einschlüssen in Zellkernen der *Crygb<sup>nop</sup>*, die *Cryge<sup>t</sup>* und die *Cryge<sup>elo</sup>* Kataraktlinsen verantwortlich gemacht. Daher sind Effekte auf den Zellkern, wie z.B. eine Beeinflussung der Transkription denkbar, die sich wiederum in einer fehlerhaften terminalen Differenzierung der Linsenfaserzellen äußern kann. So konnte gezeigt werden, daß verminderte Mengen an  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kristallin-Transkripten in den Augenlinsen der Mutanten *Crygb<sup>nop</sup>* und *Cryge<sup>elo</sup>* vorhanden sind (Graw et al., 1990b). Daneben wurde in beiden Mutanten eine drastische Reduzierung der linsenspezifischen Intermediärfilament-Proteine CP49 und Filensin festgestellt. (R. Quinlan, persönliche Mitteilung).

In einer großen Zahl von Katarakte sind vermutlich die veränderten, toxischen  $\beta$ -Kristalline die Auslöser der Zellfunktions- und Differenzierungsstörungen mit Folge der Augenlinsentrübung. Zur Klärung der Mechanismen und Konsequenzen der Kataraktentstehung sind weitere biochemische und physiologische Untersuchungen nötig. Diese sollen in Zusammenarbeit mit Dr. R. Quinlan (Dept. of Biochemistry, Medical Science Institutes, University of Dundee, Scotland) erfolgen.

## 5.4 Ausblick

Die Identifizierung von fünf in dieser Arbeit beschriebenen *Cryg* Mutationen der Maus war ein wichtiger Schritt zur Funktionsaufklärung der  $\gamma$ -Kristalline und ihrer Rolle bei pathologischen Defekten der Augenlinse. Um eine vollständigere Grundlage für den Einfluß der  $\gamma$ -Kristalline auf die Linsenentwicklung zu bekommen, ist es sinnvoll die Mutationen weiterer *Cat2* Mutanten aufzuklären. Insbesondere die Identifikation von Mutationen in den *Crygc* und *Crygf* Genen fehlt noch. Die Neuherberger Kataraktsammlung stellt hierfür eine einzigartige Möglichkeit dar.

Für eine detaillierte Funktionsaufklärung der  $\gamma$ -Kristalline ist jedoch auch die Generierung transgener Mausmodelle hilfreich. Hierzu könnten die vorgeschlagenen Modelle (5.2.5) genutzt werden. Insbesondere wäre die Generierung einer transgenen Maus mit Expression eines mutierten humanen  $\gamma$ -Kristallins, das eine dominante Katarakt erzeugt, interessant.

In einer Familie mit einer dominanten kongenitalen Katarakt konnte eine Insertion im *CRYGA* Gen identifiziert werden, die jedoch nicht mit der Katarakt assoziiert ist. Die in dieser Arbeit vorgestellte Untersuchung könnte die Grundlage für eine systematische Analyse aller humanen Kristallin-Gene von verschiedenen Familien mit erblichen Katarakten sein. Dies könnte zu einem besseren Verständnis der Kataraktentstehung beitragen und auch eine wichtige Information für die betroffenen Patienten darstellen.

Bei den bekannten Mutationen sollten die Konsequenzen, die sich für die Proteineigenschaften ergeben, weiter untersucht werden, z.B. durch Strukturuntersuchungen rekombinanter  $\gamma$ -Kristalline mittels CD oder NMR. Durch die Aufklärung der Strukturveränderungen der mutierten Proteine ergeben sich auch Hinweise auf Protein-Protein-Wechselwirkungen. Dieses kann als Grundlage für eine detaillierte Beschreibung der biochemischen Prozesse, die zu Kataraktbildung führen, dienen.

Weitere Untersuchungen des beobachteten, unvollständigen Zellkernabbaus sollte sich anschließen. Die Mechanismen die diesen Effekt verursachen, könnten die Verbindung zwischen der veränderten Biochemie der Proteine und der gestörten terminalen Differenzierung darstellen. Der Nachweis von Amyloid-ähnlichen Einschlüssen in Zellkernen der Linsenfasern könnte ein wichtiger Hinweis auf solche pathologischen Veränderungen sein, die sich in Kataraktlinsen ereignen.

## LITERATURVERZEICHNIS

- Aiyar, A. (2000). The use of CLUSTAL W and CLUSTAL X for multiple sequence alignment. *Methods Mol.Biol.* 132, 221-241.
- Barenholtz, H. (1996). Effect of inhaled corticosteroids on the risk of cataract formation in patients with steroid-dependent asthma. *Ann.Pharmacother.* 30, 1324-1327.
- Bax, B., Lapatto, R., Nalini, V., Driessen, H., Lindley, P.F., Mahadevan, D., Blundell, T.L., und Slingsby, C. (1990). X-ray analysis of  $\beta$ 2-crystallin and evolution of oligomeric lens proteins. *Nature* 347, 776-780.
- Benjamin, I.J., Shelton, J., Garry, D.J., und Richardson, J.A. (1997). Temporospacial expression of the small HSP/  $\beta$ -crystallin in cardiac and skeletal muscle during mouse development. *Dev. Dyn.* 208, 75-84.
- Blundell, T., Lindley, P., Miller, L., Moss, D., Slingsby, C., Tickle, I., Turnell, B., und Wistow, G. (1981). The molecular structure and stability of the eye lens: x-ray analysis of  $\beta$ -crystallin II. *Nature* 289, 771-777.
- Bonini, N.M., Bui, Q.T., Gray-Board, G.L., und Warrick, J.M. (1997). The Drosophila eyes absent gene directs ectopic eye formation in a pathway conserved between flies and vertebrates. *Development* 124, 4819-4826.
- Borkman, R.F., Knight, G., und Obi, B. (1996). The molecular chaperone  $\alpha$ -crystallin inhibits UV-induced protein aggregation. *Exp. Eye Res.* 62, 141-148.
- Brady, J.P., Garland, D., Douglas-Tabor, Y., Robison, W.G.J., Groome, A., und Wawrousek, E.F. (1997). Targeted disruption of the mouse  $\alpha$ -crystallin gene induces cataract and cytoplasmic inclusion bodies containing the small heat shock protein  $\beta$ -crystallin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 884-889.
- Brakenhoff, R.H., Aarts, H.J., Reek, F.H., Lubsen, N.H., und Schoenmakers, J.G. (1990). Human  $\beta$ -crystallin genes. A gene family on its way to extinction. *J.Mol.Biol.* 216, 519-532.
- Brakenhoff, R.H., Henskens, H.A., van Rossum, M.W., Lubsen, N.H., und Schoenmakers, J.G. (1994). Activation of the  $\beta$ -crystallin pseudogene in the human hereditary Coppock-like cataract. *Hum.Mol.Genet.* 3, 279-283.
- Cartier, M., Breitman, M.L., und Tsui, L.C. (1992). A frameshift mutation in the  $\beta$ -crystallin gene of the *Elo* mouse [published erratum appears in *Nat. Genet.* (1992) 2, 343]. *Nat.Genet.* 2, 42-45.
- Chambers, C. und Russell, P. (1991). Deletion mutation in an eye lens  $\beta$ -crystallin. An animal model for inherited cataracts. *J.Biol.Chem.* 266, 6742-6746.
- Chang, B., Hawes, N.L., Roderick, T.H., Smith, R.S., Heckenlively, J.R., Horwitz, J., und Davisson, M.T. (1999). Identification of a missense mutation in the  $\alpha$ -crystallin gene of the *lop18* mouse. *Mol.Vis.* 5, 21

- Chen, R., Amoui, M., Zhang, Z., und Mardon, G. (1997). Dachshund and eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila*. *Cell* 91, 893-903.
- Chow, R.L., Altmann, C.R., Lang, R.A., und Hemmati-Brivanlou, A. (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* 126, 4213-4222.
- Coban, L. (1990). Untersuchungen zur Regulation der Expression von  $\alpha$ -Kristalline der Maus. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- de Jong, W.W., Leunissen, J.A., und Voorter, C.E. (1993). Evolution of the  $\alpha$ -crystallin/small heat-shock protein family. *Mol. Biol. Evol.* 10, 103-126.
- den Dunnen, J.T., Jongbloed, R.J., Geurts, v.K.A., und Schoenmakers, J.G. (1985). Human lens  $\alpha$ -crystallin sequences are located in the p12-qter region of chromosome 2. *Hum.Genet.* 70, 217-221.
- den Dunnen, J.T., van Neck, J.W., Cremers, F.P., Lubsen, N.H., und Schoenmakers, J.G. (1989). Nucleotide sequence of the rat  $\alpha$ -crystallin gene region and comparison with an orthologous human region. *Gene* 78, 201-213.
- Dockhorn-Dworniczak, B., Dworniczak, B., Brommelkamp, L., Bulles, J., Horst, J., und Bocker, W.W. (1991). Non-isotopic detection of single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP): a rapid and sensitive technique in diagnosis of phenylketonuria. *Nucleic.Acids.Res.* 19, 2500
- Dubin, R.A., Wawrousek, E.F., und Piatigorsky, J. (1989). Expression of the murine  $\beta$ -crystallin gene is not restricted to the lens. *Mol.Cell Biol.* 9, 1083-1091.
- Dubin, R.A., Gopal-Srivastava, R., Wawrousek, E.F., und Piatigorsky, J. (1991). Expression of the murine  $\beta$ -crystallin gene in lens and skeletal muscle: identification of a muscle-preferred enhancer. *Mol.Cell Biol.* 11, 4340-4349.
- Ehling, U.H., Favor, J., Kratochvilova, J., und Neuhäuser-Klaus, A. (1982). Dominant cataract mutations and specific-locus mutations in mice induced by radiation or ethylnitrosourea. *Mutat.Res.* 92, 181-192.
- Everett, C.A., Glenister, P.H., Taylor, D.M., Lyon, M.F., Kratochvilova-Löster, J., und Favor, J. (1994). Mapping of six dominant cataract genes in the mouse. *Genomics* 20, 429-434.
- Favor, J., Neuhäuser-Klaus, A., und Ehling, U.H. (1990a). The frequency of dominant cataract and recessive specific-locus mutations and mutation mosaics in F1 mice derived from post-spermatogonial treatment with ethylnitrosourea. *Mutat.Res.* 229, 105-114.
- Favor, J., Sund, M., Neuhäuser-Klaus, A., und Ehling, U.H. (1990b). A dose-response analysis of ethylnitrosourea-induced recessive specific-locus mutations in treated spermatogonia of the mouse. *Mutat.Res.* 231, 47-54.
- Favor, J. (1999). Mechanisms of mutation induction in germ cells of the mouse as assessed by the specific locus test. *Mutat.Res.* 428, 227-236.
- Favor, J. und Neuhäuser-Klaus, A. (2000). Saturation mutagenesis for dominant eye morphological defects in the mouse *Mus musculus*. *Mamm.Genome im Druck*,

- Fischer, S.G. und Lerman, L.S. (1983). DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* *80*, 1579-1583.
- Forker, C., Wegener, A., und Graw, J. (1997). Effects of UV-B radiation on a hereditary suture cataract in mice. *Exp.Eye Res.* *64*, 405-411.
- Francis, P.J., Berry, V., Moore, A.T., und Bhattacharya, S. (1999). Lens biology: development and human cataractogenesis. *Trends.Genet.* *15*, 191-196.
- Garnier, J., Gibrat, J.F., und Robson, B. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol.* *266*, 540-553.
- Gill, D., Klose, R., Munier, F.L., McFadden, M., Priston, M., Billingsley, G., Ducrey, N., Schorderet, D.F., und Heon, E. (2000). Genetic heterogeneity of the Coppock-like cataract: a mutation in *CRYBB2* on chromosome 22q11.2. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* *41*, 159-165.
- Gong, X., Li, E., Klier, G., Huang, Q., Wu, Y., Lei, H., Kumar, N.M., Horwitz, J., und Gilula, N.B. (1997). Disruption of  $\gamma$ 3-connexin gene leads to proteolysis and cataractogenesis in mice. *Cell* *91*, 833-843.
- Gong, X., Baldo, G.J., Kumar, N.M., Gilula, N.B., und Mathias, R.T. (1998). Gap junctional coupling in lenses lacking  $\gamma$ 3-connexin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 15303-15308.
- Gong, X., Agopian, K., Kumar, N.M., und Gilula, N.B. (1999). Genetic factors influence cataract formation in  $\gamma$ 3-connexin knockout mice. *Dev.Genet.* *24*, 27-32.
- Goring, D.R., Rossant, J., Clapoff, S., Breitman, M.L., und Tsui, L.C. (1987). *In situ* detection of  $\beta$ -galactosidase in lenses of transgenic mice with a  $\gamma$ -crystallin/lacZ gene. *Science* *235*, 456-458.
- Goring, D.R., Breitman, M.L., und Tsui, L.C. (1992). Temporal regulation of six crystallin transcripts during mouse lens development. *Exp.Eye Res.* *54*, 785-795.
- Graw, J., Kratochvilova, J., und Summer, K.H. (1984). Genetical and biochemical studies of a dominant cataract mutant in mice. *Exp.Eye Res.* *39*, 37-45.
- Graw, J., Favor, J., Neuhäuser-Klaus, A., und Ehling, U.H. (1986). Dominant cataract and recessive specific locus mutations in offspring of X-irradiated male mice. *Mutat.Res.* *159*, 47-54.
- Graw, J., Kratochvilova, J., Lobke, A., Reitmeir, P., Schaffer, E., und Wulff, A. (1989). Characterization of *Scat* (suture cataract), a dominant cataract mutation in mice. *Exp.Eye Res.* *49*, 469-477.
- Graw, J., Bors, W., Gopinath, P.M., Merkle, S., Michel, C., Reitmeir, P., Schaffer, E., Summer, K.H., und Wulff, A. (1990a). Characterization of *Cat-2<sup>t</sup>*, a radiation-induced dominant cataract mutation in mice. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* *31*, 1353-1361.
- Graw, J., Werner, T., Merkle, S., Reitmeir, P., Schaffer, E., und Wulff, A. (1990b). Histological and biochemical characterization of the murine cataract mutant *Nop*. *Exp.Eye Res.* *50*, 449-456.

- Graw, J., Coban, L., Liebstein, A., und Werner, T. (1991). Murine E-crystallin is distinct from murine 2-crystallin. *Gene* 104, 265-270.
- Graw, J. und Liebstein, A. (1993a). DNase activity in murine lenses: implications for cataractogenesis. *Graefes.Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 231, 354-358.
- Graw, J., Liebstein, A., Pietrowski, D., Schmitt-John, T., und Werner, T. (1993b). Genomic sequences of murine B- and C-crystallin-encoding genes: promoter analysis and complete evolutionary pattern of mouse, rat and human -crystallins. *Gene* 136, 145-156.
- Graw, J. (1996). Genetic aspects of embryonic eye development in vertebrates. *Dev.Genet.* 18, 181-197.
- Graw, J. (1997). The crystallins: genes, proteins and diseases. *Biol.Chem.* 378, 1331-1348.
- Graw, J. (1999a). Cataract mutations and lens development. *Prog.Retin.Eye Res.* 18, 235-267.
- Graw, J. (1999b). Mouse models of congenital cataract. *Eye* 13, 438-444.
- Graw, J., Jung, M., Löster, J., Klopp, N., Soewarto, D., Fella, C., Fuchs, H., Reis, A., Wolf, E., Balling, R., und Hrabe, d.A. (1999c). Mutation in the A3/A1-crystallin encoding gene *cryba1* causes a dominant cataract in the mouse. *Genomics* 62, 67-73.
- Grimm, C., Chatterjee, B., Favor, J., Immervoll, T., Löster, J., Klopp, N., Sandulache, R., und Graw, J. (1998). *Aphakia (ak)*, a mouse mutation affecting early eye development: fine mapping, consideration of candidate genes and altered *Pax6* and *Six3* gene expression pattern. *Dev.Genet.* 23, 299-316.
- Halder, G., Callaerts, P., und Gehring, W.J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in Drosophila. *Science* 267, 1788-1792.
- Hentze, M.W. und Kulozik, A.E. (1999). A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* 96, 307-310.
- Héon, E., Liu, S., Billingsley, G., Bernasconi, O., Tsiflidis, C., Schorderet, D.F., Munier, F.L., und Tsiflidis, C. (1998). Gene localization for aculeiform cataract, on chromosome 2q33-35 [published erratum appears in *Am. J. Hum. Genet.* (1999) 64, 334]. *Am.J.Hum.Genet.* 63, 921-926.
- Héon, E., Priston, M., Schorderet, D.F., Billingsley, G.D., Girard, P.O., Lubsen, N., und Munier, F.L. (1999). The -crystallins and human cataracts: a puzzle made clearer. *Am.J.Hum.Genet.* 65, 1261-1267.
- Hodge, W.G., Witcher, J.P., und Satariano, W. (1995). Risk factors for age-related cataracts. *Epidemiol.Rev.* 17, 336-346.
- Hogan, B.M., Beddington, R., Constantini, F., and Lacy, E. (1994). Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory, New York).
- Horwitz, J. (1992). -Crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89, 10449-10453.

- Hrabe, d.A. und Balling, R. (1998). Large scale ENU screens in the mouse: genetics meets genomics. *Mutat.Res.* 400, 25-32.
- Jean, D., Ewan, K., und Gruss, P. (1998). Molecular regulators involved in vertebrate eye development. *Mech.Dev.* 76, 3-18.
- Jekel, P.A., Weijer, W.J., und Beintema, J.J. (1983). Use of endoproteinase Lys-C from *Lysobacter enzymogenes* in protein sequence analysis. *Anal.Biochem.* 134, 347-354.
- Jones, S.E., Jomary, C., Grist, J., Makwana, J., und Neal, M.J. (1999). Retinal expression of  $\gamma$ -crystallins in the mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 3017-3020.
- Kamachi, Y., Sockanathan, S., Liu, Q., Breitman, M., Lovell-Badge, R., und Kondoh, H. (1995). Involvement of SOX proteins in lens-specific activation of crystallin genes. *EMBO J.* 14, 3510-3519.
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., Collignon, J., Lovell-Badge, R., und Kondoh, H. (1998). Involvement of *Sox1*, *2* and *3* in the early and subsequent molecular events of lens induction. *Development* 125, 2521-2532.
- Kannabiran, C., Rogan, P.K., Olmos, L., Basti, S., Rao, G.N., Kaiser-Kupfer, M., und Hejtmancik, J.F. (1998). Autosomal dominant zonular cataract with sutural opacities is associated with a splice mutation in the  $\gamma$ A3/A1-crystallin gene. *Mol.Vis.* 4, 21
- Kaufman, M.H. (1992). The atlas of mouse development (London: Academic Press).
- Kawauchi, S., Takahashi, S., Nakajima, O., Ogino, H., Morita, M., Nishizawa, M., Yasuda, K., und Yamamoto, M. (1999). Regulation of lens fiber cell differentiation by transcription factor c-Maf. *J.Biol.Chem.* 274, 19254-19260.
- Kerscher, S., Glenister, P.H., Favor, J., und Lyon, M.F. (1996). Two new cataract loci, *Ccw* and *To3*, and further mapping of the *Npp* and *Opj* cataracts in the mouse. *Genomics* 36, 17-21.
- Kim, J.I., Li, T., Ho, I.C., Grusby, M.J., und Glimcher, L.H. (1999). Requirement for the c-Maf transcription factor in crystallin gene regulation and lens development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96, 3781-3785.
- Kleiman, N.J., Chiesa, R., Kolks, M.A., und Spector, A. (1988). Phosphorylation of  $\gamma$ -crystallin B2 ( 10 kDa) in the bovine lens. *J.Biol.Chem.* 263, 14978-14983.
- Klopp, N., Favor, J., Löster, J., Lutz, R.B., Neuhäuser-Klaus, A., Prescott, A., Pretsch, W., Quinlan, R.A., Sandilands, A., Vrensen, G.F., und Graw, J. (1998). Three murine cataract mutants (*Cat2*) are defective in different  $\gamma$ -crystallin genes. *Genomics* 52, 152-158.
- Klopp, N., Löster, J., und Graw, J. (2000). A nuclear and zonular cataract in the mouse (*Cat2<sup>nz</sup>*) is caused by a one bp deletion in the  $\gamma$ E-crystallin encoding gene. *Genomics eingereicht*
- Kratochvilova, J. und Ehling, U.H. (1979). Dominant cataract mutations induced by  $\gamma$ -irradiation of male mice. *Mutat.Res.* 63, 221-223.

- Kratochvilova, J. und Favor, J. (1988). Phenotypic characterization and genetic analysis of twenty dominant cataract mutations detected in offspring of irradiated male mice. *Genet.Res.* 52, 125-134.
- Kratochvilova, J. und Favor, J. (1992). Allelism tests of 15 dominant cataract mutations in mice. *Genet.Res.* 59, 199-203.
- Krausz, E., Augusteyn, R.C., Quinlan, R.A., Reddan, J.R., Russell, P., Sax, C.M., und Graw, J. (1996). Expression of Crystallins, Pax6, Filensin, CP49, MIP, and MP20 in lens-derived cell lines. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 37, 2120-2128.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lengler, J. (2000). Untersuchungen zur Regulation des F-Kristallinpromotors: Antagonistische Wechselwirkung von *Prox1* und *Six3*. Dissertationsschrift, Technische Universität München.
- Li, Z.W., Stark, G., Gotz, J., Rulicke, T., Gschwind, M., Huber, G., Muller, U., und Weissmann, C. (1996). Generation of mice with a 200-kb amyloid precursor protein gene deletion by Cre recombinase-mediated site-specific recombination in embryonic stem cells [published erratum appears in *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 12052]. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93, 6158-6162.
- Litt, M., Carrero-Valenzuela, R., LaMorticella, D.M., Schultz, D.W., Mitchell, T.N., Kramer, P., und Maumenee, I.H. (1997). Autosomal dominant cerulean cataract is associated with a chain termination mutation in the human  $\alpha$ -crystallin gene *CRYBB2*. *Hum.Mol.Genet.* 6, 665-668.
- Litt, M., Kramer, P., LaMorticella, D.M., Murphey, W., Lovrien, E.W., und Weleber, R.G. (1998). Autosomal dominant congenital cataract associated with a missense mutation in the human  $\alpha$ -crystallin gene *CRYAA*. *Hum.Mol.Genet.* 7, 471-474.
- Liu, C., Pande, J., Lomakin, A., Ogun, O., und Benedek, G.B. (1998). Aggregation in aqueous solutions of bovine lens  $\alpha$ -crystallins: special role of  $\alpha$ (s). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 1609-1619.
- Löster, J., Pretsche, W., Sandulache, R., Schmitt-John, T., Lyon, M.F., und Graw, J. (1994). Close linkage of the dominant cataract mutations (*Cat-2*) with *Idh-1* and *cryge* on mouse chromosome 1. *Genomics* 23, 240-242.
- Lubsen, N.H., Renwick, J.H., Tsui, L.C., Breitman, M.L., und Schoenmakers, J.G. (1987). A locus for a human hereditary cataract is closely linked to the  $\alpha$ -crystallin gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84, 489-492.
- Lubsen, N.H., Aarts, H.J., und Schoenmakers, J.G. (1988). The evolution of lenticular proteins: the  $\alpha$ - and  $\beta$ -crystallin super gene family. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 51, 47-76.
- Lutz, R.B. (2000). Analyse apoptotischer Prozess in Augenlinse von  $\alpha$ -Kristallin-Mutanten. Dissertationsschrift, Technische Universität München.

- Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., und Collins, F.S. (1991). Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* *19*, 1154
- Meakin, S.O., Du, R.P., Tsui, L.C., und Breitman, M.L. (1987).  $\alpha$ -crystallins of the human eye lens: expression analysis of five members of the gene family. *Mol.Cell Biol.* *7*, 2671-2679.
- Moss, S.E., Klein, R., und Klein, B.E. (1998). The 14-year incidence of visual loss in a diabetic population. *Ophthalmology* *105*, 998-1003.
- Mörner, C.Th. (1893). Untersuchungen der Proteinsubstanzen in den lichtbrechenden Medien des Auges. *Zeitschrift für Physiologische Chemie* *18*, 61-106.
- Nagy, E. und Maquat, L.E. (1998). A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends.Biochem.Sci.* *23*, 198-199.
- Newton, C.R. and Grainger, R.M. (1994). PCR (Sepktrum Akademischer Verlag).
- Nishiguchi, S., Wood, H., Kondoh, H., Lovell-Badge, R., und Episkopou, V. (1998). *Sox1* directly regulates the  $\alpha$ -crystallin genes and is essential for lens development in mice. *Genes Dev.* *12*, 776-781.
- Norledge, B.V., Hay, R.E., Bateman, O.A., Slingsby, C., und Driessen, H.P. (1997). Towards a molecular understanding of phase separation in the lens: a comparison of the X-ray structures of two high Tc  $\alpha$ -crystallins, E and F, with two low Tc  $\alpha$ -crystallins, B and D. *Exp.Eye Res.* *65*, 609-630.
- Oda, S., Watanabe, K., Fujisawa, H., und Kameyama, Y. (1980). Impaired development of lens fibers in genetic microphthalmia, eye lens obsolescence, *Elo*, of the mouse. *Exp.Eye Res.* *31*, 673-681.
- Ogino, H. und Yasuda, K. (1998). Induction of lens differentiation by activation of a bZIP transcription factor, L-Maf. *Science* *280*, 115-118.
- Oliver, G., Sosa-Pineda, B., Geisendorf, S., Spana, E.P., Doe, C.Q., und Gruss, P. (1993). *Prox1*, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development. *Mech.Dev.* *44*, 3-16.
- Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., und Gruss, P. (1995). *Six3*, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* *121*, 4045-4055.
- Oliver, G., Loosli, F., Koster, R., Wittbrodt, J., und Gruss, P. (1996). Ectopic lens induction in fish in response to the murine homeobox gene *Six3*. *Mech.Dev.* *60*, 233-239.
- Oliver, G. und Gruss, P. (1997). Current views on eye development. *Trends.Neurosci.* *20*, 415-421.

- Ono, T., Ikehata, H., Nakamura, S., Saito, Y., Komura, J., Hosoi, Y., und Yamamoto, K. (1999). Molecular nature of mutations induced by a high dose of x-rays in spleen, liver, and brain of the lacZ-transgenic mouse. *Environ.Mol.Mutagen.* 34, 97-105.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., und Hayashi, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5, 874-879.
- Pande, A., Pande, J., Asherie, N., Lomakin, A., Ogun, O., King, J.A., Lubsen, N.H., Walton, D., und Benedek, G.B. (2000). Molecular basis of a progressive juvenile-onset hereditary cataract. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97, 1993-1998.
- Pietrowski, D., Durante, M.J., Liebstein, A., Schmitt-John, T., Werner, T., und Graw, J. (1994).  $\gamma$ -crystallins are involved in specific interactions with the murine D/E/F-crystallin-encoding gene. *Gene* 144, 171-178.
- Pietrowski, D. und Graw, J. (1997). Autokinase activity of  $\gamma$ -crystallin inhibits its specific interaction with the DOTIS element in the murine D/E/F-crystallin promoter in vitro. *Biol.Chem.* 378, 1183-1186.
- Pignoni, F., Hu, B., Zavitz, K.H., Xiao, J., Garrity, P.A., und Zipursky, S.L. (1997). The eye-specification proteins So and Eya form a complex and regulate multiple steps in Drosophila eye development [published erratum appears in *Cell* (1998) 92, 585]. *Cell* 91, 881-891.
- Quinlan, P., Oda, S., Breitman, M.L., und Tsui, L.C. (1987). The mouse eye lens obsolescence (*Elo*) mutant: studies on crystallin gene expression and linkage analysis between the mutant locus and the  $\gamma$ -crystallin genes. *Genes Dev.* 1, 637-644.
- Reaume, A.G., de Sousa, P.A., Kulkarni, S., Langille, B.L., Zhu, D., Davies, T.C., Juneja, S.C., Kidder, G.M., und Rossant, J. (1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267, 1831-1834.
- Ring, B.Z., Cordes, S.P., Overbeek, P.A., und Barsh, G.S. (2000). Regulation of mouse lens fiber cell development and differentiation by the Maf gene. *Development* 127, 307-317.
- Robinson, M.L. und Overbeek, P.A. (1996). Differential expression of A- and B-crystallin during murine ocular development. *Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.* 37, 2276-2284.
- Rogaev, E.I., Rogaeva, E.A., Korovaitseva, G.I., Farrer, L.A., Petrin, A.N., Keryanov, S.A., Turaeva, S., Chumakov, I., St, und Ginter, E.K. (1996). Linkage of polymorphic congenital cataract to the  $\gamma$ -crystallin gene locus on human chromosome 2q33-35. *Hum.Mol.Genet.* 5, 699-703.
- Rudi, K., Fossheim, T., und Jakobsen, K.S. (1999). Restriction cutting independent method for cloning genomic DNA segments outside the boundaries of known sequences. *Biotechniques* 27, 1170-1177.
- Russell, W.L., Kelly, E.M., Hunsicker, P.R., Bangham, J.W., Maddux, S.C., und Phipps, E.L. (1979). Specific-locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76, 5818-5819.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).
- Santhiya, S.T., Abd-alla, S.M., Löster, J., und Graw, J. (1995). Reduced levels of  $\alpha$ -crystallin transcripts during embryonic development of murine *Cat2<sup>nop</sup>* mutant lenses. *Graefes.Arch.Clin.Exp.Ophthalmol.* 233, 795-800.
- Schwartz, D.C. und Cantor, C.R. (1984). Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37, 67-75.
- Semina, E.V., Reiter, R.S., und Murray, J.C. (1997). Isolation of a new homeobox gene belonging to the *Pitx/Rieg* family: expression during lens development and mapping to the *aphakia* region on mouse chromosome 19. *Hum.Mol.Genet.* 6, 2109-2116.
- Semina, E.V., Ferrell, R.E., Mintz-Hittner, H.A., Bitoun, P., Alward, W.L., Reiter, R.S., Funkhauser, C., Daack-Hirsch, S., und Murray, J.C. (1998). A novel homeobox gene *PITX3* is mutated in families with autosomal-dominant cataracts and ASMD. *Nat.Genet.* 19, 167-170.
- Semina, E.V., Murray, J.C., Reiter, R.S., Hrstka, R.F., and Graw, J. (2000). Deletion of the promoter region and altered expression of *Pitx3* homeobox gene in *aphakia* mice. *Hum.Mol.Genet.* *im Druck*
- Sergeev, Y.V., Chirgadze, Y.N., Mylvaganam, S.E., Driessen, H., Slingsby, C., und Blundell, T.L. (1988). Surface interactions of  $\alpha$ -crystallins in the crystal medium in relation to their association in the eye lens. *Proteins* 4, 137-147.
- Siezen, R.J., Fisch, M.R., Slingsby, C., und Benedek, G.B. (1985). Opacification of  $\alpha$ -crystallin solutions from calf lens in relation to cold cataract formation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 82, 1701-1705.
- Sinha, D., Esumi, N., Jaworski, C., Kozak, C.A., Pierce, E., und Wistow, G. (1998). Cloning and mapping the mouse *Crygs* gene and non-lens expression of  $\alpha$ S-crystallin. *Mol.Vis.* 4, 8
- Skow, L.C., Donner, M.E., Huang, S.M., Gardner, J.M., Taylor, B.A., Beamer, W.G., und Lalley, P.A. (1988). Mapping of mouse  $\alpha$ -crystallin genes on chromosome 1. *Biochem.Genet.* 26, 557-570.
- Slingsby, C. und Clout, N.J. (1999). Structure of the crystallins. *Eye* 13, 395-402.
- Smith, R.S., Hawes, N.L., Chang, B., Roderick, T.H., Akeson, E.C., Heckenlively, J.R., Gong, X., Wang, X., und Davisson, M.T. (2000). *Lop12*, a mutation in mouse *crygd* causing lens opacity similar to human coppock cataract. *Genomics* 63, 314-320.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- Stephan, D.A., Gillanders, E., Vanderveen, D., Freas-Lutz, D., Wistow, G., Baxevanis, A.D., Robbins, C.M., VanAuken, A., Quesenberry, M.I., Bailey-Wilson, J., Juo, S.H., Trent,

- J.M., Smith, L., und Brownstein, M.J. (1999). Progressive juvenile-onset punctate cataracts caused by mutation of the  $\alpha$ -D-crystallin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96, 1008-1012.
- Swamy-Mruthinti, S., Shaw, S.M., Zhao, H.R., Green, K., und Abraham, E.C. (1999). Evidence of a glycemic threshold for the development of cataracts in diabetic rats. *Curr.Eye Res.* 18, 423-429.
- Taylor, H.R. (1989). The biological effects of UV-B on the eye. *Photochem.Photobiol.* 50, 489-492.
- Tomarev, S.I., Sundin, O., Banerjee-Basu, S., Duncan, M.K., Yang, J.M., und Piatigorsky, J. (1996). Chicken homeobox gene *Prox1* related to *Drosophila prospero* is expressed in the developing lens and retina [published erratum appears in *Dev. Dyn.* (1996) 207, 120]. *Dev.Dyn.* 206, 354-367.
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76, 4350-4354.
- van Rens, G.L., Raats, J.M., Driessen, H.P., Oldenburg, M., Wijnen, J.T., Khan, P.M., de Jong, W.W., und Bloemendal, H. (1989). Structure of the bovine eye lens  $\alpha$ -crystallin gene (formerly  $\beta$ -s). *Gene* 78, 225-233.
- Voorter, C.E., De Haard-Hoekman, W.A., Hermans, M.M., Bloemendal, H., und de Jong, W.W. (1990). Differential synthesis of crystallins in the developing rat eye lens. *Exp. Eye Res.* 50, 429-437.
- Walther, C. und Gruss, P. (1991). *Pax-6*, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113, 1435-1449.
- Wang, K. und Spector, A. (1995).  $\alpha$ -crystallin can act as a chaperone under conditions of oxidative stress. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 311-321.
- Wawersik, S. und Maas, R.L. (2000). Vertebrate eye development as modeled in *Drosophila*. *Hum.Mol.Genet.* 9, 917-925.
- Wigle, J.T., Chowdhury, K., Gruss, P., und Oliver, G. (1999). *Prox1* function is crucial for mouse lens-fibre elongation. *Nat.Genet.* 21, 318-322.
- Wistow, G., Turnell, B., Summers, L., Slingsby, C., Moss, D., Miller, L., Lindley, P., und Blundell, T. (1983). X-ray analysis of the eye lens protein  $\alpha$ -II crystallin at 1.9 Å resolution. *J.Mol.Biol.* 170, 175-202.
- Wistow, G., Sinha, D., Lyon, M.F., Konzak, C., Pierce, E., Esumi, N., und Jaworski, C. (1998).  $\alpha$ -S-crystallin in lens, retina and *Opj* cataract. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 523
- Yoshiki, A., Hanazono, M., Oda, S., Wakasugi, N., Sakakura, T., und Kusakabe, M. (1991). Developmental analysis of the eye lens obsolescence (*Elo*) gene in the mouse: cell proliferation and *Elo* gene expression in the aggregation chimera. *Development* 113, 1293-1304.

- Zarbalis, K., Chatterjee, B., Löster, J., Werner, T., und Graw, J. (1996). Sequence analysis of the B2-crystallin cDNA of hamster containing a domain conserved among vertebrates. *Gene* 174, 181-184.
- Zarina, S., Slingsby, C., Jaenicke, R., Zaidi, Z.H., Driessen, H., und Srinivasan, N. (1994). Three-dimensional model and quaternary structure of the human eye lens protein S-crystallin based on  $\alpha$ - and  $\beta$ -crystallin X-ray coordinates and ultracentrifugation. *Protein Sci.* 3, 1840-1846.

**ANHANG****A.1 Puffer und Lösungen****Allgemeine Lösungen und Puffer**

|   |        |  |
|---|--------|--|
| 0,2 M Phosphatpuffer pH 7,6                 | 0,2 M  | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                |
|   | 0,2 M  | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>               |
| TENS  | 10 mM  | Tris/HCL pH 7,5                                |
|   | 1 mM   | EDTA   |
|   | 0,1 N  | NaOH   |
|   | 0,5 %  | SDS  |
| 10 x PBS-Puffer (Phosphate-Buffered Saline) | 80 g   | NaCl   |
|   | 14,4 g | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>               |
|   | 2,4 g  | Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
|   | add 1l | H <sub>2</sub> O                               |
|   |        | pH 7,3 mit 32% HCl                             |

**Lösungen und Puffer für molekularbiologische Methoden**

|                                  |        |                             |
|----------------------------------|--------|-----------------------------|
| 1 x TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) | 10 mM  | Tris/HCl (pH 7,4 -8,0)      |
|                                  | 1 mM   | EDTA                        |
| 20 x TAE (Tris-Acetat-Puffer)    | 0,8 M  | Tris                        |
|                                  | 0,2 M  | Natrium-Acetat              |
|                                  | 0,02 M | EDTA                        |
|                                  |        | pH 7,8 mit konz. Essigsäure |
| 5 x TBE (Tris-Borat-Puffer)      | 0,45 M | Tris                        |
|                                  | 0,45 M | Borsäure                    |
|                                  | 10 mM  | EDTA                        |
|                                  |        | pH mit konz. Essigsäure     |
| 20 x SSC                         | 3 M    | NaCl                        |
|                                  | 0,3 M  | Natriumcitrat               |
|                                  |        | pH 7,8 mit 10 N NaOH        |
| 10 x PCR-Puffer                  | 100 mM | Tris/HCl pH 8,3             |
|                                  | 15 mM  | MgCl <sub>2</sub>           |
|                                  | 500 mM | KCl                         |
|                                  |        | optional Gelatine           |

|                            |                        |   |
|----------------------------|------------------------|---|
| Ethidiumbromid-Stammlösung | 10 mg/ml               | vor Licht schützen, bei 4°C lagern                              |
| 6 x DNA-Probenpuffer       | 30 %<br>0,2 %<br>0,2 % | Glycerin<br>Bromphenolblau<br>Xylencyanol<br>in Tris/HCl pH 7,5 |
| SSCP Probenpuffer          | 10 mM<br>0,002 g       | NaOH<br>Bromphenolblau<br>mit 10 ml Formamid                    |

### Lösungen und Medien für mikrobiologische Methoden

|                                 |   |  |
|---------------------------------|---|--|
| IPTG-Lösung                     | 1 M   | IPTG   |
| X-Gal Lösung<br>D-Galactosidase | 25 mg/ml  | 5-Brom-4-chloro-3-indolyl-b-<br>in Formamid  |
| <i>Nährmedien für Bakterien</i> |   |  |
| LB-Medium                       | 1%<br>0,5%<br>1%                                | Bacto-Tryptone<br>Bacto-Hefeextrakt<br>NaCl<br>mit NaOH auf pH 7,0<br>einstellen; autoklavieren  |
| LB-Agar                         | 15 g/l  | LB-Medium<br>Difco-Agar  |
| LB-Topagar                      | 7,5 g/l<br>10 mM                                | LB-Medium<br>Agarose, GIBCO-BRL<br>MgSO <sub>4</sub> , autoklavieren   |
| SOC-Medium                      | 2%<br>0,5%<br>10 mM<br>2,5 mM<br>10 mM<br>20 mM | Bacto-Tryptone<br>Bacto-Hefeextrakt<br>NaCl<br>KCl<br>MgSO <sub>4</sub> , mit NaOH auf pH 7,0<br>einstellen; autoklavieren<br>Glucose (aus sterilfiltrierter 1 M<br>Glucoselösung) |

*Lösungen zur Herstellung kompetenter Zellen*

|     |   |  |
|-----|---|--|
| TB1 | 12 g<br>9,9 g<br>30 ml<br>1,5 g<br>ad 0,5 l | RbCl<br>MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O<br>1 M K-Acetat pH 7,5<br>CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O<br>H <sub>2</sub> O<br>mit Eiseesig auf pH 5,8<br>einstellen, sterilfiltrieren |
| TB2 | 1,2 g<br>150 g<br>20 ml<br>11 g<br>ad 0,5 l | RbCl<br>Glycerin<br>0,5 M MOPS pH 6,8<br>CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O<br>H <sub>2</sub> O<br>mit NaOH auf pH 6,8<br>einstellen, sterilfiltrieren                                     |

**Lösungen und Puffer für proteinchemische Methoden**

|   |                                       |   |
|---|---------------------------------------|---|
| Linsenextrakt-Puffer<br>(Homogenisierungspuffer)            | 0.1 mM<br>50 mM                       | NaCl<br>Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  |
| Fraktionierungspuffer                                       | 20 mM<br>1 mM                         | NaOH<br>Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>   |
| 2 x Proteinauftrags- (Laemmli-) Puffer                      | 5 %<br>50 %<br>0,16 M<br>2 %<br>0,01% | MeSH<br>Glycerin<br>Tris/HCl pH 6,8<br>SDS<br>Bromphenolblau                            |
| <i>Laufpuffer SDS-PAA-Proteingele</i><br>5 x Kathodenpuffer | 26,88 g<br>15 ml                      | 2 M Tris/HCl pH 8,9<br>Tricine<br>10 % SDS<br>mit H <sub>2</sub> O auf 300 ml auffüllen |
| 10 x Anodenpuffer   | 2 M                                   | Tris/HCl pH 8,9   |
| 10% APS   |                                       | Amoniumpersulfat (w/v)<br>in H <sub>2</sub> O lösen und Aliquoten bei<br>-20°C lagern   |
| PAA-Proteingel-Färbelösung                                  | 40%<br>7%<br>0.1%                     | Methanol<br>Essigsäure<br>Coomassie Brilliant Blue (w/v)                                |
| PAA-Proteingel-Entfärbelösung                               | 7%                                    | Essigsäure  |

*Western-Blot Transferpuffer*

|                           |   |   |
|---------------------------|---|---|
| Puffer 1                  | 9,08 g<br>50 ml<br>200 ml                 | Tris<br>Methanol<br>H <sub>2</sub> O  |
| Puffer 2                  | 0,758 g<br>50 ml<br>200 ml                | Tris<br>Methanol<br>H <sub>2</sub> O  |
| Puffer 3                  | 0,75 g<br>0,758 g<br>50 ml<br>200 ml      | Glycine<br>Tris<br>Methanol<br>H <sub>2</sub> O   |
| 10 x TBS                  | 0,02 M<br>0,15 M                          | Tris/HCl pH<br>NaCl   |
| 10 x TTBS                 | 2%  | 10 x TBS<br>Tween 20  |
| 10 x Ponceau-Lösung       | 3%<br>3%                                  | PonceauS (w/v)<br>Tri-chlor-Essigsäure (w/v)  |
| <i>Peroxidase-Färbung</i> |   |   |
| 5 x Puffer                | 0,225 g<br>11 g<br>8,5 g<br>0,625 ml      | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>NaCl<br>Imidazol<br>Tween 20<br>mit H <sub>2</sub> O auf 250 ml auffüllen   |
| 1 x Färbelösung           | 5 ml<br>20 ml<br>1 Ssp<br>0,1 ml<br>10 µl | 5 x Puffer<br>H <sub>2</sub> O<br>Diaminobenzidine<br>CoC <sub>2</sub> 10mg/ml<br>H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |

**Lösungen für histologische Methoden**

|  |                                  |  |
|--|----------------------------------|--|
| Carnoy-Fixierungslösung                    | 6 ml<br>3 ml<br>1 ml             | Ethanol 100%<br>Chloroform<br>Essigsäure   |
| Methylenblau-basisches Fuchsin-Färbelösung | 12 ml<br>12 ml<br>20 ml<br>12 ml | frisch gefiltertes Methylenblau<br>basische Fuchsin-Lösung<br>0,2 M Phosphtpuffer ph 7,6<br>Ethanol 100% |

**A.2 Liste der verwendeten Oligonukleotide**

| <u>Bezeichnung*</u> | <u>Amplifikat</u>                              | <u>Sequenz (5' 3')</u>              | <u>Acc. Nr.:**</u> | <u>Fragmentgröße (bp)</u> |
|---------------------|--|-------------------------------------|--------------------|---------------------------|
| intb5in2L (14442)   | <i>Cryge<sup>ns</sup></i> -Deletion            | GCA GGA CCG CTT CCA CTT CAG TGA CT  | X57855             | 1787                      |
| e3r2 (MWG)          |  | GTT AGT GTC TTC TTG ATT CTC TT      | P2-X3              |                           |
| GAPDH L (25038)     | <i>Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase</i> | GTC ACC AGG GCT GCC ATT TGC AGT     | M32599             | 314                       |
| GAPDH R (25039)     |  | GAG ATG ATG ACC CGT TTG GCT TCC ACC |                    |                           |
| -Act L (MWG)        | <b><i>b-Actin</i></b>                          | GGG TGT ATT CCC CTCC ATC GTG G      | X032599            | 894                       |
| -Act R (MWG)        |  | ACA GAG TAC TTG CGC TCA AGG AGG AGC |                    |                           |

PCR Primers zur Amplifikation der cDNA von -Kristallinen (*Cryga @Crygf*) der Maus

| <u>Bezeichnung*</u> | <u>Sequenz (5' 3')</u>                                    | <u>Acc. Nr.:**</u> | <u>Fragmentgröße (bp)</u> |
|---------------------|---|--------------------|---------------------------|
| Cryga-L (5307)      | CAT ACT CAA CAC TGA CCA TTT GCT GTC AAC                   | X00635             | 582                       |
| Cryga-R (5308)      | GGC TGT AAC AAG CAA AAG GAG GCT TAG TAC                   | X00654             |                           |
| Crygb-L (5309)      | CTC CCA GGG CAT CTC TTA CTC TCA GC                        | Z22573             | 588                       |
| Crygb-R (5310)      | TCT AGA GGA GGA AAG TAG AGT CTC AAA ATG CC                |                    |                           |
| Crygc-L (5311)      | TGA ACT CAC CAC GGG TCA GCC AG                            | Z22574             | 583                       |
| Crygc-R (5312)      | GTT CCA AAA TGA GAA AAT GGT AGC GTT AAC C                 |                    |                           |
| Crygd-L (5313)      | GCA CTA TCC CAT CCG ACC TGC CAA C                         | M16512             | 593                       |
| Crygd-R (5314)      | CGT CCA AAT GGA GAA AGG GTA GAG TAA AAA AAC C             | K02583             |                           |
| Cryge-L (5313)      | GCA CTA TCC CAT CCG ACC TGC CAA C                         | X57855             | 592                       |
| Cryge-R (5315)      | CTG TCC AGA TGG AGA AAA TGG TAG AGT AAA AAT ATT TCA ATA G |                    |                           |
| Crygf-L (5316)      | GCA CCA TCC CAT CTG ACC TGC CAA C                         | M11039             | 594                       |
| Crygf-R (5315)      | CTG TCC AGA TGG AGA AAA TGG TAG AGT AAA AAT ATT TCA ATA G | K02584             |                           |

PCR Primers zur Amplifikation der genomischen Fragmente der  $\alpha$ -Kristalline (*Cryga* @*Crygf*) der Maus

| <u>Bezeichnung*</u>   | <u>Sequenz (5' 3')</u>                          | <u>Acc. Nr.**</u> | <u>Fragmentgröße (bp)</u> |
|-----------------------|---|-------------------|---------------------------|
| Cryga-Ex12-L2 (15480) | CCA TCC TGC TAT ATA TAT ATC AGC TGC C           | K02586            | 429                       |
| Cryga-Ex12-R2 (10259) | GAA GAC CTA GTG TTC TCT CAC ATC AGC C           |                   |                           |
| Cryga-Ex3-L (10248)   | ACG AAC ACT TGA CAG ATT CGC CC                  | K02587            | 519                       |
| Cryga-Ex3-R (10249)   | GAA ACC TCT TTC AGG GTT AGG TTC CC              |                   |                           |
| Crygb-Ex12-L (10239)  | AAA GAC TTT TCT CAT TGA TGG CAA CAA C           | Z22573            | 673                       |
| Crygb-Ex12R (10240)   | TTA AGA TGA TCT TTT AGG ATA ATTTGT GTT CCC      |                   |                           |
| Crygb-Ex3-L5 (15858)  | CAA GCA CAA AGA CAG TAT GCT GAG                 | Z22573            | 613                       |
| Crygb-Ex3R5 (15864)   | CAG TAA AAA TCC ATG ACT CGC CTA A               |                   |                           |
| Crygc-Ex12-L (10241)  | CAT CTA GGA CAG CGT TGG AAC ACA CC              | Z22574            | 785                       |
| Crygc-Ex12-R2 (10260) | GGA CAA CTT TTG ATT AAT CTA ATG GTG GCA AC      |                   |                           |
| Crygc-Ex3-L (10242)   | GGT GTC TGT AAT GCT AGC AGG AGA CCC             | Z22574            | 524                       |
| Crygc-Ex3-R2 (10255)  | GAT TTG CAC ACA ATG AAA GAA TAA CAG AAG TC      |                   |                           |
| Crygd-Ex12-L2 (10257) | TCA TCC ATT CGA AAG CTC TGA AGA GTC TAG         | M16512            | 528                       |
| Crygd-Ex12-R3 (13296) | TGC AGT CAG GGT CTT CAG TGC CTC                 | AJ224342          |                           |
| Crygd-Ex3-L2 (13372)  | GCC TGG AAT CTG CCC TCA TAG TGA C               | AJ224342          | 493                       |
| Crygd-Ex3-R2 (10258)  | GCC AGG AAC ACA CAG AAA ATA TTT TAT TAG C       | K02583            |                           |
| Cryge-Ex12-L (13513)  | CAT TTA AAG GCT GGA GCC GCG                     | X57855            | 664                       |
| Cryge-Ex12-R (13514)  | CAC ATA ATT GAC TGT AGG CAG GAG CCC             |                   |                           |
| Cryge-Ex3-L3 (16185)  | CGA GTT TCA CTG TGT ACA ACT TCC T               | X57855            | 610                       |
| Cryge-Ex3-R (10246)   | CTC TGT TAT TGC ATG AAA CAC ACA GGC             |                   |                           |
| Crygf-Ex12-L (10251)  | GTT ATT CAA ATT CTC TTA GTG TGA GAA TTA TAA ACC | M11039            | 807                       |
| Crygf-Ex12-R3 (27502) | ACA AAG AAG GTA GCA GAT ATC CTA ACC             | AJ224343          |                           |
| Crygf-Ex3-L2 (9670)   | TTC TGA TGT CCC CTT GTC TGC TGT TC              | AJ224343          | 337                       |
| Crygf-Ex3-R2 (16189)  | GAA ACA CAC AGG AAA TAT TTT ATT ACT GT          | K02584            |                           |

PCR Primers zur Amplifikation der genomischen Fragmente der  $\alpha$ -Kristalline (*CRYGA* @ *CRYGD*) des Menschen

| <u>Bezeichnung*</u>  | <u>Sequenz (5' 3')</u>                    | <u>Acc. Nr.**</u> | <u>Fragmentgröße (bp)</u> |
|----------------------|---|-------------------|---------------------------|
| CRYGA-Ex12-L (17157) | AGG TCC CTT TTG TGT TGT TTT TGC C         | M17315            | 463                       |
| CRYGA-Ex12-R (17158) | CAT GAG GAA TTA TAC GGC AGG ATT GG        |                   |                           |
| CRYGA-Ex3-L (17159)  | CAG ACC AGC TCG CAC AAG TTA AGG C         | M17316            | 353                       |
| CRYGA-Ex3-R (17160)  | AAG AGC CAC TTA GTG CAG GGA ACA CAA C     |                   |                           |
| CRYGB-Ex12-L (17173) | TGC AAA TCC CCT ACT CAC CAA AAT GG        | M11970            | 519                       |
| CRYGB-Ex12-R (17174) | AAA AAG ATG GAA GGC AAA GAC AGA GCC       |                   |                           |
| CRYGB-Ex3-L2 (17181) | TGT TTT TGT TTG TTT ACT CTT GCG TTT       | M11971            | 410                       |
| CRYGB-Ex3-R (17182)  | GAA AGA AAG ACA GGG CTC TAC TAG TGC C     |                   |                           |
| CRYGC-Ex12-L (17177) | TGC ATA AAA TCC CCT TAC CGC TGA           | M11972            | 524                       |
| CRYGC-Ex12-R (17178) | ACT CTG GCG GCA TGA TGG AAA TC            |                   |                           |
| CRYGC-Ex3-L (17179)  | AGA CTC ATT TGC TTT TTT CCA TCC TTC TTT C | M11973            | 399                       |
| CRYGC-Ex3-R (17180)  | GAA AGA ATG ACA GAA GTC AGC AAT TGC C     |                   |                           |
| CRYGD-Ex12-L (17165) | CCC TTT TGT GCG GTT CTT GCC               | K03005            | 360                       |
| CRYGD-Ex12-R (17166) | TCT AAT GTT TAA CTT TTG CTT GAA ACC ATC   |                   |                           |
| CRYGD-Ex3-L (17167)  | TGC TTT TCT TCT CTT TTT ATT TCT GGG TCC   | K03006            | 400                       |
| CRYGD-Ex3-R (17168)  | AGT AAA GAA AGA CAC AAG CAA ATC AGT GCC   |                   |                           |

\*L, Primer auf der linken Seite (5'); R, Primer auf der rechten Seite (3'); (beinhaltet die laufende Labornummer) ;

Fragmente die Exon 1 und 2 beinhalten werden mit Ex12, die das Exon 3 beinhalten werden mit Ex3 bezeichnet

\*\*GeneBank oder EMBL Zugangs (Accession) Nummer

### A.3 Tabellen und Abbildungen

**Abbildung A1 (Seite 125)** Vergleich der Aminosäuresequenzen aller bekannten der  $\alpha$ -Kristalline von Mensch, Maus, Ratte und Rind.

Der Sequenzvergleich wurde mit AlignX hergestellt. In schwarz sind identische, in dunkelgrau die konservierten (biochemisch verwandte) Aminosäuren dargestellt. Manuell wurde ergänzt: Die Exongrenzen durch schwarze/weiße Striche, die Grenzen der „Griechischen Schlüssel“ Motive mit blauen Strichen und die  $\alpha$ -Faltblätter als horizontale gelbe Doppelpfeile ( $\alpha$ 1-4  $\alpha$ 1-4) nach (Slingsby und Clout, 1999). Zusätzlich wurden Aminosäureaustausche in den  $\alpha$ -Kristallinen dargestellt: In rot Kataraktmutationen (*Cryga*<sup>1Neu</sup> D77G (4.2.2.1), *Cryga*<sup>tol</sup> W43R (4.2.2.2)), in orange Polymorphismen (Tab. 5.1) und in grün Genbankfehler (Tab. 5.1) (4.2.6).

Genbank Zugangsnummern: Für Mensch *CRYGA*  $\alpha$  D Acc. Nr.: M17315, M11970, M11972, K03005, für Maus *Cryga*  $\alpha$  f Acc. Nr.: K02586, Z22573, Z22574, K02583, X57855, K02584, für Ratte *Cryga*  $\alpha$  e Acc. Nr.: M19359, *Crygf* Acc. Nr.: M19357 und für Rind *Cryga*  $\alpha$  f Acc. Nr.: P02527, M16894, L27069, M16895, Q28088, 3318981

**Tabelle A1** Prozentuale Identität der Aminosäuresequenzen der  $\alpha$ -Kristalline. Zugrunde gelegt wurde das Alignment der Abb. A1.

|                                 | Prozentuale Identität der $\alpha$ -Kristallin |  |                                    |
|---------------------------------|--|--|------------------------------------|
|                                 | gesamten Aminosäuresequenz                     | Exon 1 & 2 codierten Aminosäuresequenz | Exon 3 codierten Aminosäuresequenz |
| Mensch ( $\alpha$ - D )         | 57 %   | 69 %                                   | 46 %                               |
| Maus ( $\alpha$ - F )           | 62 %   | 80 %                                   | 46 %                               |
| Ratte ( $\alpha$ - F )          | 66 %   | 83 %                                   | 51 %                               |
| Rind ( $\alpha$ - F )           | 52 %   | 63 %                                   | 42 %                               |
| alle Species (alle $\alpha$ - ) | 35 %   | 43 %                                   | 27 %                               |

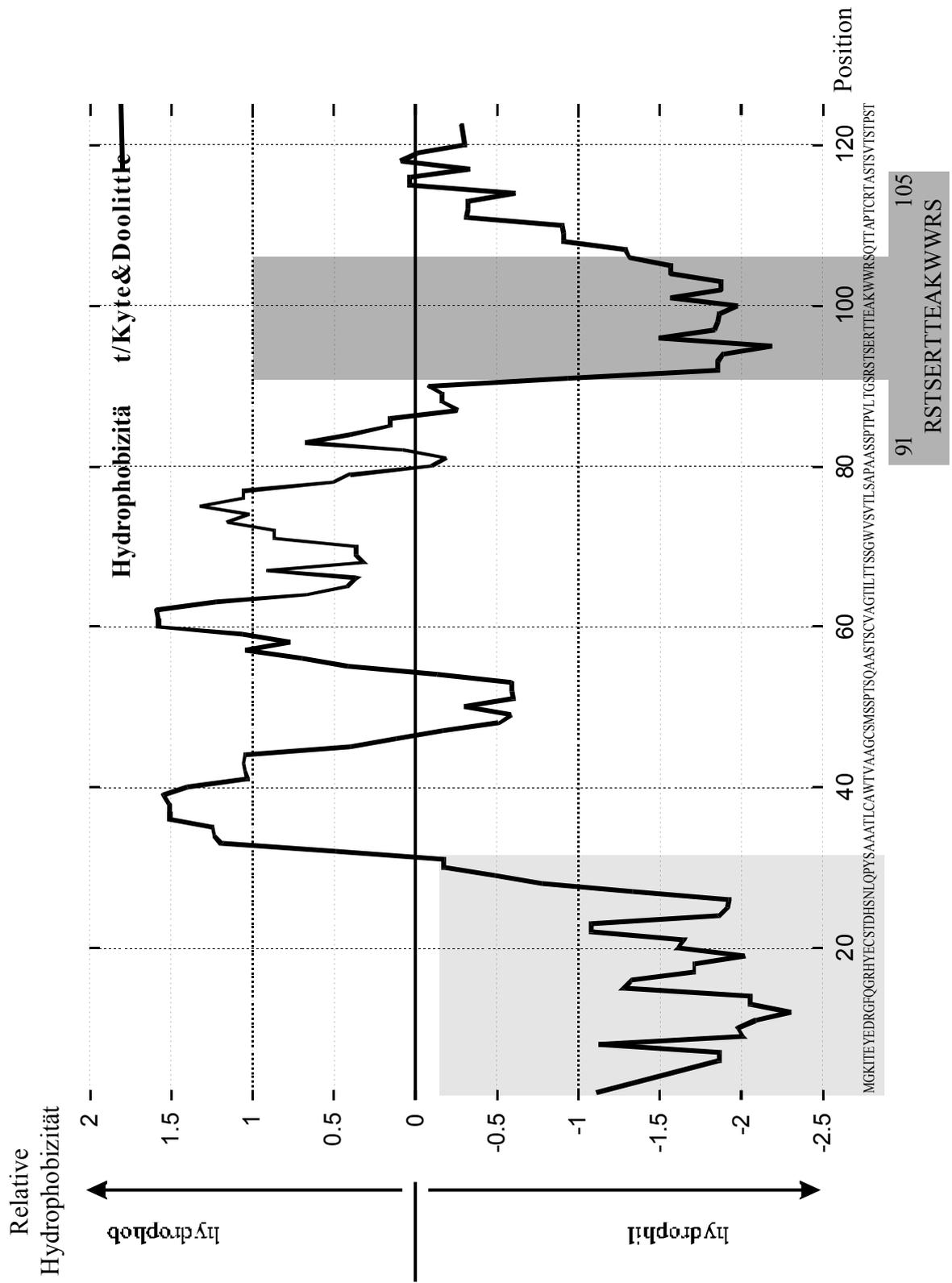
**Abbildung A2 (Seite 126)** Analyse der Hydrophobizität nach Kyte & Doolittle für das *Cryge*<sup>nz</sup>-Proteine.

Die Hydrophobizität des mutierten *Cryge*<sup>nz</sup>-Proteins wurde mit einem Algorithmus nach Kyte & Doolittle (ProtScale (<http://www.expasy.ch>)) analysiert. Unterhalb des Diagramms ist die Aminosäurekette des Proteins passend zur Position laut Diagramm notiert. Die ursprüngliche Teilsequenz des E-Kristallins (Aminosäure 1-29) ist hellgrau unterlegt. Die hydrophilste Domäne der mutierten Sequenz (Aminosäure 91-105), die zur Herstellung eines synthetischen Peptids für Immunisierungen verwendet wurde (3.4.5), ist dunkelgrau unterlegt und vergrößert dargestellt.

**Tabelle A2 (Seite 127)** Mitglieder der  $\alpha$ -/ $\beta$ -Kristalline-Superfamilie der Maus

**Tabelle A3 (Seite 128)** Aufstellung der Maus *Cat2* Mutanten der Neuherberger Katarakt-sammlung

|                  |              | 1           | a1             | b1          | c1             | d1          | a2           | b2          | 60          |             |             |            |             |             |             |               |
|------------------|--------------|-------------|----------------|-------------|----------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| Mensch           | <i>CRYGA</i> | MGKI        | TFYEDRD        | FQGR        | YEC            | ITSDC       | PNLRV        | YFSR        | CNSI        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>CRYGB</i> | MGKI        | TFYEDRA        | FQGR        | SYEC           | TTDC        | PNLQI        | YFSR        | CNSI        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>CRYGC</i> | MGKI        | TFYEDRA        | FQGR        | SYET           | TTDC        | PNLQI        | YFSR        | CNSI        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>CRYGD</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | H           | PNLQI        | YFSR        | CNSA        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
| Maus             | <i>Cryga</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | C           | PNLQI        | YFSR        | CNSI        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>Crygb</i> | MGKI        | TFYEDRS        | FQGR        | HYECSSD        | C           | PNLQI        | YFSR        | CNSV        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>Crygc</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | C           | PNLQI        | YFSR        | CNSV        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>Crygd</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | H           | PNLQI        | YFSR        | CNSV        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>Cryge</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | H           | PNLQI        | YFSR        | CNSV        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>Crygf</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | H           | PNLQI        | YFSR        | CNSV        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
| Ratte            | <i>Cryga</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | C           | PNLQI        | YFSR        | CNSI        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>Crygb</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | C           | PNLQI        | YFSR        | CNSV        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>Crygc</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | C           | PNLQI        | YFSR        | CNSI        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>Crygd</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | H           | PNLQI        | YFSR        | CNSV        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>Cryge</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | H           | PNLQI        | YFSR        | CNSV        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>Crygf</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | H           | PNLQI        | YFSR        | CNSV        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
| Rind             | <i>Cryga</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | C           | PNLQI        | YFSR        | CNSI        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>Crygb</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | C           | PNLQI        | YFSR        | CNSI        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>Crygc</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | C           | PNLQI        | YFSR        | CNSI        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>Crygd</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | H           | PNLQI        | YFSR        | CNSV        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>Cryge</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | H           | PNLQI        | YFSR        | CNSV        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
|                  | <i>Crygf</i> | MGKI        | TFYEDRG        | FQGR        | HYECSSD        | H           | PNLQI        | YFSR        | CNSV        | RVDS        | GCWM        | I          | YERP        | NYQ         | GHQY        | FLRR          |
| <b>Consensus</b> |              | <b>MGKI</b> | <b>TFYEDRG</b> | <b>FQGR</b> | <b>HYECSSD</b> | <b>C</b>    | <b>PNLQI</b> | <b>YFSR</b> | <b>CNSI</b> | <b>RVDS</b> | <b>GCWM</b> | <b>I</b>   | <b>YERP</b> | <b>NYQ</b>  | <b>GHQY</b> | <b>FLRR</b>   |
|                  |              | Exon1       | Exon2          |             |                |             |              |             |             |             |             |            |             |             |             |               |
|                  |              | 61          | c2             | d2          | a3             | b3          | c3           | 120         |             |             |             |            |             |             |             |               |
| Mensch           | <i>CRYGA</i> | GKY         | PDYQHW         | MSDS        | VQSC           | RIIP        | HTSS         | H           | KLR         | LYER        | DDYR        | GLMS       | EITD        | DCAC        | VP          | PELFR         |
|                  | <i>CRYGB</i> | GEY         | PDYQW          | MSDS        | IRSC           | CLIP        | PHSG         | A           | YMKI        | YDR         | DEIR        | GOMS       | EITD        | DC          | CL          | S             |
|                  | <i>CRYGC</i> | GEY         | PDYQW          | MSDS        | IRSC           | CLIP        | QTVS         | H           | R           | LYER        | ED          | HKGL       | MS          | EITD        | DC          | PS            |
|                  | <i>CRYGD</i> | GDY         | PDYQW          | MSDS        | VRSC           | RLIP        | HSGS         | H           | R           | LYER        | EDYR        | GOVI       | EITD        | DC          | SC          | LQDR          |
| Maus             | <i>Cryga</i> | GDY         | PDYQW          | MSDS        | IRSC           | RSIP        | YTSS         | H           | R           | LYER        | DDYR        | GLVS       | EITD        | DC          | SC          | I             |
|                  | <i>Crygb</i> | GEY         | PDYQW          | MSDS        | IRSC           | RLIP        | CHSG         | T           | Y           | FMRI        | YED         | FRG        | OMS         | EITD        | DC          | CL            |
|                  | <i>Crygc</i> | GEY         | PDYQW          | MSDS        | IRSC           | RLIP        | HAGS         | H           | R           | LYER        | ED          | HKGV       | MS          | EITD        | DC          | SC            |
|                  | <i>Crygd</i> | GDY         | PDYQW          | MSDS        | VRSC           | RLIP        | HAGS         | H           | R           | LYER        | EDYR        | GOVI       | EITD        | DC          | PS          | LQDR          |
|                  | <i>Cryge</i> | GDY         | PDYQW          | MSDS        | VRSC           | RLIP        | HSSS         | H           | R           | LYER        | EDYR        | GOVI       | EITD        | DC          | SH          | LQDR          |
|                  | <i>Crygf</i> | GDY         | PDYQW          | MSDS        | VRSC           | RLIP        | HSSS         | H           | R           | LYER        | EDYR        | GOVI       | EITD        | DC          | PH          | LQDR          |
| Ratte            | <i>Cryga</i> | GDY         | PDYQW          | MSDS        | IRSC           | RSIP        | YTSS         | H           | R           | LYER        | DDYR        | GLVS       | EITD        | DC          | SC          | I             |
|                  | <i>Crygb</i> | GDY         | PDYQW          | MSDS        | IRSC           | RLIP        | CHSG         | T           | Y           | FMRI        | YED         | FRG        | OMS         | EITD        | DC          | CL            |
|                  | <i>Crygc</i> | GDY         | PDYQW          | MSDS        | IRSC           | RLIP        | HTGS         | H           | R           | LYER        | ED          | HKGV       | MS          | EITD        | DC          | SC            |
|                  | <i>Crygd</i> | GDY         | PDYQW          | MSDS        | VRSC           | RLIP        | HAGS         | H           | R           | LYER        | EDYR        | GOVI       | EITD        | DC          | PS          | LQDR          |
|                  | <i>Cryge</i> | GDY         | PDYQW          | MSDS        | VRSC           | RLIP        | HSSS         | H           | R           | LYER        | EDYR        | GOVI       | EITD        | DC          | PH          | LQDR          |
|                  | <i>Crygf</i> | GDY         | PDYQW          | MSDS        | VRSC           | RLIP        | HSSS         | H           | R           | LYER        | EDYR        | GOVI       | EITD        | DC          | PH          | LQDR          |
| Rind             | <i>Cryga</i> | GNV         | H              | QYQW        | MSDS           | IRSC        | RLIP         | CHT         | T           | GT          | FMRI        | YED        | FRG         | OMS         | EITD        | DC            |
|                  | <i>Crygb</i> | GDY         | PDYQW          | MSDS        | IRSC           | RLIP        | CHT          | T           | GT          | FMRI        | YED         | FRG        | OMS         | EITD        | DC          | PS            |
|                  | <i>Crygc</i> | GDY         | PDYQW          | MSDS        | IRSC           | CLIS        | DTSS         | H           | R           | LYER        | ED          | QKGL       | IA          | EITD        | DC          | PC            |
|                  | <i>Crygd</i> | GDY         | PDYQW          | MSDS        | IRSC           | RLIP        | HAGS         | H           | R           | LYER        | EDYR        | GOVI       | EITD        | DC          | SC          | LQDR          |
|                  | <i>Cryge</i> | GDY         | PDYQW          | MSDS        | IRSC           | CLIS        | DTSS         | H           | R           | LYER        | ED          | QKGL       | IA          | EITD        | DC          | PC            |
|                  | <i>Crygf</i> | GDY         | PDYQW          | MSDS        | IRSC           | RLIP        | HTGS         | H           | R           | LYER        | EDYR        | GOVI       | EITD        | DC          | SS          | LQDR          |
| <b>Consensus</b> |              | <b>GDY</b>  | <b>PDYQW</b>   | <b>MSDS</b> | <b>IRSC</b>    | <b>RLIP</b> | <b>CHT</b>   | <b>T</b>    | <b>GT</b>   | <b>FMRI</b> | <b>YED</b>  | <b>FRG</b> | <b>OMS</b>  | <b>EITD</b> | <b>DC</b>   | <b>XXLQDR</b> |
|                  |              | Exon2       | Exon3          |             |                |             |              |             |             |             |             |            |             |             |             |               |
|                  |              | 121         | d3             | a4          | b4             | c4          | d4           | 175         |             |             |             |            |             |             |             |               |
| Mensch           | <i>CRYGA</i> | EIY         | SLHV           | LEGC        | WVLY           | EMP         | NRGR         | QYLL        | R           | Q           | YRRY        | HDW        | GAD         | AKV         | GS          | LRRV          |
|                  | <i>CRYGB</i> | EIH         | SINV           | LEGS        | WVLY           | EMP         | NRGR         | QYLL        | R           | P           | GEYR        | YH         | DW          | GAP         | NAK         | VG            |
|                  | <i>CRYGC</i> | EIR         | SLHV           | LEGC        | WVLY           | ELPN        | NRGR         | QYLL        | R           | Q           | YRRY        | HDW        | GAM         | DAK         | AG          | LRRV          |
|                  | <i>CRYGD</i> | EIH         | SINV           | LEGS        | WVLY           | ELSN        | NRGR         | QYLL        | R           | P           | GEYR        | YH         | DW          | GAT         | NAR         | VG            |
| Maus             | <i>Cryga</i> | EIY         | SMHV           | LEGC        | WVLY           | EMP         | NRGR         | QYLL        | R           | Q           | YRRY        | HDW        | GAM         | DAK         | VG          | LRRV          |
|                  | <i>Crygb</i> | EIH         | SINV           | LEGC        | WVLY           | EMPS        | NRGR         | QYLL        | R           | P           | GEYR        | YH         | DW          | GAA         | NAK         | VG            |
|                  | <i>Crygc</i> | EVR         | SLHV           | LEGC        | WVLY           | EMP         | NRGR         | QYLL        | R           | Q           | YRRY        | HDW        | GAV         | DAK         | AG          | LRRV          |
|                  | <i>Crygd</i> | EIY         | SINV           | LEGC        | WVLY           | EMTN        | NRGR         | QYLL        | R           | P           | GEYR        | YH         | DW          | GAM         | NAK         | VG            |
|                  | <i>Cryge</i> | DFH         | SFHV           | MEGY        | WVLY           | EMP         | NRGR         | QYLL        | R           | P           | GEYR        | YH         | DW          | GAM         | NAR         | VG            |
|                  | <i>Crygf</i> | DFH         | SFHV           | MEGY        | WVLY           | EMP         | NRGR         | QYLL        | R           | P           | GEYR        | YH         | DW          | GAM         | NAR         | VG            |
| Ratte            | <i>Cryga</i> | EIY         | SMHV           | LEGS        | WVLY           | EMP         | NRGR         | QYLL        | R           | Q           | YRRY        | HDW        | GAM         | DAK         | VG          | LRRV          |
|                  | <i>Crygb</i> | EIH         | SINV           | LEGC        | WVLY           | EMPS        | NRGR         | QYLL        | R           | P           | GEYR        | YH         | DW          | GAA         | NAK         | VG            |
|                  | <i>Crygc</i> | EVR         | SLHV           | LEGC        | WVLY           | EMP         | NRGR         | QYLL        | R           | Q           | YRRY        | HDW        | GAV         | DAK         | AG          | LRRV          |
|                  | <i>Crygd</i> | EIY         | SINV           | LEGC        | WVLY           | EMTN        | NRGR         | QYLL        | R           | P           | GEYR        | YH         | DW          | GAM         | NAR         | VG            |
|                  | <i>Cryge</i> | DFH         | SFHV           | MEGY        | WVLY           | EMP         | NRGR         | QYLL        | R           | P           | GEYR        | YH         | DW          | GAM         | NAR         | VG            |
|                  | <i>Crygf</i> | DFH         | SFHV           | MEGY        | WVLY           | EMP         | NRGR         | QYLL        | R           | P           | GEYR        | YH         | DW          | GAM         | NAR         | VG            |
| Rind             | <i>Cryga</i> | EVS         | SINV           | LEGS        | WVLY           | EMPS        | NRGR         | QYLL        | R           | P           | GEYR        | YH         | DW          | GAM         | NAK         | VG            |
|                  | <i>Crygb</i> | EVS         | SINV           | LEGS        | WVLY           | EMPS        | NRGR         | QYLL        | R           | P           | GEYR        | YH         | DW          | GAM         | NAK         | VG            |
|                  | <i>Crygc</i> | EVR         | SLHV           | LEGC        | WVLY           | EMP         | NRGR         | QYLL        | R           | Q           | YRRY        | HDW        | GAV         | DAK         | AG          | LRRV          |
|                  | <i>Crygd</i> | EIH         | SINV           | LEGS        | WVLY           | ELPN        | NRGR         | QYLL        | R           | P           | GEYR        | YH         | DW          | ---         | ---         | ---           |
|                  | <i>Cryge</i> | EVR         | SLHV           | LEGC        | WVLY           | EMTN        | NRGR         | QYLL        | R           | Q           | YRRY        | HDW        | GAV         | DAK         | AG          | LRRV          |
|                  | <i>Crygf</i> | EIH         | SINV           | LEGC        | WVLY           | EMTN        | NRGR         | QYLL        | R           | P           | GEYR        | YH         | DW          | GAT         | NAR         | VG            |
| <b>Consensus</b> |              | <b>EIHS</b> | <b>SLHV</b>    | <b>LEGC</b> | <b>WVLY</b>    | <b>EMP</b>  | <b>NRGR</b>  | <b>QYLL</b> | <b>R</b>    | <b>P</b>    | <b>GEYR</b> | <b>YH</b>  | <b>DW</b>   | <b>GAM</b>  | <b>NAK</b>  | <b>VG</b>     |



**Tabelle A2** Mitglieder der -/-Kristalline-Superfamilie der Maus

| Gen                   | Gen-Symbol    | chromosomle Lokalisation |              | Protein                    | Katarakt / Mutation         |                              |
|-----------------------|---------------|--------------------------|--------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
|                       |               | Maus*                    | Mensch       |                            | Maus                        | Mensch                       |
| <b>bA1-Kristallin</b> | <i>Cryba1</i> | 11 (44,7)                | 17q11.1-12   | A1/A3-Kristallin 23/25 kDa | <i>Cryba1<sup>pol</sup></i> | Katarakt                     |
| <b>bA2-Kristallin</b> | <i>Cryba2</i> | 1 (40,8)                 | 2q34-36      | A2-Kristallin 22 kDa       |                             |                              |
| <b>bA4-Kristallin</b> | <i>Cryba4</i> | 5 (59,0)                 | 22q11.2-13.1 | A4-Kristallin 22 kDa       |                             |                              |
| <b>bB1-Kristallin</b> | <i>Crybb1</i> | 5 (59,0)                 | 22q11.2-12.1 | B1-Kristallin 28 kDa       |                             |                              |
| <b>bB2-Kristallin</b> | <i>Crybb2</i> | 5 (60)                   | 22q11.2-12.2 | B2-Kristallin 23 kDa       | <i>Philly</i>               | Katarakt                     |
| <b>bB3-Kristallin</b> | <i>Crybb3</i> | 5 (60)                   | 22q11.2-12.2 | B3-Kristallin 24 kDa       |                             |                              |
| <b>gS-Kristallin</b>  | <i>Crygs</i>  | 16 (26)                  | 3q           | S-Kristallin 20 kDa        | <i>Opj</i>                  |                              |
| <b>gA-Kristallin</b>  | <i>Cryga</i>  | 1 (32)                   | 2q33-35      | -Kristallin 20 kDa         |                             |                              |
| <b>gB-Kristallin</b>  | <i>Crygb</i>  | 1 (32)                   | 2q33-35      | -Kristallin 20 kDa         | <i>Crygb<sup>nop</sup></i>  |                              |
| <b>gC-Kristallin</b>  | <i>Crygc</i>  | 1 (32)                   | 2q33-35      | -Kristallin 20 kDa         |                             | Coppock                      |
| <b>gD-Kristallin</b>  | <i>Crygd</i>  | 1 (32)                   | 2q33-35      | -Kristallin 20 kDa         | <i>Lop12</i>                | pulverulenter / aculeiformer |
| <b>gE-Kristallin</b>  | <i>Cryge</i>  | 1 (32)                   | 2q33-35      | -Kristallin 20 kDa         | <i>Elo</i>                  |                              |
| <b>gF-Kristallin</b>  | <i>Crygf</i>  | 1 (32)                   | 2q33-35      | -Kristallin 20 kDa         |                             |                              |

\* cM Position nach Maus Komitee Report (2000) in Klammern

**Tabelle A3** Aufstellung der Maus *Cat2* Mutanten der Neuherberger Kataraktsammlung

| Mutante                              | Mutagene Behandlung            | Homozygoter Phänotyp der Linse | Referenz*                     |
|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <i>Cat2<sup>nz</sup> / Nzc</i>       | -Strahlung                     | Nukleäre Trübung               | Kratochvilova & Ehling, 1979  |
| <i>Cat2<sup>r</sup> / R324</i>       | Röntgenstrahlung               | Totale Trübung und Dysplasie   | Graw, et al. 1986             |
| <i>Cat2<sup>o</sup> / Rop</i>        | Procarbazine                   | Homogene Trübung               | Kratochvilova, et al. 1988    |
| <i>Cat2<sup>nop</sup> / Nop</i>      | keine / spontan                | Nukleäre Trübung               | Graw, et al. 1984             |
| <i>Cat2<sup>ns</sup> / Scat</i>      |                                | Totale Trübung und Dysplasie   | Graw, et al. 1989             |
| <i>Cat2<sup>tol</sup> / ENU-369</i>  | Ethylnitroseharnstoff<br>(ENU) | Totale Trübung                 | Everett, et al. 1994          |
| <i>Cat2<sup>no2</sup> / ENU-3018</i> |                                | Totale Trübung                 |                               |
| <i>ENU-413</i>                       |                                | Zonuläre Trübung               | Favor & Neuhäuser-Klaus, 2000 |
| <i>ENU-418</i>                       |                                | Nukleäre und zonuläre Trübung  |                               |
| <i>ENU-436</i>                       |                                | Nukleäre Trübung               |                               |
| <i>ENU-449</i>                       |                                | Diffuse totale Trübung         |                               |
| <i>ENU-632</i>                       |                                | Totale Trübung                 |                               |
| <i>ENU-637</i>                       |                                | Diffuse totale Trübung         |                               |
| <i>ENU-640</i>                       |                                | Totale Trübung                 |                               |
| <i>ENU-719</i>                       |                                | Posteriore Nahttrübung         |                               |
| <i>ENU-722</i>                       |                                | Posteriore polare Trübung      |                               |
| <i>ENU-723</i>                       |                                | Posteriore polare Trübung      |                               |
| <i>ENU-910</i>                       |                                | Diffuse totale Trübung         |                               |
| <i>ENU-2042</i>                      |                                | Totale Trübung                 |                               |
| <i>ENU-3030</i>                      |                                | Nukleäre Trübung               |                               |
| <i>ENU-5023</i>                      |                                | Totale Trübung                 |                               |
| <i>ENU-5038</i>                      |                                | Nukleäre Trübung               |                               |

\* der ersten Beschreibung

## ABKÜRZUNGEN

|       |   |                 |   |
|-------|---|-----------------|---|
| Abb   | Abbildung   | MMDB Id         | Proteinstruktur<br>Identifikationsnummer (NCBI)         |
| AccNr | Genbank Zugangsnummer   | mRNA            | messenger RNA   |
| AP    | Alkalische Phosphatase  | NCBI            | US National Center for<br>Biotechnology Information     |
| AS    | Aminosäuren   | NMR             | Nuclear Magnetic Resonance-<br>Spektroskopie            |
| ATP   | Adenosintriphosphat   | NTP             | Nucleosidtriphosphat                                    |
| BAC   | bakterielles artifizielles Chromosom                            | OD              | optische Dichte   |
| bp    | Basenpaar   | OMIM            | Online Mendelian Inheritance in<br>Man                  |
| BSA   | bovine serum albumin  | <sup>32</sup> P | Phosphor Isotop   |
| CD    | Circulardichroismus   | P               | postnataler Tag   |
| cDNA  | komplementäre DNA   | PAA             | Polyacrylamid   |
| cM    | centi Morgan  | PBS             | Phosphate buffered saline                               |
| cpm   | counts pre minute / Zerfälle pro min                            | PCR             | Polymerase-Kettenreaktion                               |
| Da    | Dalton  | pfu             | plaque forming units                                    |
| DNA   | Desoxyribonukleinsäure  | pH              | pondus hydrogenii                                       |
| dNTP  | Desoxyribonukleosidtriphosphat                                  | RNA             | Ribonukleinsäure  |
| DTT   | Dithiotreitol   | rpm             | Umdrehungen pro Minute                                  |
| E     | embryonaler Tag   | SDS             | Sodium dodecyl sulphate                                 |
| EC    | Enzyme Commission Number  | SNP             | Single Nucleotide Polymorphism                          |
| EDTA  | Ethylendiamintetraacetat  | SSC             | Sodium chloride-sodium citrate                          |
| EST   | expressed sequence tag  | SSCP            | single strand conformation<br>polymorphism              |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase                         | Tab             | Tabelle   |
| GFP   | Green fluorescence protein                                      | TAE             | Tris-Acetat-EDTA-Elektrophorese-<br>Buffer              |
| htgs  | unfinished high throughput genomic sequence<br>Datenbank (NCBI) | TBE             | Tris-Borat-EDTA-Elektrophorese-<br>Buffer               |
| HUGO  | Humane Genome Project   | TE              | Tris-EDTA   |
| IPTG  | Isopropyl-β-D-thio-Galactopyranosid                             | TUNEL           | terminal transferase-mediated<br>dUTP nick end labeling |
| k     | Kilo  | Tris            | Tri(hydroxymethyl)-aminomethan                          |
| kb    | Kilobase  | UV              | Ultraviolett  |
| kDa   | Kilodalton  | V               | Volt  |
| l     | Liter   | v/v             | Volumen pro Volumen                                     |
| LB    | Luria-Broth   | W               | Watt  |
| m     | Meter   | w/v             | Gewicht pro Volumen                                     |
| M     | Mol   | WT              | Wildtyp   |
| Mb    | Megabasen   | X-Gal           | 5-Brom-4Chlor-3-Indolyl-β-D-<br>Galactopyranosid        |
| min   | Minute  |                 |   |