

Analyse einer Olfactomedin-1 (Pancortin) mutierter
Maus mit Myocilin-Defizienz



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.)
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

Vorgelegt von

Markus Götz

aus Neumarkt i. d. Opf.

2017

Analyse einer Olfactomedin-1 (Pancortin) mutierter
Maus mit Myocilin-Defizienz



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin (Dr. med.)
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

Vorgelegt von

Markus Götz

aus Neumarkt i. d. Opf.

2017

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. E. R. Tamm
Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 06.09.2017

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung.....	5
I.1	Die Familie der Olfactomedin-Proteine.....	5
I.2	Myocilin.....	8
I.3	Olfactomedin-1 (Pancortin).....	9
I.4	Olfactomedine und Erkrankungen des Menschen.....	11
I.5	Neue Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe.....	13
II.	Zielsetzung der Arbeit.....	15
II.1	Analyse einer Olfactomedin-1 mutierten Maus mit Myocilindeizienz.....	15
III.	Material und Methoden.....	16
III.1	Verwendete Materialien.....	16
III.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	16
III.1.1.1	Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	16
III.1.1.2	Geräteliste.....	17
III.1.2	Liste der verwendeten Reagenzien.....	18
III.1.3	Enzyme und Kits.....	20
III.1.4	Zusammensetzung von Gelen, Puffern und Lösungen.....	20
III.1.5	Oligonukleotid-Primer.....	23
III.1.6	Verwendete Tiere.....	24
III.2	Methoden der Molekularbiologie.....	24
III.2.1	Isolierung von DNA aus Mausschwänzen.....	24
III.2.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	25
III.2.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	28
III.2.4	Expressionsanalyse mit der quantitativen real-time RT-PCR.....	29
III.2.4.1	Prinzip der quantitativen real-time RT-PCR.....	29
III.2.4.2	RNA-Isolierung aus Netzhäuten.....	30
III.2.4.3	Herstellung von cDNA.....	31
III.2.4.4	Durchführung der quantitativen real-time RT-PCR.....	32
III.3	<i>In vivo</i> – Versuche.....	35
III.3.1	Versuchstiere und deren Haltung.....	35
III.3.2	Präparation diverser Gewebe.....	36
III.3.3	Schadensmodelle.....	37
III.3.3.1	Intravitreale Injektionen von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA).....	37

III.3.3.2	Licht-induzierte Schädigung von Photorezeptoren	38
III.3.3.3	Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Assay	39
III.4	Histologische Arbeitstechniken.....	40
III.4.1	Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten.....	40
III.4.2	Einbettung in Epon und Herstellung von Semidünnschnitten	41
III.4.3	Histologische Färbungen	42
III.5	Mikroskopie	43
III.6	Auswertung und Statistik.....	43
IV.	Ergebnisse.....	44
IV.1	Morphologische Untersuchungen.....	44
IV.1.1	Makroskopische Begutachtung der Versuchstiere.....	44
IV.1.2	Morphologische Betrachtung des Auges	45
IV.1.3	Morphologische Charakterisierung der Sehnerven und Netzhäute	46
IV.1.4	Untersuchungen zum ontogenetischen Zelltod.....	49
IV.1.4.1	TUNEL-Assays von P4-, P9- und P14-Netzhäuten.....	49
IV.1.5	Untersuchungen anhand von etablierten Schadensmodellen.....	53
IV.1.5.1	NMDA-induzierte Schädigung von retinalen Ganglienzellen.....	53
IV.1.5.2	Licht-induzierte Schädigung von Photorezeptoren	55
IV.1.6	Quantitative Realtime-PCR-Untersuchungen.....	58
IV.1.6.1	Latrophilin	58
IV.1.6.2	Olfactomedine.....	59
V.	Diskussion	60
VI.	Zusammenfassung	66
VII.	Summary	67
VIII.	Anhang	68
VIII.1	Literaturverzeichnis	68
VIII.2	Abbildungsverzeichnis.....	78
VIII.3	Tabellenverzeichnis.....	79
VIII.4	Abkürzungsverzeichnis	80
VIII.5	Danksagung	84
VIII.6	Erklärung.....	85

I. Einleitung

Die in folgender Arbeit untersuchten Proteine Myocilin und Olfactomedin-1 (Pancortin) werden beide zur Familie der Olfactomedine gezählt. Dabei ist Myocilin in der Gruppe drei und Pancortin in der Gruppe eins eingeordnet (*Abb.1*). Über die Funktionen der meisten Olfactomedine ist bis jetzt wenig bekannt und das obwohl Assoziationen zu wichtigen Krankheitsbildern wie dem Glaukom (Stone et al., 1997; Adam et al., 1997; Wiggs et al., 1998; Fingert et al., 1999 und 2002), was weltweit zu den Hauptursachen der Erblindung zählt (Quigley et al., 1996), oder malignen Erkrankungen, wie dem Magenkarzinom (Oue et al., 2009, Liu et al., 2012) bestehen. Anhand der Kreuzung einer Olfactomedin-1 mutierten Maus mit einem Myocilin defizientem Hintergrund erfolgte in der vorliegenden Arbeit die weitere Untersuchung der Funktionen von Myocilin und Pancortin in der Netzhaut.

I.1 Die Familie der Olfactomedin-Proteine

Die Familie der Olfactomedine besteht aus einer Vielzahl an Proteinen, die nach der Arbeitsgruppe Zeng et al. in sieben Untergruppen unterteilt werden (*Abb.1*). Neuere Arbeiten suggerieren jedoch eine achte Subgruppe, da mehrere Formen von Amassin in Seeigel entdeckt wurden und diese somit eine eigene Subfamilie bilden könnten (Hillier et al., 2007). Insgesamt betrachtet handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe an Proteinen, welche in fast allen Geweben und Organen, z.B. Herz, Lunge, Leber (Wan et al., 2008), Niere (Goldwich et al., 2005), Hoden, Skelettmuskel, Thymus (Resch, Fautsch, 2008) und neuronalem Gewebe (Lelianova et al., 1997; Tomarev et al., 1998; Matsushita et al., 1999) vorkommen und sowohl in sezernierter Form als auch als membranständige Rezeptoren, wie die Latrophiline (Tobaben et al., 2002), existieren. Nicht nur das Vorkommen sondern auch die Funktionsgebiete der Olfactomedinproteine zeigen ein weit verbreitetes Feld, welches von der Beteiligung an der Regulation des Zellzyklus (Kobayashi et al., 2007; Wan et al., 2008), der Zellmigration (Kwon, Tomarev, 2011), Zellproliferation (Kobayashi et al., 2007; Wan et al., 2008), Apoptose (Cheng et al., 2007) bis zur Beteiligung an Prozessen der Neurogenese (Moreno et al., 2001) reicht.

Trotz aller heute bekannten Vielfalt ist der Ursprung der Familie ein in Riechepithelien des Ochsenfrosches, *Rana catesbeiana*, nachgewiesenes Protein (Snyder et al., 1991), das ins Nasenlumen sezerniert wird und sich dort in den unteren Schleimhautschichten in engen Kontakt zu den chemosensorischen dendritischen Zilien ablagert (Bal and Antholt, 1993). Aufgrund der Lokalisation wurde dieses Protein Olfactomedin genannt (Snyder et al., 1991) und die dort nachgewiesene ca. 250 Aminosäuren lange „Olfactomedin-Domäne“ (Zeng et al., 2005) zum gemeinsamen Nenner der heutigen Olfactomedinproteinfamilie.

Besonders interessant werden Vertreter der Olfactomedine, da diese auch im menschlichen Organismus nachgewiesen werden konnten. Analog zu Mäusen besteht die humane Olfactomedinfamilie aus 13 Genprodukten (Antholt, 2014). Besonders Olfactomedin 1-4, sowie Myocilin waren in vielen verschiedenen Gewebeproben vertreten und wiesen gewebsspezifische Expressionsmuster auf (Kulkarni et al., 2000). Im Hinblick auf die Rolle der Olfactomedine als wichtige Mediatoren der Entwicklung, vor allem der Neurogenese und Hämatopoese (Antholt, 2014), könnten Olfactomedinproteine somit wichtige Bausteine in der Entstehung von Krankheiten sein.

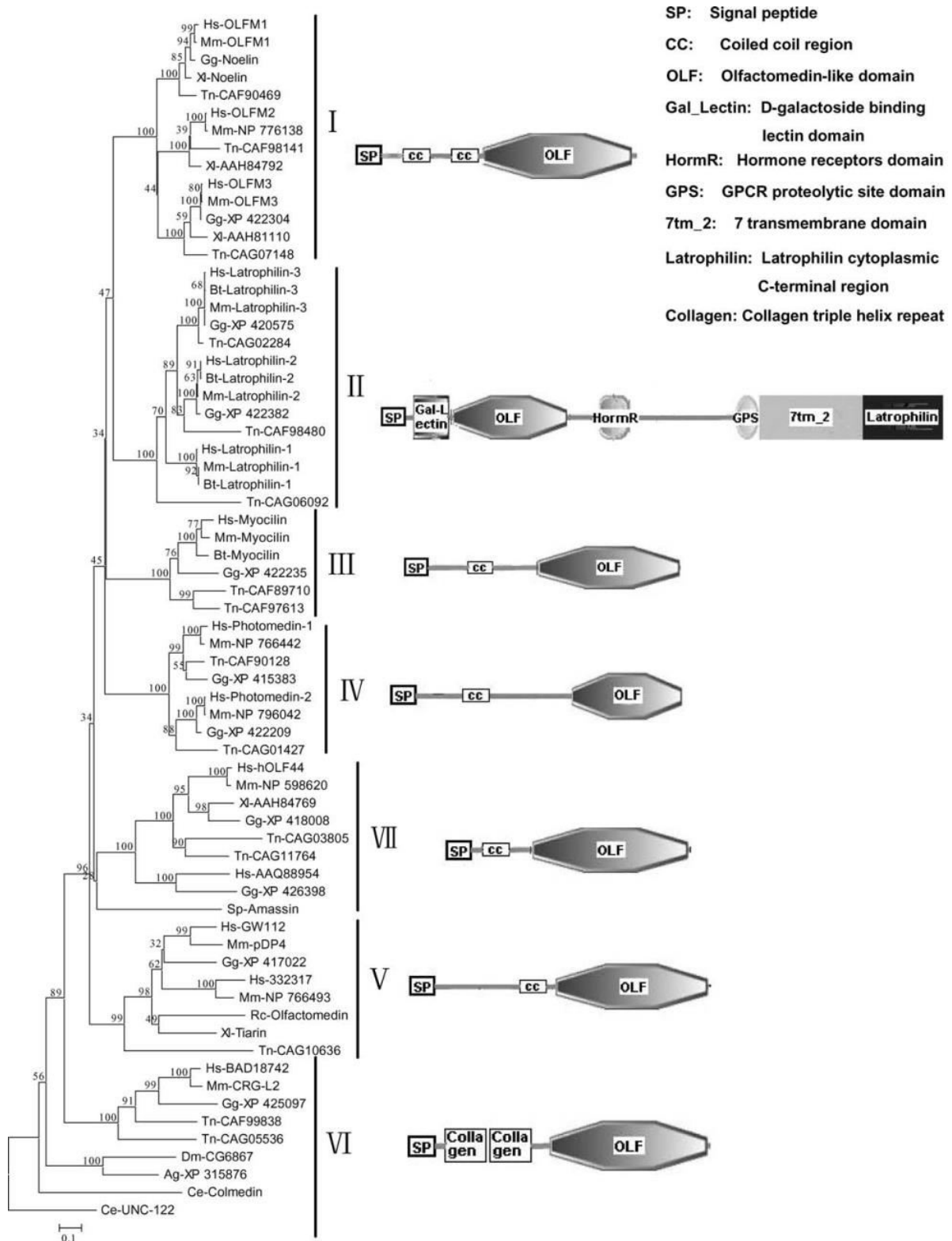


Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Olfactomedin-Proteine

Die Abbildung zeigt die phylogenetischen Beziehungen der Olfactomedin-Proteine. Die vertikalen Balken und die römische Beschriftung grenzen die sieben Subfamilien voneinander ab, wobei die horizontalen Äste dem phylogenetischen Abstand entsprechen. Der Aufbau typischer Vertreter jeder Subfamilie ist jeweils rechts davon dargestellt. Der Baum wurde nach der Neighbor Joining Methode erstellt. (Aus: Zeng et al., 2005; modifiziert nach Rosenhammer, 2015)

I.2 Myocilin

Myocilin ist ein Glykoprotein, welches mitunter auch im Menschen (Stone et al., 1997) nachgewiesen werden konnte. Das Myocilin-Gen besteht dabei aus einer 5-kb langen Promotorregion und drei Exons, welche 13 Elemente der hormonellen Antwort, unter anderem Elemente der Glucocorticoidregulation, enthält (Ngyuen et al., 1998; Antholt 2014). Das fertige Protein Myocilin enthält eine N-terminale leucinzipper-like Domäne, eine zentrale Verbindungsregion und am C-terminalen Ende die bereits angesprochene Olfactomedindomäne (Sanchez-Sanchez et al., 2007, Rosenhammer, 2015). Im Verlauf der Translation wird Myocilin im endoplasmatischen Reticulum durch Calpain II, eine calcium-abhängige Endoprotease, in zwei Teile gespalten, wobei die C-terminale Domäne sezerniert wird und die N-terminale Domäne hauptsächlich in der Zelle verbleibt (Sanchez-Sanchez et al., 2007).

Welche Funktion Myocilin anschließend im Gewebe übernimmt ist weitestgehend unbekannt, jedoch gibt es Hinweise auf eine Interaktion von Myocilin und Olfactomedin 3 (Optimedin), welches ebenfalls im Auge exprimiert wird (Torrado et al., 2002). Optimedin seinerseits wirkt durch Anregung einer NGF-stimulierten Anhäufung von PC12 Zellen, sowie Induktion der N-cadherin Expression an der Zelladhäsion mit (Lee and Tomarev, 2007). Somit könnte Myocilin, ggf. im Verbund mit Optimedin die Zellinteraktionen stabilisieren. Zudem liegt die Vermutung nahe, dass Myocilin eine wichtige Modulatorrolle in der Entwicklung des Auges einnimmt, was durch den Einfluss von Myocilin auf den *Wnt*-Signalweg (Kwon et al., 2009) und die Aktivierung des *Integrin-focal adhesion kinase*-Signalweges (Kwon and Tomarev, 2011) begründet ist. Durch letzteren wird die Zellmigration von NIH3T3 und FHL124 Zellen angeregt (Kwon and Tomarev, 2011).

Eine Verbindung zum Glucocorticoidstoffwechsel liegt bereits durch die in der Genstruktur von Myocilin nachgewiesenen regulatorischen Elemente (Ngyuen et al., 1998; Antholt, 2014) nahe. So konnte durch Gabe von Dexamethason über 10 Tage die intrazelluläre Konzentration von Myocilin im Trabekelwerk von kaum nachweisbaren Dosen auf mehr als 2% der gesamten Konzentration an mRNA in den Zellen gesteigert werden (Ngyuen et al., 1998). Die Lokalisation von Myocilin im

Trabekelwerk und die Induktion der Bildung von Myocilin durch Dexamethason führte dazu, dass Myocilin zunächst unter dem Namen *Trabecular meshwork-inducible glucocorticoid response protein (TIGR)* bekannt wurde (Polansky et al., 1997; Ngyuen et al., 1998; Antholt, 2014; Rosenhammer, 2015). Die Tatsache, dass Myocilin durch Mutationen in der Olfactomedindomäne als erstes Olfactomedin mit einer Erkrankung des Menschen, nämlich dem Glaukom (s. I.4.), in Verbindung gebracht wurde (Stone et al., 1997; Adam et al., 1997; Wiggs et al., 1998; Fingert et al., 1999 und 2002), macht Myocilin bis dato zum am häufigsten untersuchten Vertreter der Olfactomedinfamilie.

I.3 Olfactomedin-1 (Pancortin)

Im Verlauf der Erforschung der Olfactomedine wurden zunächst in Rattengehirnen vier strukturell verwandte, neuronspezifische, 1B426b mRNAs entdeckt, welche AMY, BMY, AMZ und BMZ genannt wurden (Danielson et al., 1994). Die Differenzierung der vier Isoformen erfolgt durch alternatives Splicen und unterschiedliche Promotor-Aktivität (*Abb. 2*) (Danielson et al. 1994). Diese konnten letztendlich auf einen gemeinsamen Gensprung zurück verfolgt werden, der je nach Spezies unter verschiedenen Namen, wie Pancortin, Noelin, AMZ-Protein und eben Olfactomedin-1 (Olfm-1) bekannt ist (Nagano et al., 1998; Barembaum et al., 2000; Kulkarni et al., 2000; Moreno et al., 2001, Antholt, 2014, Rosenhammer, 2015).

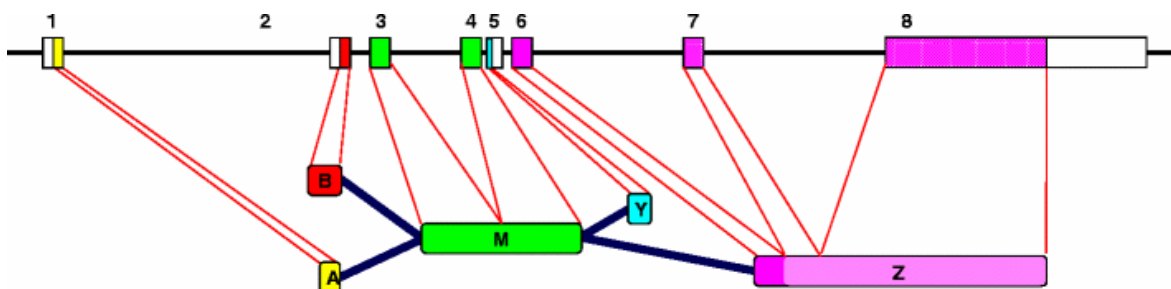


Abbildung 2: Schematisches Diagramm der Entstehung der Pancortin-Isoformen.

Das Diagramm zeigt die verschiedenen Formen von Pancortin, die durch die Verwendung unterschiedlicher Promotoren (Exon 1 oder 2) oder durch alternatives Spleißen (Exon 5 oder Exon 6-8) entstehen. Die zentrale M-Region, kodiert durch Exon 3 und 4, ist bei allen Isoformen gleich. Die Exons 7 und 8 kodieren für die Olfactomedin-Domäne. (Aus: Tomarev, Nakaya, 2009; modifiziert nach Rosenhammer, 2015)

Hauptlokalisation dabei scheint neuronales Gewebe zu sein. Zwar konnte Olfactomedin-1 weit verbreitet in Gehirngewebe und dem Nebennierenmark nachgewiesen werden (Danielson et al., 1994; Nagano et al., 1998; Antholt, 2014), jedoch wurden besonders hohe Konzentrationen im Hippocampus und im Bulbus olfactorius gefunden (Nagano et al., 1998; Ando et al., 2005). Entsprechend der Lokalisation ist Olfactomedin-1 in Signalprozesse der neuronalen Entwicklung involviert. So beeinflusst Olfactomedin-1 den Zeitpunkt der neuronalen Differenzierung und stimuliert die Neurogenese (Moreno et al., 2001; Moreno et al., 2005). Des Weiteren ist bekannt, dass Olfactomedin-1 sowohl in die Regulation von Axonwachstum (Nakaya et al., 2012), die Migration von kortikalen Zellen (Rice et al., 2012) als auch die Bildung des Neuralrohrs (Barembaum et al., 2000) involviert ist. Olfactomedin-1 mutierte Mäuse wiesen zudem deutliche Störungen des Verhaltens und Dystrophien des zentralen Nervensystems auf (Nakaya et al., 2013), was die Wichtigkeit von Olfm-1 in der Entwicklung des Nervensystems unterstreicht.

Der genaue Mechanismus hierbei ist bis jetzt unbekannt, jedoch scheinen Wechselwirkungen mit anderen wichtigen Proteinen neuronaler Signalprozesse eine Rolle zu spielen. So bildet Olfactomedin Bindungen zum *Wnt*-Antagonisten *Wnt-inhibitory factor 1 (WIF-1)* (Nakaya et al., 2008), *WAVE1* (Cheng et al., 2007), *Bcl-xL* (Cheng et al., 2007), *Teneurin-4 (ODZ4)* (Nakaya et al., 2013), *Kidins220* (Nakaya et al., 2013), *Synaptophysin* (Nakaya et al., 2013), *Clip1* (Nakaya et al., 2013), *USP19* (Nakaya et al., 2013), *Nogo Rezeptor 1* (Nakaya et al., 2012), *amyloid precursor protein* (Rice et al., 2012), sowie zum *GluR2 AMPA Rezeptor* und dem *Cav2.1 Kalziumkanal* (Nakaya et al., 2013). Im Falle einer Olfactomedin-1 Mutation wird dabei das Zusammenspiel mit dem AMPA Rezeptor und dem Cav2.1 Kalziumkanal behindert, was zu einer Akkumulation von Kalzium in den Zellen führt (Nakaya et al., 2013). Daraus resultieren Störungen der Signalkaskade, die letztendlich zur Dystrophie des Gehirns und abnormen Verhaltensmustern der Versuchstiere führen (Nakaya et al., 2013).

Einen weiteren Gesichtspunkt zum Verständnis der Olfactomedin-1 Funktion stellt die Struktur des Proteins an sich dar. So konnte durch eine Kombination aus Röntgenkristallographie, Ultrazentrifugation und Elektronenmikroskopie eine durch Disulfide verbundene, V-förmige, tertamerische Form von Olfactomedin

nachgewiesen werden (Pronker et al., 2015). Dabei befinden sich am C-terminalen Ende der beiden Enden β -Propeller, welche entsprechende Signalprozesse durch Cluster-Bildung von Rezeptoren beeinflussen könnten (Pronker et al., 2015).

I.4 Olfactomedine und Erkrankungen des Menschen

Assoziationen von Olfactomedinen zu Krankheitsbildern des Menschen sind Anlass intensiver Forschungen zur Entschlüsselung der physiologischen Funktion der entsprechenden Mitglieder der Olfactomedinfamilie. Dies zeigt, wie bereits erwähnt, das Beispiel von Myocilin, welches durch die Verbindung zur Glaukomerkrankung (Stone et al., 1997; Adam et al., 1997; Wiggs et al., 1998; Fingert et al., 1999 und 2002) als das am häufigsten untersuchte Olfactomedinprotein gilt. Einen großen Durchbruch zum Verständnis der Pathogenese stellte die Tatsache dar, dass die Expression von Myocilin in den Trabekelwerkzellen durch Cortisol getriggert wird (Polansky et al., 1997), da sowohl erhöhte Blutzuckerwerte als auch arterieller Hypertonus als Risikofaktoren der Krankheitsentstehung gelten. Im weiteren Verlauf konnte ein Genlocus, *GLC1A*, auf Chromosom 1q23-q25 bei verschiedenen Familien, die vom *primary open-angle glaucoma* (POAG) oder dem *juvenile-onset POAG* (JOAG) betroffen sind, entdeckt werden (Adam et al., 1997, Stone et al., 1997). Beim Versuch Gene für ein Mutationsscreening zu finden, wurden so zunächst drei Mutationen im Myocilin-Gen entdeckt, die bei ca 4% der Studienpopulation nachweisbar waren (Stone et al., 1997). Mittlerweile konnten mehrere Mutationen von Myocilin, vor allem in der Olfactomedin-Domäne, in ca. 4% der Fälle von POAG und sogar in mehr als 10% der Fälle von JOAG nachgewiesen werden (Stone et al., 1997; Adam et al., 1997; Wiggs et al., 1998; Fingert et al., 1999 und 2002). Die Mutationen führen entweder zu einer trunkierten Form des Myocilins ohne Olfactomedin-Domäne oder zu fehlgefalteten Myocilinproteinen, welche nicht durch Calpain II gespalten werden können und somit im endoplasmatischen Retikulum akkumulieren (Caballero et al., 2000; Gobeil et al., 2006; Antholt and Carbone 2013; Antholt, 2014). Dies wiederum löst die *unfolded protein response* (UPR) aus (Abb. 3), was in Stress des endoplasmatischen Retikulums (ER) und bei zu hoher Akkumulation der mutierten Proteine in Apoptose der Zelle resultiert (Carbone et al., 2009; Antholt and Carbone, 2013; Antholt, 2014).

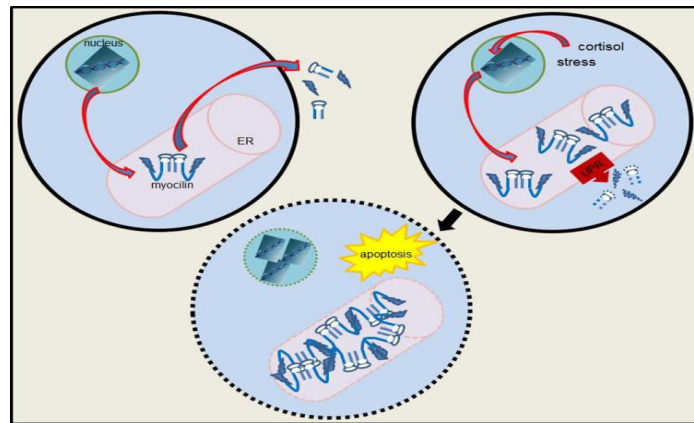


Abbildung 3: Schematische Darstellung von Myocilin-induziertem Stress des ER

Durch Überexpression von Myocilin kommt es zur Aggregatbildung im ER und damit zum Auslösen der UPR. Sobald die Aggregation von Myocilin die Kapazität der UPR überschreitet kommt es zur Apoptose (Aus: Antholt, 2014)

Längere Zeit war das Glaukom die einzige Erkrankung in deren Pathogenese Olfactomedine nachgewiesen werden konnten, jedoch scheinen Olfactomedin-1, Olfactomedin-3, und vor allem Olfactomedin-4 an der Entstehung von malignen Tumoren beteiligt zu sein. So wurde, beim Versuch Biomarker für das Nicht-kleinzellige-Lungenkarzinom (NSCLC) zu identifizieren, eine signifikant erhöhte Menge an Olfactomedin-1 im Tumorgewebe gefunden (Wu et al., 2010). Olfactomedin-3 hingegen ist für das Wachstum von Endotheliomen förderlich, indem es an BMP4 bindet und somit den SMAD1/5/8 Signalweg aktiviert, der für die BMP4-induzierte Angiogenese benötigt wird (Miljkovic-Licina et al., 2012). Die Blockade von Olfm-3 durch Antikörper war dabei hocheffektiv die Tumolvaskularisation und das Tumorstadium zu vermindern (Miljkovic-Licina et al., 2012). Am verbreitetsten in verschiedenen Tumorentitäten ist jedoch Olfactomedin-4, welches z.B. mit dem Pankreaskarzinom (Kobayashi et al., 2007; Chen et al., 2011), Endometriose (Dassen et al., 2010), Lungenkarzinomen und Mammakarzinomen (Seko et al., 2010; Besson et al., 2011; Sentani et al., 2013), sowie dem Magenkarzinom (Oue et al., 2009, Liu et al., 2012) assoziiert ist. In letzterem wird Olfactomedin-4 als prognostischer Marker für die Früherkennung gehandelt, da es vor allem in Frühstadien des Magenkarzinoms detektiert werden konnte (Oue et al., 2009). Die weiter zunehmenden Nachweise von Olfactomedinen in der Pathogenese menschlicher Erkrankungen unterstreichen nochmals die Notwendigkeit die physiologischen Funktionen der Olfactomedinproteine zu entschlüsseln um Möglichkeiten zu finden für die betroffenen Patienten prognostische Verbesserungen zu erzielen.

I.5 Neue Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe

In Vorversuchen beschäftigte sich unsere Arbeitsgruppe mit zwei Mauslinien, einer Myocilin-defizient und einer Pancortin- mutierten (Rosenhammer, 2015), und konnte dabei einige neue Erkenntnisse gewinnen. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Kim et al. im Jahr 2001 konnte ein v.a. okulär ausgeprägter Phänotyp der Myocilin-defizienten Mäuse beobachtet werden (Koch et al., 2014; Rosenhammer, 2015). So weisen diese eine signifikant erhöhte Anzahl an Axonen im Sehnerv und eine erhöhte Anzahl an retinalen Ganglienzellen (Koch et al., 2014; Rosenhammer, 2015), sowie eine erhöhte Anzahl an Zellen in der inneren Körnerschicht (INL) und äußeren Körnerschicht (ONL) auf (Koch et al., 2014; Rosenhammer, 2015). Außerdem konnte bei der Untersuchung des ontogenetischen Zelltodes durch TUNEL-Färbungen eine deutlich erniedrigte Apoptoserate bei Tieren mit Myocilindefizienz beobachtet werden (Koch et al., 2014; Rosenhammer, 2015). Dieser Schutz vor Zelluntergang konnte auch in Versuchen mit Lichtschaden und Schaden durch NMDA-Injektion bestätigt werden. So zeigen Myocilin-KO Tiere in beiden Modellen (Abb.4) einen deutlich geringer ausgeprägten Schädigungsgrad als Wildtypiere (Rosenhammer, 2015; Koch et al. 2017).

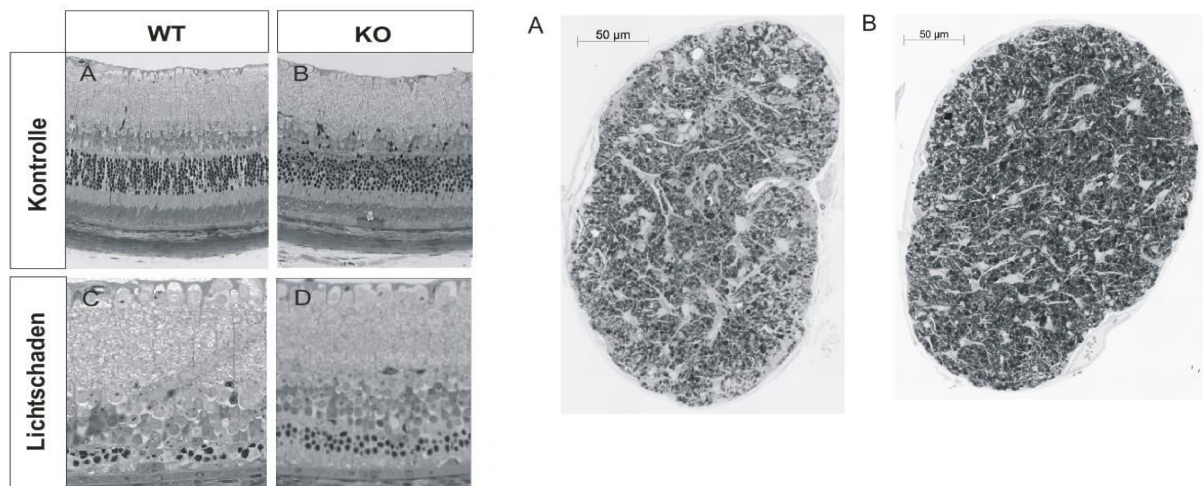


Abbildung 4: Ausprägung des Schadens bei Lichtschaden und NMDA-Injektion.

Links: Zu sehen sind Semidünnschnitte der Retinae von Myocilin-KO Mäusen und Wildtypieren. Die oberen Schnitte zeigen unbelichtete Kontrolltiere, die unteren die Versuchstiere, wobei hier bereits der deutlich geringer ausgeprägte Schaden der ONL bei den Myocilin-KO Tieren auffällt.

Rechts: Hier sind zwei Querschnitte durch den Sehnerv nach NMDA-Injektion einer Wildtypmaus (A) und einer Myocilin-KO Maus (B) zu sehen. Es zeigt sich ein deutlich größerer Verlust an Axonen im Wildtypier im Vergleich zum Myocilin-KO Tier. (Aus: Rosenhammer, 2015)

In der Mauslinie mit Olfactomedin-1 Mutation zeigten sich die Versuchstiere makroskopisch deutlich kleiner, was durch ein signifikant geringeres Körpergewicht bestätigt werden konnte (Nakaya et al., 2013; Koch et al., 2017). Während in den morphologischen Untersuchungen des Auges keine Unterschiede zwischen den Wildtypmäusen und den Pancortin-mutierten Versuchstieren gesehen werden konnten (Koch et al., 2017), zeigten die Versuchstiere eine deutlich erhöhte Anfälligkeit für Lichtschaden (Rosenhammer, 2015; Koch et al., 2017), was in TUNEL-Essays belegt werden konnte (*Abb. 5*).

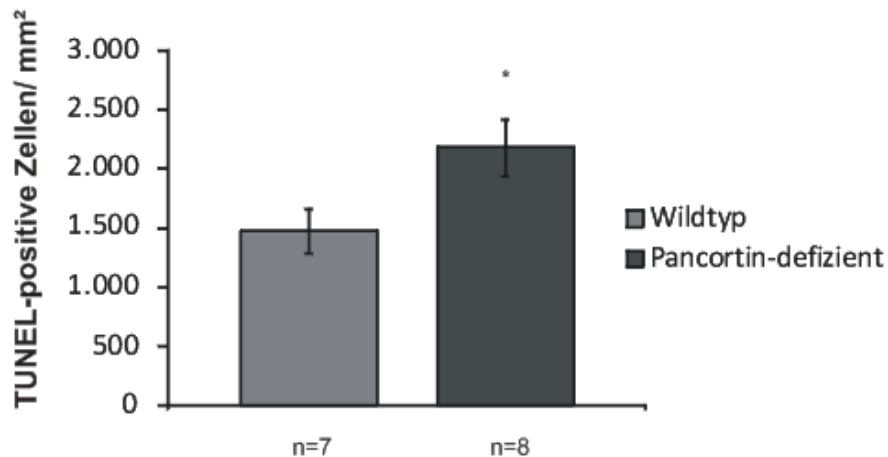


Abbildung 5: Quantitative Auswertung der TUNEL-Färbungen

Die Anzahl apoptotischer Zellen nach Lichtschaden ist bei den Pancortin-mutierten Mäusen um 47,8% erhöht. Mittelwerte ± SEM. * $p < 0,05$. (Aus: Rosenhammer, 2015)

Aufgrund der genau unterschiedlichen Ergebnisse im Bereich der zellulären Schädigung von Mäusen mit Myocilindefizienz und Olfactomedin-1 Mutation, wurde eine Kombination der beiden Mauslinien interessant.

II. Zielsetzung der Arbeit

II.1 Analyse einer Olfactomedin-1 mutierten Maus mit Myocilin-Defizienz

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, welche Auswirkungen eine zusätzliche Myocilin-Defizienz in einer Maus mit Pancortinmutation bewirkt, wobei zunächst die Versuchstiere als ganzes betrachtet werden sollen. Der Schwerpunkt der Untersuchungen liegt jedoch auf der Analyse der Augen und der dort eventuell auftretenden Veränderungen, um die erhaltenen Informationen anschließend mit den bereits erzielten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe zu den Mäusen, welche nur eine Myocilindefizienz oder nur eine Pancortinmutation aufweisen, vergleichen zu können.

III. Material und Methoden

III.1 Verwendete Materialien

III.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

III.1.1.1 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Materialien	Bezugsquelle
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nürnberg
Dispomed Einmalspritzen	Dispomed Witt oHG, Geinhausen
Glaswaren	Schott, Roth, VWR
Handschuhe Latex	Roth, Karlsruhe
Handschuhe Nitril	VWR, Darmstadt
Liquid Blocker PAP-Pen	SCI Science Services, München
Microseal®„B“ Film	Biorad, München
Multi-Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Roth, Karlsruhe
Ohrmarken	Hauptner & Heberholz, Solingen
Omnifix sterile Einmalspritzen	B. Braun, Wertheim
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR Plates, 96-well iCycler IQ	Biorad, München
Personna Rasierklingen	American Safety Razor Company, Verona, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Präparationsbesteck	Wild, Tuttlingen
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
Sterican Einmal-Injektions-Kanüle	B. Braun, Wertheim
SuperFrost®Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig

III.1.1.2 Geräteliste

Tabelle 2: Geräte

Geräte	Bezugsquelle
Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Einbettautomat EM TP (Epon)	Leica, Wetzlar
Einbettautomat HMP110 (Paraffin)	Microm, Waldorf
Gelelektrophoresekammern	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Inolab pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
IQ5 Multicolor Real-time PCR Detection System + iCycler	BioRad, München
Julabo SW20 Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Kern PJL 2100-2M Analysewaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Mastercycler gradient, personal	Eppendorf, Hamburg
Memmert Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Gießen
Mikroskop Axio Imager Z1	Zeiss, Göttingen
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA
Model 45-101-i ClassII Electrophoresis System	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
NanoDrop-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Neonlampe Auro-DLF006	Shaoxing Aonuo Electrical Appliance Manufacture Co. Ltd., Songxia, China
Pipetman Pipetten	Gilson, Den Haag, Niederlande
Power Gen 125 Homogenisators	Fisher Scientific, Schwerte
PowerShot G5 Digitalkamera	Canon, Krefeld
Power Supply	Consort, Turnhout, Belgien
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Supercut 2050 (Paraffin)	Reichert-Jung, Kirchseeon
Systec V75 Autoklav	Systec GmbH, Wettenburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator	Herolab Laborgeräte GmbH, Wiesloch
Ultracut E-Ultramikrotom (Epon)	Reichert-Jung, Kirchseeon
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf, Hamburg

III.1.2 Liste der verwendeten Reagenzien

Tabelle 3: Reagenzien

Reagenzien	Bezugsquelle
10x NH4 PCR-Reaction Buffer	Bioline, Luckenwalde
10x PCR-Puffer	Qiagen, Hilden
1,4-p-Phenylendiamin	Sigma, Taufkirchen
2-Dodecenylsuccinic-acid-anhydride (DDSA)	Serva, Heidelberg
2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl) Phenol (DMP-30)	Serva, Heidelberg
Agarose NEEO RotiGarose	Biozym Scientific, Oldendorf
Bleicitrat	Merck, Darmstadt
Borat (Natriumtetraborat)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Serva, Heidelberg
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie® Brillant Blue R-250	Sigma, Taufkirchen
DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Deoxycholsäure	Roth, Karlsruhe
dNTPs (10 mM)	Qiagen, Hilden
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Epon	Serva, Heidelberg
Ethanol, absolute	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ficoll	Serva, Heidelberg
Fluorescein	Qiagen, Hilden
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gelatine	Sigma, Taufkirchen
GeneRuler® 100 bp Plus DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycidether	Serva, Heidelberg
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid	Roth, Karlsruhe

Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB, 1% in dH ₂ O)	Serva, Heidelberg
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhexacyanoferat II	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ , 25 mM)	Qiagen, Hilden
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ , 50 mM)	Bioline, Luckenwalde
Methanol	Merck, Darmstadt
Methyl-Nadic-Anhydrid (MNA)	Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Natriummonohydrogenphosphatdihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)	Sigma, Taufkirchen
Oligonukleotide (Primer)	Invitrogen, Karlsruhe
Osmiumtetroxid	Merck, Darmstadt
Paraffin	Engelbrecht, München
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Taufkirchen
PBS (phosphate buffered saline)	Invitrogen, Karlsruhe
peqGold TriFast™ Reagenz	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pioloform	Plano, Marburg
Propylenoxid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Salzsäure 37% (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Roth, Karlsruhe
SYBR-Green I	Qiagen, Hilden
Tergitol	Sigma, Taufkirchen
Tissue-Tek®	Sakura, Zoeterwoude, NL
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Tris Ultrapure, MB Grade	Usb Corporation, Cleveland, USA
Trypanblaulösung (0,08%)	Sigma, Taufkirchen
Tween 20	Roth, Karlsruhe

Uranylacetat	Merck, Darmstadt
Wasser Rotisolv (Rnase-frei)	Roth, Karlsruhe
Xylencyanol FF	Roth, Karlsruhe
Xylol	Merck, Darmstadt

III.1.3 Enzyme und Kits

Tabelle 4: Enzyme und Kits

Enzyme/Kits	Bezugsquelle
BioTaq500 DNA Polymerase	Bioline, Luckenwalde
Dead-End TUNEL Assay	Promega, Mannheim
cDNA-Kit	
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad, München
MangoTaq500 DNA Polymerase	Bioline, Luckenwalde
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Restriktionsenzym Mwo I	New England BioLabs GmbH, Frankfurt a.M.
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden

III.1.4 Zusammensetzung von Gelen, Puffern und Lösungen

Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen:

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Auftragspuffer, 6x	0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylencyanol FF 15% (w/v) Ficoll
Cacodylatpuffer	20,14 g Cacodylsäure, in 0,5 l dH ₂ O pH 7,2

EM-Fixans	2,5% Paraformaldehyd 2,5% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer
Färbelösung nach Richardson: Stammlösung I Stammlösung II Gebrauchslösung	1% Azur II: 5 g Azur in 500 ml dH ₂ O 1% Methylenblau: 5 g Methylenblau in 500 ml 1% Natriumborat 1 Teil Stammlösung I + 1 Teil Stammlösung II + 2 Teile dH ₂ O
Mausschwanzlyse-Puffer	50 mM KCl 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 2 mM MgCl ₂ 0,1 mg/ml Gelatine 0,45% Nonidet P-40 (Tergitol) 0,45% Tween 20 Je 1 ml Lysispuffer wurden 500 µg Proteinase K vor Gebrauch frisch zugegeben.
PBS, 10x	80 g NaCl 2 g KCl 4,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ mit dH ₂ O ad 1 l, autoklavieren pH 7,4
PFA (Paraformaldehyd), 4%	4 g PFA 100 ml Phosphatpuffer unter Rühren und Erwärmen lösen pH 7,4
Phosphatpuffer, 0,1 M	P1: Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O: 35,6 g auf 2 l P2: NaH ₂ PO ₄ x 1H ₂ O: 13,8 g auf 1 l P1:P2 = 5:1 pH 7,4

Stammlösung A (für Eponeinbettung)	62 ml Glycidether 100 100 ml DDSA
Stammlösung B (für Eponeinbettung)	100 ml Glycidether 100 89 ml MNA
TBE-Puffer, 10x	108 g Tris 55 g Borat 40 ml EDTA (0,5M), pH 8 in dH ₂ O lösen, ad 1 l
TBS, 10x	30 g Tris/HCl 80 g NaCl 2 g KCl mit dH ₂ O ad 1 l, autoklavieren pH 7,4
Tris/HCl, 1 M	121,14 g Tris in dH ₂ O lösen, ad 1 l pH 6,8
Tris/HCl, 1,5 M	181,71 g Tris in dH ₂ O lösen, ad 1 l pH 8,8
Waschpuffer zur Proteinisolation	0,3 M Guanidin HCL in 95% Ethanol lösen

Verwendete Gele:

Tabelle 6: Gele

Art des Gels	Zusammensetzung
Agarose-Gel, 1%	1 g Agarose 100 ml TBE

III.1.5 Oligonukleotid-Primer

Sämtliche Oligonukleotid-Primer wurden über die Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Tabelle 7: Oligonukleotid-Primer**PCR**

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz von 5' nach 3'	Produktgröße
Myocilin-WT	mm	Fwd Rev	CCTCACCCAGCCTCCACACT GTGAAGGTGTATTGGCATCG	173 bp
Myocilin-LacZ-KO	mm	Fwd Rev	GCATCGAGCTGGGTAATAAGG GTTGGCAAT GACACCAGACCAACTGGTAAT GGTAGCGAC	800 bp
Pancortin-WT	mm	"Pancortin-1" "Pancortin-2"	CGCTGTCAGCAAGGACACTC CTCCACGTAAGTGCAGGTC	380 bp
Pancortin-defizient	mm	"Pancortin-1" "Pancortin-3"	CGCTGTCAGCAAGGACACTC GCACTGACGTCAGATTCTGG	618 bp
RPE65	mm	Fwd Rev	CACTGTGGTCTCTGCTATCTTC GGTGCAGTTCCTTCCAGTT	674 bp

qPCR

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz von 5' nach 3'
GNB2L1	mm	Fwd Rev	TCTGCAAGTACACGGTCCAG GAGACGATGATAGGGTTGCTG
Lphn1	mm	Fwd Rev	CGCCTTCAAATCATGTCAC CAGGAAAGGCGTCAGAGC
Lphn2	mm	Fwd Rev	CCAGGGACTCTTCATTTTCATC GCACTTGCCATACTCTTTTCG
Lphn3	mm	Fwd Rev	TGAGGATAACAGACCCTTCATCA AAGGCCAGGTCAATCCTA
Olfm2	mm	Fwd Rev	AACAACACTATTGCTGGAGGTCAGA ACGCACTTGCCATCAGGT
Olfm2A	mm	Fwd Rev	GGCCTCCCAGATGAATACG TTGTTCTCCAGGCTCAGGTT
Olfm2B	mm	Fwd Rev	GTGGGGCGAGTGGATAAAC GCTCATTCTCCTTGGTGAGG

Olfm3	mm	Fwd Rev	TGTGTTCCAGAGATGCCAAA TGAAAATCTCTCTGAGTTCTCAAGTT
Olfm4	mm	Fwd Rev	GTGAGGCCTCCAAAAGTGAC AGGATACTTCCAGCTGCTCCT

III.1.6 Verwendete Tiere

Für die Tierexperimente wurden die folgenden beiden Mauslinien verwendet:

- 1) Myocilin-KO Albino-Mäuse im Balb/c-Hintergrund
- 2) Pancortin-defiziente Mäuse im 129 SvEvBrd-Hintergrund (pigmentiert)
- 3) Myocilin/Pancortin- defiziente Mäuse mit gemischten Albino Balb/c/129SvEvBrd-Hintergrund (F3-Generation)

III.2 Methoden der Molekularbiologie

III.2.1 Isolierung von DNA aus Mausschwänzen

Um eine Genotypisierung der Tiere zu erreichen wurden zunächst ca. 0,5 cm lange Mausschwanzproben präpariert und im Anschluss die DNA isoliert. Hierzu wurde zu den Proben jeweils 200 µl Mausschwanzlyse-Puffer mit Proteinase K gegeben. Anschließend erfolgte im Thermomixer einige Stunden die Inkubation der Proben bei 55°C und 800 bis 1000 Upm. Zur Beendigung des Lysevorgangs wurde die Proteinase K durch Erhitzen auf 95°C für 10min inaktiviert. Nach kurzer Zentrifugation (10 min bei 13200 Upm) erfolgten als nächste Schritte die Vermessung des flüssigen Überstandes im *NanoDrop-1000 Spectrophotometer*, sowie die Verdünnung der DNA mit Wasser auf 50 ng/µl. Zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion wurden 1,5 µl (=75 ng) als Template eingesetzt.

III.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung der DNA *in vitro*. Die gezielte Amplifikation bestimmter DNA-Bereiche kann durch Anwendung spezifischer Primer erreicht werden. Der Nachweis der entstandenen Produkte erfolgt durch anschließende Gelelektrophorese.

Das von Kim et al. etablierte Schema diente zur Bestimmung des Myocilingenotyps (Kim et al., 2001): Dabei wurde das Wildtyp-Allel mit Hilfe einer Primer-Kombination, die ein 173 bp großes Fragment im Bereich 5'UTR/Exon 1 amplifizierte, identifiziert. Analog wurden KO-Tieren durch eine Primer-Kombination, die ein 800 bp großes Fragment im Deletionsbereich amplifizierte, detektiert. Explizit wurde folgender Ansatz angewandt:

Tabelle 8: Ansatz der Myocilin-PCR

	Myocilin-WT	Myocilin-KO-LacZ
ddH ₂ O	12,05 µl	13,05 µl
10x PCR-Puffer	2,5 µl	2,5 µl
Primer fwd (1:10 mit ddH ₂ O verdünnt)	1 µl	0,5 µl
Primer rev (1:10 mit ddH ₂ O verdünnt)	1 µl	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	0,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl	0,75 µl
5x Glycerol	5 µl	5 µl
BioTaq500 DNA-Polymerase	0,2 µl	0,2 µl
DNA-Template	2 µl	2 µl
	25 µl	25 µl

Folgendes Programm wurde anschließend für die Durchführung der PCR im Thermocycler gewählt:

Tabelle 9: Myocilin-PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	96°C	2 min
2. (29x)	94°C	45 sec
	59°C	45 sec
	72°C	1 min
3.	72°C	5 min
4.	10°C	∞

Zur Genotypisierung von Pancortin etablierte Cheng et al. (Cheng et al., 2007) ein bewährtes Schema. Darin wurden zwei Primerkombinationen verwendet:

Zum einen ein Primerpaar („Pancortin-1“ und „Pancortin-2“), das Intron-Sequenzen amplifizierte, welche den Bereich des Exons M2 flankieren, zur Bestimmung des Wildtyp-Allels. Zum anderen ein zweites Primerpaar („Pancortin-1“ und Pancortin-3“) zur Bestimmung von Pancortin defizienten Tieren. Dieses amplifizierte den Bereich zwischen den beiden *loxP-sites* (Bereich Exon M2 und Y).

Schema und PCR-Programm:

Tabelle 10: Ansatz der Pancortin-PCR

	„Pancortin-1“	„Pancortin-2“	„Pancortin-3“
ddH ₂ O	17,5 µl	17,5 µl	17,5 µl
10x PCR-Puffer	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
Primer (1:10 mit ddH ₂ O verdünnt)	1 µl	1 µl	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl	1 µl	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Taq DNA-Polymerase	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
DNA-Template	2 µl	2 µl	2 µl
	25 µl	25 µl	25 µl

Tabelle 11: Pancortin-PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	94°C	3 min
2. (29x)	94°C	30 sec
	58°C	30 sec
	72°C	30 sec
3.	72°C	7 min
4.	10°C	∞

Um vor den Lichtchadensversuchen die *LeuRPE65Met*-Mutation durch Genotypisierung auszuschließen, wurde das *nexttec™ Genomic DNA Isolation Kit* zur Isolierung der DNA, wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben, verwendet. Die verwendeten Primer amplifizierten einen 674 bp großen Bereich, der die Mutation enthielt.

Ansatz und PCR-Programm:

Tabelle 12: Ansatz der LeuRPE65Met-PCR

ddH ₂ O	29 µl
10x PCR-Puffer	5 µl
Primer fwd (1:10 mit dH ₂ O verdünnt)	2 µl
Primer rev (1:10 mit dH ₂ O verdünnt)	2 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
MgCl ₂ (50 mM)	3 µl
Taq-DNA-Polymerase	1 µl
DNA-Template	4 µl (100 µg)
	50 µl

Tabelle 13: LeuRPE65Met-PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	94°C	2 min
2.	94°C	30 sec
	55°C	45 sec
	72°C	1 min
3.	72°C	10 min
4.	10°C	∞

Anschließend wurde das PCR-Produkt durch das Restriktionsenzym Mwo I 3 h bei 37°C verdaut. Dieses schneidet bei Vorliegen der gesuchten Mutation das 674 bp große PCR-Produkt in zwei Fragmente von 437 bp und 236 bp.

III.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Durch eine Agarose-Gelelektrophorese konnten die amplifizierten PCR-Produkte sichtbar gemacht und das Ergebnis der Genotypisierung bestimmt werden. Hierfür wurde eine horizontale Elektrophoresekammer verwendet. Die Herstellung des Gels erfolgte durch vollständige Lösung von 1 g Agarose in 100 ml 1x TBE-Puffer, was durch Aufkochen in einer Mikrowelle erreicht wurde. Es erfolgte noch vor der Umfüllung des flüssigen Gels in den Elektrophoreseschlitten die Zugabe von 3,5 µl einer 0,01%igen Ethidiumbromid-Lösung, die sich in die doppelsträngige DNA einlagert und das Amplifikat unter UV- Lichtbestrahlung sichtbar macht. Nachdem das flüssige Agarosegel in den Schlitten gefüllt worden war, konnte durch Verwendung von Plastikämmern die Bildung von Taschen, in die die Proben aufgetragen werden konnten, erreicht werden. Die vollständige Verfestigung des Gels erfolgte bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Agarosegel mit dem Schlitten in die Elektrophoresekammer gegeben und diese mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt bis das Gel gerade bedeckt war. Während die zu untersuchenden Proben der Pancortin-Genotypisierung mit 6x Probenpuffer gemischt werden mussten, um so die Rückdiffusion aus den Kammern zu verhindern, konnte darauf bei den Myocilin-Genotypisierungen wegen des bereits im PCR-Puffers vorhandenem Glycerols verzichtet werden. Die Elektrophorese wurde 40 min (Myocilin) bzw. 45 min

(Pancortin) bei einer Spannung von 120 V in 1x TBE-Puffer durchgeführt. Nach Auftrennung der DNA wurde der Elektrophoreseschlitten, in dem sich das Gel befindet, aus der Kammer genommen und in einen Transilluminator überführt, so dass unter UV-Bestrahlung das Ergebnis mit einem Kamerasystem fotodokumentiert werden konnte.

III.2.4 Expressionsanalyse mit der quantitativen real-time RT-PCR

Netzhäute von 10 Tage alten Myocilin/Pancortin-KO-Mäusen dienen als Grundlage für Expressionsanalysen, die anhand einer quantitativen real-time RT-PCR durchgeführt wurden.

III.2.4.1 Prinzip der quantitativen real-time RT-PCR

Als Methode der Wahl zur quantitativen Analyse der relativen Genexpression wurde die quantitative real-time RT-PCR verwendet. Hierbei wird aus RNA mittels reverser Transkriptase ein komplementärer DNA-Strang, sogenannte *complementary DNA* (cDNA) hergestellt, welche im Anschluss als Ausgangsmaterial für eine Polymerasekettenreaktion eingesetzt wird. Die Besonderheit dieses Verfahrens ist, dass die Amplifizierung des PCR-Produktes während des gesamten Vorgangs kontinuierlich gemessen werden kann, was als „*real-time*“ bezeichnet wird. Dies gelingt durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR-Green I), der sich durch Interkalation in die doppelsträngige DNA einlagert, und durch einen Laser angeregt werden kann. Die Intensität der folglich emittierten Fluoreszenz kann im Laufe der Reaktion vermessen werden. Dabei besteht ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Intensität der Fluoreszenz und der entstehenden DNA-Menge, da der Farbstoff SYBR-Green I ungebunden nur schwach fluoresziert (Higuchi et al., 1993). Ab dem sogenannten „*cycle-threshold*“ (CT), dem Zyklus, bei dem die Fluoreszenz den Hintergrundwert überschreitet, startet die exponentielle Vermehrung des PCR-Produktes. Durch diesen kann eine quantitative Aussage über die zu Beginn eingesetzte Menge an mRNA getroffen werden, da der „*cycle-threshold*“ (CT) von der eingesetzten cDNA-Konzentration des zu untersuchenden Gens abhängig ist (Roche, 2001 und 2003).

Auf Grund der Interkalation des SYBR-Green-Farbstoffs in doppelsträngige DNA, können zusätzlich Primer-Dimere entstehen, welche ebenfalls fluoreszieren. Diese werden nach der Amplifikation durch Erstellen einer Schmelzkurve von dem gesuchten Produkt differenziert. Um eine relative Quantifizierung durchführen zu können wird die untersuchte Genexpression mit der Expression eines Referenzgens, im vorliegenden Fall einem sogenannten „*Housekeeping*“-Gen, welches sich im Hinblick auf sein Expressionsniveau möglichst wenig verändert, verglichen.

III.2.4.2 RNA-Isolierung aus Netzhäuten

Zur Isolierung der für die Analysen mittels quantitativer RT-PCR benötigten RNA aus zuvor präparierten Mäuseretinae, wurden diese nach der Methode von Chomczynski und Sacchi behandelt (Chomczynski, Sacchi, 1987). Besonders wichtig war dabei, dass die einzelnen Arbeitsschritte auf Eis und mit gänzlich RNase-freien Geräten, Materialien und Reagenzien durchgeführt wurden, um eine Verunreinigung oder den Zerfall der RNA zu verhindern. Als erster Schritt erfolgte die Homogenisierung des Retinagewebes mittels *Power Gen 125 Homogenisator*, so dass durch Zugabe des peqGold TriFast™ -Reagenz, einer einphasigen Lösung mit Phenol und Guanidinisothiocyanat, ein Aufschluss der Zellen ermöglicht wurde. Nach Zugabe von 0,2ml Chloroform konnte so, nach kurzer Inkubationszeit und Zentrifugation, das Homogenat in drei Phasen aufgetrennt und die RNA aus der wässrigen Phase mit Isopropanol ausgefällt werden.

Nachfolgend das genaue Protokoll der durchgeführten Schritte:

- 500 µl peqGold TriFast™ -Reagenz auf das Gewebe geben und mit Hilfe des Power Gen 125 homogenisieren
- 0,2 ml Chloroform pro ml peqGold TriFast™ -Reagenz zugeben, vortexen
- 20 min auf Eis inkubieren,
- 20 min bei 4°C bei 13200 Upm zentrifugieren
- obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen
- übrige Phasen für Proteinisolation (siehe III.3.1) bei -20°C lagern
- 400 µl Isopropanol zugeben, vortexen
- über Nacht bei – 20°C RNA ausfällen

- 20 min bei 4°C bei 13200 Upm zentrifugieren
- Isopropanol-Überstand vorsichtig abnehmen und verwerfen
- Pellet in 500 µl 70% Ethanol aufnehmen, vortexen
- für 5 min bei 4°C bei 13200 Upm zentrifugieren
- Ethanol-Überstand vorsichtig abnehmen und verwerfen
- RNA-Pellet kurz antrocknen lassen
- RNA-Pellet je nach Größe in 10 – 20 µl RNase-freiem Wasser resuspendieren
- bei – 80°C lagern

Eine anschließende Vermessung der Konzentration der isolierten RNA mit dem *NanoDrop-1000 Spectrophotometer* stellte sicher, dass für die spätere Herstellung der cDNA gleiche Mengen an RNA eingesetzt wurden. Als nächstes erfolgte, um extreme Verunreinigungen der RNA durch Proteine ausschließen zu können, die Ermittlung der Extinktion bei $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm gegen RNase-freies Wasser. Als rein wurden Proben mit einem Wert des Quotienten E260/E280 zwischen 1,8 und 2 erachtet und die RNA für die cDNA-Herstellung verwendet.

III.2.4.3 Herstellung von cDNA

Bei cDNA handelt es sich um einen komplementären DNA-Strang der mittels reverser Transkriptase aus RNA synthetisiert wird. Da cDNA stabiler ist als die ursprüngliche RNA sind die gespeicherten Informationen somit durch PCR Techniken analysierbar. Als Primer für die reverse Transkription wurden Oligo-dT-Ketten verwendet, welche an Poly-A-Enden der mRNA binden, so dass speziell Aussagen über die Expression der mRNA getroffen werden konnten. Das *iScript cDNA Synthese Kit* wurde für die Herstellung der cDNA eingesetzt. Verunreinigungen der RNA mit DNA konnten durch Verwendung zweier Ansätze, einmal mit reverser Transkriptase („+RT“) und einmal ohne reverser Transkriptase („-RT“), je RNA Probe abgeschätzt werden (siehe *Tabelle 17*).

Tabelle 14: Reaktionsansatz für die cDNA-Herstellung

Reaktionsansatz	+RT	-RT
0,5 µg RNA	7,5 µl	10 µl
H ₂ O		
5x <i>iScript</i> TM Reaction Mix	2 µl	-
<i>iScript</i> TM Reverse Transcriptase	0,5 µl	-
	10 µl	10 µl

Das Programm für die reverse Transkription, welche in einem Thermocycler durchgeführt wurde, sah folgendermaßen aus:

Tabelle 15: Programm der reversen Transkription

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	25°C	5 min
2.	42°C	30 min
3.	85°C	5 min
4.	10°C	∞

Im 2. Schritt erfolgte bei 42°C die eigentliche reverse Transkription, welche im 3. Schritt durch Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 85°C beendet wurde. Anschließend erfolgte die Lagerung der fertigen cDNA für nachfolgende qPCR Analysen bei -20°C.

III.2.4.4 Durchführung der quantitativen real-time RT-PCR

Die Bestimmung der relativen Genexpression wurde nun mit Hilfe der quantitativen real-time RT-PCR durchgeführt. Zur Ausführung der Analysen fand das *iQ5 Multicolor Real-Time-PCR Detection System* zusammen mit dem *iCycler* Anwendung. Anschließend konnten die PCR-Produkte durch den Fluoreszenzfarbstoff *SYBR-Green I* detektiert werden. Um eine Normalisierung zu erreichen wurde als interner Standard jeweils das Referenzgen GNB2L eingesetzt. Insgesamt wurden drei verschiedene Ansätze pipettiert. Zum einen die zu analysierenden cDNA Proben („+RT“), von derer jeweils ein Triplet untersucht wurde. Zum anderen ein – RT- Ansatz zum Ausschluss einer möglichen DNA-

Kontamination und als drittes eine Negativkontrolle mittels RNase-freien Wassers für jedes Primerpaar.

Jeder dieser Ansätze wurde zunächst mit einem Master-Mix versetzt, so dass +RT-, -RT- und Kontroll-Ansätze entstanden. Diese wurden nach einem bestimmten Schema zu je 15 µl in die 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegt:

„+RT“/„-RT“/H₂O-Master-Mix (für einen Ansatz):

Probe („+RT“ bzw. „-RT“ oder RNase-freies Wasser)	0,2 µl
10x PCR-Puffer	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	0,8 µl
dNTPs (25 mM)	0,16 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,08 µl
SYBR-Green I (7,4% (v/v) in DMSO)	0,25 µl
Fluorescein (1:100)	0,02 µl
RNase-freies Wasser	11,49 µl

Im Anschluss erfolgte die Zugabe von je 5 µl eines Primer-Mix, der die spezifischen Primer des zu untersuchenden Gens enthielt:

Primer-Mix (für einen Ansatz):

Forward Primer (1 µM)	0,17 µl
Reverse Primer (1 µM)	0,17 µl
RNase-freies Wasser	4,66 µl

Mit Hilfe einer Klebefolie wurden die 96-well-Mikrotiterplatten abgedichtet. Anschließend erfolgte eine kurze Zentrifugation der Proben und die PCR wurde nach folgendem Programm gestartet:

Tabelle 16: Real-Time PCR-Programm

Schritt	Temperatur	Dauer
1.	95°C	15 min
2.	95°C	10 sec
(40x)	60°C	40 sec
3.	95°C	1 min
4.	55°C	1 min
5.	55°C +0,5°C je Zyklus für die Schmelzkurve	Je 6 sec
(81x)		
6.	4°C	∞

Zur Auswertung der Daten wurde die *iQ Optical System Software Version 2.0* (BioRad, München) herangezogen und die relative Expression mit Hilfe der $\Delta\Delta CT$ -Methode berechnet (Livak, Schmittgen, 2001). Hierfür wurden die CT-Werte des Zielgens (x) auf die CT-Werte des Referenzgens GNB2L normalisiert und anschließend die konditionierte Bedingung (KO-Maus) auf die Standardbedingung (Wildtyp-Maus) bezogen.

Die Formeln für die Berechnung lauten:

$$\Delta CT = CT (\text{Referenzgen}) - CT (\text{Zielgen}) \quad (1)$$

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{KO}) - \Delta CT (\text{Wildtyp}) \quad (2)$$

$$x = 2^{-\Delta\Delta CT} \quad (3)$$

III.3 *In vivo* – Versuche

III.3.1 Versuchstiere und deren Haltung

Die entsprechenden Versuchstiere waren zuvor von der Arbeitsgruppe etabliert worden und wurden unter artgerechten optimalen Bedingungen gehalten:

Temperatur $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit $55\% \pm 5\%$,
Hell-Dunkelintervall 12 h, Futter und Wasser ad libitum.

Eine Überprüfung, ob neue Nachkommen geboren wurden, erfolgte täglich stets zur selben Zeit, so dass das entsprechende Alter der Tiere möglichst genau bestimmt werden konnte. Abgesehen von den Untersuchungen zum ontogenetischen Zelltod wurde als Alter der Tiere für die Versuche stets sechs bis acht Wochen gewählt.

Für die Zucht wurden ausschließlich Tiere mit dem Genotyp *Myoc*^{-/-}/*Olfm1*^{+/-} untereinander verpaart, um Nachkommen mit einem *Myoc*^{-/-}/*Olfm1*-mutant Genotyp zu erhalten. Nachkommen aus der Wildtypzucht dienten bei allen Versuchen als Referenzgruppe. Im Alter von drei bis vier Wochen wurden die Jungtiere von ihren Eltern abgesetzt. Nach kurzer Narkose durch Isofluran wurden diese mit nummerierten Ohrmarken gepierct, um eine spätere Zuordnung der Genotypisierungsergebnisse zu den einzelnen Mäusen zu ermöglichen. Während die Mäuse noch narkotisiert waren, wurde ein kurzes Stück (0,5 cm) des Schwanzes mit einer Schere abgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde zu jeder Probe 200 µl Mausschwanzlyse-Puffer mit Proteinase K gegeben. Die Ermittlung des Genotyps erfolgte nach abgeschlossener Lyse der Mausschwänze mit der Polymerase-Kettenreaktion.

III.3.2 Präparation diverser Gewebe

Für die Gewebspräparation wurden die Versuchstiere nach kurzer Inhalationsnarkose mit Isofluran durch zervikale Dislokation getötet.

Augen- und Nerven-Präparation für die Histologie:

Die Augen wurden zusammen mit den *Nn. optici* mit Hilfe einer stumpfen Pinzette enukleiert. Je nach Verwendung der so präparierten Augen und Sehnerven erfolgte die Überführung in 4% Paraformaldehyd (PFA), für die Einbettung in Paraffin, oder in EM-Fixans, für die anschließende Einbettung in Epon. Zwei Stunden nach Präparation wurde um eine Fixierung des gesamten Auges, insbesondere des hinteren Augenabschnitts, zu gewährleisten, noch ein kleiner Schnitt in die Cornea gesetzt.

Präparation verschiedener Organsysteme zur makroskopischen Beurteilung:

Makroskopisch wurden Lunge, Schilddrüse, Herz, das Darmsystem und der Ösophagus untersucht. Zur Präparation wurde zuerst mit einer spitzen Schere und einer feinen Pinzette eine Längslaparotomie und Thorakotomie durchgeführt, anschließend die entsprechenden Organe vorsichtig freigelegt und entfernt. Die Begutachtung wurde unter Binokularsicht bei 4 bis 16 facher Vergrößerung durchgeführt und alle Organe fotodokumentiert.

Isolierung der Netzhäute für RNA- und Proteinisolation:

Nach Eukleation der Augen wurde unter dem Binokular mit einer Schere der gesamte vordere Augenabschnitt am Limbus scharf abgetrennt. Daraufhin wurde durch sanften Druck zuerst die Linse unbeschädigt aus dem Augenbecher entfernt und anschließend die Retina vorsichtig von distal nach proximal aus dem Augenbecher herausmobilisiert. Die gewonnenen Retinae wurden möglichst schnell in ein auf Eis stehendes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, das bereits 500 µl peqGold TriFast™ -Reagenz enthielt. Nach Abschluss der Präparation wurden alle Proben bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

III.3.3 Schadensmodelle

III.3.3.1 Intravitreale Injektionen von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)

Die spezifische exzitotoxische Schädigung retinaler Ganglienzellen ist die Grundlage des NMDA- Schadensmodells:

NMDA, ein synthetisch hergestelltes Aminosäurederivat, fungiert als Ligand an NMDA-Glutamat-Rezeptoren, welche unspezifische Kationen-Kanäle darstellen. Diese besitzen u.a. eine hohe Leitfähigkeit für Ca^{2+} -Ionen und es kommt nach erfolgter Bindung des NMDA zur Öffnung der Kanäle mit anschließendem Ca^{2+} -Influx in die Ganglienzellen. Da NMDA kein physiologischer Ligand ist, wirkt er anders als Glutamat nur an den NMDA-Glutamat-Rezeptoren und es fehlen entsprechende Mechanismen zur Inaktivierung des NMDA-Rezeptorkomplexes. Als Folge daraus resultiert eine extrem lange Öffnung des Ca^{2+} -Kanals, die zu einem dramatischen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt. Als intrazelluläres Signalmolekül kann Ca^{2+} nun zahlreiche Signalwege beeinflussen, was über einen noch unbekanntem Mechanismus eine Apoptoseinduktion bedingt (Shen et al., 2006).

Nach erfolgter Isofluraninhalationsnarkose wurde den betäubten Tieren eine mit einer 25 μl Hamiltonpipette verbundene Nadel (33 G) am Augenäquator durch die Sklera in Richtung des Sehnerven in den Glaskörper eingeführt. Anschließend wurde jedem Versuchstier unter äußerster Vorsicht 3 μl NMDA (10 mM NMDA in PBS) in den Glaskörper des rechten bzw. 3 μl PBS als Kontrolle in den Glaskörper des linken Auges injiziert. Die Nadel wurde nach etwa 20 sec. Wartezeit wieder aus dem Auge entfernt. Dies diente dazu dem Auge die Möglichkeit zu geben, den durch die Injektion bedingten erhöhten Augeninnendruck auszugleichen. Drei Wochen nach der Injektion fand die Präparation der Augen der Versuchstiere statt, welche nach Vorbereitung in EM-Fixans in Epon eingebettet wurden. Anschließend wurden Semidünnschnitte von 1 μm hergestellt. Zur Auswertung und Quantifizierung der Sehnerven durch Auszählen der Axone wurde das „Cell Counter“- Plugin des Programms „ImageJ“ verwendet.

III.3.3.2 Licht-induzierte Schädigung von Photorezeptoren

Eine unphysiologische Belichtung von Photorezeptoren führt, über noch nicht hinreichend bekannte Mechanismen, zur selektiven Schädigung, zur Einleitung der Apoptose und dem daraus resultierenden Untergang eben dieser. Nachgewiesen wurde bisher nur, dass dafür eine repetitive Absorption von Photonen sowie ein intakter Sehzyklus mit ausreichender Bereitstellung und funktionierender enzymatischer Regeneration von Rhodopsin nötig ist, dem Pigment, das für die Absorption verantwortlich ist (Grimm et al., 2000). Weiterhin wurden Hinweise dafür gefunden, dass in Abhängigkeit von der Belichtungsstärke und -dauer verschiedene Mechanismen für die Entstehung des Lichtschadens in Kraft treten, welche vom Phototransduktionsvorgang abhängig sein können oder eben nicht (Hao et al., 2002).

Vor Durchführung der Schädigung wurden die Versuchstiere zunächst für sechs Tage dunkeladaptiert. Dieses Zeitintervall setzte sich aus den ersten fünf Tagen, in denen die Tiere in einem speziell abgedunkelten Raum bei einer schwachen Belichtung von maximal 100 lux gehalten wurden, und den letzten 18 h vor der Bestrahlung, welche diese in kompletter Dunkelheit verbrachten, zusammen. Da für die Versuche ausschließlich nicht-pigmentierte Tiere verwendet wurden, war keine weitere Vorbereitung durch Einleiten einer Mydriasis notwendig. In kompletter Dunkelheit wurden die Tiere in einer speziell angefertigten Lichtschadensbox einzeln plaziert und anschließend mit einer Belichtungsstärke von 5000 bzw. 14500 lux für 1 h bestrahlt. Nach Beendigung der Belichtung wurden die Tiere nochmals einen Tag lang als Regenerationsphase unter schwacher Belichtung gehalten. Für die Präparation der Tiere wurden zwei Zeitpunkte gewählt. Dem ersten Teil der Versuchstiere wurde nach einer Woche, dem anderen Teil nach zwei Wochen die Augen entnommen und in Epon eingebettet. Nachdem sagittale Semidünnschnitte von 1 µm, die immer die *Papilla nervi optici* enthielten, angefertigt wurden, erfolgte die Quantifizierung des Lichtschadens durch Messung der Dicke der äußeren Körnerschicht mit Hilfe des Programms „ImageJ“.

III.3.3.3 Nachweis apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Assay

Das Ziel des TUNEL-Assay waren die Untersuchungen zum ontogenetischen Zelltod.

Prinzip:

Während des Apoptosevorgangs wird unter anderem die DNA durch Endonukleasen aufgespalten und dabei unter anderem 3'Hydroxylgruppen frei. Diese können durch das Enzym Terminale Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) mit markierten dNTPs versehen werden und somit die apoptotischen Zellen durch den TUNEL-Assay (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) angefärbt werden (Darzynkiewicz et al., 2008). Die im vorliegenden Fall zur Markierung verwendeten dNTPs waren Fluoreszein-12-UTPs.

Kurzprotokoll für die Durchführung des TUNEL-Assays:

Zuerst wurden die Schnitte nach folgendem Schema entparaffiniert und rehydriert:

- 2x 10 min Xylol
- 2x 10 min 100% Isopropanol
- 2x 5 min 96% Isopropanol
- 2x 5 min 80% Isopropanol
- 1x 5 min 70% Isopropanol
- 1x 5 min 50% Isopropanol
- 1x 5 min dH₂O
- 1x 5 min 0,89% NaCl-Lösung

Daraufhin wurde die TUNEL-Färbung nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- 2x 5 min mit 1x PBS waschen
- 15 min mit 4% PFA fixieren
- 2x 5 min mit 1x PBS waschen
- 8 min andauern des Gewebes mit Proteinase K (20 µg/ml)

- 5 min mit 4% PFA fixieren
- 10 min inkubieren mit *Equilibration Buffer* (ca. 100 µl Puffer pro Schnitt)
- Ca. 25 µl *TdT-Reaction Mix* pro Schnitt hinzugeben

Zusammensetzung des *TdT-Reaction Mix*: (51 µl, für 2 Schnitte)

Equilibration Buffer 45 µl

Nucleotide Mix 5 µl

rTdT 1 µl

- 60 min im Dunkeln bei 37 °C inkubieren
- 2x SSC 15 min waschen
- 3x 5 min mit 1x PBS waschen
- Schnitte mit *Fluorescent Mounting Medium* (+DAPI) eindeckeln

Die TUNEL-gefärbten Schnitte wurden in Form von Mosaikaufnahmen mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops aufgenommen. Anschließend wurden die TUNEL-positiven Zellen für die Auswertung in allen Retinaschichten ausgezählt und auf die Flächen der entsprechenden Retina-Schichten, welche mithilfe der Funktion „Kontur“ des Programms „Carl Zeiss AxioVisionLE 4.8“ gemessen wurden, normiert.

III.4 Histologische Arbeitstechniken

III.4.1 Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten

Anwendung für Paraffinschnitte waren TUNEL-Färbungen, die zur Untersuchung von apoptotischen Ereignissen im Rahmen des ontogenetischen Zelltods dienen. Für die Einbettung in Paraffin wurden die präparierten Augen für mindestens 4 h in 4% PFA überführt und immersionsfixiert. Anschließend dreimal für 20 min mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen und danach erst 1 h in 50% Isopropanol, dann 1 h in 70% Isopropanol gewaschen und aufbewahrt.

Die Einbettung erfolgte im Einbettautomaten:

- Isopropanol (80, 96 und 100% jeweils 1-2 h)
- Xylol (2x 1 h 100 %)
- Paraffin (4 h Paraffin, 8 h Paraffin).

Die Ausbettung erfolgte durch Entnahme der Augen aus den Einbettförmchen und Überführung in Ausbettrahmen, in welchen diese mit 65°C warmem Paraffin überschichtet wurden. Dabei war es wichtig die Augen sagittal auszurichten, was aufgrund der Lage der Cornea und des *N. opticus* möglich war. Durch anschließendes Abkühlen der Rahmen auf einer Kälteplatte erstarrte das Paraffin. Von den Augen wurden mit Hilfe des *Supercut-Mikrotoms* Schnitte von etwa 5 µm angefertigt, welche später wie in Abschnitt III.5.3.3 beschrieben im Rahmen des TUNEL-Assays weiterverarbeitet wurden.

III.4.2 Einbettung in Epon und Herstellung von Semidünnschnitten

Für morphologische Untersuchungen wurden die diversen Gewebe in Epon eingebettet und Semidünnschnitte angefertigt. Zum einen wurden die *Nn. optici*, nach Kontrastierung mit Paraphenyldiamin, für die Ermittlung der Axonanzahl verwendet, zum anderen wurden, um die jeweilige Dicke der entsprechenden Netzhautschichten vermessen zu können, Sagittalschnitte von ganzen Augen, die die *Papilla nervi optici* enthielten, angefertigt.

Für die Einbettung in Epon wurde die Methode nach Ito und Karnovski (Ito, Karnovski, 1968) verwendet. Zuerst wurden die enukleierten Augen in EM-Fixans für mindestens 12 h immersionsfixiert und anschließend viermal für mindestens 20 min in Cacodylatpuffer gespült. Danach erfolgte eine Nachfixierung der Augen in 1% Osmiumtetroxid und ein erneutes Spülen mit Cacodylatpuffer, dH₂O und Ethanol (25, 35, 50, 60, 70%). Zum Schluss mussten die Augen in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70, 80, 90, 100 %) entwässert werden, um diese anschließend im Einbettautomaten nach der Standardmethode einbetten zu können:

- Propylenoxid
- Epon/Propylenoxid 1:2
- Epon/Propylenoxid 1:1
- Epon/Propylenoxid 2:1
- Epon
- Aushärten im Brutschrank 24 h bei 60°C und 48 h bei 90°C.

Für die Einbettung wurden Stammlösung A und Stammlösung B im Verhältnis 1:1 mit 2% Beschleuniger DMP-30 verwendet. Von den Augen wurden zunächst Semidünnschnitte (1 µm) angefertigt. Unter lichtmikroskopischer Betrachtung wurden anschließend passende Regionen ausgewählt und von diesen Ultradünnschnitte (60 nm) mit Hilfe des „*Ultracut E*“-*Ultramikrotoms* angefertigt. Diese wurden auf Kupfergrids bzw. mit Pioloform überzogenen Slotgrids aufgefangen und mit Uranylacetat (10%, 10 min) sowie Bleicitrat (5%, 10 min) unter Lichtabschluss kontrastiert.

III.4.3 Histologische Färbungen

Färbung von Sagittalschnitten für Schichtdickenvermessungen:

Sagittale Semidünnschnitte von Augen wurden nach Richardson (Richardson et al., 1960) gefärbt:

- Schnitte 15 – 30 sec bei 60°C mit der Gebrauchslösung überschichten
- mit dH₂O abspülen

Kontrastierung der *Nn. optici und Nn. ischiadici* mit Paraphenyldiamin:

Die Nerven wurden mit Paraphenyldiamin nach folgendem Protokoll kontrastiert (Schultz, 1972):

- 500 mg Paraphenyldiamin in 50 ml Ethanol (absolut) lösen

- Paraphenyldiamin-Lösung drei Tage bei Tageslicht stehen lassen, bis sie dunkel wird
- Semidünnschnitte bei Raumtemperatur 2-3 min färben
- mit Ethanol (absolut) spülen

III.5 Mikroskopie

Die Paraffin- und Semidünnschnitte wurden mit Hilfe des *Axio Imager Z1-Mikroskops* analysiert.

III.6 Auswertung und Statistik

Die Erhebung aller numerischen Daten wurde mit dem Programm „*Microsoft® Excel*“ (Microsoft® Corporation, Redmond, USA) durchgeführt. Für die statistische Analyse wurde der studentische T-Test herangezogen, wobei für Wahrscheinlichkeitswerte von $p < 0,05$ (*) statistisch signifikante und von $p < 0,01$ (**) bzw. $p < 0,001$ (***) statistisch hoch signifikante Unterschiede angenommen wurden. Diese wurden über den jeweiligen Fehlerbalken vermerkt. Die Fehlerbalken stellen jeweils den Standardfehler SEM („*standard error of the mean*“) dar. Für die Erstellung aller Abbildungen wurde das Programm „*CorelDraw®*“ (Corel® Corporation, Ottawa, Canada) verwendet.

IV. Ergebnisse

IV.1 Morphologische Untersuchungen

IV.1.1 Makroskopische Begutachtung der Versuchstiere

Um bereits makroskopisch sichtbare Veränderungen feststellen zu können, wurden sechs bis acht Wochen alte Tiere zuerst bezüglich Fell, Körperbau und Gewicht beurteilt, anschließend durch zervikale Dislokation getötet und die Organe Lunge, Herz, Ösophagus, Schilddrüse, Darmsystem und Gehirn makroskopisch begutachtet. Es zeigten sich keine sichtbaren Unterschiede des Körperbaus der *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäuse im Vergleich zu den Wildtypen. Es konnte lediglich ein hoch signifikanter Unterschied des Körpergewichts zwischen den Versuchstieren und den Wildtypmäusen beobachtet werden ($p < 0,001$). Es wurde dabei geschlechtsspezifisch beobachtet und die Daten für Männchen und Weibchen (Abb. 7) getrennt dokumentiert.

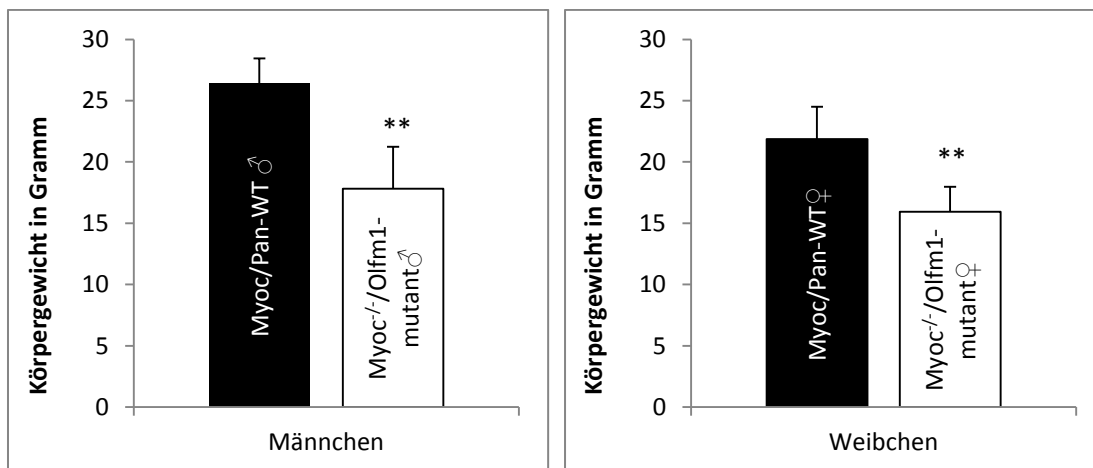


Abbildung 6: Geschlechterspezifischer Gewichtsunterschied (jeweils n=10)

Links: *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Männchen sind im Vergleich zu den Wildtypen um 32,44% leichter. Mittelwerte+SEM. ** $p < 0,01$. **Rechts:** *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Weibchen sind im Vergleich zu den Wildtypen um 27,12% leichter. Mittelwerte+SEM. ** $p < 0,01$.

Bei der darauf folgenden Organinspektion boten sich bei Herz, Ösophagus, Lunge (Abb. 8), Schilddrüse, Darmsystem und Gehirn makroskopisch keine erkennbaren Differenzen zwischen *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* - und Wildtyptieren.

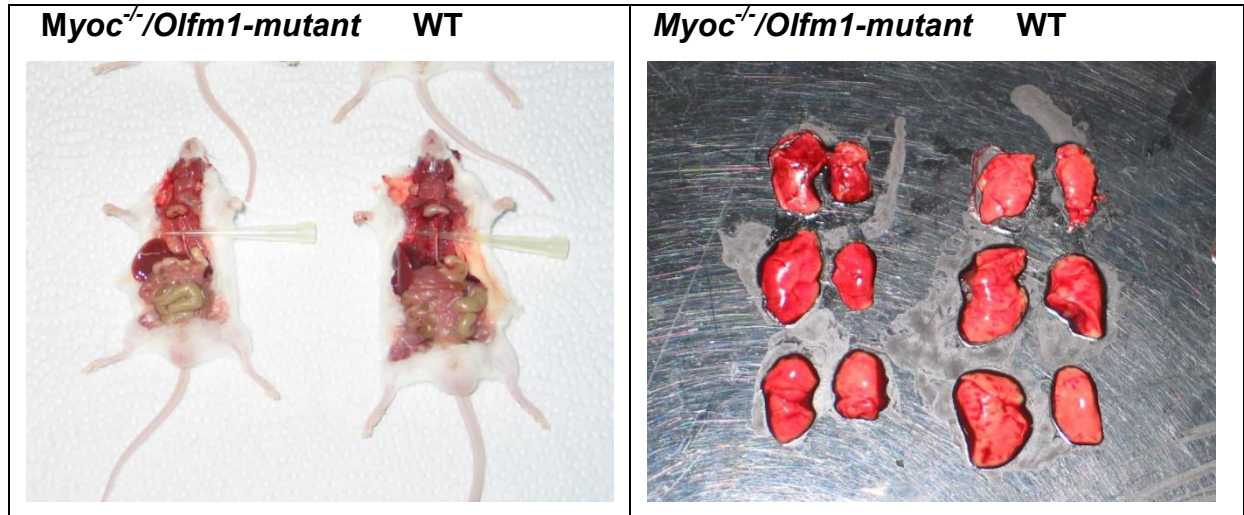


Abbildung 7: Makroskopische Betrachtung von Organen

Links: Mit der Pipettenspitze markiert ist der Ösophagus. Hier ist makroskopisch kein Unterschied zu erkennen. **Rechts:** Jeweils linker und rechter Lungenflügel von drei *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Tieren und drei Wildtyptieren. Auch hier ist kein Unterschied ersichtlich.

IV.1.2 Morphologische Betrachtung des Auges

Bei der morphologischen Betrachtung der Augen der Versuchstiere konnten makroskopisch keine Unterschiede zwischen *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäusen und den Wildtyptieren festgestellt werden. Auch bei genauerer Betrachtung unter dem Lichtmikroskop war der Aufbau des jeweiligen Organs gleich ohne sichtbare Strukturunterschiede.

IV.1.3 Morphologische Charakterisierung der Sehnerven und Netzhäute

Die Analyse beinhaltete die Untersuchung der Axonanzahl im *N. opticus* und die Dicke der inneren und äußeren Körnerschicht (INL und ONL). Es fand sich dabei, dass sich die absolute Axonanzahl in den *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäusen nicht von derer der Wildtypiere unterscheidet (Abb 9).

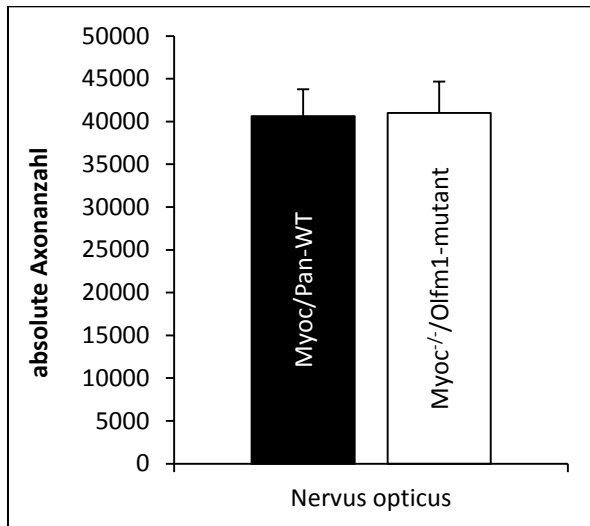


Abbildung 8: Absolute Anzahl der Axone im *N. opticus*

Die Anzahl der Axone ist bei den *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Tieren im Vergleich zu den Wildtypen nicht signifikant unterschiedlich (jeweils $n=10$).

Außerdem wurde die Zelldichte der RGCs ermittelt, da diese anatomisch die Ursprungsneurone der Axone im Sehnerv darstellen (Abb.10).

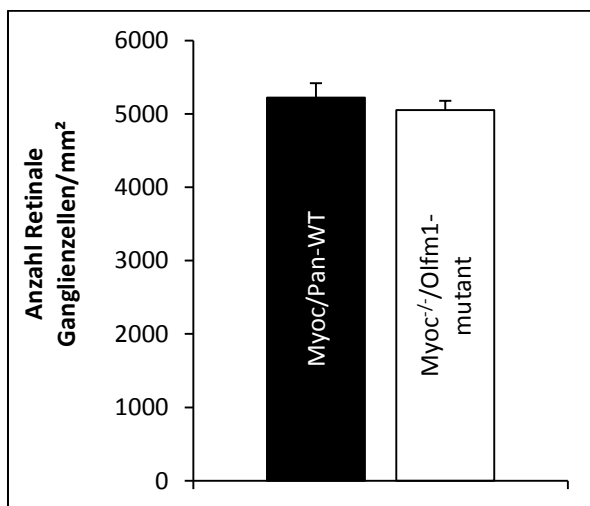


Abbildung 9: Zelldichte der retinalen Ganglienzellen

Es ist bei Betrachtung der Zelldichte der retinalen Ganglienzellen kein signifikanter Unterschied zwischen *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Tieren und Wildtypen nachzuweisen.

Auch hier zeigte sich bei den Myocilin-defizienten und Pancortin mutierten Tieren kein signifikanter Unterschied zu den Wildtypen.

Zur weiteren morphologischen Charakterisierung wurden INL und ONL bezüglich ihrer Dicken vermessen und die erhaltenen Messdaten in sogenannten Spiderdiagrammen von nasal nach temporal dargestellt (*Abb.11*). Die Ergebnisse zeigen, dass die *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäuse eine signifikant dickere ONL bei sich entsprechender INL-Dicke besitzen. Dies deutet auf eine erhöhte Zellzahl in der äußeren Körnerschicht hin.

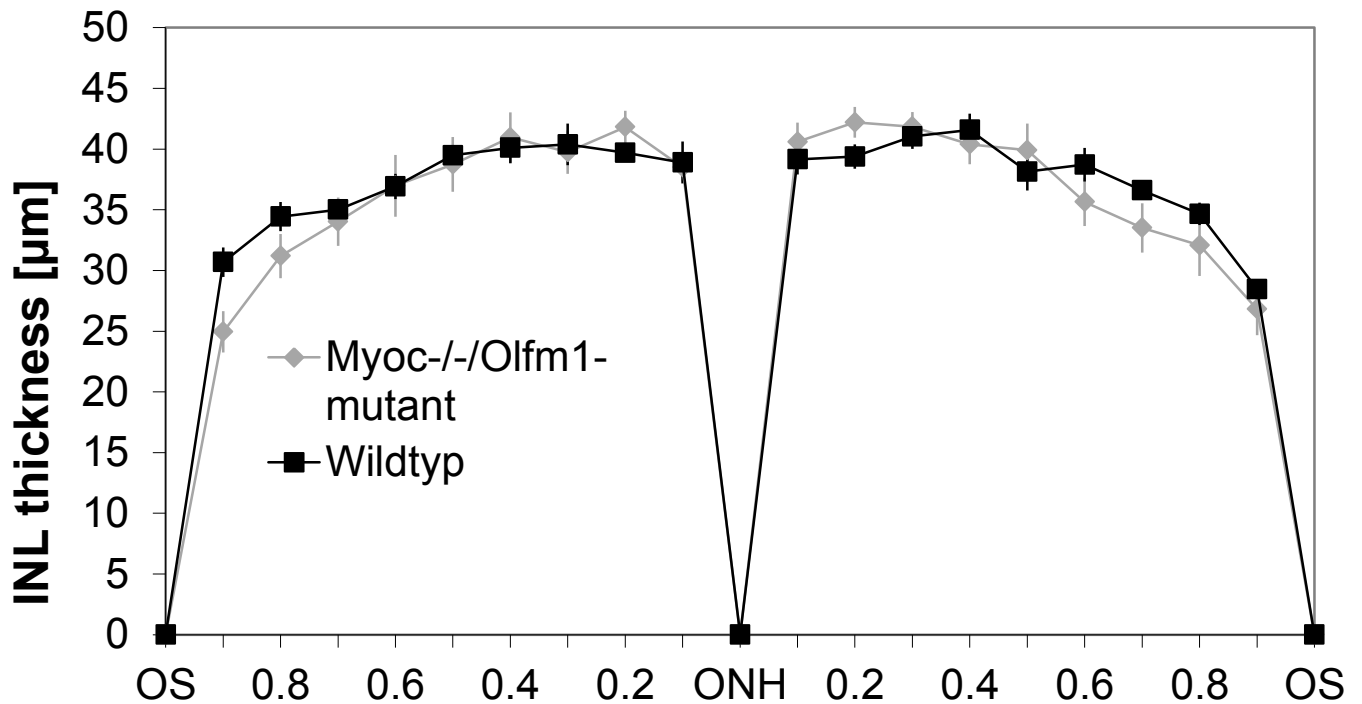
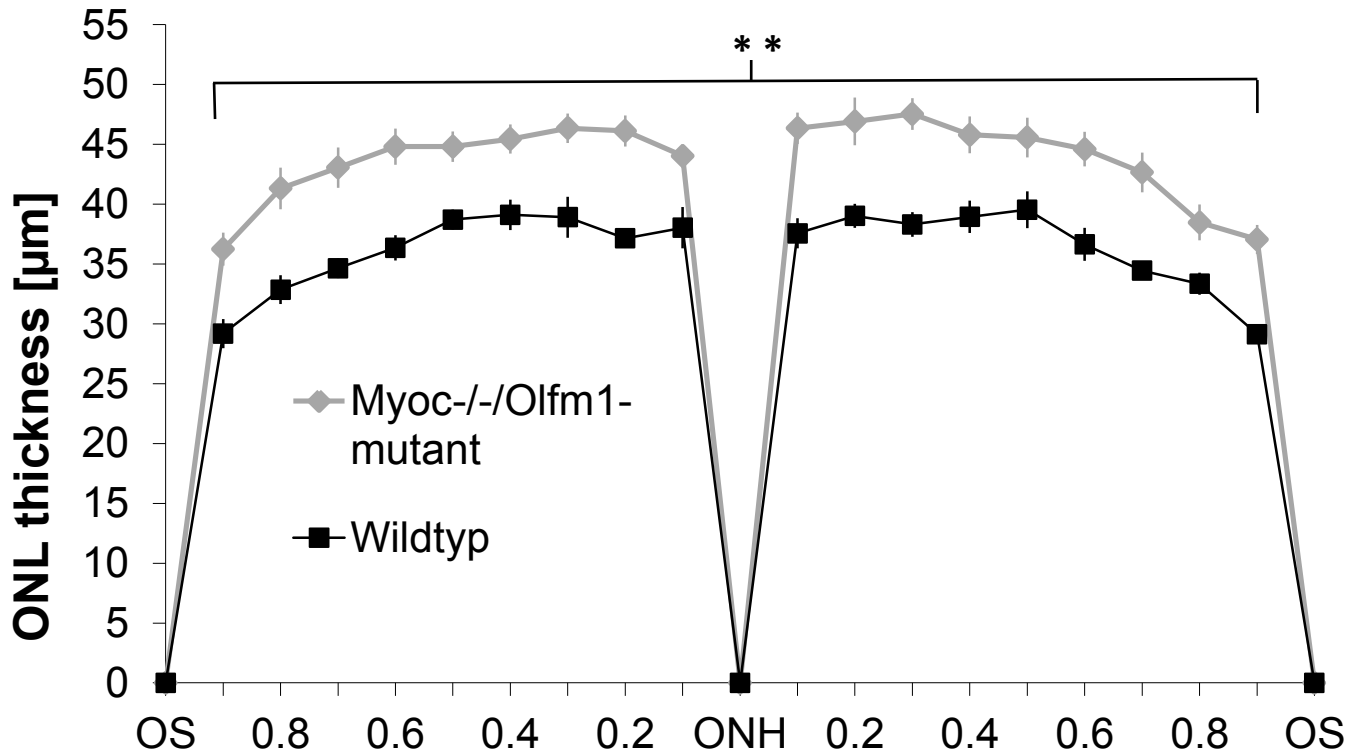


Abbildung 10: Spiderdiagramme der Retina-Schichtdickenvermessungen

Gezeigt wird der Schichtdicken-Vergleich der ONL (Oben) und INL (Unten) von Myoc^{-/-}/Olfr1-mutant Tieren und Wildtypen (jeweils n=10). Die Myoc^{-/-}/Olfr1-mutant Tiere haben zwar eine signifikant höhere Dicke der ONL als die Wildtypen, jedoch ist in der INL die Schichtdicke gleich. Mittelwerte ± SEM. **p<0,01. OS=ora serrata, ONH=Sehnervenkopf (optic nerve head).

IV.1.4 Untersuchungen zum ontogenetischen Zelltod

Um nun einen Vergleich mit den Ergebnissen der Myocilin-defizienten Mäuse anstellen zu können, wurden ebenfalls TUNEL-Färbungen zur Identifizierung apoptotischer Zellen am vierten (P4) und neunten (P9) Tag nach der Geburt durchgeführt. Diese Tage wurden auf Grund der Myocilin-Expression und der Apoptoseinzidenz in der Entwicklungsphase ausgewählt. Anschließend erfolgte die Auswertung der Apoptose-Inzidenz in der gesamten Retina, sowie auch spezifisch innerhalb einzelner Netzhautschichten, durch Auszählen der TUNEL-positiven Zellen und Normierung der Anzahl auf die Schichtfläche in mm^2 .

IV.1.4.1 TUNEL-Assays von P4- und P9- Netzhäuten

Zunächst wurden vier Tage alte Versuchstiere betrachtet. Wie in *Abb.12* deutlich erkennbar, besteht zu diesem Zeitpunkt die murine Retina nur aus zwei Zellschichten. Und zwar der in mehreren Lagen angeordneten retinalen Ganglienzellschicht und einer Stammzellschicht (*Ventricular cell layer*), die sich später in die innere Körnerschicht und die Photorezeptoren differenziert. Die Trennlinie bildet die innere plexiforme Schicht, die im Gegensatz zur äußeren plexiformen Schicht bereits vorhanden ist.

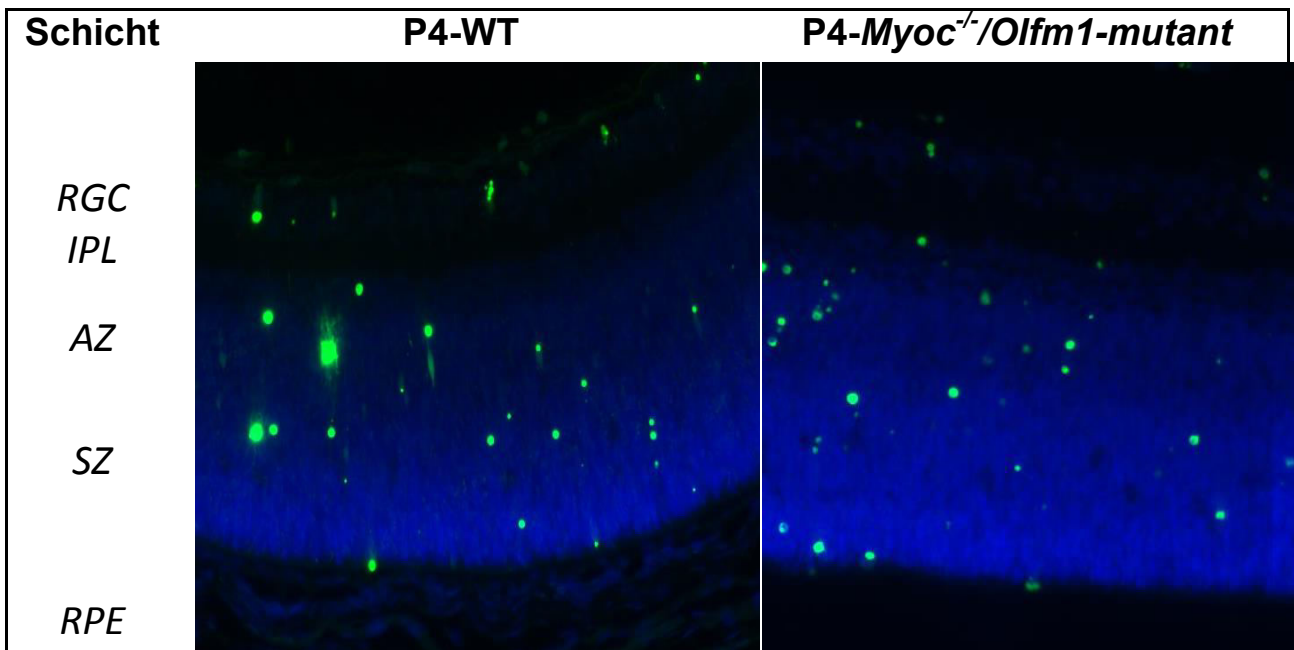


Abbildung 11: TUNEL-Färbung von P4-Retinae

Bei der TUNEL-Färbung von Netzhäuten vier Tage alter Mäuse (jeweils n=10) zeigt sich die Differenzierung der Retina in zwei Schichten: Die RGC-Schicht und eine Schicht aus Stammzellen, aus der sich bereits Amakrine Zellen entwickelt haben. Die Trennung dieser Schichten erfolgt durch die IPL, eine OPL ist noch nicht erkennbar. Es zeigen sich wenige apoptotische Zellen, die v.a. in der RGC-Schicht und in der Stammzellschicht lokalisiert sind. Ein Unterschied zwischen den Versuchstieren und Wildtypen ist nicht zu sehen. RGC=retinale Ganglienzellen, IPL=innere plexiforme Schicht, AZ=Amakrine Zellen, SZ=Stammzellen, RPE=retinales Pigmentepithel.

Es wurden sowohl die TUNEL-positiven Zellen der gesamten Retina als auch separat der retinalen Ganglienzellen ausgewertet (Abb.13). Hier zeigten sich bei den Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant Mäusen keine signifikanten Unterschiede zu den Wildtypen.

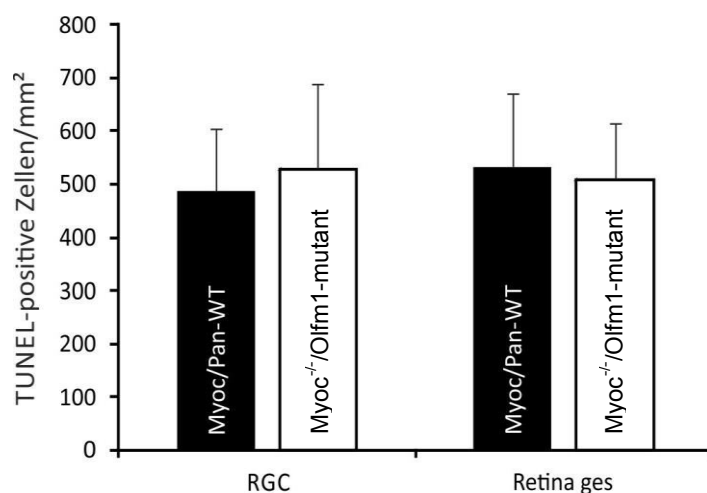


Abbildung 12: Anzahl TUNEL-positiver Zellen zum Zeitpunkt P4

Die Anzahl apoptotischer Zellen unterscheidet sich bei Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant Tieren zum Zeitpunkt P4 sowohl in der gesamten Retina als auch speziell in der retinalen Ganglienzellschicht nicht im Vergleich zu den Wildtypen.

Als nächstes erfolgte die Auswertung der neun Tage alten Mäuse. Begutachtet man nun zuerst die TUNEL-Bilder (Abb.14) ist zu allererst die Trennung der Stammzellschicht in INL und ONL durch die neu ausgebildete äußere plexiforme Schicht auffällig.

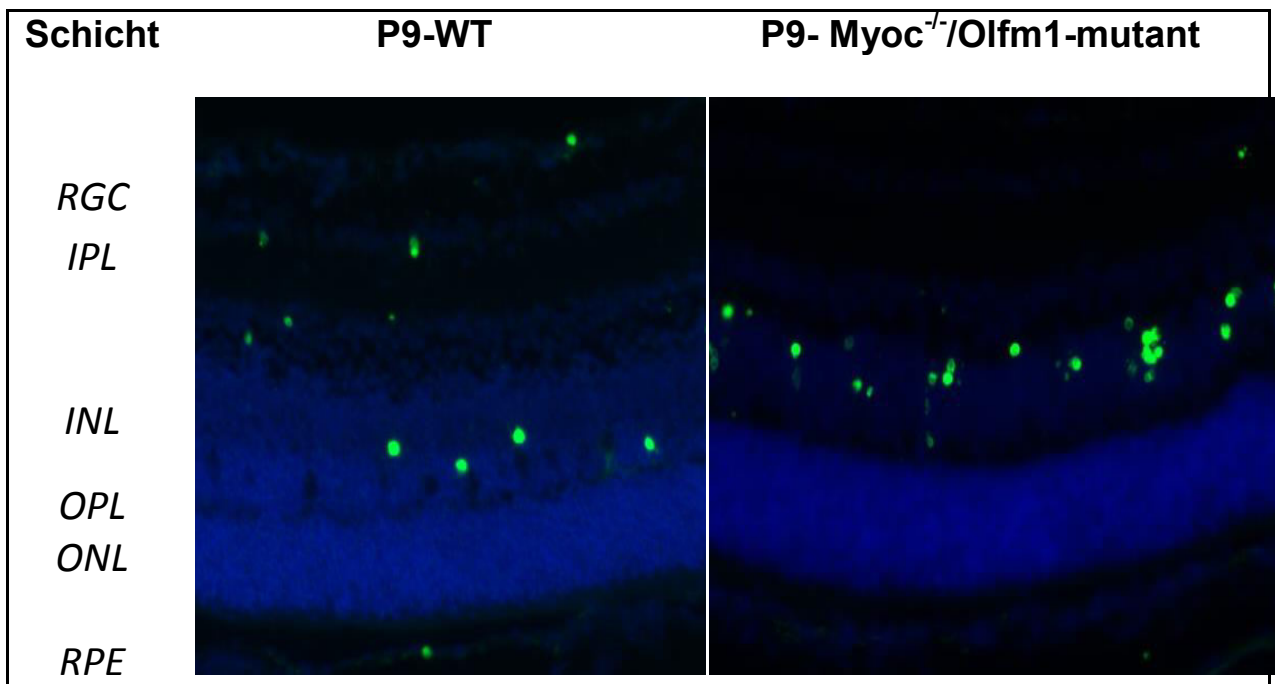


Abbildung 13: TUNEL-Färbung von P9-Retinae

Die Netzhaut am neunten Tag zeigt bereits die Ausbildung aller Schichten der reifen Retina, die Zellzahl ist jedoch in allen Schichten noch erhöht. Dies wird durch ständige Apoptosevorgänge im Lauf der weiteren Entwicklung ausgeglichen, es zeigen sich daher zahlreiche TUNEL-positive Zellen. Außerdem ist erkennbar, dass die Schicht der Stäbchen und Zapfen noch schmal ausgebildet ist, was mit der noch nicht erfolgten Differenzierung der Photorezeptoren zusammenhängt. Bereits mit bloßem Auge sind bei den Myocilin-KO/Pancortin-mutant Mäusen in der INL mehr apoptotische Zellen als im Wildtyppräparat zu erkennen. RGC=retinale Ganglienzellen, IPL=innere plexiforme Schicht, INL=innere Körnerschicht, OPL=äußere plexiforme Schicht, ONL=äußere Körnerschicht, RPE=retinales Pigmentepithel.

Weiterhin sind bereits die sich formierenden Fortsätze der Photorezeptoren erkennbar, die jedoch erst um den zwölften Tag unter Lichteinwirkung endgültig ausdifferenzieren, und die hohe Anzahl an apoptotischen Zellen in der gesamten Retina, besonders in der zukünftigen INL, erkennbar.

Bei der quantitativen Auswertung (Abb.15) zeigt sich sowohl in der retinalen Ganglienzellschicht als auch in der äußeren Körnerschicht keine erhöhte Apoptoserate im Vergleich zum Wildtyp. Jedoch ist bei den *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäusen in der INL eine hoch signifikant erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen zu erkennen ($p < 0,01$).

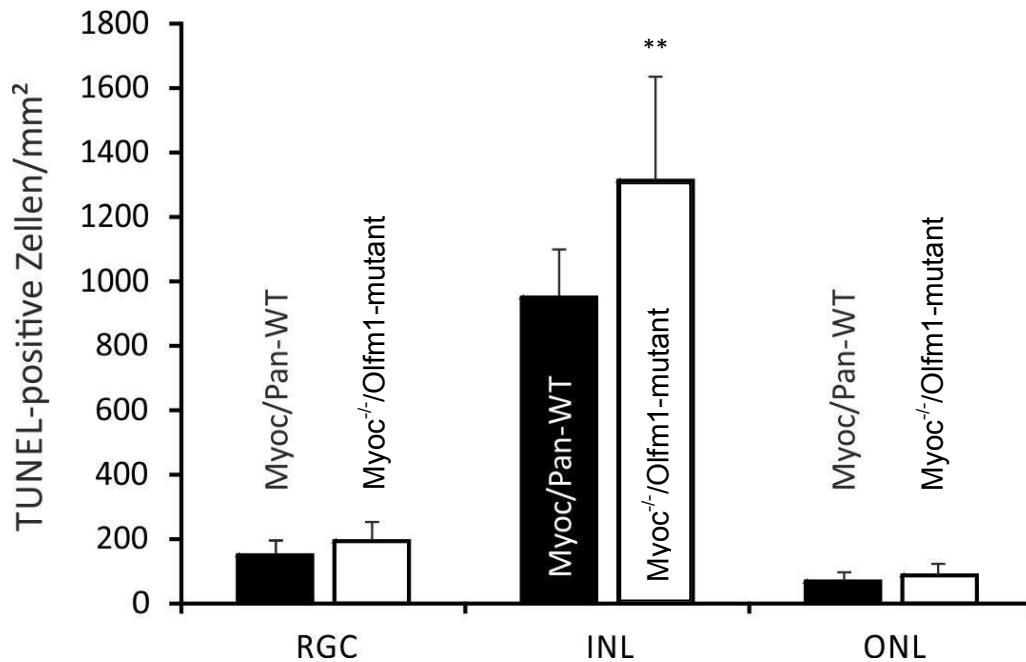


Abbildung 14: Anzahl TUNEL-positiver Zellen zum Zeitpunkt P9

Während in der RGC-Schicht und der äußeren Körnerschicht die Anzahl apoptotischer Zellen zwischen *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäusen und Wildtypen identisch ist, weisen *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Tiere zum Zeitpunkt P9 im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant erhöhte Apoptoserate in der inneren Körnerschicht auf. Mittelwerte ± SEM. ** $p < 0,01$. (n=10)

Zusammenfassend lässt sich somit bei *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäusen feststellen, dass zum Zeitpunkt P4 wieder ein Angleich der Apoptose-Inzidenz an den Wildtyp erfolgt und sich diese auch zum Zeitpunkt P9 nur durch eine erhöhte Apoptoserate in der INL vom Wildtyp unterscheiden.

IV.1.5 Untersuchungen anhand etablierter Schadensmodelle

IV.1.5.1 NMDA-induzierte Schädigung von retinalen Ganglienzellen

Wie bei den unbehandelten Tieren (vgl. IV.1.1) waren auch bei den PBS-Injektionen keine Unterschiede zwischen *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäusen und Wildtypen erkennbar (Vgl. Abb.16), was zum einen den in IV.1.1 erhobenen Befund bestätigte und zum anderen eine injektionsbedingte Schädigung der RGCs ausschloss.

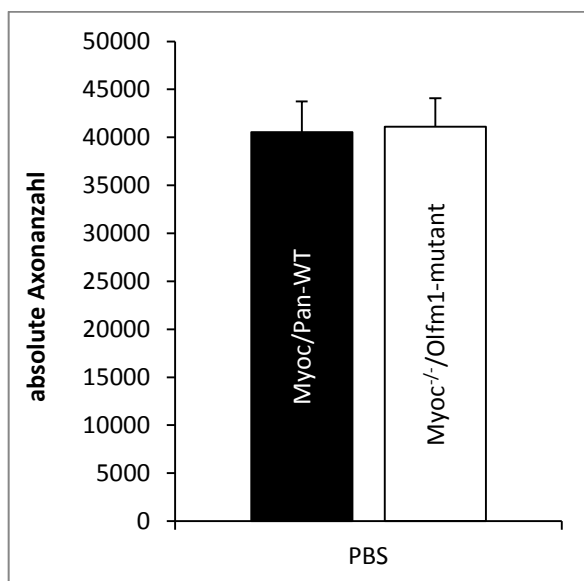
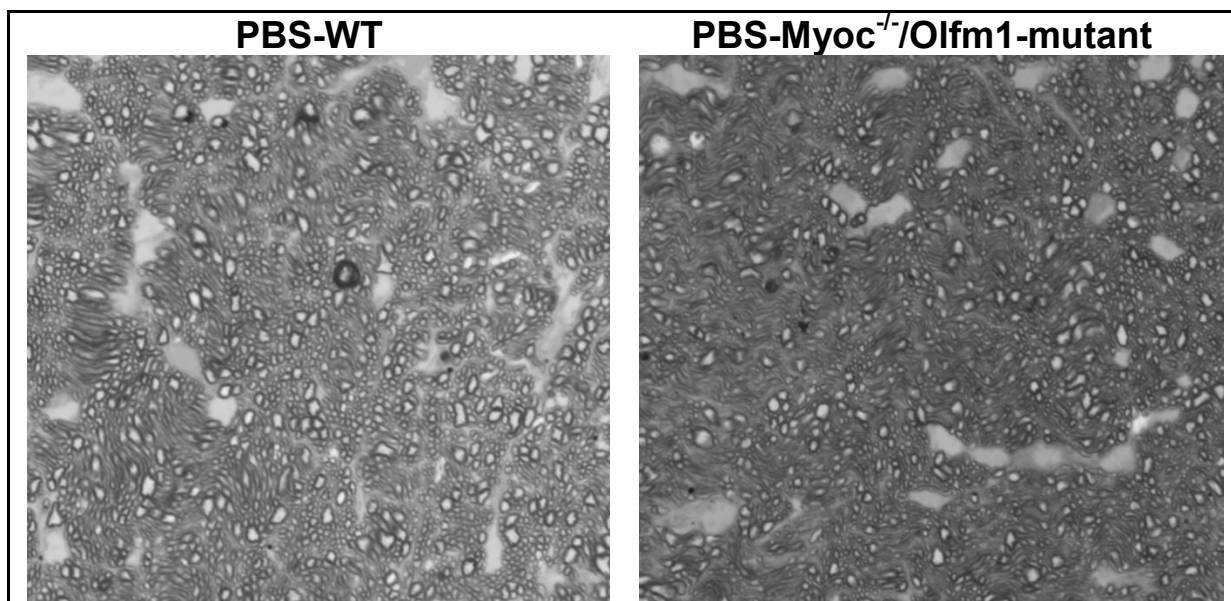


Abbildung 15: Lichtmikroskopie und quantitative Auswertung von PBS-Kontrollinjektionen

Oben: Bei Betrachtung der PBS-Kontrollen ist kein Unterschied unter dem Lichtmikroskop zwischen den *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäusen und den Wildtypen ersichtlich. **Unten:** Die statistische Auswertung bestätigt den makroskopischen Befund

Anschließend erfolgte die Betrachtung der durch NMDA-Injektion geschädigten Sehnerven. Hier ist ein deutlicher Verlust von Axonen mit konsekutivem bindegewebigem Umbau zu erkennen. Ein Unterschied zwischen *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Tieren und Wildtypen ist nicht ersichtlich (Abb. 17).

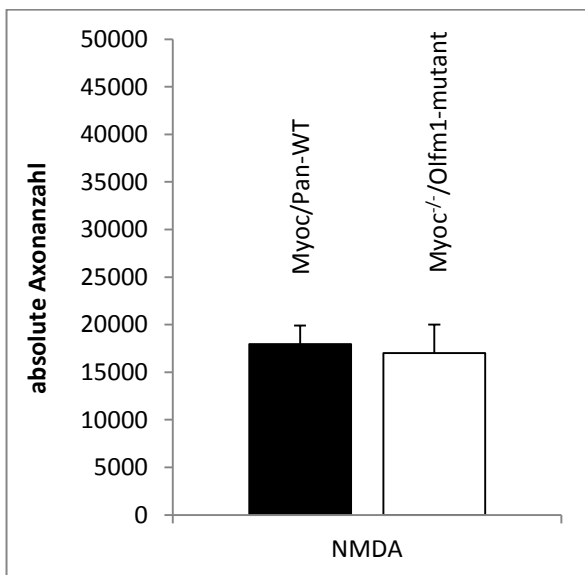
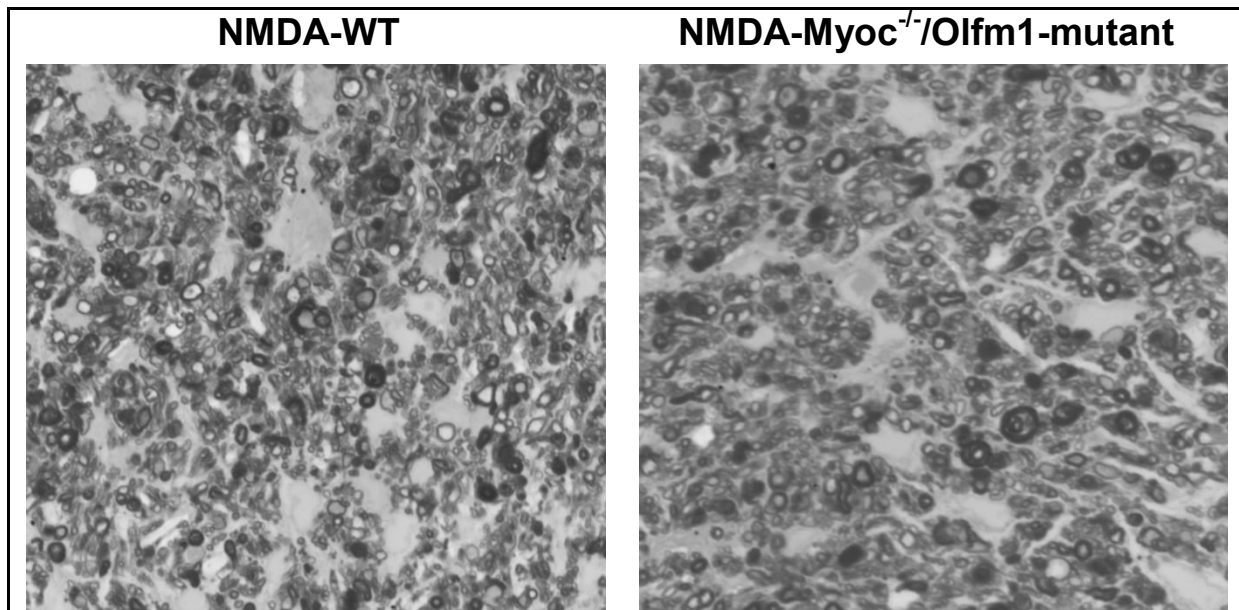


Abbildung 16: Lichtmikroskopie und quantitative Auswertung von NMDA-Injektionen

Oben: Gezeigt werden Semidünnschnitte von Sehnerven eines Wildtyps und einer *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant*-Maus nach NMDA-Injektion. Es ist bei beiden Schnitten ein ähnlicher Verlust an Axonen und fibrotischer Umbau ersichtlich. **Unten:** Die statistische Auswertung bestätigt, dass *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Tiere und Wildtypen gleichermaßen geschädigt werden.

IV.1.5.2 Licht-induzierte Schädigung von Photorezeptoren

Die oben beobachteten Befunde sollten in einem zweiten Schadensmodell überprüft werden. Bevor man jedoch mit der Versuchsdurchführung starten konnte, musste zuerst eine bekannte Mutation im sogenannten RPE65 (*Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein*) - Gen ausgeschlossen werden, da diese eine deutlich verminderte Empfindlichkeit für Licht-induzierte Photorezeptor-Schädigung bedingt (Wenzel et al., 2001). Zum Ausschluss dieser Mutation wurden die Ausgangszuchttiere getestet. Hierbei wurde nach Isolierung der DNA eine Sequenz, die die fragliche Mutation enthält, mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurde das Produkt mit dem Restriktions-enzym Mwo I verdaut, welches die Wildtyp-Sequenz in zwei Fragmente aufspaltet. Beim Vorliegen der Wildtyp-Sequenz können nach der Gelelektrophorese zwei Banden bei 437 bp und 236 bp detektiert werden, im Falle der Mutation nur eine Bande bei 647 bp, da das Restriktionsenzym Mwo I aufgrund der veränderten Basen-sequenz nicht schneiden konnte.

Wie *Abb. 18* zeigt, besaß keine der ausgewählten Tiere die entsprechende Mutation. Somit waren die Voraussetzungen für eine korrekte Durchführung der Lichtschadenversuche gegeben.

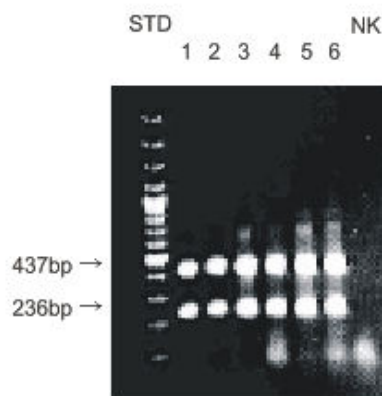


Abbildung 17: Genotypisierung zur Untersuchung der LeuRPE54Met-Mutation

Das Bild zeigt das Ergebnis der Genotypisierung zur Untersuchung der RPE65-Mutation. Es fanden sich keine mutierten Tiere. STD=Basenpaarstandard. NK=Negativkontrolle.

Anschließend konnten die Schadensversuche durchgeführt werden. Dabei ist, sowohl lichtmikroskopisch (*Abb.19*) als auch bei der quantitativen Auswertung (*Abb.20*), nach Belichtung mit 14500 lux, sowie bei der geringeren Lichtintensität von 5000 lux, kein signifikanter Unterschied in der ONL-Dicke zu erkennen. Das Schadensausmaß ist, sowohl bei den Wildtyptieren als auch bei den *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäusen, gleichermaßen ausgeprägt.

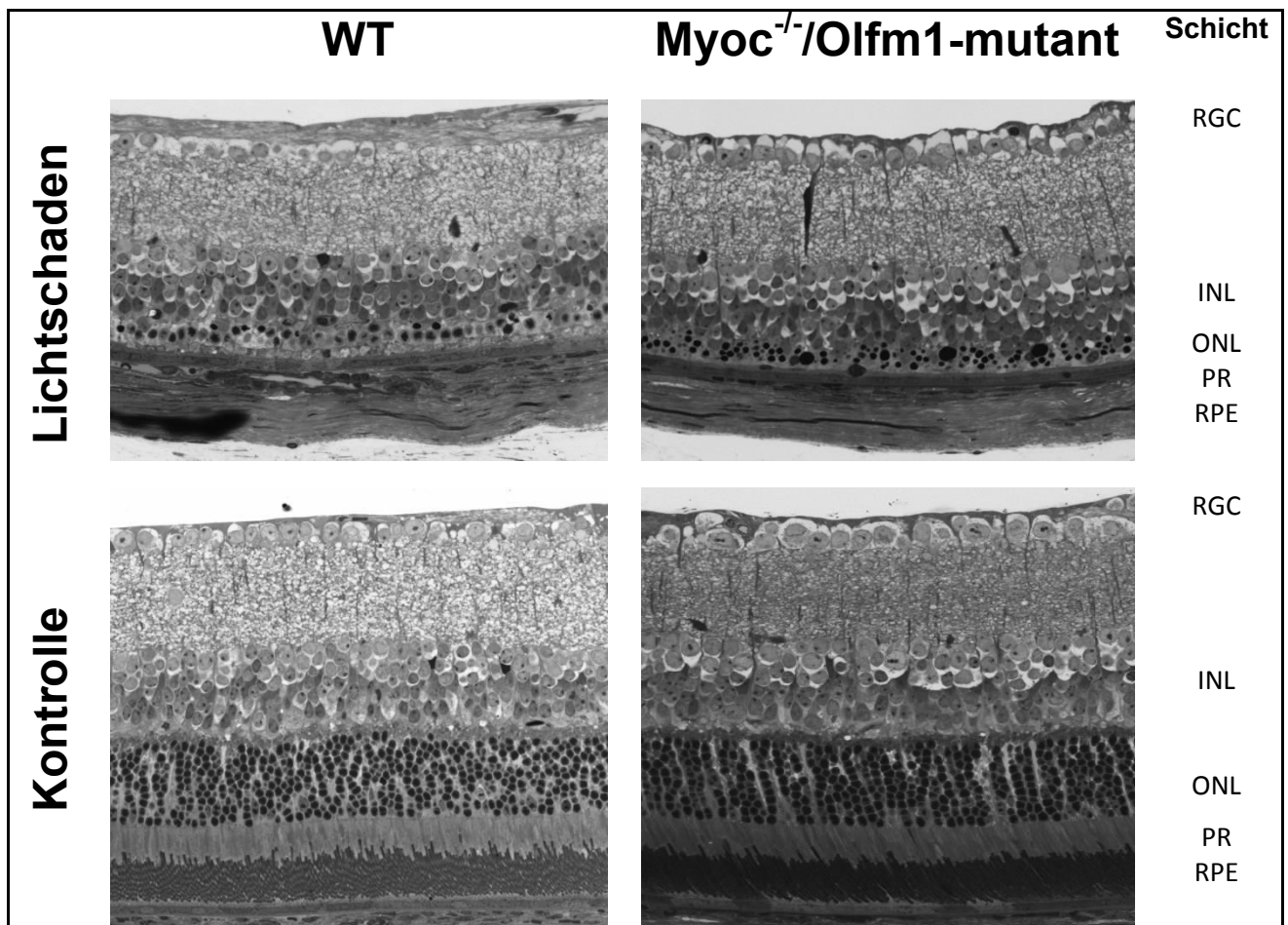


Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen nach Lichtschaden

Gezeigt werden Semidünnschnitte von Retinae unbelichteter Kontrolltiere (unten) sowie von Versuchstieren nach Lichtschaden bei 5000 lux für 60 min (oben). Nach Lichtschaden zeigt sich bereits lichtmikroskopisch, dass kein Unterschied der ONL-Dicke zu sehen ist. RGC=retinale Ganglienzellen, INL=innere Körnerschicht, ONL=äußere Körnerschicht, RPE= retinales Pigmentepithel.

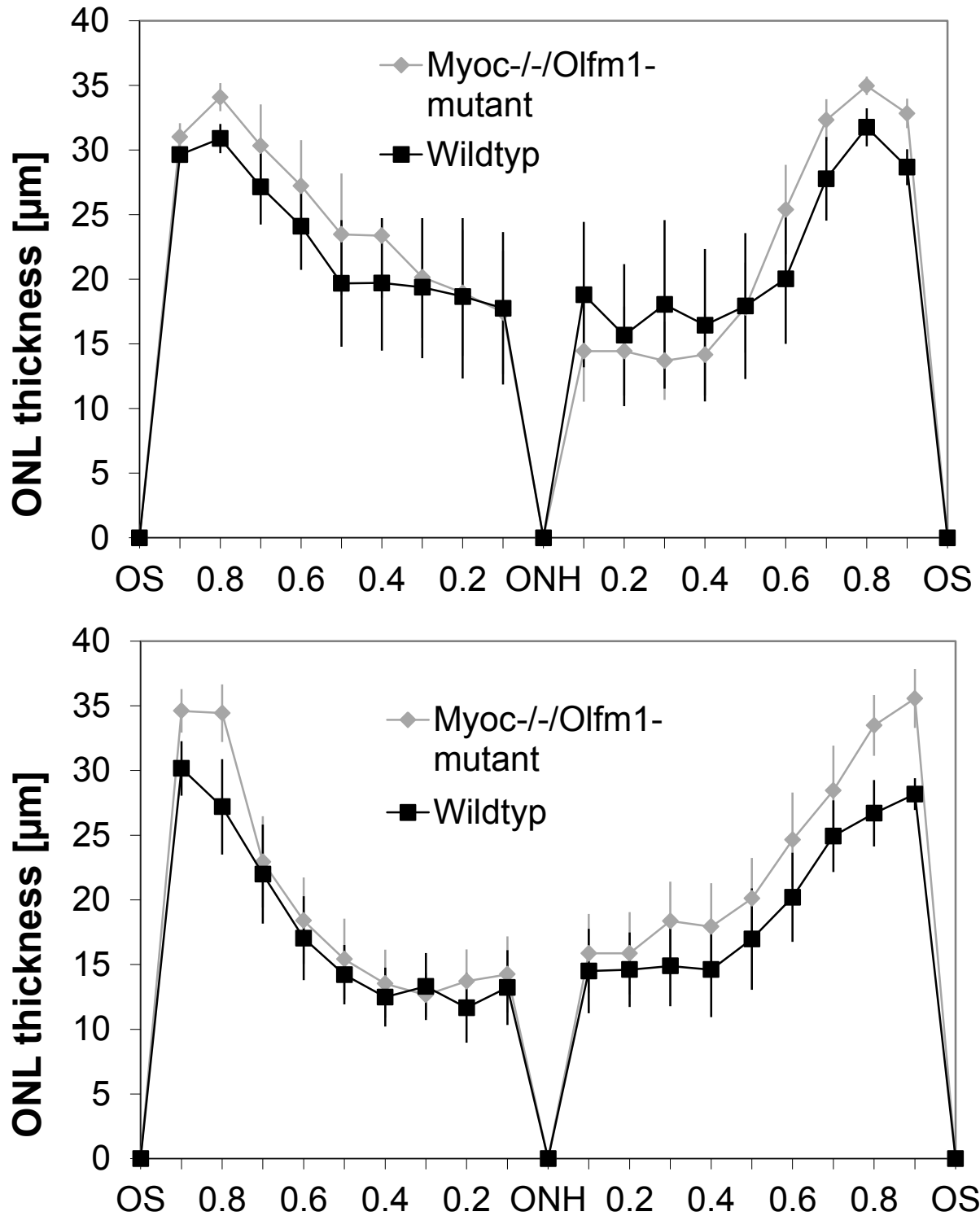


Abbildung 19: Spiderdiagramme der Lichtschadensversuche mit Myoc^{-/-}/Olfm1^{-/-} mutant Mäusen. Die quantitative Auswertung der Lichtschadensversuche zeigt keinen Unterschied zwischen Myoc^{-/-}/Olfm1^{-/-} mutant Tieren und Wildtypen (jeweils n=10) eine Woche nach Belichtung mit 14500lux (oben) und 5000lux (unten). Der Verlust an Photorezeptoren ist gleichermaßen stark ausgeprägt. OS=ora serrata, ONH=Sehnervenkopf (optic nerve head).

IV.1.6 Quantitative Realtime-PCR-Untersuchungen

IV.1.6.1 Latrophilin

Die Latrophiline sind eine Gruppe von neuronalen „adhesion G-protein-coupled receptors“ (adhesion GPCR), welche einen Einfluss auf die Polarität von Zellteilung und Zellmigration während der Embryogenese haben (Langenhan et al., 2009). In den durchgeführten RT-PCR Untersuchungen zeigte sich dabei bei 10 Tagen alten Tieren kein Unterschied zwischen Wildtyptieren und *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäusen. Jedoch war im Alter von 8 Wochen eine deutlich vermehrte Expression an Lphn1 bei den *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäusen zu sehen, während Lphn2 signifikant weniger im Vergleich zum Wildtyp gebildet wurde (Abb. 21).

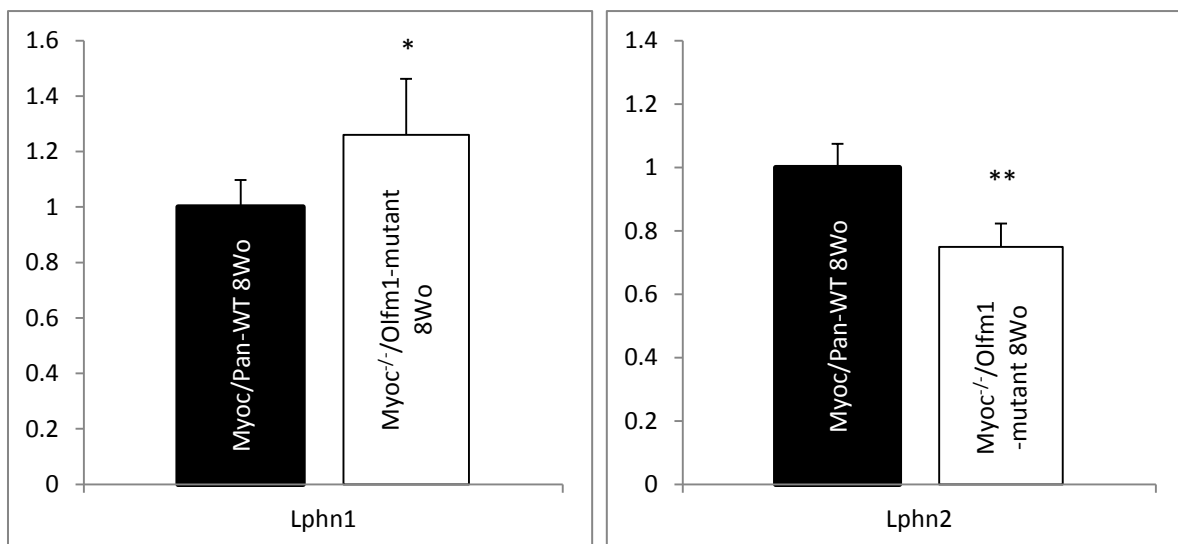


Abbildung 20: Quantitative Realtime-PCR Auswertung von Lphn1 und Lphn2

Links: Es ist deutlich zu erkennen, dass Lphn1 signifikant mehr in 8 Wochen alten *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Tieren als in WT-Tieren exprimiert wird. **Rechts:** Dagegen verhält es sich umgekehrt bei der Expression von Lphn2. Hier ist eine hoch signifikant höhere Menge an Lphn2 bei den Wildtyptieren nachweisbar. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

IV.1.6.2 Olfactomedine

Zudem wurden weitere Vertreter der Olfactomedine untersucht. Es zeigte sich dabei, dass Olfm 3 in 10 Tagen alten *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäusen signifikant weniger exprimiert wird als in Wildtypen (Abb. 22). Dies war in den Untersuchungen mit acht Wochen alten Tieren nicht mehr nachzuvollziehen. Für Olfm 2a, Olfm 2b und Olfm 4 konnte kein Unterschied sowohl für Mäuse im Alter von 10 Tagen als auch 8 Wochen festgestellt werden.

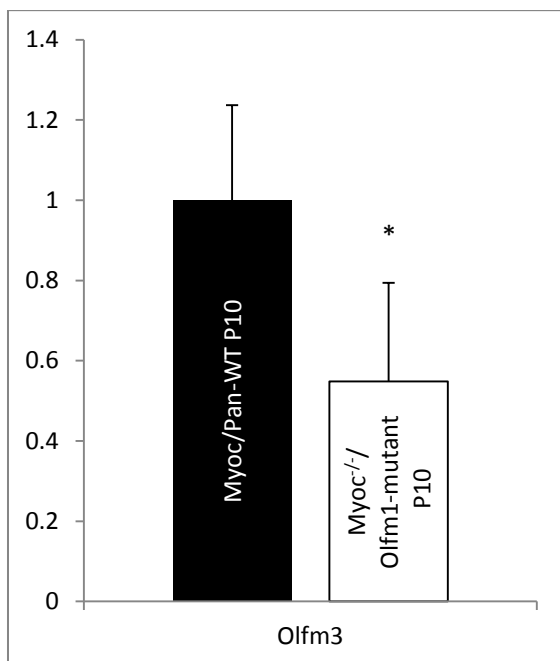


Abbildung 21: Quantitative Realtime-PCR Auswertung von Olfm3

Es zeigt eine signifikant geringere Expression von Olfm3 in den Retinae der *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäuse zum Zeitpunkt P10 im Vergleich zu den Wildtypen. Mittelwerte ± SEM. * $p < 0,05$.

V. Diskussion

Myocilin und Olfactomedin-1 sind Proteine der Olfactomedinfamilie, die im Auge vorkommen. Im Falle einer Myocilindefizienz oder einer Olfactomedin-1 Mutation konnte jeweils ein sich vom Wildtyp unterscheidender okulärer Phänotyp nachgewiesen werden. So besitzen myocilindefiziente Mäuse eine erhöhte Zellzahl in allen Schichten der Retina und mehr Axone im Sehnerv (Koch et al., 2014). Dies konnte in TUNEL-Färbungen auf eine deutlich verringerte Apoptoserate während des ontogenetischen Zelltodes zurückgeführt werden (Koch et al., 2014). Zudem zeigen die myocilindefizienten Versuchstieren in etablierten Schadensmodellen der Netzhaut einen signifikant geringer ausgeprägten Schaden (Koch et al., 2017). Pancortin mutierte Mäuse hingegen weisen keinen Unterschied bei Betrachtung der Zellzahl der Retinaschichten, sowie der Anzahl der Sehnervaxone im Vergleich zum Wildtyp auf (Koch et al., 2017). Jedoch konnte auch im Falle einer Pancortinmutation ein Einfluss auf den ontogenetischen Zelltod beschrieben werden (Nakaya et al., 2008). Zudem war der Grad der Schädigung bei Lichtschaden oder Schaden durch eine NMDA-Injektion im Falle einer Pancortinmutation deutlich mehr ausgeprägt als bei entsprechenden Wildtyptieren.

Nachdem bei Betrachtung der Augen der *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäuse zunächst weder makroskopisch noch mikroskopisch ein Defekt der anatomischen Bestandteile des Organs identifiziert werden konnte, zeigte sich doch ein deutlicher Unterschied des okulären Phänotyps im Vergleich zu den Wildtyptieren. So besitzen *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäuse eine deutlich erhöhte Zellzahl in der äußeren Körnerschicht, während sich die Zellzahlen in der retinalen Ganglienzellschicht und der inneren Körnerschicht, sowie die Anzahl an Axonen im Sehnerv nicht vom Wildtyp unterscheiden. Dies stellt zudem einen deutlichen Unterschied zu den Mäusen mit reiner Myocilindefizienz dar. Inwiefern und ob dies durch die zusätzliche Pancortinmutation zu erklären ist, kann derzeit nicht mit Sicherheit postuliert werden, da bei den bisher erfolgten Studien zu Pancortin mutierten Mäusen kein Einfluss auf die Anzahl an Sehnervaxonen oder die Zellzahl der Retinaschichten beschrieben wurde (Koch et al. 2017).

Da für die morphologischen Veränderungen bei den Myocilin-defizienten Tieren wahrscheinlich Veränderungen des ontogenetischen Zelltodes ursächlich sind (Koch et al., 2014) und zudem auch für Pancortin mutierte Tiere ein Einfluss auf den ontogenetischen Zelltod beschrieben ist (Nakaya et al., 2008), könnte hier auch die Erklärung für die morphologischen Unterschiede zwischen *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäusen und den Wildtyptieren zu finden sein. Analog zu den Vorversuchen wurden die Zeitpunkte P4 und P9 für die TUNEL-Färbungen gewählt um später auch einen Vergleich zu den Myocilin-defizienten Mäusen ziehen zu können. Bei den 4 Tage alten *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Tieren konnte kein Unterschied mehr im Bezug auf die Anzahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu den Wildtyptieren nachvollzogen werden. Es zeigte sich jedoch bei den neun Tage alten Mäusen eine signifikant erhöhte Apoptoserate im Bereich der zukünftigen inneren Körnerschicht, während bei Betrachtung der retinalen Ganglienzellschicht und der zukünftigen äußeren Körnerschicht kein Unterschied ersichtlich war. Im Falle einer alleinigen Pancortinmutation wurden erhöhte Zahlen an apoptotischen Zellen im Bereich der INL und der retinalen Ganglienzellschicht bereits vorbeschrieben (Nakaya et al., 2008). Durch eine zusätzliche Myocilindefizienz bleibt dieser Effekt im Bereich der retinalen Ganglienzellschicht anscheinend aus. Somit heben sich die Effekte von mutiertem Pancortin und einer Myocilindefizienz im Bereich der retinalen Ganglienzellschicht wahrscheinlich gegenseitig auf. Jedoch liefern die Versuchsergebnisse keine Erklärung für die morphologischen Unterschiede zwischen unseren Versuchstieren und den Wildtyptieren. Eine Möglichkeit weshalb die erhöhte Apoptoserate in der INL, welche in den TUNEL-Färbungen gesehen wurde, keine Auswirkung auf die Schichtdicke der erwachsenen Tiere hat, könnte an der Zellart der absterbenden Zellen liegen. Da in TUNEL-Färbungen die gefärbten Zellen nicht genauer zu charakterisieren sind, könnten auch Stützzellen der INL wie z.B. Müllerzellen, die vermutlich keine ausgeprägte Auswirkung auf die Dicke der Netzhaut haben, vermehrt absterben. Zum anderen könnte die Ursache in der Embryonalentwicklung der *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäuse liegen und sowohl in der ONL als auch in der INL primär eine größere Zahl an Zellen gebildet werden. Durch die erhöhte Apoptoserate in der INL würden sich im Erwachsenenalter die Zellzahlen der inneren Körnerschichten wieder dem Wildtyp angleichen, während in der äußeren Körnerschicht eine vermehrte Zellzahl verbleibt. Um dies zu klären müssten in weiteren Versuchen die apoptotischen Zellen genauer charakterisiert und die

Zellzahlen in bestimmten Entwicklungsstadien gemessen werden. Weiterhin kommt in Betracht, dass die gewählten Zeitpunkte P4 und P9 nicht den richtigen Zeitraum abdecken und weitere Zeitpunkte untersucht werden müssen.

Aufgrund der bereits in der morphologischen Untersuchung festgestellten Unterschiede zwischen *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäusen und den Wildtyptieren, sowie den Tieren mit singularer Myocilindefizienz, sollte nun auch für unsere Versuchstiere die Auswirkung von retinaler Schädigung untersucht werden. Analog zu den Voruntersuchungen bei Myocilin-defizienten Tieren von Koch et al. wurden nun zwei etablierte Schadensmodelle gewählt:

Als erstes wurde durch intravitreale Injektion von NMDA eine Schädigung der retinalen Ganglienzellen induziert. Dabei kommt es durch vermehrten Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen zur exzitotoxischen Schädigung und anschließend zum Absterben derselben (Seitz et al., 2013). Außerdem wurde durch Belichtung der Tiere mit hoher Lichtintensität ein irreversibler Schaden im Bereich der Photorezeptoren gesetzt, der im Untergang dieser resultierte (Noell et al., 1971, Cachafeiro et al. 2013).

Doch zuerst musste vor Durchführung der Lichtschadensversuche eine Mutation im RPE65-Gen ausgeschlossen werden. Diese bedingt nämlich ein deutlich verringertes Ansprechen auf Licht-induzierte Schädigung der Photorezeptoren und kann sogar im Falle eines RPE65-KO-Gens eine vollständige Immunität gegen Lichtschaden zur Folge haben (Grimm et al., 2000). Ursächlich ist dabei, dass an Position 450 der Aminosäuresequenz die Aminosäure Leucin durch Methionin ersetzt ist (*LeuRPE65Met*) und dadurch vermutlich durch einen posttranslationalen Mechanismus die Menge des RPE65-Protein (*Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein*) reduziert ist (Wenzel et al., 2001). Dieses Protein kommt ausschließlich im retinalen Pigmentepithel (RPE) vor (Redmond et al., 1998) und wirkt unverzichtbar an der metabolischen Regeneration von Rhodopsin mit. Somit kann es durch eine erniedrigte Menge an RPE65-Protein zur verlangsamten Regeneration von Rhodopsin und zur Veränderung der Lichtempfindlichkeit bei Schadensversuchen kommen. Es konnte jedoch durch Genotypisierung einiger *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Tiere eine Veränderung im RPE65 Gen ausgeschlossen werden. In der Auswertung der Ergebnisse beider Schadensmodelle zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Ausprägung der Schädigung zwischen den betrachteten Versuchstieren und den Wildtyptieren, was zudem einen Unterschied zu den Ergebnissen der Versuche zu

Mäusen mit alleiniger Myocilindefizienz und alleiniger Pancortinmutation darstellt. Die gegensätzlichen Effekte des mutierten Pancortin und der Myocilindefizienz könnten sich in den betrachteten Versuchstieren gegenseitig neutralisiert haben und somit kein Unterschied mehr zum Wildtyp zu erkennen gewesen sein. Dabei könnten die Effekte zum einen durch den gemeinsamen Einfluss von Pancortin und Myocilin auf den *Wnt*-Signalweg, dessen neuroprotektiven Eigenschaften ausreichend bekannt sind (De Ferrari, 2003; Toledo; 2008), zu erklären sein. Trotz der für Myocilin beschriebenen aktivierenden Wirkung auf den *Wnt*-Signalweg, sowohl auf den kanonischen (Shen et al. 2012) als auch auf den nicht-kanonischen (Kwon et al. 2009), zeigten Mäuse mit Myocilindefizienz einen verstärkten Schutz vor retinaler Schädigung (Koch et al., 2017). Auch wenn hierfür der genaue Grund nicht bekannt ist, könnte eine kompensatorische Überexpression an anderen Olfactomedinproteinen die Erklärung sein. Auch Pancortin zeigte in Studien eine aktivierende Wirkung auf den *Wnt*-Signalweg. Dies geschieht durch Bindung bestimmter *Wnt*-Rezeptoren und des Inhibitors WIF-1 (Nakaya et al., 2008), der in der Entwicklung (P16) vor allem in der RGC-Schicht und der INL vorkommt, während in adulten Tieren das Expressionsmaximum eher in der ONL und INL zu finden ist (Hunter et al., 2004). Dabei konnten in Versuchen die Auswirkungen einer WIF-1-RNA Injektion durch Co-Injektion von Olfm-1-RNA annulliert werden (Nakaya et al., 2008), was zu der Annahme führt, dass Pancortin durch Bindung von WIF-1 den *Wnt*-Signalweg aktiviert. Bei der Einnistung der Eizelle in den Uterus, bzw. im Falle einer Eileiterschwangerschaft kommt es jedoch zur Aktivierung des *Wnt*-Signalweges durch eine Verminderung der Olfactomedin-1 Expression (Kodithuwakku et al., 2012, So et al., 2015), sodass in Zukunft durch weitere Untersuchungen die genaue Wirkung von Pancortin auf den *Wnt*-Signalweg geklärt werden muss. Weiterhin muss bedacht werden, dass Myocilin und Pancortin nicht durch Beeinflussung des gleichen Signalweges sondern durch unterschiedliche Wirkmechanismen die beobachteten Ergebnisse bewirken. Myocilin triggert eine Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials, welche eine Sensibilisierung für apoptotische Vorgänge zur Folge haben könnte (Sakai et al., 2007). Das Fehlen von Myocilin würde dadurch theoretisch diese Potentiale stabilisieren und das Auslösen eines Apoptosevorgangs erschweren. Pancortin hingegen ist in der Interphotorezeptormatrix (IPM) vertreten, welche am Austausch von Nährstoffen (Gonzales-Fernandez et al., 2003) und am Erhalt von Photorezeptoren (Hollyfield et

al., 1989) mitwirkt. Eine physiologisch funktionierende IPM verlängerte in Zellkulturen das Überleben der Photorezeptoren (Hewitt et al., 1990) und spielt außerdem noch, durch einen entscheidenden Einfluss auf die Regeneration von Rhodopsin, eine wichtige Rolle im Sehvorgang (Saari et al., 2000). Eine durch Pancortin gesteigerte Regenerationskinetik als Ursache der stärkeren Schädigung der Pancortin-mutant Tiere konnte zwar durch Messung der Ausgangsmenge an Rhodopsin und seiner Regeneration im Sehzyklus nach zehnminütiger Belichtung durch unsere Arbeitsgruppe ausgeschlossen werden, jedoch können noch unbekannte Störungen in der IPM, z.B. im Transport von Metaboliten, der verstärkten Schädigung bei Pancortindefizienz zu Grunde liegen (Koch et al., 2017).

Um die These einer kompensatorischen Gegenregulation im Falle einer Myocilindefizienz oder Pancortinmutation zu überprüfen, erfolgte noch die Untersuchung der Expression einiger anderer Vertreter der Olfactomedinfamilie zu den Zeitpunkten P10 und 8 Wochen durch Realtime-PCR. Dabei zeigte sich tatsächlich, dass bei *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäusen im Alter von 8 Wochen *Lphn1* signifikant mehr und *Lphn2* signifikant weniger exprimiert wird, sowie auch die Expression von *Olfm 3* bei 10 Tage alten Tieren signifikant erniedrigt ist. Da es sich aber bei Myocilin und Olfactomedin um sezernierte Proteine (Snyder et al., 1991, Russel et al., 2001) handelt und Latrophiline membranständige, neuronale „adhesion G-protein-coupled receptors“ (adhesion GPCR) sind (Silva et al., 2010), ist eine kompensatorische Übernahme der physiologischen Funktion von Myocilin und Pancortin durch Latrophiline eher unwahrscheinlich. Auch im Falle der untersuchten Olfactomedine ist eine Kompensation eher nicht anzunehmen, da die Menge an *Olfm 3* bei den Versuchstieren geringer war als die der Wildtypiere. Somit zeigt sich zwar, dass durch eine Myocilindefizienz oder Pancortinmutation auch die Regulation anderer Olfactomedinverteiler beeinflusst wird. Jedoch müssen noch weitere Versuche klären, ob durch Gegenregulation anderer Olfactomedine der Ausfall von Myocilin oder die Mutation des Pancortins abgeschwächt wird.

Als Nebenbeobachtung fiel als außerdem ein deutlicher Unterschied der Körpergröße zwischen Wildtieren und den zu untersuchenden Mäusen auf, was sich in einem hoch signifikanten Gewichtsunterschied messen ließ. Ein ähnlicher Befund konnte in Voruntersuchungen bereits für rein Pancortin mutierte Tiere beschrieben werden

(Nakaya et al., 2014, Koch et al, 2017). Dabei sind *Myoc^{-/-}/Olfm1-mutant* Mäuse in der Betrachtung des absoluten Gewichtes nochmals leichter als die Pancortin mutierten Mäuse. Da aber auch die entsprechenden Wildtypiere ein geringeres Körpergewicht aufweisen als die entsprechenden Wildtypmäuse der Voruntersuchungen und der relative Gewichtsunterschied sich nicht signifikant unterscheidet, ist dies wohl auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund zurückzuführen. Um eine mögliche Ursache hierfür zu finden, wurden verschiedene Organsysteme, wie Lunge, Herz, Schilddrüse, Ösophagus, Gastrointestinaltrakt und Gehirn, betrachtet. Jedoch konnte dadurch kein offensichtlicher anatomischer Unterschied zu den Wildtypieren gefunden werden. Ursächlich könnten aber bei Pancortin-Mutation entstehende Kleinhirndefekte sein, die eine Beeinträchtigung des Geruchssinnes und ein abnormales Verhalten der Tiere mit Pancortinmutation zur Folge haben (Nakaya et al., 2013).

VI. Zusammenfassung

Hintergrund: Myocilin und Olfactomedin-1 sind Proteine der Olfactomedinfamilie, deren Funktion weitestgehend ungeklärt ist. Myocilin-defiziente Mäuse besitzen sowohl mehr Zellen in allen Retinaschichten als auch eine erhöhte Anzahl an Axonen im N. opticus und zeigen eine geringere Ausprägung der Schädigung in etablierten Schadensmodellen der Netzhaut. Mäuse, die eine mutierte Form von Olfactomedin-1 (*Olfm1-mutant*) bilden, werden hingegen vermehrt geschädigt.

Methoden: Durch Kreuzung von *Myoc*^{-/-}-Mäusen mit *Olfm1-mutant* Mäusen wurde eine *Myoc*^{-/-}/*Olfm1-mutant* Mauslinie generiert und durch PCR genotypisiert. Diese wurde durch Untersuchungen anhand von Semidünnschnitten, TUNEL-Färbungen, Lichtschaden, NMDA-Injektion und Realtime-PCR analysiert.

Ergebnisse: *Myoc*^{-/-}/*Olfm1-mutant* Mäuse besitzen eine erhöhte Anzahl an Photorezeptoren in der äußeren Körnerschicht. Da die Ursache hierfür im Ablauf des ontogenetischen Zelltodes vermutet wurde, wurden TUNEL-Färbungen durchgeführt. Diese zeigten eine erhöhte Anzahl an apoptotischen Zellen in der inneren Körnerschicht zum Zeitpunkt P9 während in den anderen Retinaschichten kein Unterschied bestand. Weitere Versuche mit Lichtschädigung und exzitatorischer Schädigung durch NMDA-Injektion lieferten zudem keine Hinweise auf einen Unterschied zwischen *Myoc*^{-/-}/*Olfm1-mutant* Mäusen und Wildtyptieren bezüglich des Ausprägungsgrads der Schädigung. Da dies durch Gegenregulation anderer Olfactomedinproteine bedingt sein könnte, wurde durch quantitative Realtime-PCR die Expression ausgewählter Vertreter der Olfactomedine untersucht. Dabei zeigte sich tatsächlich eine vermehrte Expression an Latrophilin 1 (zum Zeitpunkt 8 Wochen), während jedoch Latrophilin 2 (zum Zeitpunkt 8 Wochen) und Olfactomedin 3 (zum Zeitpunkt P10), herunterreguliert werden.

Schlussfolgerung: *Myoc*^{-/-}/*Olfm1-mutant* Mäuse weisen einen vom Wildtyp abweichenden Phänotyp auf, der sich auch vom Phänotyp von *Myoc*^{-/-} oder *Olfm1-mutant* Mäusen der rein Myocilin defizienten oder Pancortin mutierten Tiere unterscheidet. Somit besteht wahrscheinlich ein gegenseitiger Einfluss von Myocilin und Olfactomedin-1. Ein Effekt durch den unterschiedlichen genetischen Hintergrund kann nicht ausgeschlossen werden.

VII. Summary

Background: Myocilin and Olfactomedin-1 are proteins of the olfactomedin family, whose function has not been finally clarified. Myocilin-deficient mice have more cells in all retinal layers, a higher number of axons in the optical nerve and show less damage in established models of experimental retinal injury. Instead, mice that synthesize a mutant form of Olfactomedin-1 (*Olfm1-mutant*), show increased damage.

Methods: Through crossbreeding of *Myoc*^{-/-}-mice with *Olfm1-mutant* mice a *Myoc*^{-/-}/*Olfm1-mutant* mouse line was generated and genotyped through PCR. This mouse was analyzed by analysis of semi thin sections, TUNEL-stainings, light damage, NMDA injection and realtime-PCR.

Results: *Myoc*^{-/-}/*Olfm1-mutant* mice have an increased number of photoreceptors in their outer nuclear layer (ONL) when compared to wildtype littermates. To follow up on the hypothesis that changes in developmental cell death are responsible for this, TUNEL-staining to check for apoptotic cell death was performed. An increased number of apoptotic cells in the inner nuclear layer (INL) at postnatal day (P) 9 was observed, but not in other layers of the retina. Further experiments using light damage und excitatory damage through NMDA-injection did not indicate a different vulnerability between *Myoc*^{-/-}/*Olfm1-mutant* mice and wild type mice. To analyze a possible influence on the regulation of other olfactomedin proteins, the expression of some olfactomedin family members was analyzed through quantitative realtime-PCR at different points. An increased expression of Latrophilin 1 (after 8 weeks) could be shown while Latrophilin 2 (after 8 weeks) and Olfactomedin 3 (at P10) were down regulated.

Conclusion: *Myoc*^{-/-}/*Olfm1-mutant* mice show a phenotype different to that of wildtype littermates, *Myoc*^{-/-} or *Olfm1-mutant* mice. The effects of mutant Olfactomedin-1 appear to be different in a Myocilin-deficient background. A general effect of the different genetic backgrounds cannot be excluded.

VIII. Anhang

VIII.1 Literaturverzeichnis

Adam MF, Belmouden A, Binisti P, Brézin AP, Valtot F, Béchetoille A, Dascotte JC, Copin B, Gomez L, Chaventré A, Bach JF, Garchon HJ (1997): "Recurrent mutations in a single exon encoding the evolutionarily conserved olfactomedin-homology domain of TIGR in familial open-angle glaucoma". *Hum Mol Genet*; 6(12):2091-2097.

Antholt RRH, Carbone MA (2013): "A Molecular Mechanism for Glaucoma: Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response" *Trends Mol Med*; 19(10):586-593

Antholt RRH (2014): "Olfactomedin proteins: central players in development and disease" *Front Cell Dev Biol* 2:6

Ando K, Nagano T, Nakamura A, Konno D, Yagi H, Sato M (2005): "Expression and characterization of disulfide bond use of oligomerized A2-Pancortins: extracellular matrix constituents in the developing brain". *Neuroscience*; 133(4):947-957.

Bal RS, Antholt RRH (1993): "Formation of the extracellular mucous matrix of olfactory neuroepithelium: identification of partially and non-glycosylated precursors of olfactomedin." *Biochemistry*; 32:1047-1053

Barembaum M, Moreno TA, LaBonne C, Sechrist J, Bronner-Fraser M (2000): "Noelin-1 is a secreted glycoprotein involved in generation of the neural crest". *Nat Cell Biol*; 2(4):219-225

Besson D, Pavageau AH, Valo I, Bourneau A, Eymerit-Morin C, Mouliere A, Chassevent A, Boisdron-Celle M, Morel A, Solassol J, Campone M, Gamelin E, Barre B, Coqueret O, Guette C (2011): "A quantitative proteomic approach of the different stages of colorectal cancer establishes OLFM4 as a new nonmetastatic tumor marker." *Mol Cell Proteomics*; 10(12):M111.009712

Caballero M, Rowlette LL, Borrás T (2000): "Altered secretion of a TIGR/MYOC mutant lacking the olfactomedin domain". *Biochem Biophys Acta*; 1502:447-460.

Cachafeiro M¹, Bemelmans AP, Samardzija M, Afanasieva T, Pournaras JA, Grimm C, Kostic C, Philippe S, Wenzel A, Arsenijevic Y. (2013): "Hyperactivation of retina by light in mice leads to photoreceptor cell death mediated by VEGF and retinal pigment epithelium permeability." *Cell Death Dis.*; 4:e781.

Carbone MA, Ayroles JF, Yamamoto A, Morozova TV, West SA, Magwire MM, Mackay TF, Antholt RRH (2009): "Overexpression of myocilin in the Drosophila eye activates the unfolded protein response: implications for glaucoma" *PLoS One*; 4(1):e4216

Cheng A, Arumugam TV, Liu D, Khatri RG, Mustafa K, Kwak S, Ling H, Gonzales C, Xin O, Jo D, Guo Z, Mark RJ, Mattson MP (2007): "Pancortin-2 interacts with WAVE1 and Bcl-xL in a mitochondria-associated protein complex that mediates ischemic neuronal death". *J Neurosci*; 27(7):1519-1528.

Chomczynski P, Sacchi N (1987): "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Anal Biochem*; 162(1):156-159.

Danielson PE, Forss-Petter S, Battenberg EL, deLecea L, Bloom FE, Sutcliffe JG (1994): "Four structurally distinct neuron-specific olfactomedin-related glycoproteins produced by differential promoter utilization and alternative mRNA splicing from a single gene". *J Neurosci Res*; 38(4):468-478.

Darzynkiewicz Z, Galkowski D, Zhao H (2008): "Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay". *Methods*; 44:250-254.

Dassen H, Punyadeera C, Delvoux B, Schulkens I, Marchetti C, Kamps R, Klomp J, Dijcks F, de Goeij A, D'Hooghe T, Kyama C, Ederveen A, Dunselman G, Groothuis P, Romano A (2010): "Olfactomedin-4 regulation by estrogen in the human endometrium requires epidermal growth factor signaling." *Am j Pathol* 177(5): 2495-508

Davletov BA, Shamotienko OG, Lelianova VG, et al. (1996): "Isolation and biochemical characterization of a Ca²⁺-independent α -latrotoxin-binding protein." *J Biol Chem*. 271:23239–23245.

De Ferrari GV, Chacón MA, Barría MI, Garrido JL, Godoy JA, Olivares G, Reyes AE, Alvarez A, Bronfman M, Inestrosa NC (2003): "Activation of Wnt signaling rescues neurodegeneration and behavioral impairments induced by beta-amyloid fibrils". *Mol Psychiatry*; 8(2):195-208.

Fingert JH, Heon E, Liebmann JM, Yamamoto T, Craig JE, Rait J, Kawase K, Hoh ST, Buys YM, Dickinson J, Hockey RR, Williams-Lyn D, Trope G, Kitazawa Y, Ritch R, Mackey DA, Alward WL, Sheffield VC, Stone EM (1999): „Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations“. *Hum Mol Genet*; 8:899–905.

Fingert JH, Stone EM, Sheffield VC, Alward WL (2002): "Myocilin glaucoma". *Surv Ophthalmol*; 47:547–561.

Foster PJ, Buhrmann R, Quigley HA, Johnson GJ (2002): "The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys". *Br J Ophthalmol*; 86(2):238-242.

Funayama T, Mashima Y, Ohtake Y, Ishikawa K, Fuse N, Yasuda N, Fukuchi T, Murakami A, Hotta Y, Shimada N (2006): "SNPs and interaction analyses of noelin 2, myocilin, and optineurin genes in Japanese patients with open-angle glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 47(12):5368-5375.

Gobeil S, Letartre L, Raymond V (2006): "Functional analysis of the glaucoma-causing TIGR/myocilin protein: integrity of amino-terminal coiled-coil regions an olfactomedin homology domain is essential for extracellular adhesion and secretion" *Exp Eye Res*; 82, 1017-1029

Goldwisch A, Baulmann DC, Ohlmann A, Flügel-Koch C, Schöcklmann H, Tamm ER (2005): "Myocilin is expressed in the glomerulus of the kidney and induced in mesangioproliferative glomerulonephritis". *Kidney Int*; 67(1):140-151.

Gonzalez-Fernandez F (2003): "Interphotoreceptor retinoid-binding protein-an old gene for new eyes". *Vision Res*; 43(28):3021-3036.

Gould DB, Miceli-Libby L, Savinova OV, Torrado M, Tomarev SI, Smith RS, John SWM (2004): "Genetically increasing Myoc expression supports a necessary pathologic role of abnormal proteins in glaucoma". *Mol Cell Biol*; 24(20):9019-9025. VI. Anhang 117.

Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, Yu S, Redmond TM, Remé CE (2000): "Protection of Rpe65-deficient mice identifies rhodopsin as a mediator of light-induced retinal degeneration". *Nat Genet*; 25(1):63-6.

Hao W, Wenzel A, Obin MS, Chen CK, Brill E, Krasnoperova NV, Eversole-Cire P, Kleyner Y, Taylor A, Simon MI, Grimm C, Remé CE, Lem J (2002): "Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration". *Nat Genet*; 32(2):254-60.

Hauser MA, Allingham RR, Linkroum K, Wang J, LaRocque-Abramson K, Figueiredo D, Santiago-Turla C, del Bono EA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Wiggs JL (2006): "Distribution of WDR36 DNA sequence variants in patients with primary open-angle glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 47:2542-2546.

Hewitt AT, Lindsey JD, Carbott D, Adler R (1990): "Photoreceptor survival-promoting activity in interphotoreceptor matrix preparations: characterization and partial purification". *Exp Eye Res*; 50(1):79-88.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993): "Kinetic PCR Analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions". *Nat Biotech*; 11:1026-1030.

Hillier BJ, Moy GW, Vacqzier VD (2007): "Diversity of olfactomedin proteins in the sea urchin." *Genomics* 89:721-730

Hollyfield JG, Varner HH, Rayborn ME, Osterfeld AM (1989): "Retinal attachment to the pigment epithelium. Linkage through an extracellular sheath surrounding cone photoreceptors". *Retina*; 9(1):59-68.

Houart C, Caneparo L, Heisenberg C, Barth K, Take-Uchi M, Wilson S (2002): Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron*; 35:255-265.

Hunter DD¹, Zhang M, Ferguson JW, Koch M, Brunken WJ. (2004): „The extracellular matrix component WIF-1 is expressed during, and can modulate, retinal development.” *Mol Cell Neurosci.*; 27(4):477-88.

Ichtchenko K, Bittner MA, Krasnoperov V, et al. (1999): “A novel ubiquitously expressed α -latrotoxin receptor is a member of the C1RL family of G-protein-coupled receptors.” *J Biol Chem.* 274:5491–5498

Ito S, Karnovsky MJ (1968): “Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds”. *J Cell Biol*; 39:168-9.

Jurynek MJ, Riley CP, Gupta DK, Nguyen TD, McKeon RJ, Buck CR (2003): “TIGR is upregulated in the chronic glial scar in response to central nervous system injury and inhibits neurite outgrowth”. *Mol Cell Neurosci*; 23:69–80.

Kim BS, Savinova OV, Reedy MV, Martin J, Lun Y, Gan L, Smith RS, Tomarev SI, John SW, Johnson RL (2001): “Targeted Disruption of the Myocilin Gene (Myoc) Suggests that Human Glaucoma-Causing Mutations Are Gain of Function”. *Mol Cell Biol*; 21(22):7707-7713.

Knaupp C, Flügel-Koch C, Goldwisch A, Ohlmann A, Tamm ER (2004): “The expression of myocilin during murine eye development”. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*; 42(4):339-45.

Kobayashi D, Koshida S, Moriai R, Tsuji N, Watanabe N (2007): “Olfactomedin 4 promotes S-phase transition in proliferation of pancreatic cancer cells”. *Cancer Sci*; 98(3):334-340.

Koch MA, Rosenhammer B, Koschade SE, Braunger BM, Volz C, Jägle H, Tamm ER. (2014): „Myocilin modulates programmed cell death during retinal development“. *Exp Eye Res.*: 125:41-52

Koch MA, Rosenhammer B, Paper W, Volz C, Braunger BM, Hausberger J, Jägle H, Tamm ER (2017): „Mutated olfactomedin 1 in the interphotoreceptor matrix of the mouse retina causes functional deficits and vulnerability to light damage.“ *Histochem Cell Biol.* 147(4):453-469

Kodithuwakku SP¹, Pang RT, Ng EH, Cheung AN, Horne AW, Ho PC, Yeung WS, Lee KF. (2012): „Wnt activation downregulates olfactomedin-1 in Fallopian tubal epithelial cells: a microenvironment predisposed to tubal ectopic pregnancy.” *Lab Invest.*; 92(2):256-64

Koga T, Shen X, Park JS, Qiu Y, Park BC, Shyam, R, Yue BY (2010): “Differential Effects of *Myocilin* and *Optineurin*, Two Glaucoma Genes, on Neurite Outgrowth”. *Am J Pathol*; 176(1):343-52.

Kulkarni NH, Karavanich CA, Atchley WR, Anholt RR (2000): “Characterization and differential expression of a human gene family of olfactomedin-related proteins”. *Genet Res*; 76(1):41-50.

Kwon HS, Lee H, Ji Y, Rubin JS, Tomarev SI (2009): "Myocilin is a modulator of Wnt signaling". *Mol Cell Biol*; 29(8):2139-2154.

Kwon HS, Tomarev SI (2011): „Myocilin, a glaucoma-associated protein, promotes cell migration through activation of integrin-focal adhesion kinase-serine/threonine kinase signaling pathway". *J Cell Physiol*; 226(12):3392-402.

Kwon YH, Fingert JH, Kuehn MH, Alward WL (2009): "Primary open-angle glaucoma". *N Engl J Med*; 360:1113–1124.

Langenhan T, Promel S, Mestek L, et al. (2009): "Latrophilin signaling links anterior-posterior tissue polarity and oriented cell divisions in the *C. elegans* embryo." *Dev Cell*. 17:494–504

Lee H, Tomarev SI (2007): "Optimedin induces expression of N-cadherin and stimulates aggregation of NGF-stimulated PC12 cells". *Exp Cell Res*; 313(1): 98-108.

Lee J, Anholt RRH, Cole GJ (2008): "Olfactomedin-2 mediates development of the anterior central nervous system and head structures in zebrafish". *Mech Dev*; 125(1-2):167-181.

Lelianova VG, Davletov BA, Sterling A, Rahman MA, Grishin EV, Totty NF, Ushkaryov YA (1997): "Alpha-latrotoxin receptor, latrophilin, is a novel member of the secretin family of G protein-coupled receptors". *J Biol Chem*; 272(34):21504-21508.

Liu Y, Vollrath D (2004): „Reversal of mutant myocilin non-secretion and cell killing: implications for glaucoma". *Hum Mol Genet*; 13(11):1193-204.

Liu Y, Allingham R (2011): "Molecular genetics in glaucoma". *Exp Eye Res*; 93(4): 331-9.

Liu RH, Yang MH, Xiang H, Bao LM, Yang HA, Yue LW, Jiang X, Ang N, Wu LY, Huang Y (2012): "Depletion of OLFM4 gene inhibits cell growth and increases sensitization to hydrogen peroxide and tumor necrosis factor-alpha induced-apoptosis in gastric cancer cells." *J Biomed Sci*; 19:38

Livak KJ, Schmittgen TD (2001): "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method". *Methods*; 25(4):402-408.

Matsushita H, Lelianova VG, Ushkaryov YA (1999): "The latrophilin family: multiply spliced G protein-coupled receptors with differential tissue distribution". *FEBS Lett*; 443(3):348-352.

Monemi S, Spaeth G, DaSilva A, Popinchalk S, Ilitchev E, Liebmann J, Ritch R, Héon E, Crick RP, Child A, Sarfarazi M (2005): "Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1". *Hum Mol Genet*; 14: 725–733.

- Moreno TA¹, Bronner-Fraser M. (2001): „The secreted glycoprotein Noelin-1 promotes neurogenesis in *Xenopus*.” *Dev Biol.* ;240(2):340-60.
- Moreno TA¹, Bronner-Fraser M. (2005): “Noelins modulate the timing of neuronal differentiation during development.” *Dev Biol*; 288(2):434-47
- Miljkovic-Licina M, Hammel P, Garrido-Urbani S, Lee BP, Meguenani M, Chaabane C, Bochaton-Piallat ML, Imhof BA (2012): “Targeting olfactomedin-like 3 inhibits tumor growth impairing angiogenesis and pericyte coverage” *Mol Cancer Ther.*; 11(12):2588-99
- Nagano T, Nakamura A, Mori Y, Maeda M, Takami T, Shiosaka S, Takagi H, Sato M (1998): “Differentially expressed olfactomedin-related glycoproteins (Pancortins) in the brain”. *Mol Brain Res*; 53(1-2):13-23.
- Nagano T, Nakamura A, Konno D, Kurata M, Yagi H, Sato M (2000): “A2-Pancortins (Pancortin-3 and -4) Are the Dominant Pancortins During Neocortical Development”. *Journal of Neurochemistry*; 75(1):1-8.
- Nakaya N, Tomarev SI (2007): “Expression patterns of alternative transcripts of the zebrafish olfactomedin 1 genes”. *Gene Expr Patterns*; 7:723–729.
- Nakaya N, Lee H, Takada Y, Tzchori I, Tomarev SI (2008): “Zebrafish olfactomedin 1 regulates retinal axon elongation *in vivo* and is a modulator of Wnt signaling pathway”. *J Neurosci*; 28(31):7900-7910.
- Nakaya N, Sultana A, Lee HS, Tomarev SI (2012): “Olfactomedin-1 interacts with the Nogo A receptor complex to regulate axon growth.” *J Biol Chem*; 287(44):37171-84
- Nakaya N, Sultana A, Munasinghe J, Cheng A, Mattson MP, Tomarev SI. (2013): “Deletion in the N-terminal half of olfactomedin 1 modifies its interaction with synaptic proteins and causes brain dystrophy and abnormal behavior in mice. *Exp Neurol*; 250:205-18.
- Ngyuen TD, Chen P, Huang WD, Chen H, Johnson D, Polansky JR (1998): “Gene structure and properties of TIGR, an olfactomedin-related glycoprotein cloned from glucocorticoid-induced trabecular meshwork cells.” *J Biol Chem*; 273(11): 6341-50
- Noell WK, Albrecht R. (1971): “Irreversible effects on visible light on the retina: role of vitamin A.” *Science.*; 172(3978):76-9.
- Oppenheim RW (1991): “Cell death during development of the nervous System”. *Annu Rev Neurosci*; 14:453-501.
- Oue N, Sentani K, Noguchi T, Ohara S, Sakamoto N, Hayashi T, Anami K, Motoshita J, Ito M, Tanaka S, Yoshida K, Yasui W (2009): “ Serum olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) in combination with Reg IV is a highly sensitive biomarker for gastric cancer patients.” *Int J Cancer*; 125(10):2383-92

Park BC, Tibudan M, Samaraweera M, Shen X, Yue BY (2007): "Interaction between two glaucoma genes, optineurin and myocilin". *Genes Cells*; 12:969–979.

Pezeron G, Anselme I, Laplante M, Ellingsen S, Becker TS, Rosa FM, Charnay P, Schneider-Maunoury S, Mourrain P, Ghislain J (2006): "Duplicate *sfrp1* genes in zebrafish: *sfrp1a* is dynamically expressed in the developing central nervous system, gut and lateral line". *Gene Expr Patterns*; 6:835–842

Polansky JR, Fauss DJ, Chen P, Chen H, Lutjen-Drecoll E, Johnson D, Kurtz RM, Ma ZD, Bloom E, Nguyen TD (1997): "Cellular pharmacology and molecular biology of the trabecular meshwork inducible glucocorticoid response gene product". *Ophthalmologica*; 211:126–139.

Pronker MF, Bos T, Sharp TH, Thies-Weesie D, Janssen B (2015): "Olfactomedin-1 Has a V-shaped Disulfide-linked Tetrameric Structure." *J Biol Chem*; 290(24):15092-15101

Quigley HA (1996): "Number of people with glaucoma worldwide". *Br J Ophthalmol*; 80(5):389-393.

Redmond TM, Yu S, Lee E, Bok D, Hamasaki D, Chen N, Goletz P, Ma JX, Crouch RK, Pfeifer K (1998): "Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle". *Nat Genet*; 20(4):344-351.

Resch ZT, Fautsch MP (2008): "Glaucoma-associated myocilin: A better understanding but much more to learn". *Exp Eye Res*; 88:704–712.

Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, Heon E, Krupin T, Ritch R, Kreutzer D, Crick RP, Sarfarazi M (2002): "Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin". *Science*; 295:1077-1079.

Rice HC¹, Townsend M, Bai J, Suth S, Cavanaugh W, Selkoe DJ, Young-Pearse TL. (2012): "Pancortins interact with amyloid precursor protein and modulate cortical cell migration." *Development*.:3986-96.

Richardson KC, Jarett L, Finke EH (1960): "Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy". *Stain Techn*; 35:313–323.

Roche AS (2001): "Relative Quantification". *Technical Note* No. LC 13/2001.

Roche AS (2003): "Light Cycler: Absolut quantification with external standards". *Technical Note*, No. LC 11/update 2003.

Rosenhammer B (2015): "Morphologische und molekulare Untersuchungen zur Funktion von Myocilin und Olfactomedin-1(Pancortin) in der Netzhaut." *Urn:nbn:de:bvb:355-epub-312150*

Saari JC (2000): "Biochemistry of visual pigment regeneration". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 41:337–348.

Sachsenweger M (2003): in: *Duale Reihe Augenheilkunde*, 2.Auflage, 210-238, Thieme Verlag, Stuttgart.

Sakai H, Shen X, Koga T, Park BC, Noskina Y, Tibudan M, Yue BY (2007): "Mitochondrial association of myocilin, product of a glaucoma gene, in human trabecular meshwork cells. *J Cell Physiol*; 213:775–784.

Sanchez-Sanchez F, Martinez-Redondo F, Aroca-Agiular JD, Coca-Prados M, Escribano J (2007): "Characterization of the intracellular proteolytic cleavage of myocilin and identification of calpain II as a myocilin-processing protease." *J Biol Chem*; 282(38):27810-24

Schultz WH (1972): „Über das Paraphenylendiamin in der histologischen Färbetechnik und über eine neue Schnellfärbemethode der Nervenmarkscheide am Gefrierschnitt“. *Zentralbl Pathol*; 36:639-640.

Seitz R, Tamm ER (2013): "N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated excitotoxic damage: a mouse model of acute retinal ganglion cell damage." *Methods Mol Biol*; 935:99-109.

Seko N, Oue N, Noguchi T, Sentani K, Sakamoto N, Hinoi T, Okajima M, Yasui W (2010): „Olfactomedin 4 (GW112, hGC-1) is an independent prognostic marker for survival in patients with colorectal cancer." *Exp Ther Med*; 1(1): 73-78

Sentani K, Sakamoto N, Shimamoto F, Anami K, Oue N, Yasui W (2013): "Expression of olfactomedin 4 and claudin-18 in serrated neoplasia of the colorectum: a characteristic pattern is associated with sessile serrated lesion." *Histopathology*; 62(7): 1018-27

Shen X¹, Ying H, Yue BY (2012): „Wnt activation by wild type and mutant myocilin in cultured human trabecular meshwork cells." *PLoS One*; 7(9):e44902.

Shen X, Koga T, Park BC, SundarRaj N, Yue BY (2008): "Rho GTPase and cAMP/protein kinase A signaling mediates myocilin-induced alterations in cultured human trabecular meshwork cells". *J Biol Chem*; 283:603–612.

Shen Y, Liu X-L, Yang X-L (2006): "N-Methyl-D-aspartate receptors in the retina". *Mol Neurobiol*; 34:163-179.

Silva JP, Ushkaryov YA (2010): "The latrophilins, "split-personality" receptors." *Adv Exp Med Biol*; 706: 59–75.

Snyder DA, Rivers AM, Yokoe H, Menco BP, Anholt RR (1991): "Olfactomedin: purification, characterization, and localization of a novel olfactory glycoprotein". *Biochemistry*; 30(38):9143-9153.

So KH, Kodithuwakku SP, Kottawatta KS, Li RH, Chiu PC, Cheung AN, Ng EH, Yeung WS, Lee KF (2015): "Human chorionic gonadotropin stimulates spheroid attachment on fallopian tube epithelial cells through the mitogen-activated protein kinase pathway and down-regulation of olfactomedin-1." *Fertil Steril*. 104(2):474-82.

Stigloher C, Ninkovic J, Laplante M, Geling A, Tannhauser B, Topp S, Kikuta H, Becker TS, Houart C, Bally-Cuif L (2006): "Segregation of telencephalic and eye-field identities inside the zebrafish forebrain territory is controlled by Rx3". *Development*; 133:2925–2935.

Stone EM, Fingert JH, Alward WL, Nguyen TD, Polansky JR, Sunden SL, Nishimura D, Clark AF, Nystuen A, Nichols BE, Mackey DA, Ritch R, Kalenak JW, Craven ER, Sheffield VC (1997): "Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma". *Science*; 275:668–670.

Tamm ER, Russell P, Epstein DL, Johnson DH, Piatigorsky J (1999): "Modulation of myocilin/TIGR expression in human trabecular meshwork". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 40:2577–2582.

Tobaben S, Südhof TC, Stahl B (2002): "Genetic analysis of alpha-latrotoxin receptors reveals functional interdependence of CIRL/latrophilin 1 and neurexin 1 alpha". *J Biol Chem*; 277(8):6359-6365.

Toledo EM, Colombres M, Inestrosa NC (2008): "Wnt signaling in neuroprotection and stem cell differentiation". *Prog Neurobiol*; 86(3):281-296.

Tomarev SI, Tamm ER, Chang B (1998): "Characterization of the Mouse Myoc/TigrGene". *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 245(3):887-893.

Tomarev SI, Nakaya N (2009): "Olfactomedin Domain-Containing Proteins: Possible Mechanisms of Action and Functions in Normal Development and Pathology". *Mol Neurobiol*; 40(2):122-138.

Torrado M, Trivedi R, Zinovieva R, Karavanova I, Tomarev SI (2002): "Optimedlin: a novel olfactomedin-related protein that interacts with myocilin". *Hum Mol Genet*; 11(11):1291-1301.

Wan B, Zhou Y, Zhang X, Zhu H, Huo K, Han Z (2008): "hOLFML1, a novel secreted glycoprotein, enhances the proliferation of human cancer cell lines *in vitro*". *FEBS Lett*; 582(21-22):3185-3192.

Wenzel A, Reme CE, Williams TP, Hafezi F, Grimm C (2001): "The Rpe65 Leu450Met variation increases retinal resistance against light-induced degeneration by slowing rhodopsin regeneration". *J. Neurosci*; 21(1):53-58.

Wiggs JL, Allingham RR, Vollrath D, Jones KH, De la Paz M, Kern J, Patterson K, Babb VL, Del Bono EA, Broome BW, Pericak-Vance MA, Haines JL (1998): "Prevalence of mutations in TIGR/Myocilin in patients with adult and juvenile primary open-angle glaucoma." *Am j Hum Genet*; 63(5):1549-52

Wu L, Chang W, Zhao J, Yu Y, Tan X, Su T, Zhao L, Huang S, Liu S, Cao G (2010): "Development of autoantibody signatures as novel diagnostic biomarkers of non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res.*;16(14):3760-8

Zeng LC, Han ZG, Ma WJ (2005): "Elucidation of subfamily segregation and intramolecular coevolution of the olfactomedin-like proteins by comprehensive phylogenetic analysis and gene expression pattern assessment". *FEBS Lett*; 579(25):5443-5453.

Zilinski C, Brownell I, Hashimoto R, Medina-Martinez O, Swindell EC, Jamrich M (2004): "Expression of FoxE4 and Rx visualizes the timing and dynamics of critical processes taking place during initial stages of vertebrate eye development". *Dev Neurosci*; 26:294–307.

Zillig M, Wurm A, Grehn FJ, Russell P, Tamm ER (2005): „Overexpression and properties of wild-type and Tyr437His mutated myocilin in the eyes of transgenic mice". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 46(1):223-234.

VIII.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetischer Stammbaum der Olfactomedin-Proteine	7
Abbildung 2: Schematisches Diagramm der Entstehung der Pancortin-Isoformen	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung von Myocilin-induziertem Stress des ER ...	12
Abbildung 4: Ausprägung des Schadens bei Lichtschaden und NMDA-Injektion	13
Abbildung 5: Quantitative Auswertung der TUNEL-Färbungen	14
Abbildung 6: Geschlechterspezifischer Gewichtsunterschied.....	44
Abbildung 7: Makroskopische Betrachtung von Organen.....	45
Abbildung 8: Absolute Anzahl der Axone im N. opticus	46
Abbildung 9: Zelldichte der retinalen Ganglienzellen.....	46
Abbildung 10: Spiderdiagramme der Retina-Schichtdickenvermessungen... ..	48
Abbildung 11: TUNEL-Färbung von P4-Retinae.....	50
Abbildung 12: Anzahl TUNEL-positiver Zellen zum Zeitpunkt P4	50
Abbildung 13: TUNEL-Färbung von P9-Retinae.....	51
Abbildung 14: Anzahl TUNEL-positiver Zellen zum Zeitpunkt P9	52
Abbildung 15: Lichtmikroskopie und quantitative Auswertung von PBS- Kontrollinjektionen	53
Abbildung 16: Lichtmikroskopie und quantitative Auswertung von NMDA- Injektionen	54
Abbildung 17: Genotypisierung zur Untersuchung der LeuRPE54Met-Mutation	55
Abbildung 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen nach Lichtschaden	56
Abbildung 19: Spiderdiagramme der Lichtschadensversuche mit <i>Myoc^{-/-}/Olfm1-</i> <i>mutant</i> Mäusen	57
Abbildung 20: Quantitative Realtime-PCR Auswertung von Lphn1 und Lphn2	58
Abbildung 21: Quantitative Realtime-PCR Auswertung von Olfm3.....	59

VIII.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	16
Tabelle 2: Geräte	17
Tabelle 3: Reagenzien	18
Tabelle 4: Enzyme und Kits	20
Tabelle 5: Puffer und Lösungen	20
Tabelle 6: Gele	22
Tabelle 7: Oligonukleotid-Primer	23
Tabelle 8: Ansatz der Myocilin-PCR	25
Tabelle 9: Myocilin-PCR-Programm	26
Tabelle 10: Ansatz der Pancortin-PCR	26
Tabelle 11: Pancortin-PCR-Programm	27
Tabelle 12: Ansatz der <i>LeuRPE65Met</i> -PCR	27
Tabelle 13: <i>LeuRPE65Met</i> -PCR-Programm	28
Tabelle 14: Reaktionsansatz für die cDNA-Herstellung	30
Tabelle 15: Programm der reversen Transkription	32
Tabelle 16: <i>Real-Time</i> PCR-Programm	34

VIII.4 Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro (10^{-6})
°C	Grad Celsius
A	Ampere; Adenin
Abb.	Abbildung
ad	zu
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
c	centi (10^{-2})
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DDSA	<i>2-Dodeceny/succinic-acid-anhydride</i>
d.h.	das heißt
dH ₂ O /ddH ₂ O	einfach/doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
ds	Doppelstrang
E	embryonaler Tag; Extinktion
EDTA	Ethylendiamintereessigsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
EM	Elektronenmikroskop
et al.	und andere (et alia)
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
Fwd	vorwärts (<i>forward</i>)
Fzd	<i>Frizzled</i>
g	Gramm; Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
G	Guanin

GNB2L	<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like</i>
h	Stunde
i.d.R.	in der Regel
IgG	Immunglobulin G
in vitro	außerhalb des lebenden Organismus, im "Reagenzglas"
in vivo	im lebenden Organismus
INL	innere Körnerschicht (<i>inner nuclear layer</i>)
IPL	innere plexiforme Schicht (<i>inner plexiform layer</i>)
IPM	Interphotorezeptormatrix
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
k	Kilo
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knock out</i>
l	Liter
m	milli (10^{-3}), Meter
M; M.	molar (mol/l); Musculus (Muskel)
min	Minute(n)
mind.	mindestens
mm	Mus musculus (Hausmaus)
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MNA	<i>Methyl-nadic-anhydrid</i>
mRNA	messenger RNA
n	nano (10^{-9}); Fallzahl
N./ Nn.	Nervus (Nerv)/Nervi (Nerven)
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
ONH	Sehnervenkopf (<i>optic nerve head</i>)
ONL	äußere Körnerschicht (<i>outer nuclear layer</i>)
OPL	äußere plexiforme Schicht (<i>outer plexiform layer</i>)
p	Phospho-; (Fehler-) Wahrscheinlichkeit
P	postnataler Tag
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PI3-Kinase	Phosphatidylinositid-3-Kinase

PFA	Paraformaldehyd
POAG	Primäres Offenwinkelglaukom (<i>primary open angle glaucoma</i>)
PR	Photorezeptoren (<i>photoreceptors</i>)
Rev	rückwärts (reverse)
RGC	retinale Ganglienzellen (<i>retinal ganglion cells</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	retinales Pigmentepithel
RT	Reverse Transkriptase; Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
s.u.	siehe unten
sFRP	<i>secreted frizzled related protein</i>
T	Thymin
Taq Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TdT	terminale Deoxynukleotidyl-Transferase
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
TUNEL	<i>Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
U	<i>Unit</i> ; Uracil
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
vgl.	vergleiche
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
WAVE 1	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein.family verprolin homologous protein 1</i>
WIF-1	<i>Wnt inhibitory factor-1</i>
Wnt	<i>Wingless type</i>
x	-fach/mal

z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
∞	unendlich

VIII.5 Danksagung

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei Herrn Prof. Dr. Ernst Tamm für die Ermöglichung der Promotion, für die Vergabe des interessanten Themas und für die Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Frank Schweda danke ich herzlich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer sowie gutem Freund Herrn Dr. Marcus Koch, der mich während der gesamten Zeit mit Rat und Tat zu jeder Zeit unterstützt und die vielen Stunden im Labor mit Weißwurst-Frühstücken und Gummibärchen versüßt hat. Zusammen durften wir nicht nur die Zeit während der Promotion, sondern auch etliche Anatomiekurse und lustige Abende verbringen.

Ferner danke ich Frau PD Dr. Dr. Barbara Braunger und Prof. Dr. Rudolf Fuchshofer für die zusätzliche Hilfe bei allen Problemen und Fragen, die im Laufe der Promotion auftraten.

Insbesondere möchte ich mich bei Elke Stauber, Angelika Pach, Silvia Babl, Margit Schimmel, Corinna Unger und Eva Zitzelsberger für ihre tatkräftige Anleitung und Unterstützung bei Anfertigung und Färbung der histologischen Schnitte, sowie aller anderen Arbeiten im Labor bedanken.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Humananatomie und Embryologie danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und die gute Atmosphäre. Hier möchte ich v.a. Bernd Rosenhammer, Sebastian Koschade, Eva Diepold, Johanna Hausberger, Christiane Sippl, Magdalena Schneider und Sabrina Schmitt für die lustigen gemeinsamen Stunden innerhalb und außerhalb des Labors danken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und Verlobten Julia Eglmeier, die mich nicht nur während meiner Promotion und meines ganzen Studiums mit unendlicher Geduld unterstützt haben, sondern manchmal auch für den nötigen Motivationsschub sorgten.

VIII.6 Erklärung

Die Dissertation wurde von Prof. Dr. E. R. Tamm, Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie der Universität Regensburg, angeregt und ihre Ausarbeitung überwacht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne die Benutzung anderer als die angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater und andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 06.09.2017

Markus Götz