

Morphologische und molekulare Untersuchungen zur  
Funktion von Myocilin und Olfactomedin-1  
(Pancortin) in der Netzhaut



Dissertation

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

vorgelegt von

**Bernd Rosenhammer**

aus Regensburg

im Jahr 2014



Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

11.08.2014

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. med. Ernst R. Tamm



Meiner Familie



## Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung.....	10
I.1	Die Familie der Olfactomedin-Proteine.....	10
I.2	Myocilin.....	13
I.3	Olfactomedin-1 (Pancortin).....	16
I.4	Anatomie des Auges.....	19
I.5	Entwicklung der Netzhaut und des Sehnerven in der Maus.....	24
II.	Zielsetzung der Arbeit.....	28
II.1	Myocilin.....	28
II.2	Olfactomedin-1 (Pancortin).....	28
III.	Material und Methoden.....	29
III.1	Verwendete Materialien.....	29
III.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	29
III.1.1.1	Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	29
III.1.1.2	Geräteliste.....	30
III.1.2	Liste der verwendeten Reagenzien.....	31
III.1.3	Enzyme und Kits.....	34
III.1.4	Zusammensetzung von Gelen, Puffern und Lösungen.....	34
III.1.5	Antikörper und Molekulargewichtstandard.....	38
III.1.6	Oligonukleotid-Primer.....	39
III.1.7	Verwendete Tiere.....	40
III.1.8	Verwendete Zelllinien und Kulturbedingungen.....	40
III.2	Methoden der Molekularbiologie.....	41
III.2.1	Isolierung von DNA aus Mausschwänzen.....	41
III.2.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	41
III.2.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	45
III.2.4	Expressionsanalyse mit der quantitativen real-time RT-PCR.....	45
III.2.4.1	Prinzip der quantitativen real-time RT-PCR.....	46
III.2.4.2	RNA-Isolierung aus Netzhäuten.....	46
III.2.4.3	Herstellung von cDNA.....	48
III.2.4.4	Durchführung der quantitativen real-time RT-PCR.....	49

III.3	Proteinbiochemische Methoden .....	51
III.3.1	Proteinisolierung aus Geweben mit peqGold TriFast™ - Reagenz.....	51
III.3.2	Bestimmung von Proteinmengen mittels BCA-Assay.....	52
III.3.3	Western-Blot.....	53
III.3.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	53
III.3.3.2	Semidry-Blotting.....	54
III.3.3.3	Nachweis spezifischer Proteinbanden.....	55
III.3.4	Coomassie-Färbung.....	56
III.4	<i>In vitro</i> – Versuche .....	57
III.4.1	Allgemeine Arbeitstechniken in der Zellkultur .....	57
III.4.2	Gewinnung von serumfreiem Überstand aus HEK293-Zellen.....	58
III.4.3	Behandlung von RGC-5-Zellen .....	58
III.5	<i>In vivo</i> – Versuche.....	59
III.5.1	Versuchstiere und deren Haltung.....	59
III.5.2	Präparation diverser Gewebe .....	60
III.5.3	Schadensmodelle .....	61
III.5.3.1	Intravitreale Injektionen von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA).....	61
III.5.3.2	Licht-induzierte Schädigung von Photorezeptoren .....	62
III.5.3.3	Nachweis apoptotischer Zellen mittels <i>TUNEL-Assay</i> .....	63
III.5.3.4	Apoptose-Nachweis mittels <i>Cell Death Detection ELISA</i> .....	65
III.5.3.5	Messung des Rhodopsin-Umsatzes nach Lichtschaden.....	66
III.6	Histologische Arbeitstechniken.....	68
III.6.1	Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten .....	68
III.6.2	Einbettung in Epon und Herstellung von Semidünnschnitten.....	68
III.6.3	Histologische Färbungen.....	70
III.7	Mikroskopie.....	70
III.8	Auswertung und Statistik.....	71
IV.	Ergebnisse.....	72
IV.1	Myocilin.....	72
IV.1.1	Morphologische Charakterisierung der Sehnerven und Netzhäute von Myocilin <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	72
IV.1.2	Untersuchung der <i>Nn. Ischiadici</i> von Myocilin <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	77
IV.1.3	Untersuchung des Einflusses von fehlendem Myocilin auf den ontogenetischen Zelltod.....	78
IV.1.3.1	TUNEL-Assays von P4-, P9- und P14-Netzhäuten.....	78

IV.1.3.2	Untersuchung des Einflusses von fehlendem Myocilin auf diverse Signalwege .....	82
IV.1.3.2.1	Kanonischer <i>Wnt</i> -Signalweg.....	83
IV.1.3.2.2	Nicht-kanonischer <i>Wnt</i> -Signalweg.....	83
IV.1.3.2.3	PI3-Kinase/ <i>Akt</i> -Signalweg.....	85
IV.1.3.2.4	<i>Nerve growth factor</i> - und <i>Brain-derived neurotrophic factor</i> -Signalweg.....	86
IV.1.3.2.5	<i>Transforming growth factor-β</i> -Signalweg.....	87
IV.1.4	Untersuchung eines möglichen Effekts von fehlendem Myocilin in Schadensmodellen .....	88
IV.1.4.1	NMDA-induzierte Schädigung von retinalen Ganglienzellen.....	88
IV.1.4.2	Licht-induzierte Schädigung von Photorezeptoren .....	91
IV.1.5	Behandlung von RGC-5-Zellen .....	94
IV.2	Olfactomedin-1 (Pancortin).....	96
IV.2.1	Bestätigung des protektiven Effekts von Pancortin nach Licht-induzierter Schädigung von Photorezeptoren in Pancortin-defizienten Mäusen.....	96
IV.2.1.1	Apoptosenachweis mittels <i>TUNEL</i> -Assay.....	96
IV.2.1.2	Apoptosenachweis mittels <i>Cell Death Detection ELISA</i> .....	97
IV.2.1.3	Morphologie der äußeren Körnerschicht.....	98
IV.2.2	Rhodopsin-Umsatz in Pancortin-defizienten Mäusen.....	100
V.	Diskussion .....	102
V.1	Myocilin.....	102
V.2	Olfactomedin-1 (Pancortin).....	113
VI.	Zusammenfassung .....	116
VII.	Summary .....	117
VIII.	Anhang .....	118
VIII.1	Literaturverzeichnis .....	118
VIII.2	Abbildungsverzeichnis.....	134
VIII.3	Tabellenverzeichnis.....	136
VIII.4	Abkürzungsverzeichnis .....	137
VIII.5	Danksagung.....	141
VIII.6	Erklärung.....	142

## I. Einleitung

Bei den Proteinen Myocilin und Olfactomedin-1 (Pancortin) handelt es sich um zwei Mitglieder der Familie der Olfactomedine, die beide in der Netzhaut des Auges lokalisiert sind, deren Funktion jedoch weitgehend unbekannt ist.

Mutationen im Myocilin-Gen wurden bereits mit einer autosomal-dominant vererbten Form des Glaukoms assoziiert (Stone et al., 1997; Adam et al., 1997; Fingert et al., 1999 und 2002), einer schwerwiegenden Augenerkrankung, die weltweit eine der Hauptursachen für irreversible Blindheit darstellt (Quigley et al., 1996).

Mit Hilfe zweier Maus-Modelle wurde in der vorliegenden Arbeit die Funktion von Myocilin und Pancortin in der Netzhaut weiter untersucht.

Vorab sollen einleitend einige wichtige Erkenntnisse über die beiden Proteine vorgestellt werden und anschließend eine Übersicht über relevante anatomische Strukturen und die Embryogenese der Netzhaut gegeben werden.

### I.1 Die Familie der Olfactomedin-Proteine

Die Familie der Olfactomedine geht zurück auf das Protein Olfactomedin, das erstmals im Jahre 1991 beschrieben wurde. Dabei handelt es sich um ein 57 kDa großes Glykoprotein, das im Riechepithel von Fröschen exprimiert wird und dort möglicherweise eine Rolle bei der Chemozeption spielt (Snyder et al., 1991).

Über die folgenden Jahre hinweg zeigte sich, dass Olfactomedin an seinem C-terminalen Ende eine Domäne mit einer Länge von ca. 250 Aminosäuren besitzt, die in zahlreichen anderen Proteinen verschiedener Spezies nachgewiesen werden konnte (Hillier et al., 2003; Karavanich et al., 1998; Kulkarni et al., 2000; Loria et al., 2004; Nakaya et al., 2008) und als „Olfactomedin-Domäne“ bezeichnet wurde (Zeng et al., 2005). Diese Proteine wurden letztendlich zur Familie der Olfactomedin-Proteine zusammengefasst.

Interessanterweise fanden sich diese Proteine nur in mehrzelligen Organismen, was zu der Annahme führen könnte, dass sie eine Rolle bei Vorgängen wie Zell-Zell-Interaktion und -Kommunikation spielen.

Während die meisten Olfactomedine von der Zelle sezerniert werden, gibt es unter ihnen auch einige, die als membrangebundene Rezeptoren dienen, wie z.B. die Latrophiline (Tobaben et al., 2002).

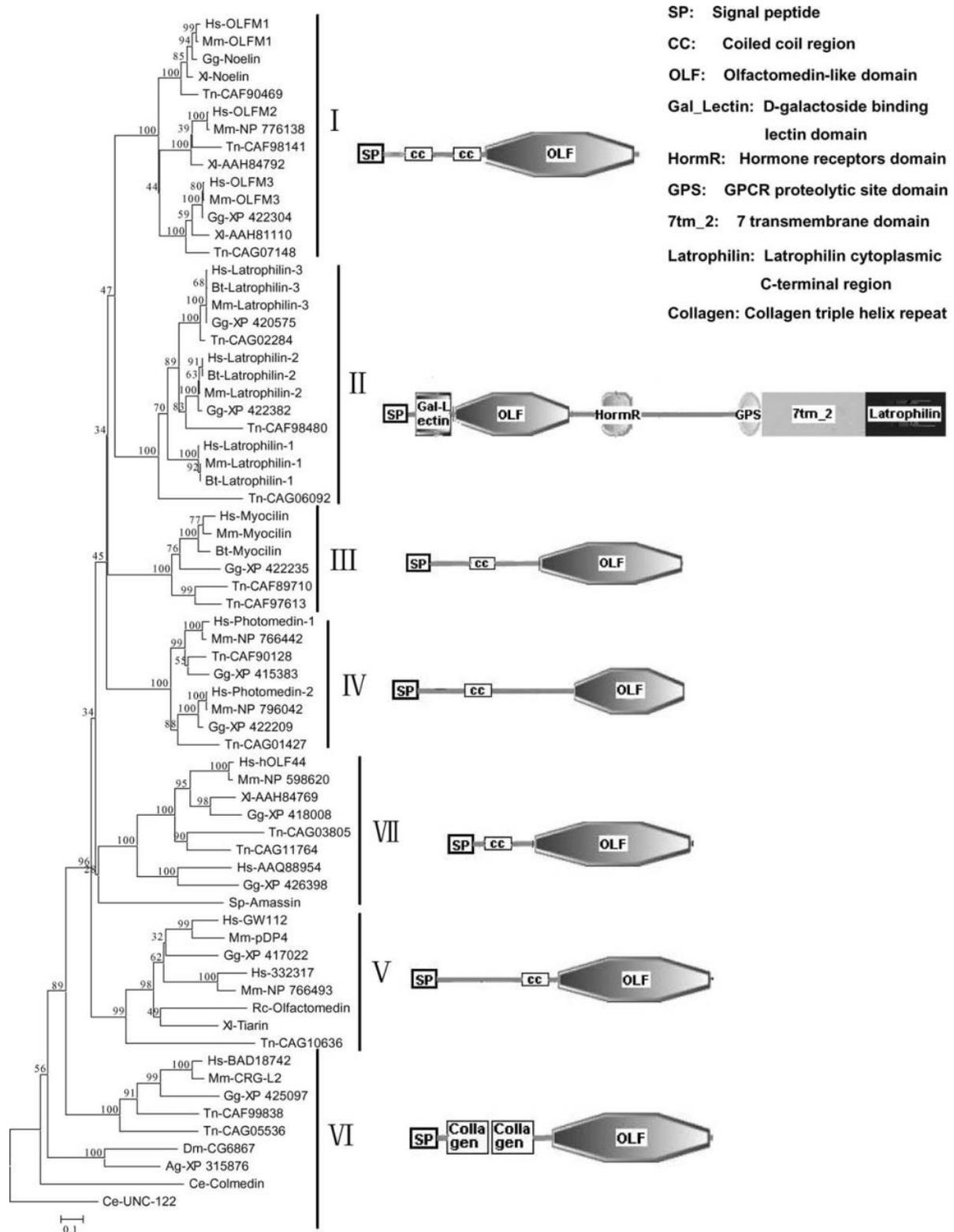
Eine Klassifikation der Proteine nahm die Arbeitsgruppe Zeng et al. vor: Hierbei wurde die Proteinfamilie u.a. durch Sequenzvergleiche und aufgrund ähnlicher biochemischer Eigenschaften in sieben Untergruppen aufgeteilt (*Abb. 1*).

Demnach können die im Verlauf der Arbeit untersuchten Proteine Olfactomedin-1 (Pancortin) und Myocilin der ersten bzw. dritten Gruppe zugeordnet werden.

Das Expressionsmuster der Olfactomedine ist äußerst vielfältig. Für einige Vertreter konnte eine Expression in neuronalem Gewebe gezeigt werden, wie z.B. für Olfactomedin-1-3 (Torrado et al., 2002; Lee et al., 2008), Gliomedin (Eshed, 2005 und 2007), Myocilin (Tomarev et al., 1998) und die Latrophiline 1-3 (Lelianova et al., 1997; Matsushita et al., 1999). Speziell im Auge werden neben den genannten auch Olfactomedin-Like 2 und 3 exprimiert (Zeng et al., 2004). Aber auch in Herz, Lunge, Leber (Wan et al., 2008), Niere (Goldwich et al., 2005), Hoden, Skelettmuskel, Thymus (Resch, Fautsch, 2008) konnten Mitglieder der Proteinfamilie nachgewiesen werden.

Über die physiologische Funktion der meisten Olfactomedine ist wenig bekannt. Entsprechend der Expression und Lokalisation der Proteine konnte allerdings eine Beteiligung an Prozessen der Neurogenese (Moreno et al., 2001), Zell-Zell-Adhäsion (Lee, Tomarev, 2007), Zellmigration (Kwon, Tomarev, 2011), Zellproliferation (Kobayashi et al., 2007; Wan et al., 2008), Apoptose (Cheng et al., 2007) oder auch an der Regulation des Zellzyklus (Kobayashi et al., 2007; Wan et al., 2008) gezeigt werden.

Obwohl Mutationen in Olfactomedin-Proteinen beim Menschen mit Erkrankungen wie dem Glaukom (Funayama et al., 2006; Adam et al., 1997) assoziiert sind, ist es erstaunlich, dass KO-Mausmodelle bzw. transgene Mäuse, die Olfactomedine überexprimieren, keine oder nur schwache Phänotypen aufweisen (Kim et al., 2001; Gould et al., 2004; Zillig et al., 2005; Cheng et al., 2007).



**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.

Eine wichtige Eigenschaft der Olfactomedine ist die Interaktion mit diversen Signalwegen. So konnte für Olfactomedin-1 und Myocilin eine Modulation des *Wnt*-Signalweges nachgewiesen werden (Nakaya et al., 2008; Kwon HS et al., 2009), bei Olfactomedin-Like 3 aus *Xenopus* zeigte sich eine Interaktion mit dem *Bone morphogenetic protein-* (*BMP*-) Signalweg (Inomata et al., 2008) und für Myocilin wurde kürzlich die Aktivierung des *Focal adhesion kinase-* (*FAK*-) Signalweges beschrieben (Kwon, Tomarev, 2011).

## I.2 Myocilin

Unter den Olfactomedinen ist Myocilin sicherlich das am intensivsten untersuchte Protein. Ein Grund hierfür dürfte sein, dass Mutationen im Myocilin- (*MYOC*-) Gen mit einer schwerwiegenden Augenerkrankung, dem Glaukom, assoziiert sind (Stone et al., 1997; Adam et al., 1997; Fingert et al., 1999 und 2002).

Das Glaukom, im Volksmund auch „grüner Star“ genannt, ist eine Erkrankung, die mit einer progredienten Degeneration von Axonen der retinalen Ganglienzellen einhergeht. Kennzeichnend für das Glaukom ist dabei, dass sich die Atrophie der Nervenfasern am Sehnervenkopf bei ihrem Austritt aus dem Auge ereignet, was sich am Patienten bei fortgeschrittener Erkrankung in charakteristischen Gesichtsfeldausfällen äußern kann (Sachsenweger, 2003).

Unter dem Begriff Glaukom ist eine Vielzahl von Erkrankungen zusammengefasst, von denen das primäre Offenwinkelglaukom (*primary open angle glaucoma; POAG*) am weitesten verbreitet ist und typischerweise einen morphologisch unauffälligen Kammerwinkel aufweist (Foster et al., 2002). Über die Ursachen der primären Glaukom-Erkrankungen ist bisher wenig bekannt. Einen bedeutenden Risikofaktor stellt die Erhöhung des Augeninnendrucks dar (Bron et al., 2008), z.B. infolge einer akuten oder auch chronischen Steigerung des Kammerwasser-Abflusswiderstandes. Darüber hinaus wurden allerdings genetische Prädispositionen identifiziert, die das Risiko einer Glaukom-Entwicklung steigern. So können u.a. Mutationen in den Genen Myocilin, Optineurin (Rezaie et al., 2002; Alward et al., 2003; Aung et al., 2003; Liu, Allingham, 2011) und möglicherweise WDR36 (Monemi et al., 2005; Hauser et al., 2006; Liu, Allingham, 2011) die Entstehung eines Glaukoms begünstigen.

Insbesondere finden sich in über 10% der Fälle von juvenilem primärem Offenwinkelglaukom und 3-4% der Patienten mit primärem Offenwinkelglaukom im Erwachsenenalter Mutationen im MYOC-Gen, die meisten davon im Bereich der Olfactomedin-Domäne (Stone et al., 1997; Adam et al., 1997; Fingert et al., 1999 und 2002; Kwon YH et al., 2009).

Myocilin, ein sezerniertes 504 Aminosäuren umfassendes Glykoprotein mit einer Masse von 55-57 kDa, wurde ursprünglich *Trabecular meshwork-inducible glucocorticoid response protein (TIGR)* genannt, nachdem seine Expression in menschlichen Trabekelwerkzellen enorm durch Dexamethason induziert werden konnte (Polansky et al., 1997). Interessanterweise kann auch klinisch eine topische oder systemische Gabe von Glukokortikoiden einen erhöhten Augeninnendruck hervorrufen und zu Symptomen führen, die denen beim primärem Offenwinkelglaukom ähnlich sind (Armaly, 1963; Becker, Hahn, 1964; Skuta, Morgan, 1996; Wordinger, Clark, 1999).

Strukturell weist das Protein wie etliche andere Vertreter der Olfactomedine am 5'-Ende ein Signalpeptid auf, was darauf hinweist, dass es sich um ein sezerniertes Protein handelt. Ferner befindet sich am 3'-Ende die charakteristische Olfactomedin-Domäne. Eine proteolytische Spaltung des Proteins durch Calpain II resultiert in zwei Fragmenten von 35 kDa (C-terminal) und 22 kDa (N-terminal), die auch im menschlichen Kammerwasser detektiert werden konnten (Russel et al., 2001).

Das Expressionsmuster von Myocilin im Organismus ist vielfältig: So werden hohe mRNA-Level in vielen Geweben des Auges vorgefunden, darunter in Trabekelwerk, Iris, Ziliarkörper und retinalem Pigmentepithel. Aber auch extraokulär wird Myocilin exprimiert, u.a. in Skelettmuskel, Brustdrüse, Thymus, Hoden und Ischias-Nerv (Stone et al., 1997; Adam et al., 1997; Tomarev et al., 1998; Ohlmann et al., 2003; Tamm, 2002). Abgesehen von oben genannten Steroiden wurden weitere Moleküle identifiziert, die die Myocilin-Expression stimulieren können, wie z.B. *Transforming growth factor- $\beta$  1* (Tamm et al., 1999) oder auch Optineurin (Park et al., 2007). Darüber hinaus wird Myocilin vermehrt unter Stressbedingungen exprimiert, insbesondere unter mechanischem und oxidativem Stress (Polansky et al., 1997; Tamm et al., 1999).

Neben seiner extrazellulären Lokalisation ist Myocilin auch intrazellulär an verschiedene Organellen assoziiert: So wurde es abgesehen von den Organellen

des klassischen Sekretionsweges wie dem Endoplasmatischem Retikulum und dem Golgi-Apparat (Clark et al., 2001a, b; Lutjen-Drecoll et al., 1998; Merts et al., 1999; O'Brien et al., 2000; Polansky et al., 2000; Stamer et al., 1998) auch in Mitochondrien (Sakai et al., 2007; Ueda et al., 2000; Wentz-Hunter et al., 2003) vorgefunden.

Die physiologische Funktion von Myocilin ist weitgehend unbekannt, zumal Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäuse keinen offensichtlichen Phänotyp aufweisen (Kim et al., 2001). Es gibt allerdings Hinweise für eine Rolle bei Zell-Matrix-Interaktionen (Shen et al., 2008; Peters et al., 2005), Zellmigration (Kwon, Tomarev, 2011) sowie bei der Ausbildung des Aktin-Zytoskeletts (Kwon HS et al., 2009). Außerdem wurde gezeigt, dass Myocilin das Auswachsen von Axonen hemmen kann (Juryneć et al., 2003; Koga et al., 2010).

Eine Interaktion mit diversen Signalwegen scheint dabei eine kritische Rolle zu spielen. So wurde eine Modulation des *Wnt*-Signalweges durch Interaktion mit Rezeptoren der *Frizzled*- (*Fzd*-) Familie wie auch mit Inhibitoren dieses Signalweges wie den *Secreted frizzled-related proteins* (*sFRP*) und dem *Wnt inhibitory factor-1* (*WIF-1*) beschrieben (Kwon HS et al., 2009).

Ferner wurde kürzlich eine Aktivierung des *Integrin-focal adhesion kinase*- (*FAK*-) *serin/threonin kinase*- (*Akt*-) Signalweges nachgewiesen. Hierbei wurde letztendlich die Beteiligung der Serin-/Threonin-Kinase *Akt* als *downstream target* postuliert, die ihrerseits mittels Phosphorylierung durch die Phosphatidylinositid-3- (*PI3*-) Kinase aktiviert wird (Kwon, Tomarev, 2011).

Intrazellulär hingegen scheint Myocilin die Funktion der Mitochondrien beeinflussen zu können, indem es durch deren Sensibilisierung apoptotische Ereignisse auslöst. (Sakai et al., 2007).

Die Myocilin-assoziierten Glaukom-Erkrankungen gehen meist mit einem z.T. massiv erhöhten Augeninnendruck einher. Eine kritische anatomische Struktur hierbei ist, wie im Abschnitt I.4 erläutert wird, das Trabekelwerk im Kammerwinkel. Da genau hier auch das höchste intraokuläre Expressionsniveau für Myocilin festgestellt werden konnte (Adam et al., 1997; Tamm et al., 1999), wurden in den letzten Jahren viele Experimente unternommen, ob Wildtyp-Myocilin oder diverse mutierte Formen Einfluss auf den Abflusswiderstand nehmen. Aufgrund vieler widersprüchlicher Ergebnisse und der Tatsache, dass auch Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäuse ebenso wie transgene

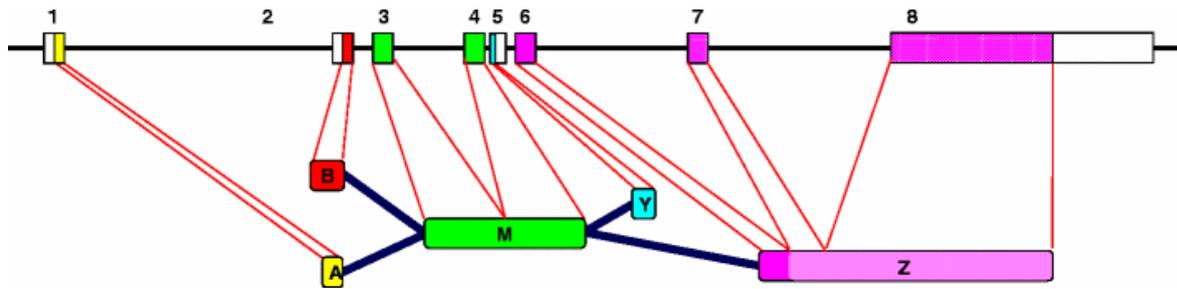
Mäuse, die Myocilin überexprimieren, keinen erhöhten intraokulären Druck aufweisen, bleibt diese Frage letztendlich unbeantwortet, sodass die Mechanismen, die zur Ausbildung des Glaukoms führen, immer noch unklar sind (Resch, Fautsch, 2008).

Eine veränderte Aminosäuresequenz aufgrund von Mutationen im Myocilin-Gen scheint hingegen Folgen für den Sekretionsvorgang zu haben. Demnach wird das mutierte Protein nicht regelrecht von der Zelle abgegeben, sondern akkumuliert im endoplasmatischen Retikulum (Caballero, Borrás, 2001; Caballero et al., 2000; Gobeil et al., 2004; Joe et al., 2003; Kanagavalli et al., 2007; Wang et al., 2007; Yam et al., 2007; Yuan et al., 2007). Dies könnte zu zellulärem Stress und schließlich zu Apoptose führen (Liu, Vollrath, 2004; Gobeil et al., 2004; Yam et al., 2007). Ein Verlust von Trabekelwerkzellen wurde interessanterweise beim primären Offenwinkelglaukom beobachtet (Alvarado et al., 1984).

### **I.3 Olfactomedin-1 (Pancortin)**

Olfactomedin-1 (Olfm1), das auch als Noelin in Huhn und *Xenopus* (Barembaum et al., 2000; Moreno et al., 2001), *Olfactomedin-related glycoprotein* in der Ratte (Danielson et al., 1994), hOlfA im Menschen (Kulkarni et al., 2000) und als Pancortin in der Maus (Nagano et al., 1998) bekannt ist, ist ein sezerniertes Glykoprotein, das ursprünglich im Riechepithel des Ochsenfrosches (Snyder et al., 1991) isoliert wurde. Aus dem Pancortin-Gen gehen vier strukturell verschiedene mRNAs hervor, die BMZ (Pancortin-1), BMY (Pancortin-2), AMZ (Pancortin-3) und AMY (Pancortin-4) genannt werden (Vgl. *Abb.2*).

Alle Transkripte enthalten eine gemeinsame M-Region. Sie unterscheiden sich allerdings hinsichtlich ihrer 5'-Regionen, die infolge unterschiedlicher Promotor-Aktivität entstehen und als A oder B bezeichnet werden, sowie hinsichtlich ihrer 3'-Regionen, die durch alternatives Spleißen hervorgebracht werden und als Y oder Z bezeichnet werden (Danielson et al., 1994).



**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.

Zu beachten ist, dass lediglich BMZ und AMZ für die beiden längeren Pancortin-Isoformen kodieren, welche die Olfactomedin-Domäne enthalten (Vgl. Abb.2).

Ferner befindet sich am Beginn der B-Region ein Signalpeptid, woraus man schließen kann, dass es sich bei den beiden Isoformen Pancortin-1 und Pancortin-2 um sezernierte Proteine handelt. Allerdings existieren Hinweise, dass auch die anderen Isoformen sezerniert werden (Nagano et al., 2000; Ando et al., 2005; Tomarev, Nakaya, 2009). Das Expressionsmuster von Olfactomedin-1 ist spezieübergreifend durchaus ähnlich. Generell kann eine Expression vorwiegend in neuronalem Gewebe festgestellt werden und zwar sowohl während der Entwicklung (Barembaum et al., 2000; Moreno et al., 2001; Moreno et al., 2005; Nakaya, Tomarev, 2007; Ando et al., 2005) als auch postnatal, wo es in hohem Maße im *Bulbus olfactorius* und im *Hippocampus* exprimiert wird (Nagano et al., 1998; Ando et al., 2005).

Diese Daten lassen auf eine wichtige Funktion von Olfactomedin-1 bei der Entwicklung und Funktion neuronaler Gewebe schließen, obwohl bisher keine Daten vorliegen, die Erkrankungen beim Menschen infolge einer Mutation im Olfactomedin-1-Gen nachwiesen. Andererseits konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Olfactomedin-1 im Huhn enorme Auswirkungen auf die Entwicklung von Neuralrohr und Neuralleiste (Barembaum et al., 2000) zu haben scheint und in *Xenopus* eine Überexpression speziell der AMY-Form zur Vergrößerung von Neuralrohr und Retina führte (Moreno et al., 2005).

Darüber hinaus führte eine Überexpression von Olfactomedin-1 im Zebrafisch zur Verdickung des Sehnerven und zur Vergrößerung von Repräsentationsfeldern im

*Tectum* des Mittelhirns, die Inhibition der Olfactomedin-1-Expression durch Morpholino-Oligonukleotide hingegen reduzierte die Größe der Augen, verhinderte das Auswachsen des Sehnerven und hatte eine erhöhte Apoptoserate im Bereich der retinalen Ganglienzellen und der inneren Körnerschicht zur Folge (Nakaya et al., 2008).

Ähnlich wie für Myocilin wurde auch für Olfactomedin-1 eine Interaktion mit dem *Wnt*-Antagonisten *Wnt-inhibitory factor 1 (WIF-1)* nachgewiesen, sodass auch Olfactomedin-1 den *Wnt*-Signalweg zu modulieren scheint (Nakaya et al., 2008). Dieser wiederum stellt bekanntermaßen einen wichtigen Signalweg in der Entwicklung mehrzelliger Organismen dar, insbesondere spielt er auch eine kritische Rolle in frühen Stadien der Augenentwicklung (Houart et al., 2002; Zilinski et al., 2004; Pézeron et al., 2006; Stigloher et al., 2006).

So könnte die wichtige Rolle von Olfactomedin-1 bei der Entwicklung durch die Modulation des *Wnt*-Signalweges erklärt werden.

Pancortin-defiziente Mäuse weisen überraschenderweise keinen offensichtlichen Phänotyp auf. Das Ausschalten der zentralen M-Region mittels eines Cre-Lox-Systems brachte Tiere hervor, die eine normale Lebenserwartung hatten und auch sonst keine Auffälligkeiten aufwiesen, abgesehen von der Tatsache, dass die homozygot defizienten Weibchen infertil waren (Cheng et al., 2007).

Allerdings zeigte sich, dass die homozygot defizienten Tiere gegen ischämischen Zelltod im Bereich des Großhirn-Kortex geschützt waren. Die erzeugte Ischämie induziert hier die Bildung eines Komplexes aus Pancortin-2 (BMY), dem Aktin-Zytoskelett-modulierenden Protein *WAVE1* und dem antiapoptotischen Protein *Bcl-xL*. Dieser Mitochondrien-assoziierte Komplex wiederum führt zu einer verstärkten Interaktion des Proteins *Bax* mit Mitochondrien, was letztendlich eine *Cytochrom c* – Freisetzung und Apoptose zur Folge hat.

Somit wirkt sich ein Fehlen von Pancortin-2 hemmend auf diese Kaskade aus und die Tiere sind vor Apoptose geschützt (Cheng et al., 2007).

Es stellt sich aufgrund dieser Befunde die Frage, ob die Abwesenheit von Pancortin auch im neuronalen Gewebe des Auges, d.h. im Bereich der Retina, eine schützende Funktion ausüben könnte.

Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass es sich bei den Tieren von Cheng et al. keineswegs um KO-Tiere handelt, sondern diese eine trunkierte Form des

Proteins exprimieren. Hierbei konnte eine Deletion der Exone M2 und Y im Pancortin-Gen festgestellt werden.

Welche funktionellen Eigenschaften dieses mutierte Protein aufweist, ist unklar. Die Daten von Cheng et al. lassen zumindest eine Funktionseinschränkung vermuten.

Zur Beantwortung der Frage, ob eine Defizienz von physiologischem Pancortin auch in der Netzhaut eine schützende Wirkung hat, wurden zwei etablierte Schadensmodelle angewendet, nämlich die Schädigung der retinalen Ganglienzellen mittels NMDA und die Schädigung der Photorezeptoren durch Licht (Siehe Abschnitt III.5.3). Das Fehlen von Pancortin hatte beim NMDA-Schadensmodell keine Auswirkungen, jedoch konnte bei Licht-induzierter Schädigung der Photorezeptoren durch Vermessung der äußeren Körnerschicht festgestellt werden, dass im Vergleich zum Wildtyp die Pancortin-defizienten Tiere empfindlicher reagierten und stärker geschädigt wurden. Dies stellte einen gegensätzlichen Effekt zu den Versuchen von Cheng et al. dar.

Ferner konnten wichtige Hinweise zur genauen Lokalisation von Pancortin gewonnen werden. Nachdem die Expression von Pancortin in der Retina bereits 2003 mittels RT-PCR nachgewiesen wurde (Tomarev et al., 2003), wiesen nun immunhistochemische Färbungen das Protein in der Interphotorezeptormatrix zwischen Photorezeptoren und retinalem Pigmentepithel nach.

#### **I.4 Anatomie des Auges**

Zum besseren Verständnis der anatomischen Zusammenhänge im Verlauf der Arbeit soll an dieser Stelle ein kurzer Abriss der Anatomie des Auges, insbesondere der Netzhaut gegeben werden.

Das Sehorgan Auge setzt sich prinzipiell zusammen aus einem optischen Apparat, dessen Aufgabe es ist, ein Bild auf die Netzhaut zu projizieren, und einem Hilfsapparat. Dazu zählen neben den äußeren Augenmuskeln, die zur korrekten Ausrichtung des Augapfels (*Bulbus oculi*) führen, auch Einrichtungen, die dem Schutz des Organs dienen, wie die Augenlider, die Bindehaut und der Tränenapparat (Kirsch, 2007).

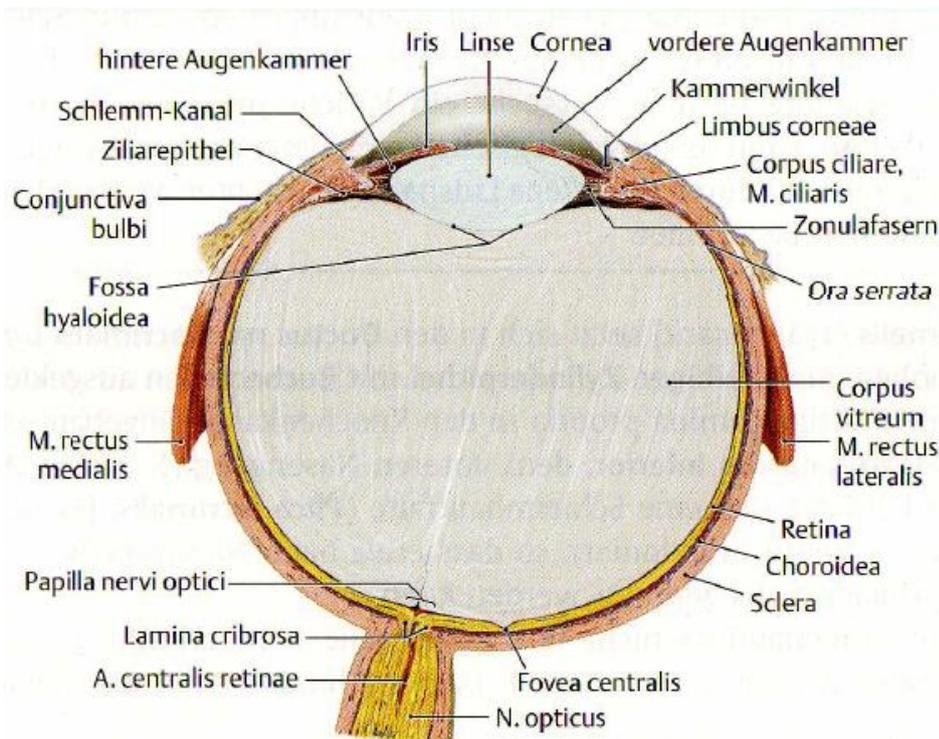
Der Augapfel selbst ist, von außen nach innen betrachtet, aus drei komplexen Schichten aufgebaut (siehe *Abb.3*):

Die äußere *Tunica fibrosa bulbi* besteht aus der Hornhaut (*Cornea*) sowie der Lederhaut (*Sclera*) und stellt eine mechanische Stabilisierung des Bulbus dar.

Die mittlere Schicht, *Tunica vasculosa bulbi*, setzt sich zusammen aus der Regenbogenhaut (*Iris*), dem Strahlenkörper (*Corpus ciliare*) und der Aderhaut (*Choroidea*), die zahlreiche kleine Blutgefäße führt. Der Aufgabenbereich dieser Schicht ist vielfältig: Die Iris gibt zum einen dem Auge durch ihre typische Pigmentierung seine charakteristische Farbe, ferner dienen die dort gelegenen *Mm. sphincter* und *dilatator pupillae* der Regelung der Pupillenweite bzw. des Lichteinfalls. Außerdem ist das Ziliarepithel an der Innenseite des Ziliarkörpers verantwortlich für die Produktion des Kammerwassers, welches den Augeninnendruck aufrecht erhält. Dieser ist unabdingbar für die Integrität der lichtbrechenden Medien (s.u.). Schließlich sorgt der *M. ciliaris*, ein zur Linse hin gerichteter glatter Muskel, für die Nah- bzw. Fern-Akkommodation. Der passive Prozess der Desakkommodation hingegen wird durch elastische Fasern der in der *Choroidea* gelegenen Bruch-Membran bewerkstelligt.

Innen schließt sich als dritte Schicht die Netzhaut (*Retina, Tunica interna bulbi*) an. Sie besteht aus einem lichtempfindlichen Teil (*Pars optica*), der vom Sehnerv bis zu einer gezackten Linie (*Ora serrata*) reicht und einem „blinden“ Teil (*Pars caeca*), der die Rückseite von Ziliarkörper und Iris bildet.

Die *Pars optica* beinhaltet das sogenannte *Stratum nervosum*, den sensorischen Abschnitt, der die zahlreichen Nervenzellen (Neurone) zur Aufnahme und Weiterleitung der Sinnesreize enthält, sowie ein *Stratum pigmentosum* (Retinales Pigmentepithel, RPE) (Kirsch, 2007).



**Abbildung 3: Schematischer Querschnitt durch das menschliche Auge**

Aus: *Duale Reihe Anatomie, Thieme Verlag, Stuttgart, 2007.*

In der *Pars optica* werden verschiedene Typen von Neuronen mit unterschiedlichen Aufgaben vorgefunden:

Die Aufnahme der Lichtreize geschieht durch die Photorezeptoren, die in Stäbchen und Zapfen unterteilt werden. Von diesen werden die Lichtreize durch Sehfärbstoffe absorbiert und über einen komplexen Mechanismus in elektrische Signale umgewandelt.

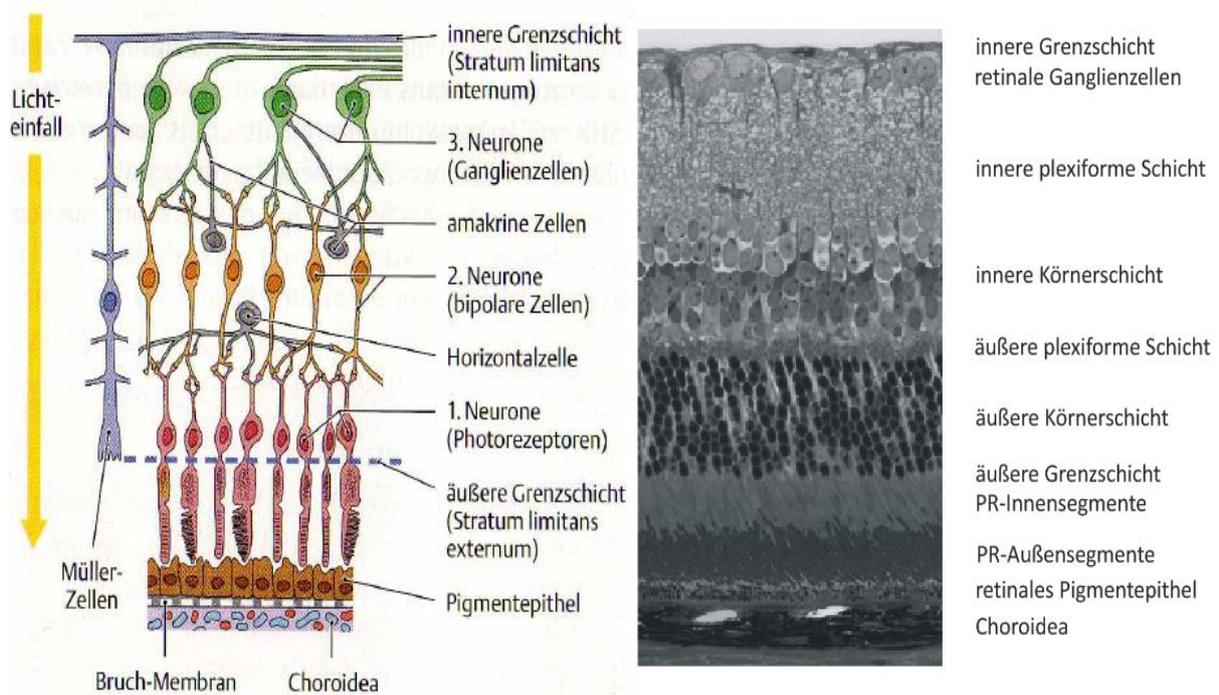
Dabei sind in den Photorezeptoren unterschiedliche Sehfärbstoffe vorhanden, die sich in ihren spektralen Absorptionskurven unterscheiden. In den Stäbchen, die für das skotopische (Dämmerungs-) Sehen verantwortlich sind, wird der Sehfärbstoff Rhodopsin vorgefunden, der aus dem Glykoprotein Opsin und dem Vitamin A-Derivat 11-cis-Retinal besteht. Das photopische (Tages- und Farben-) Sehen hingegen wird durch drei verschiedene Zapfenopsine vermittelt, die ebenfalls kovalent mit dem Lichtsensor 11-cis-Retinal in Verbindung stehen.

Ausgehend von den Photorezeptoren wird die Information über modulierende Zwischenneurone (Amakrine, Bipolar- und Horizontal-Zellen) an die retinalen Ganglienzellen weitergeleitet und gelangt letztendlich über den Sehnerv zur Verarbeitung ins Gehirn (Eysel, Grüsser-Cornehls, 2004).

Die Aufgaben des Pigmentepithels umfassen den Stoffaustausch zwischen der reich durchbluteten *Choroidea* und dem *Stratum nervosum*, die Regeneration des Lichtsensors 11-cis-Retinal, die Abschirmung der Außensegmente der Photorezeptoren gegen Photooxidation und die Phagozytose der kontinuierlich anfallenden Membranteile der Photorezeptor-Außensegmente (Strauss, 2005).

Im *Stratum nervosum* lassen sich lichtmikroskopisch neun Schichten voneinander unterscheiden (*Abb.4*):

Das *Stratum segmentorum externorum et internorum* (Schicht der Photorezeptor-Fortsätze) befindet sich ganz außen zum retinalen Pigmentepithel hingewandt und enthält die inneren und äußeren Segmente der Photorezeptoren. Es folgt das *Stratum limitans externum* (äußere Grenzmembran), das von den Fortsätzen der Müller-Gliazellen gebildet wird und das *Stratum nucleare externum* (äußere Körnerschicht; *outer nuclear layer, ONL*), das die Zellkörper (Somata) der Photorezeptoren beinhaltet. Die anderen Zelltypen der Retina sind die Amakrinen Zellen, die Bipolarzellen, die Horizontalzellen, die bereits erwähnten Müller-Stützzellen und die retinalen Ganglienzellen (*Retinal ganglion cells, RGC*). Die Zellkörper sind mit Ausnahme der Ganglienzellen alle im *Stratum nucleare internum* (innere Körnerschicht; *inner nuclear layer, INL*) lokalisiert. Die Somata der Ganglienzellen bilden zusammen mit einigen Amakrinen Zellen das *Stratum ganglionicum* (retinale Ganglienzellschicht). Zwischen der äußeren und inneren Körnerschicht befindet sich das *Stratum plexiforme externum* (äußere plexiforme Schicht; *outer plexiform layer, OPL*), das die Synapsen zwischen Bipolar-, Horizontal- und Photorezeptor-Zellen enthält. Das *Stratum plexiforme internum* (innere plexiforme Schicht; *inner plexiform layer, IPL*) hingegen enthält die Synapsen zwischen Bipolar-, Horizontal-, Amakrinen und Ganglienzellen und trennt die innere Körnerschicht von der Ganglienzellschicht. Jenseits der Ganglienzellschicht bilden die Axone der Ganglienzellen das *Stratum neurofibrarum* (Nervenfaserschicht) und ziehen zum Sehnervenaustrittspunkt (*Discus nervi optici*) und von dort als myelinisierte Axone im Sehnerv (*N. opticus*) zum *Corpus geniculatum laterale* des Zwischenhirns. Den Abschluss bildet das *Stratum limitans internum* (innere Grenzmembran) mit den Endfortsätzen der Müller-Stützzellen und einer Basalmembran (Lüllmann-Rauch, 2006).



**Abbildung 4: Zelltypen und Verschaltungen in der Netzhaut**

Zu sehen ist eine schematische Zeichnung der Zelltypen und Verschaltungen in der Netzhaut (links) sowie ein lichtmikroskopisches Bild (Färbung nach Richardson) des stratum nervosum retinae (rechts). PR=Photorezeptoren.

Linke Abbildung modifiziert nach: *Duale Reihe Anatomie, Thieme Verlag, Stuttgart, 2007.*

Zu beachten ist, dass die *Pars optica* der Retina nur an der *Ora serrata* und dem *Discus nervi optici* mit dem Retinalen Pigmentepithel fest verwachsen ist. Daher kann es relativ leicht zu partiellen Netzhautablösungen kommen. Ferner ist darauf hinzuweisen, dass am *Discus nervi optici* keine Sinneszellen vorhanden sind, weshalb dieser Punkt auch „blinder Fleck“ genannt wird, da der entsprechende Punkt des Gesichtsfelds nicht wahrgenommen werden kann.

Anatomisch zu erwähnen ist noch die *Macula lutea* („Gelber Fleck“), die gänzlich frei von Blutgefäßen temporal des *Discus nervi optici* liegt und in ihrem Mittelpunkt die *Fovea centralis* bildet, welche aufgrund der hohen Zapfen-Dichte und der annähernden 1:1-Verschaltung mit den weiterleitenden Nervenzellen den Ort des schärfsten Sehens darstellt (Kirsch, 2007).

Der Innenraum des Augapfels beherbergt die Linse (*Lens*), die Augenkammern und den Glaskörper (*Corpus vitreum*). Zusammen mit der *Cornea* bilden diese Strukturen den sogenannten „dioptrischen Apparat“, der für die Brechung des Lichts und damit für eine scharfe Abbildung des Bildes auf der Netzhaut notwendig ist. Der einfallende

Lichtstrahl wird hierbei zunächst an der Hornhaut gebrochen, die mit 40 Dioptrien den Hauptanteil des lichtbrechenden Apparates (65 Dioptrien) darstellt.

Anschließend durchdringt der Strahl das transparente Kammerwasser der Vorderkammer, welche durch die Hornhaut-Rückseite und die *Iris* begrenzt wird und über die Pupille mit der hinteren Augenkammer in Verbindung steht. Letztere befindet sich seitlich der Linse hinter der *Iris*. Nun wird das Licht an der Linse erneut gebrochen, ein Vorgang der durch die Koppelung der Linse an den *M. ciliaris* über Zonulafasern modifiziert werden kann und auf diese Weise eine Nah- bzw. Fernakkomodation ermöglicht. Vor dem Auftreffen auf die Netzhaut durchdringt der Lichtstrahl schließlich noch den Glaskörper, der aus einer gallertartigen, transparenten Masse besteht und vom Hinterrand der Linse bis zur Retina reichend den größten Raum des Auges ausfüllt (Kirsch, 2007).

Die korrekte Anordnung und Integrität des dioptrischen Apparats sowie der Netzhaut wird nicht zuletzt durch den vom Kammerwasser erzeugten intraokulären Druck bestimmt, der physiologisch etwa 15 mmHg beträgt. Das Kammerwassers wird wie oben erwähnt vom Ziliarepithel produziert und in die hintere Augenkammer abgegeben und fließt über die Vorderkammer entlang eines Druckgradienten ab. Der Ort des Abflusses ist der sogenannte Kammerwinkel zwischen *Sklera* und *Iris*. Hier fließt das Wasser durch ein feines Trabekelwerk in den sogenannten *Sinus venosus sclerae* (Schlemm-Kanal), der über zahlreiche Kanälchen mit den Kammerwasser-Venen und den episkleralen Venen in Verbindung steht. Auf diese Weise wird das Kammerwasser wieder der Blutbahn zugeführt (Kirsch, 2007).

Somit wird verständlich, dass eine erschwerte Kammerwasser-Ableitung, beispielsweise infolge eines pathologisch verändertes Trabekelwerk, schnell zu einer Erhöhung des Augeninnendrucks führen kann, was bei einigen Glaukom-Formen vorliegen kann.

## **I.5 Entwicklung der Netzhaut und des Sehnerven in der Maus**

Aufgrund der Untersuchungen zum ontogenetischen Zelltod im Kapitel IV.1.3 soll an dieser Stelle eine kurze Übersicht über die Entwicklung von Netzhaut und Sehnerv in der Maus gegeben werden. Die Entwicklung gliedert sich dabei in eine embryonale

und eine postnatale Phase, wobei im weiteren Verlauf der Arbeit Embryonal-Tage mit dem Buchstaben E und postnatale Tage mit dem Buchstaben P abgekürzt werden.

Die Entwicklung der murinen Augen beginnt in etwa ab E8 mit der Ausbildung der Sehgruben, kranialen Verdickungen im Bereich der inneren Oberfläche der Neuralfalten, die die Region der weiteren Augenentwicklung markieren.

Mit der Verschmelzung beider Neuralfalten zwischen E8 und E8.5 formen sich zu beiden Seiten die sogenannten Augenbläschen als laterale Ausstülpungen des sich entwickelnden Zwischenhirns, mit dem sie durch die Augenbecherstiele in Verbindung stehen (Kaufman, Bard, 1999). Die Augenbläschen nähern sich im Verlauf der nächsten beiden Tage dem Oberflächenektoderm an und induzieren die Bildung der Linsenplakode, aus der im weiteren Verlauf die Linse hervorgehen wird (Pei, Rhodin, 1970).

Das Augenbläschen selbst differenziert sich zwischen E10 und E12 durch Invagination zum sogenannten Augenbecher, der nun aus zwei neuroepithelialen Schichten besteht:

Die äußere Schicht bildet später das Retinale Pigmentepithel, die innere Schicht, die aus primitiven Neuroblasten besteht, stellt die zukünftige Netzhaut dar und zeigt zu diesem Zeitpunkt eine starke Proliferationsrate, die bis zur Geburt andauert (Pei, Rhodin, 1970).

Um E11.5 beginnt im Bereich der hinteren Retina das Aussprossen der Axone der sich allmählich entwickelnden retinalen Ganglienzellen, die im Bereich des Augens Stiels den zukünftigen Sehnerv bilden werden (Deiner et al., 1997).

Ab E12 differenziert sich ferner die primitive Neuroblastenschicht in eine innere Zellpopulation, aus der später die retinalen Ganglienzellen hervorgehen und eine äußere Zellpopulation, aus der sich die übrigen Neurone der zukünftigen Retina differenzieren werden. Getrennt werden diese beiden Schichten durch die innere plexiforme Schicht (Pei, Rhodin, 1970).

Zum Zeitpunkt der Geburt existieren neben den beiden Neuroblastenschichten die innere und äußere Grenzmembran sowie die Nervenfaserschicht der retinalen Ganglienzellen. Auch der Sehnerv ist bei der Geburt bereits voll ausgebildet (Pei, Rhodin, 1970; Smith et al., 2001).

Postnatal, etwa zwischen P2 und P4, beginnt der Prozess der weiteren Differenzierung der Retina im Bereich der retinalen Ganglienzellen. Im Verlauf gehen aus der äußeren Neuroblastenschicht die innere und äußere Körnerschicht hervor. Auffällig ist hierbei die hohe Apoptoserate zwischen P3 und P11, die mit der Ausreifung der verschiedenen Netzhautschichten einhergeht. Mit der Trennung von innerer und äußerer Körnerschicht durch die äußere plexiforme Schicht, die erst zwischen P6 und P8 nachgewiesen werden kann, sind schließlich alle Zellschichten der reifen Netzhaut angelegt, wobei die komplexen Differenzierungsvorgänge noch längere Zeit andauern (Young, 1984; Smith et al., 2001). Insbesondere die Reifung der Photorezeptoren nimmt einen längeren Zeitraum in Anspruch. Die mitochondrienreichen Innensegmente der Photorezeptorfortsätze entwickeln sich zwar bereits ab P2-P8, die Entwicklung und Reifung der Außensegmente hingegen findet erst ab P10-14 statt und fällt zeitlich mit dem erstmaligen Öffnen der Augen zusammen. Ab P21 ist die Netzhaut schließlich vollständig ausgereift (Young, 1984; Connolly et al., 1988).

Ein wichtiger Vorgang im Rahmen der Netzhautentwicklung ist der im Organismus weit verbreitete ontogenetische oder programmierte Zelltod. Hierbei kommt es physiologisch durch gezielte, genetisch festgelegte Apoptose-Ereignisse zur Differenzierung des Gewebes (Jacobson et al., 1997; Metzstein et al., 1998; Lockshin, Zakeri, 2001).

Bei der Entwicklung der murinen Netzhaut sind in diesem Zusammenhang zwei Zeitspannen getrennt voneinander zu beobachten, die auch funktionell verschiedenen Zielen dienen: Einerseits finden bereits pränatal v.a. im zentralen Bereich der Retina Apoptose-Vorgänge statt, um den aussprossenden Axonen der retinalen Ganglienzellen Platz für die Bildung des Sehnervs zu geben (Cuadros et al., 1988).

Zum anderen gehen auch postnatal, etwa bis zum 30. Tag nach der Geburt, bereits ausdifferenzierte Zellen in Apoptose und tragen auf diese Weise zur Histogenese bei (Young, 1984). Die verschiedenen Zelltypen nehmen dabei, wie oben beschrieben, zu unterschiedlichen Zeitpunkten am ontogenetischen Zelltod teil.

Einen Überblick über die Zelltod-Inzidenz zwischen Geburt und P30 gibt *Abb.5*.

TABLE 1. Incidence of Cell Death in Different Layers of the Mouse Retina Between Birth and 30 Days of Age<sup>1</sup>

Age (days)	Ganglion	Retinal layer							Total
		Inner plexiform	Amacrine	Bipolar + Müller	Ventricular	Inner rods	Outer rods	Mitosis	
B	2.5	0.5	0.4	—	1.5	—	—	0.1	5.0
1	1.3	0.8	0.4	—	3.4	—	—	0.1	6.0
2	6.0	0.2	0.3	—	3.0	—	—	0	9.5
3	4.5	1.0	3.8	—	9.8	—	—	0.4	19.5
4	4.0	0.5	8.0	—	10.6	—	—	0.3	23.4
5	2.7	0.8	6.3	—	—	1.8	—	0.2	21.8
6	1.2	0.7	5.2	8.7	—	6.8	1.3	0	22.2
7	0.8	0.1	5.9	7.0	—	18.3	0.2	0	33.8
8	0.9	0.3	2.7	8.5	—	10.8	0.9	0	36.9
9	0.6	0	1.3	21.3	—	4.5	1.6	0	27.9
10	0.2	0	0.7	19.9	—	3.9	0.7	0	20.6
11	0.1	0	0.4	15.1	—	2.4	2.7	—	16.0
12	0	0	0	10.4	—	—	1.2	—	8.6
13	0	0	0	7.4	—	—	2.8	—	7.6
14	0	0	0.2	4.8	—	—	1.6	—	4.8
15	0	0	0	3.0	—	—	2.2	—	3.2
16	0	0	0.1	1.0	—	—	2.9	—	3.6
17	0	0	0	0.6	—	—	2.3	—	3.0
18	0	0	0	0.7	—	—	2.1	—	2.7
19	0	0	0	0.6	—	—	0.4	—	0.4
20	0	0	0	0	—	—	0.7	—	0.7
21	0	0	0	0	—	—	0.1	—	0.1
24	0	0	0	0	—	—	0.1	—	0.1
30	0	0	0	0	—	—	0	—	0

<sup>1</sup>Average No. of dead cells (pyknotic nuclei) per 0.5- $\mu$ m section extending from optic nerve to ora serrata.

Abbildung 5: Zelltod-Inzidenz in verschiedenen Retina-Schichten nach der Geburt  
Aus: Young, 1984.

## II. Zielsetzung der Arbeit

### II.1 Myocilin

Da die meisten Daten zur Funktion von Myocilin *in vitro* erhoben wurden, sollten mit Hilfe von Myocilin-defizienten Mäusen weitere Hinweise auf eine mögliche Funktion des Proteins untersucht werden.

Aufgrund der Tatsache, dass die höchste Myocilin-Expression im Trabekelwerk nachgewiesen wurde (Adam et al., 1997; Tamm et al., 1999) und dieses zugleich eine bedeutende Rolle bei der Entstehung eines erhöhten Augeninnendrucks spielen könnte, konzentrierten sich bisher viele Untersuchungen auf den Einfluss Myocilins auf diese Struktur. Beim Glaukom handelt es sich aber um eine neurodegenerative Erkrankung, bei der es insbesondere zu einer Schädigung von Netzhaut und Sehnerv kommt. Myocilin könnte auch dort eine wichtige Funktion ausüben, sodass zunächst eine morphologische Analyse dieser Strukturen vorgenommen werden sollte. Außerdem sollte unter Berücksichtigung der Tatsache, dass Myocilin mit dem neuroprotektiven *Wnt*-Signalweg interagiert (Kwon HS et al., 2009), ein möglicher Einfluss von fehlendem Myocilin auf die Neuroprotektion in der Netzhaut in etablierten Schadensmodellen überprüft werden.

### II.2 Olfactomedin-1 (Pancortin)

Fehlendes Pancortin-2 wirkt sich bei der Induktion von Ischämie im Gehirn protektiv aus (Cheng et al., 2007). Vorversuche der Arbeitsgruppe zeigten, dass Pancortin in der Netzhaut v.a. in der Interphotorezeptormatrix lokalisiert ist und die Pancortin-Defizienz in der Netzhaut funktionell einen gegenläufigen Effekt zu den Befunden im Gehirn zur Folge hat. So wurde eine erhöhte Empfindlichkeit für eine Licht-induzierte Schädigung der Photorezeptoren beobachtet.

Dieser Befund sollte zunächst verifiziert und anschließend Hinweise auf einen möglichen Wirkmechanismus gesammelt werden.

### 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
3 MM Blotting ("Whatman")-Papiere	Neolab, Heidelberg
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nürnberg
CellScraper (Zellschaber)	Sarstedt, Nürnberg
Deckgläser, 24 x 60 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Dispomed Einmalspritzen	Dispomed Witt oHG, Geinhausen
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Glaswaren	Schott, Roth, VWR
Hamiltonspritze	Roth, Karlsruhe
Handschuhe Latex	Roth, Karlsruhe
Handschuhe Nitril	VWR, Darmstadt
Küvetten	Schott, Mainz
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
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR Plates, 96-well iCycler IQ	Biorad, München
Personna Rasierklingen	American Safety Razor Company, Verona, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Präparationsbesteck	Wild, Tuttlingen
PVDF-Western Blot Membran	Roche, Mannheim

Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
Serologische Pipetten	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
CASY® Cell Counter and Analyser TT	Schärfer, Reutlingen
Einbettautomat EM TP (Epon)	Leica, Wetzlar
Einbettautomat HMP110 (Paraffin)	Microm, Waldorf
Gelelektrophoresekammern	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Hera Cell 150 Brutschrank	Heraeus, Hanau
Hera Safe Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
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
LAS 3000 Intelligent Dark Box	Fujifilm, Düsseldorf
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
Pipettierhilfe Macroman™	Gilson, Den Haag, Niederlande

Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Kelheim
Power Gen 125 Homogenisators	Fisher Scientific, Schwerte
PowerShot G5 Digitalkamera	Canon, Krefeld
Power Supply	Consort, Turnhout, Belgien
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Sunrise-Basic ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH, Grodig, Österreich
Supercut 2050 (Paraffin)	Reichert-Jung, Kirchseeon
System V75 Autoklav	System GmbH, Wettendorf
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
0,05% Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
10x NH4 PCR-Reaction Buffer	Bioline, Luckenwalde
10x PCR-Puffer	Qiagen, Hilden
1,4-p-Phenylendiamin	Sigma, Taufkirchen
2-Dodecenylsuccinic-acid-anhydride (DDSA)	Merck, Darmstadt
2,4,6-Tri(dimethylaminomethyl) Phenol (DPM-30)	Serva, Heidelberg
Agarose NEEO RotiGarose	Biozym Scientific, Oldendorf
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS), 10% (w/v)	Roth, Karlsruhe
BC Assay Reagenz A+B	Interchim, Wörgl, Österreich
Bleicitrat	Merck, Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Borat (Natriumtetraborat)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Merck, Darmstadt

Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie®Brillant Blue R-250	Sigma, Taufkirchen
Deoxycholsäure	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Taufkirchen
dNTPs (10 mM)	Qiagen, Hilden
DMEM + GlutaMax II	PAA, Pasching, Österreich
EDTA-Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Epon	Serva, Heidelberg
Essigsäure, glazial	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolute	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FBS (fetal bovine serum)	Biochrom AG, Berlin
Ficoll	Serva, Heidelberg
Fluorescein	Qiagen, Hilden
Fluorescent Mounting Medium	Serva, Heidelberg
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Gelatine	Sigma, Taufkirchen
GeneRuler® 100 bp Plus DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Geneticindsulfat (G418)	Roth, Karlsruhe
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycidether	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Guanidinhydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB, 1% in dH <sub>2</sub> O)	Serva, Heidelberg
Hygromycin B (50 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Luminat <sup>™</sup> Western HRP Substrat	Millipore Corporation, Billerica, USA

Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> , 25 mM)	Qiagen, Hilden
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> , 50 mM)	Bioline, Luckenwalde
Methanol	Merck, Darmstadt
Methyl-Nadic-Anhydrid (MNA)	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphatmonohydrat NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
Natriummonohydrogenphosphatdihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)	Sigma, Taufkirchen
Oligonukleotide (Primer)	Invitrogen, Karlsruhe
Osmiumtetroxid	Merck, Darmstadt
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Paraffin	Engelbrecht, München
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Taufkirchen
PBS (phosphate buffered saline)	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
peqGold TriFast™ Reagenz	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pioloform	Plano, Marburg
Propylenoxid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamid-Stammlösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37% (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Roth, Karlsruhe
Staurosporin (SS)	Alexis Biochemicals, San Diego, USA
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
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector Laboratories, Burlinga
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
Cell Death Detection ELISA plus	Roche, Mannheim
Dead-End TUNEL Assay	Promega, Mannheim
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad, München
nexttec™ Genomic DNA Isolation Kit	nexttec™ Biotechnologie GmbH, Leverkusen
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 <sub>2</sub> O pH 7,2

Coomassie-Entfärbelösung	500 ml Methanol 10 ml Essigsäure mit dH <sub>2</sub> O auffüllen, ad 1 l
Coomassie-Färbelösung	40 ml Methanol 2 ml Essigsäure (glazial) 0,2 g Coomassie-Brilliant Blue R250 mit dH <sub>2</sub> O auffüllen, ad 100 ml
EM-Fixans	2,5% Paraformaldehyd 2,5% Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer
Färbelösung nach Richardson:	
Stammlösung I	1% Azur II: 5 g Azur in 500 ml dH <sub>2</sub> O
Stammlösung II	1% Methylenblau: 5 g Methylenblau in 500 ml 1% Natriumborat
Gebrauchslösung	1 Teil Stammlösung I + 1 Teil Stammlösung II + 2 Teile dH <sub>2</sub> O
Mausschwanzlyse-Puffer	50 mM KCl 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 2 mM MgCl <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit dH <sub>2</sub> 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: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ : 35,6 g auf 2 l P2: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$ : 13,8 g auf 1 l P1:P2 = 5:1 pH 7,4
RIPA ( <i>Radio Immuno Precipitation Assay</i> )-Puffer	150 mM NaCl 1 % (v/v) Tergitol 0,5 % (w/v) Deoxycholsäure 0,1 % (w/v) SDS 50 mM Tris pH 8
SDS-PAGE-Laufpuffer, 10x	250 mM Tris/HCl 400 mM Glycin 1% (w/v) SDS in $\text{dH}_2\text{O}$ lösen, ad 1 l
SDS-Probenpuffer, 4x	0,25 M Tris/HCl, pH 6,8 30% Glycerin 8% (w/v) SDS 0,02% (w/v) Bromphenolblau 10% $\beta$ -Mercaptoethanol bzw. 0,3 M DTT
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 $\text{dH}_2\text{O}$ lösen, ad 1 l
TBS, 10x	30 g Tris/HCl 80 g NaCl 2 g KCl mit $\text{dH}_2\text{O}$ ad 1 l, autoklavieren pH 7,4

TBS-T, 1x	100 ml 10x TBS 0,05% (v/v) Tween 20 mit dH <sub>2</sub> O ad 1 l
Tris/HCl, 1 M	121,14 g Tris in dH <sub>2</sub> O lösen, ad 1 l pH 6,8
Tris/HCl, 1,5 M	181,71 g Tris in dH <sub>2</sub> 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
Polyacrylamid-Sammelgel	0,68 ml dH <sub>2</sub> O 0,17 ml Rotiphorese® Gel 30 0,13 ml Tris/HCl, 1 M, pH 6,8 0,01 ml 10% SDS 0,01 ml 10% APS 0,001 ml TEMED
Polyacrylamid-Trenngel, 10%	1,9 ml dH <sub>2</sub> O 1,7 ml Rotiphorese® Gel 30 1,3 ml Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8 0,05 ml 10% SDS 0,05 ml 10% APS 0,002 ml TEMED

## III.1.5 Antikörper und Molekulargewichtstandard

Die im Folgenden aufgelisteten Antikörper wurden für die Western Blot-Analysen eingesetzt, wobei der GAPDH-Antikörper stets als Ladungskontrolle diente.

Das entsprechende Molekulargewicht der detektierten Banden wurde jeweils anhand des Protein-Molekulargewichtstandards *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* ermittelt.

**Tabelle 7: Primäre Antikörper**

Protein	Primärer Antikörper	Bezugsquelle
Akt	Monoclonal mouse anti-Akt	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
β-Catenin	Monoclonal rabbit anti β-Catenin	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
GAPDH	Monoclonal mouse anti-GAPDH-HRP	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Myocilin	Polyclonal goat anti-Myocilin (N15)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
pAkt	Monoclonal mouse anti-pAkt	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
pJNK	Monoclonal mouse anti-pJNK	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
pSmad 2	Monoclonal rabbit anti-pSmad 2	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
pSmad 3	Monoclonal rabbit anti-pSmad 3	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA

**Tabelle 8: Sekundäre Antikörper**

Sekundärer Antikörper	Bezugsquelle
Chicken-anti-rabbit-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Chicken-anti-mouse-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Chicken-anti-goat-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

## III.1.6 Oligonukleotid-Primer

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

**Tabelle 9: Oligonukleotid-Primer**

<b>PCR</b>				
<b>Primer</b>	<b>Spezies</b>	<b>Orientierung</b>	<b>Sequenz von 5´ nach 3´</b>	<b>Produktgröße</b>
Myocilin-WT	mm	Fwd Rev	CCTCACCCAGCCTCCCACT 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 GGTGCAGTCCACTTCAGTT	674 bp

<b>qPCR</b>				
<b>Primer</b>	<b>Spezies</b>	<b>Orientierung</b>	<b>Sequenz von 5´ nach 3´</b>	
GNB2L	mm	Fwd Rev	TCTGCAAGTACACGGTCCAG GAGACGATGATAGGGTTGCTG	
NGF	mm	Fwd Rev	TATACTGGCCGCAGTGAGGT GGACATTGCTATCTGTGTACGG	
BDNF	mm	Fwd Rev	AGTCTCCTGGACTCCAATGC TGCAACCGAAGTATGAAATAACC ACGGAGCTGTTGGTAAACCT	
Rac 1	mm	Fwd Rev	AGACGGTGGGGATGTAAGTCTC GACTGGGGACAGTTTTGAGAC	
ROCK 1	mm	Fwd Rev	CGCAGCAGGTTGTCGATTT GGTTTACAGATGAAAGCGGAAGA	
ROCK 2	mm	Fwd Rev	GTGATGCCTTATGACGAACCAA GAAACTGGTGATTGTTGGTGATG	
Rho A	mm	Fwd Rev	ACCGTGGGCACATAGACCT	

### III.1.7 Verwendete Tiere

Für die Tierexperimente wurden die folgenden beiden Mauslinien verwendet:

- 1) Myocilin<sup>-/-</sup>-Albino-Mäuse im Balb/c-Hintergrund
- 2) Pancortin-defiziente Mäuse im 129 SvEvBrd-Hintergrund (pigmentiert)

### III.1.8 Verwendete Zelllinien und Kulturbedingungen

Für die *in vitro* Experimente wurden die folgenden beiden Zelllinien verwendet:

- 1) HEK293-Zellen (*human embryonic kidney cells*) mit und ohne Myocilin-Überexpressionsvektor für die Gewinnung von serumfreiem Überstand.
- 2) Immortalisierte RGC-5-Zellen (*retinal ganglion cells*), die mit Staurosporin und den unter 1) erhaltenen Überständen behandelt wurden.

Beide Zelllinien waren zuvor bereits von der Arbeitsgruppe etabliert worden.

Kulturbedingungen: (jeweils bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>)

***Tabelle 10: Kulturbedingungen der verwendeten Zellen***

Zelllinie	HEK293-Myoc	HEK293	RGC-5
<b>Medium</b>	500 ml DMEM + GlutaMaxII	500 ml DMEM + GlutaMaxII	500 ml DMEM + GlutaMaxII
<b>Serumgehalt</b>	25 ml FBS	50 ml FBS	50 ml FBS
<b>Antibiotika</b>	3 ml Hygromycin B 2,5 ml G418 1 ml Gentamycin	5 ml Penicillin/Streptomycin	5 ml Penicillin/Streptomycin

## III.2 Methoden der Molekularbiologie

### III.2.1 Isolierung von DNA aus Mausschwänzen

Für die Genotypisierung der Tiere wurde zunächst die DNA aus 0,5 cm langen Mausschwanzproben isoliert. Hierfür wurden die Schwänze nach Zugabe von je 200 µl Mausschwanzlyse-Puffer mit Proteinase K einige Stunden bei 55°C und 1000 Upm im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde die Lyse durch Inaktivierung der Proteinase K für 10 min bei 95°C gestoppt.

Nach kurzer Zentrifugation (5 min bei maximaler Umdrehung) wurde der Überstand im *NanoDrop-1000 Spectrophotometer* vermessen, die DNA mit Wasser auf 50 ng/µl verdünnt und 2 µl (=100 ng) als Template für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet.

### III.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) können durch Verwendung spezifischer Primer bestimmte Bereiche der DNA soweit amplifiziert werden, dass die entstandenen Produkte durch Gelelektrophorese nachgewiesen werden können.

Die Myocilin-Genotypisierung wurde nach dem etablierten Schema von Kim et al. durchgeführt (Kim et al., 2001): Hierbei kam für die Identifikation des Wildtyp-Allels eine Primer-Kombination zum Einsatz, die ein 173 bp großes Fragment im Bereich 5'UTR/Exon 1 amplifizierte. Zur Ermittlung von Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren diente eine Primer-Kombination, die ein 800 bp großes Fragment im Deletionsbereich amplifizierte.

Konkret wurde folgender Ansatz angewandt:

**Tabelle 11: Ansatz der Myocilin-PCR**

	Myocilin-WT	Myocilin <sup>-/-</sup> -LacZ
ddH <sub>2</sub> O	12,05 µl	13,05 µl
10x PCR-Puffer	2,5 µl	2,5 µl
Primer fwd (1:10 mit ddH <sub>2</sub> O verdünnt)	1 µl	0,5 µl

Primer rev (1:10 mit ddH <sub>2</sub> O verdünnt)	1 µl	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	0,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (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
	<b>25 µl</b>	<b>25 µl</b>

Die PCR wurde schließlich in einem Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt:

**Tabelle 12: Myocilin-PCR-Programm**

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

Für die Pancortin-Genotypisierung bewährten sich Design und Schema von Cheng et al. (Cheng et al., 2007), welche zwei Primerkombinationen vorsahen:

Zur Identifikation der Wildtypen wurde ein Primerpaar verwendet („Pancortin-1“ und „Pancortin-2“), das Intron-Sequenzen amplifizierte, welche den Bereich des Exons M2 flankieren.

Die Ermittlung der Pancortin-defizienten Tiere geschah mit Hilfe eines zweiten Primerpaares („Pancortin-1“ und Pancortin-3“), das den Bereich zwischen den beiden *loxP-sites* amplifizierte (Bereich Exon M2 und Y).

Schema und PCR-Programm:

**Tabelle 13: Ansatz der Pancortin-PCR**

	„Pancortin-1“	„Pancortin-2“	„Pancortin-3“
ddH <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O verdünnt)	1 µl	1 µl	1 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl	1 µl	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (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
	<b>25 µl</b>	<b>25 µl</b>	<b>25 µl</b>

**Tabelle 14: Pancortin-PCR-Programm**

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

Für die Genotypisierung zur Untersuchung der *LeuRPE65Met*-Mutation im Rahmen der Lichtschadensversuche wurde die DNA mit dem *nexttec™ Genomic DNA Isolation Kit* nach Anleitung des Herstellers isoliert.

Die verwendeten Primer amplifizierten einen 674 bp großen Bereich, der die Mutation enthielt.

Ansatz und PCR-Programm:

**Tabelle 15: Ansatz der LeuRPE65Met-PCR**

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

**Tabelle 16: 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

Um die amplifizierten DNA-Fragmente nachweisen zu können und somit das Genotypisierungsergebnis zu erhalten, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese in einer horizontalen Elektrophoresekammer durchgeführt.

Für das Gel wurde 1 g Agarose durch Aufkochen in einer Mikrowelle in 100 ml 1x TBE-Puffer vollständig gelöst und anschließend abgekühlt. Um später unter UV-Licht-Bestrahlung das Amplifikat sichtbar machen zu können, wurden vor dem Überführen des noch flüssigen Gels in die Kammer 2 µl einer 0,01%igen Ethidiumbromid-Lösung zugegeben, die sich in die doppelsträngige DNA einlagerte. Plastikämme, die in das noch flüssige Agarosegel hineingesteckt wurden, sorgten für die Bildung von Taschen, in die die Proben aufgetragen werden konnten. Sobald das Gel ausgehärtet war, wurde die Elektrophoresekammer mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt, so dass das Gel gerade bedeckt war.

Die zu untersuchenden Proben wurden mit 6x Probenpuffer gemischt, um nach der Beladung eine Rückdiffusion zu verhindern. Bei den Myocilin-Genotypisierungen war dies aufgrund des vorher bereits zugesetzten Glycerols nicht notwendig.

Die Elektrophorese wurde 40 min bei einer Spannung von 130 V in 1x TBE-Puffer durchgeführt. Durch das Bromphenolblau im Probenpuffer konnte die Wanderstrecke der Proben abgeschätzt werden. Nach Auftrennung der DNA wurde das Gel aus der Apparatur entnommen und unter UV-Bestrahlung in einem Transilluminator mit einem Kamerasystem dokumentiert.

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

Für Expressionsanalysen, die mittels quantitativer real-time RT-PCR erfolgten, wurden Netzhäute von 10 Tage alten Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen verwendet.

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

Zur quantitativen Analyse der relativen Genexpression wurde die quantitative real-time RT-PCR eingesetzt. Bei dieser Methode dient sogenannte *complementary DNA* (cDNA), die aus RNA revers transkribiert wurde, als Ausgangsmaterial für eine Polymerasekettenreaktion.

Die exponentielle Vermehrung des PCR-Produktes kann hierbei kontinuierlich gemessen werden („*real-time*“), weil im Rahmen der Reaktion ein Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green I), der in die doppelsträngige DNA interkaliert, durch einen Laser angeregt wird und die Intensität der emittierten Fluoreszenz detektiert wird. Die Intensität der Fluoreszenz verhält sich dabei proportional zur entstehenden DNA-Menge, da SYBR-Green I ungebunden nur schwach fluoresziert (Higuchi et al., 1993).

Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz den Hintergrundwert überschreitet, wird als „*cycle-threshold*“ (CT) bezeichnet und kennzeichnet den Zyklus, ab dem die exponentielle Zunahme des Produkts stattfindet. Dieser ist abhängig von der eingesetzten cDNA-Konzentration des untersuchten Gens, weshalb er eine quantitative Aussage über die ursprünglich eingesetzte mRNA-Menge möglich macht (Roche, 2001 und 2003).

Wegen der Eigenschaft des SYBR-Green-Farbstoffs, sich in doppelsträngige DNA einzulagern, wird nach der Amplifikation eine Schmelzkurve erstellt, um entstandene Primer-Dimere von dem gesuchten Produkt unterscheiden zu können.

Zur relativen Quantifizierung wird die untersuchte Genexpression mit der Expression eines Referenzgens verglichen.

Hierfür eignen sich sogenannte „*Housekeeping*“-Gene, die sich in ihrem Expressionsniveau möglichst wenig verändern.

### III.2.4.2 RNA-Isolierung aus Netzhäuten

Für Expressionsanalysen mittels quantitativer RT-PCR wurde die RNA zunächst aus den präparierten Retinae isoliert werden. Dies erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski, Sacchi, 1987).

Dabei wurden aufgrund der Instabilität der RNA alle Arbeitsschritte mit RNase-freien Geräten, Materialien und Reagenzien unter gekühlten Bedingungen ausgeführt. Der erste Schritt bestand nach Homogenisierung des Gewebes im Aufschluss der Zellen durch das peqGold TriFast™ -Reagenz, eine einphasige Lösung mit Phenol und Guanidinisothiocyanat. Nach Zugabe von Chloroform wurde so das Homogenat in drei Phasen aufgetrennt und aus der wässrigen Phase die RNA mit Isopropanol ausgefällt.

Im Einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt:

- 200 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

Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem *NanoDrop-1000 Spectrophotometer* ermittelt, um später für die cDNA-Herstellung gleiche Mengen an RNA einsetzen zu können.

Außerdem wurde, um extreme Verunreinigungen der RNA durch Proteine auszuschließen, die Extinktion bei  $\lambda=260$  nm und  $\lambda=280$  nm gegen RNase-freies Wasser ermittelt. Bei einem Wert des Quotienten E260/E280 zwischen 1,8 und 2 wurde die RNA als rein betrachtet und für die cDNA-Herstellung verwendet.

## III.2.4.3 Herstellung von cDNA

Mittels reverser Transkription ist es möglich, RNA in cDNA umzuschreiben. Auf diese Art und Weise liegen die Informationen, die ursprünglich auf der mRNA gespeichert waren, in stabilerer Form vor und lassen sich mit PCR Techniken analysieren. Um nun die Expression speziell der mRNA beurteilen zu können, wurden als Primer für die reverse Transkription Oligo-dT-Ketten verwendet, welche an Poly-A-Enden der mRNA binden. Die Durchführung der cDNA-Synthese erfolgte mit dem *iScript cDNA Synthese Kit*. Um Verunreinigungen der RNA mit DNA abschätzen zu können, wurden pro RNA-Probe zwei Ansätze, einmal mit reverser Transkriptase („+RT“) und einmal ohne reverse Transkriptase („-RT“), angesetzt (siehe *Tabelle 17*).

***Tabelle 17: Reaktionsansatz für die cDNA-Herstellung***

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

Die reverse Transkription wurde in einem Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt:

***Tabelle 18: 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	∞

Die reverse Transkription erfolgte im 2. Schritt bei 42°C. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase schließlich bei 85°C inaktiviert. Nach dem letzten Schritt wurde die fertige cDNA bei -20°C für qPCR Analysen aufbewahrt.

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

Die Ermittlung der relativen Genexpression wurde nun mit der quantitativen real-time RT-PCR bestimmt.

Für die Analysen kam das *iQ5 Multicolor Real-Time-PCR Detection System* in Kombination mit dem *iCycler* zum Einsatz und die Detektion der PCR-Produkte erfolgte durch den Fluoreszenzfarbstoff *SYBR-Green I*.

Als Referenzgen wurde jeweils GNB2L als interner Standard zur Normalisierung verwendet.

Von jeder zu analysierenden cDNA Probe („+RT“) wurde ein Triplet untersucht.

Um mögliche DNA-Kontaminationen auszuschließen, wurde außerdem jeweils ein -RT-Ansatz pipettiert. Ergänzt wurde das Schema durch eine Negativkontrolle mit Wasser für jedes Primerpaar.

Zunächst wurde jede cDNA-Probe (+RT) und zugehöriger -RT-Ansatz mit einer Master-Mix-Lösung versetzt. Die so entstandenen +RT- und -RT-Ansätze wurden nach einem bestimmten Schema zu je 15 µl in die 96-well-Mikrotiterplatte vorgelegt:

##### „+RT“/„-RT“/H<sub>2</sub>O-Master-Mix (für einen Ansatz):

Probe („+RT“ bzw. „-RT“ oder RNase-freies Wasser)	0,2 µl
10x PCR-Puffer	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (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 wurden je 5 µl eines Primer-Mix, der die spezifischen Primer des zu untersuchenden Gens enthielt, zugegeben:

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, die Proben kurz zentrifugiert und anschließend die PCR nach folgendem Programm gestartet:

**Tabelle 19: 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	∞

Die Daten wurden mit Hilfe der *iQ Optical System Software Version 2.0 (BioRad, München)* erhoben und darin die relative Expression nach 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 (Myocilin<sup>-/-</sup>-Maus) auf die Standardbedingung (Wildtyp-Maus) bezogen.

Die Formeln für die Berechnung lauten:

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

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{Myocilin}^{-/-}) - \Delta CT (\text{Wildtyp}) \quad (2)$$

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

### III.3 Proteinbiochemische Methoden

#### III.3.1 Proteinisolierung aus Geweben mit peqGold TriFast™ - Reagenz

Für proteinbiochemische Analysen der Retinae mittels Western Blot mussten in einem ersten Schritt die zu untersuchenden Proteine aus den präparierten Netzhäuten isoliert werden.

Dies wurde, ebenso wie die RNA-Isolation, mit der peqGold TriFast™-Reagenz durchgeführt. Nach Aufschluss und Homogenisieren des Gewebes wurde wie unter III.2.4.2 beschrieben das Homogenat durch Zugabe von Chloroform in drei Phasen aufgeteilt und die RNA aus der oberen wässrigen Phase isoliert, während nun die Proteine aus der verbleibenden Phenol-Chloroform- und Interphase extrahiert werden konnten (Chomczynski, 1993).

Zunächst wurde durch 100% Ethanol die DNA abgetrennt, dann die Proteine mit Isopropanol präzipitiert, das gewonnene Proteinpellet gewaschen und in 1% SDS aufgenommen.

Im Einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt:

- 0,3 ml 100% Ethanol pro ml peqGold TriFast™ -Reagenz zugeben, vortexen
- 3 min bei RT inkubieren
- 5 min bei 4°C und 2000 g zentrifugieren
- Pellet mit DNA verwerfen
- Überstand mit 1,5 ml Isopropanol pro ml peqGold TriFast™ -Reagenz mischen
- 10 min bei RT inkubieren
- 10 min und 4°C bei 12000 g zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Proteinpellet dreimal waschen:  
20 min bei RT mit 2 ml Waschpuffer pro ml peqGold TriFast™ -Reagenz inkubieren und anschließend jeweils 5 min bei 4°C und 7600 g zentrifugieren
- 2 ml 95% Ethanol pro ml peqGold TriFast™ -Reagenz hinzugeben
- 20 min bei RT inkubieren
- 5 min bei 4°C und 7600 g zentrifugieren

- Pellet antrocknen lassen
- Pellet je nach Größe in bis zu 300 µl 1% SDS aufnehmen und bei 50°C und 750 Upm über Nacht lösen
- 10 min bei 4°C und 10000 g zentrifugieren
- Überstand mit Gesamtprotein abnehmen
- bei – 20°C lagern

### III.3.2 Bestimmung von Proteinmengen mittels BCA-Assay

Der BCA- (Bicinchoninsäure-) Assay basiert auf der Bildung von  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexen mit vorhandenen Proteinen unter alkalischen Bedingungen, welche eine Reduktion des  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  zur Folge haben. Die Menge des reduzierten Kupfers ist dabei proportional zur Menge des vorhandenen Proteins. Indirekt wird das vorhandene Protein mit Hilfe der Bicinchoninsäure sichtbar gemacht, da diese unter alkalischen Bedingungen violette Komplexe mit einwertigem Kupfer bildet. Dies kann durch Messung der optischen Dichte bei 560 nm nachgewiesen werden (Smith et al., 1985).

Mit Hilfe folgender BSA-Standardkonzentrationen wurde eine Eichkurve erstellt:

1000 µg/l, 500 µg/l, 250 µg/l, 125 µg/l, 62,5 µg/l, 31,25 µg/l.

Jeweils 10 µl der Proteinproben (unverdünnt und 1:5 verdünnt; in RIPA-Puffer) und der Standardkonzentrationen wurden auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte aufgetragen und mit 200 µl BCA-Lösung (Reagenz A : Reagenz B = 50:1) versetzt. Jede Probe wurde dabei doppelt angesetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurde die Proteinbestimmung in einem ELISA-Reader durchgeführt. Dabei wurde die Extinktion bei 560 nm photometrisch gemessen und mit der Eichgeraden verglichen, um so die Proteinkonzentration abschätzen zu können. Die endgültige Proteinkonzentration ergab sich aus dem Mittelwert der Einzelmessungen.

### III.3.3 Western-Blot

#### III.3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine für die Western Blot-Analysen wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) vorgenommen. Die Gelelektrophorese sowie die Herstellung der Polyacrylamidgele wurden nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt.

Zum Gießen eines Geles (Zusammensetzung vgl. Abschnitt III.1.4) wurde eine Apparatur der Firma *Peqlab Biotechnology GmbH* verwendet.

Anschließend wurde zuerst das Trenngel zwischen die beiden Glasplatten, die zuvor mit 70% Ethanol gereinigt worden waren, pipettiert und mit etwas Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation und Abkippen des Isopropanols wurde das Sammelgel auf das Trenngel pipettiert und ein Plastikamm in das flüssige Sammelgel gesteckt, um nach der Polymerisation Taschen für die Auftragung der Proteinproben zu erhalten.

Im Sammelgel wurden auf Grund der zum Trenngel unterschiedlichen Porengröße, des pH-Werts und der elektrophoretischen Beweglichkeit seiner Ionen die Proteine aufkonzentriert.

Im Trenngel fand hingegen eine Auftrennung nach Proteingröße statt.

Dem im Gel enthaltenen SDS kam hierbei eine wichtige Funktion zu, da es zum einen während der Elektrophorese stets für denaturierende Bedingungen sorgte und zum anderen die Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts mit einer negativen Ladung versah, sodass diese im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden konnten.

Vor dem Auftragen wurde zu den Proteinproben noch 4x SDS Probenpuffer gegeben, in dem  $\beta$ -Mercaptoethanol bzw. DTT enthalten war, um die Bildung von Disulfidbrücken bzw. Polymeren zu verhindern. Anschließend wurden die Proben noch für 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert und kurz zentrifugiert.

Nachdem das fertige Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Puffertank mit 1x Laufpuffer aufgefüllt worden war, wurden die Proben zu gleichen Volumina in die Geltaschen geladen, wobei in die erste Tasche stets 4  $\mu$ l eines Proteinmolekulargewichtsmarker vorgegeben wurden.

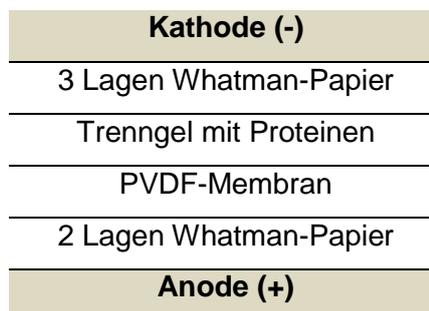
Die Auftrennung durch Gelelektrophorese erfolgte für 75 min bei 20 mA (pro Gel). Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel verworfen.

### III.3.3.2 Semidry-Blotting

Die aufgetrennten Proteine wurden aus dem Trenngel mittels Elektrobloiting auf eine Polyvinylfluorid (PVDF)-Membran übertragen, was mit Hilfe einer Semidry Blotting Apparatur bewerkstelligt wurde. Die PVDF-Membran wurde dazu auf die Größe des Trenngels zugeschnitten, kurz mit Methanol aktiviert und anschließend mit Transferpuffer äquilibriert.

Die für den Blotting-Vorgang benötigten Whatman-Papiere wurden ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtet.

Der Blot wurde wie folgt zusammengebaut (*Abb.6*):



**Abbildung 6: Aufbau des Semidry-Blots**

Beim Zusammenbau des Semidry Blots wurde darauf geachtet, dass sich zwischen Membran und Gel keine Luftblasen befanden, die den Proteintransfer behindern könnten.

Der Blotting-Vorgang erfolgte bei 25 V für 90 min.

### III.3.3.3 Nachweis spezifischer Proteinbanden

Das Prinzip des Nachweises spezifischer Proteinbanden im Rahmen von Western Blot-Analysen beruht auf dem Einsatz spezifischer Antikörper:

Zuerst wurde ein Primärantikörper gegen das gesuchte Protein hinzugefügt, welcher mit diesem einen Antikörper-Antigen-Komplex bildet. Ein für den Primär-Antikörper spezifischer Sekundär-Antikörper bindet anschließend an diesen Komplex. Durch die Koppelung des Sekundärantikörpers mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) kann dieser nach Zugabe des Substrates der Peroxidase, nämlich Luminol, durch ein Chemilumineszenz-Signal detektiert werden, welches bei der Umsetzung des Luminols in seine oxidierte Form entsteht.

Nach dem Semidry-Blot wurden die PVDF-Membranen zunächst 1 h bei Raumtemperatur mit einer Magermilch- bzw. BSA-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Dauer je nach Antikörper, vgl. Tabelle 22). Nach drei Waschschritten von je 5 min mit TBS-T wurde der Sekundärantikörper zugegeben (stets für 1 h bei Raumtemperatur).

Auch hier wurde anschließend dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen.

Bei allen Schritten wurden die Membranen in den Lösungen geschüttelt.

#### Kurzprotokolle:

**Tabelle 20: Verwendete Antikörper und Kurzprotokolle**

Protein	Blockierungslösung	Primärer AK	Sekundärer AK
<i>Akt</i>	5% MM/TBS-T	1:1000 in 0,5% MM/TBS-T 1 h RT	Chicken-anti-mouse-HRP 1:2000 in 0,5% MM/TBS-T
$\beta$ -Catenin	5% MM/TBS-T	1:1000 in 5% BSA/TBS-T Ü.N.	Chicken-anti-rabbit-HRP 1:2000 in 0,5% BSA/TBS-T
GAPDH	5% MM/TBS-T	1:10000 0,5% MM/TBS-T 1 h RT	1.AK bereits HRP-gekoppelt
Myocilin (N15)	0,5% BSA/TBS-T	1:1000 in 0,25% BSA/TBS-T Ü.N. 4°C	Donkey-anti-goat-HRP 1:2000 in 0,25% BSA/TBS-T
<i>pAkt</i>	5% BSA/TBS-T	1:500 in 5% BSA/TBS-T 2-3 h RT, dann ü.N. 4°C	Chicken-anti-mouse-HRP 1:2000 in 0,5% BSA/TBS-T

<i>pJNK</i>	5% BSA/TBS-T	1:1000 in 0,5% BSA/TBS-T Ü.N. 4°C	Chicken-anti-mouse-HRP 1:2000 in 0,5% BSA/TBS-T
<i>pSmad 2</i>	5% BSA/TBS-T	1:200 in 0,5% MM/TBS-T 1 h RT, dann ü.N. 4°C	Chicken-anti-rabbit-HRP 1:2000 in 0,5% BSA/TBS-T
<i>pSmad 3</i>	5% BSA/TBS-T	1:200 in 0,5% MM/TBS-T 1 h RT, dann ü.N. 4°C	Chicken-anti-rabbit-HRP 1:2000 in 0,5% BSA/TBS-T

Zur Detektion über die Meerrettich-Peroxidase wurden die Membranen nach dem letzten Waschschritt mit 1 ml *HRP Substrate Luminol Reagent* und *HRP Peroxidase Solution* (1:1 gemischt) in eine Folie eingeschlagen und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Chemilumineszenz-Signal wurde mit dem *LAS 3000* digital aufgenommen und entsprechend in Graustufen umgesetzt.

Zur Analyse und Quantifizierung der Chemilumineszenz-Signale wurde die Software *Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06* eingesetzt, wobei die Höhe der detektierten Banden mit Hilfe des eingesetzten Proteinmolekulargewichtsmarkers bestimmt wurde. Die Banden wurden nun densitometrisch vermessen und die Hintergrundwerte abgezogen. Zur Ladungsnormierung wurden die jeweiligen Bandenstärken zur entsprechenden GAPDH-Bandenstärke in Beziehung gesetzt und die relativen Proteinmengen ermittelt.

### III.3.4 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung wurde neben dem GAPDH-Antikörper zur Ladungskontrolle bei Western Blot Analysen herangezogen.

*Coomassie-Brilliant Blue R 250* ist ein Triphenylmethan-Farbstoff, der sich an basische Seitenketten von Aminosäuren anlagert und so Proteine unspezifisch anfärbt, wodurch das aufgetragene Gesamtprotein auf PVDF-Membranen nachgewiesen werden kann (Maniatis et al., 1989).

Für die Färbung wurden die PVDF-Membranen bzw. Polyacrylamid-Gele in die Coomassie-Färbelösung gegeben, bei Raumtemperatur für etwa 30 min inkubiert und anschließend mit Entfärbelösung über Nacht unter ständigem Schütteln gewaschen. Die Membranen bzw. Gele wurden anschließend getrocknet und mit Hilfe der *LAS 3000 Intelligent Dark Box* fotografiert.

### III.4 *In vitro* – Versuche

#### III.4.1 Allgemeine Arbeitstechniken in der Zellkultur

Sowohl die Kultivierung als auch die Behandlung der verwendeten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle verwendeten Kunststoffmaterialien waren steril verpackt. Die genutzten Glaswaren wurden vor Gebrauch autoklaviert und die verwendeten Lösungen und Puffer wurden steril filtriert. Die Herstellung steriler Lösungen und Medien, sowie der Wechsel des Mediums und die Behandlung der Zellen wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt.

#### Passagieren (Splitten):

Bei Konfluenz der Zellen wurde zum Splitten der Zellen zuerst das Medium abgesaugt und zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS wurde 1 ml 0,05% Trypsin in EDTA zugegeben und kurz inkubiert. Das Ablösen der Zellen von der Oberfläche wurde mikroskopisch überprüft und durch Zugabe von 5 ml kalziumhaltigem Medium gestoppt.

Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 1000 Upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in frischem Medium resuspendiert und in neue Zellkulturflaschen verteilt.

#### Einfrieren und Auftauen:

Die Lagerung der Zellen, die gerade nicht für Versuche verwendet wurden, erfolgte nach Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen ebenfalls durch Trypsin abgelöst, gewaschen und zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 2 ml DMSO-haltigem Einfriermedium (10% DMSO, 10% FBS in DMEM) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt.

Die Kryoröhrchen wurden in ein Einfriergefäß gegeben und über Nacht bei -80 °C langsam eingefroren (-1 °C/min). Die endgültige Lagerung erfolgte nach 24 h in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und unter leichtem Schütteln in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut. Diese Zellsuspension wurde sofort in ein 15 ml Reaktionsgefäß, in das bereits 5 ml Medium vorgelegt wurden, überführt. Nach kurzem Resuspendieren der Zellen wurde fünf Minuten bei 1000 Upm zentrifugiert.

Der Mediumüberstand wurde vollständig abgesaugt, die Zellen anschließend in 10 ml frischem Medium resuspendiert und vollständig in eine T-75 Zellkulturflasche ausgesät.

#### III.4.2 Gewinnung von serumfreiem Überstand aus HEK293-Zellen

Für die Behandlung der RGC-5-Zellen mit Myocilin-haltigem Kulturmedium wurde dieses zunächst aus HEK293-Zellen mit einem Myocilin-Überexpressionsvektor gewonnen.

Dazu wurden die HEK293-Zellen zwei Tage unter serumfreien Bedingungen kultiviert, um die Stoffwechselleistung zu minimieren und alle Zellen in den gleichen Grundzustand zu bringen.

Anschließend wurde aus dem Überstand, der aus den transfizierten Zellen erhalten wurde, das überexprimierte Myocilin mittels Western Blot nachgewiesen.

Zur Kontrolle wurden serumfreie Kulturmedien verwendet, die aus HEK293-Zellen ohne Expressions-Vektor erhalten worden waren.

#### III.4.3 Behandlung von RGC-5-Zellen

Bei RGC-5 handelt es sich um eine immortalisierte retinale Ganglienzelllinie aus der Ratte, die Ganglienzell-typische Marker exprimiert (Krishnamoorthy et al., 2001).

Trotzdem unterscheiden sich diese Zellen durch ihre Morphologie und ihre Fähigkeit zur Proliferation deutlich von untransformierten Ganglienzellen. Um aussagekräftige *in vitro* – Versuche mit RGC-5 durchführen zu können, wurden diese nach der von Frassetto et al. (Frassetto et al. 2006) vorgestellten Methode differenziert. Hierzu wurden die Zellen mit dem unspezifischen Kinaseinhibitor Staurosporin (200 nM für eine Stunde) behandelt.

Die differenzierten Zellen unterschieden sich daraufhin stark von den immortalisierten Zellen, da sie nicht nur ihre Proliferation einstellten, sondern auch ein Auswachsen von zahlreichen Axonen und Dendriten zu beobachten war. Auf diese Weise wurde ein Vergleich mit *in vivo* vorkommenden retinalen Ganglienzellen möglich.

Die Behandlung der RGC-5-Zellen mit den oben genannten Kulturmedien erfolgte unter serumfreien Bedingungen, um durch den Entzug sämtlicher Wachstumsfaktoren in den Zellen Apoptose zu induzieren (Charles et al., 2005).

Die RGC-5 Zellen wurden in einer 12-well Kulturplatte bei 37°C bis zur Konfluenz kultiviert und am Tag vor der Behandlung zunächst eine Stunde mit 200 nM Staurosporin inkubiert. Über Nacht wurden die Zellen schließlich unter serumfreien Bedingungen kultiviert.

Am Behandlungstag wurde das Medium abgesaugt, zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit je 1 ml der Kulturmedien aus den HEK293-Kulturen behandelt. Die unterschiedlich eingesetzten Antibiotika bei den HEK293-Zellen (Vgl. Abschnitt III.1.8) wurden vor den Behandlungen angeglichen, sodass in allen Medien die gleichen Antibiotika in gleicher Konzentration vorhanden waren.

In weiteren Versuchen wurden die Überstände noch mit Anti-Myocilin (N15)-Antikörper (1:100) versetzt.

Nach 20 h wurde das Medium abgesaugt, zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen nach zehnminütiger Fixierung in 4% PFA und zweimaligem Waschen mit 0,1 M Phosphatpuffer mit *Fluorescent Mounting Medium* (+DAPI) eingedeckelt.

### **III.5            *In vivo* – Versuche**

#### **III.5.1            Versuchstiere und deren Haltung**

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

Temperatur 23°C ± 2°C, relative Luftfeuchtigkeit 55% ± 5%,  
Hell-Dunkelintervall 12 h, Futter und Wasser ad libitum.

Es wurde jeden Tag zur selben Zeit überprüft und ggf. vermerkt, ob sich neue Nachkommen in den Käfigen befanden, damit eine möglichst genaue Bestimmung des Alters aller Versuchstiere sichergestellt werden konnte.

Abgesehen von den Untersuchungen zum ontogenetischen Zelltod waren die Tiere zum Versuchszeitpunkt stets sechs bis acht Wochen alt.

Für die Zucht wurden ausschließlich heterozygote Tiere untereinander verpaart, um transgene Nachkommen zu erhalten. Als Kontrolle bei allen Versuchen dienten stets Wildtyp-Geschwistertiere.

Die Ermittlung des Genotyps erfolgte mit der Polymerase-Kettenreaktion.

Alle Tiere wurden im Alter von drei Wochen von ihren Eltern abgesetzt und unter kurzer Isofluran-Narkose mit nummerierten Ohrmarken versehen, um später die Ergebnisse der Genotypisierungen den einzelnen Mäusen zuordnen zu können.

Im Anschluss wurde ein kurzes Stück (0,5 cm) des Schwanzes abgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben.

### III.5.2 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, die *Nn. ischiadici* wurden rückenmarksnah mit einem distal belassenen Muskelstück zur Orientierung abgetrennt.

Zur Vorbereitung für die Einbettung in Paraffin wurden die Augen in 4% Paraformaldehyd (PFA) überführt, im Falle einer anschließenden Einbettung in Epon wurden die Augen bzw. *Nn. ischiadici* in EM-Fixans überführt.

Um eine Fixierung des gesamten Auges, insbesondere des hinteren Augenabschnitts zu gewährleisten, wurde jeweils noch ein kleiner Schnitt in die Cornea gesetzt.

### Isolierung der Netzhäute für RNA- und Proteinisolation:

Nach Eukleation der Augen wurde mit einer Schere ein kleiner Schnitt zwischen Cornea und Sklera gesetzt und der ganze vordere Augenabschnitt zirkulär abgetrennt. Daraufhin wurde die Linse aus dem Augenbecher entfernt und die Retina vorsichtig von distal nach proximal aus dem Augenbecher herausmobilisiert.

Nun wurde die gewonnene Retina in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, das bereits 200 µl peqGold TriFast™ -Reagenz enthielt, und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### III.5.3 Schadensmodelle

#### III.5.3.1 Intravitreale Injektionen von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)

Das Prinzip des NMDA-Schadensmodells beruht auf der spezifischen exzitotoxischen Schädigung retinaler Ganglienzellen:

Als synthetisch hergestellter Ligand bindet NMDA an NMDA-Glutamat-Rezeptoren, welche unspezifische Kationen-Kanäle darstellen und u.a. eine hohe Leitfähigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen besitzen. Durch die Bindung kommt es zur Öffnung der Kanäle daraufhin zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx in die Ganglienzellen.

Da NMDA kein physiologischer Ligand ist, fehlen entsprechende Mechanismen, die zu einer Inaktivierung des NMDA-Rezeptorkomplexes führen.

Dies führt zu einer extrem langen Öffnung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals und zu einem dramatischen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Als intrazelluläres Signalmolekül kann  $\text{Ca}^{2+}$  nun zahlreiche Signalwege beeinflussen und über einen noch unbekanntem Mechanismus Apoptose induzieren (Shen et al., 2006).

Vor der Injektion wurden die Tiere durch eine Isofluran-Inhalationsnarkose betäubt. Eine mit einer 25 µl Hamiltonpipette verbundene Nadel (33 G) wurde am Augenäquator durch die Sklera in Richtung Sehnerv in den Glaskörper eingeführt. Schließlich erfolgte die Injektion von 3 µl NMDA (10 mM NMDA in PBS) bzw. 3 µl PBS als Kontrolle in den Glaskörper.

Anschließend wurde die Nadel nach etwa 20 sec Wartezeit wieder aus dem Auge entfernt, um dem Auge die Möglichkeit zu geben, den durch die Injektion bedingten erhöhten Augeninnendruck auszugleichen.

Bei jedem Versuchstier wurde jeweils in ein Auge NMDA injiziert und in das andere PBS als Kontrolle.

Drei Wochen nach der Injektion wurden die Augen der Versuchstiere präpariert, in Epon eingebettet und anschließend Semidünnschnitte von 1  $\mu\text{m}$  hergestellt.

Die Auswertung und Quantifizierung der Sehnerven erfolgte schließlich durch Zählen der Axone mithilfe der „*Count and Tag*“-Funktion des Programms „*Image Tool 3.0*“.

### III.5.3.2 Licht-induzierte Schädigung von Photorezeptoren

Photorezeptoren können durch unphysiologische Belichtung selektiv geschädigt werden. Allerdings sind die genauen Mechanismen, die zur Einleitung der Apoptose und damit zum Untergang der Photorezeptoren führen, weitgehend ungeklärt. Belegt ist nur, dass hierfür 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). Ferner gibt es Hinweise, dass abhängig von der Belichtungsstärke und -dauer verschiedene Mechanismen für die Entstehung des Lichtschadens greifen, nämlich mit bzw. ohne Abhängigkeit vom Phototransduktionsvorgang (Hao et al., 2002).

Vor dem Erzeugen des Lichtschadens erfolgte zunächst eine sechs Tage andauernde Phase der Dunkeladaptation, wobei die Versuchstiere während der ersten fünf Tage in einem speziell abgedunkelten Raum bei einer schwachen Belichtung von maximal 100 lux gehalten wurden, wohingegen die letzten 18 h vor der Bestrahlung in kompletter Dunkelheit verbracht wurden.

Im Falle der pigmentierten Pancortin-defizienten Tiere wurden 30 min vor dem Lichtschaden die Pupillen mit Mydriaticum Augentropfen unter Rotlicht geweitet. Bei den nicht-pigmentierten Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren war dies nicht notwendig.

Anschließend wurden die Tiere in kompletter Dunkelheit zu einer speziell angefertigten Lichtschadensbox gebracht und mit einer Belichtungsstärke von 14500 lux für 1 h (pigmentierte Tiere) bzw. 5000 lux für 45 min (nicht-pigmentierte Tiere) bestrahlt. Nach der Belichtung wurden die Tiere nochmals einen Tag unter schwacher Belichtung gehalten, um sich zu regenerieren.

Für die Retina-Schichtdickenvermessungen wurden die Versuchstiere eine bzw. zwei Wochen später präpariert, die entnommenen Augen in Epon eingebettet und sagittale Semidünnschnitte von 1  $\mu\text{m}$  hergestellt, die immer die *Papilla nervi optici* enthielten.

Die Quantifizierung des Lichtschadens erfolgte durch Messung der Dicke der äußeren Körnerschicht mit Hilfe des Programms „*Carl Zeiss AxioVisionLE 4.8*“.

Die Versuchstiere, die für TUNEL-Färbungen (Vgl. Abschnitt III.5.3.3) verwendet wurden, wurden bereits nach 30 h präpariert, die entnommenen Augen in Paraffin eingebettet und Sagittalschnitte hergestellt.

### III.5.3.3 Nachweis apoptotischer Zellen mittels *TUNEL-Assay*

Der *TUNEL-Assay* wurde sowohl zur Quantifizierung des Licht-induzierten Netzhautschadens als auch für die Untersuchungen zum ontogenetischen Zelltod herangezogen.

#### Prinzip:

Der *TUNEL-Assay* (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*) ist eine Methode, um apoptotische Zellen anzufärben.

Während des Apoptosevorgangs wird unter anderem die DNA durch Endonukleasen aufgespalten. Die dabei freiwerdenden 3'-Hydroxylgruppen können durch das Enzym Terminale Deoxynucleotidyl Transferase (TdT) mit markierten dNTPs versehen werden (Darzynkiewicz et al., 2008). Im Falle des verwendeten Assays erfolgte die Markierung durch 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 dH<sub>2</sub>O
- 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.

Die Auswertung erfolgte durch Auszählen der TUNEL-positiven Zellen und Normierung auf die Flächen der entsprechenden Retina-Schichten, welche mithilfe der Funktion „Kontur“ des Programms „Carl Zeiss AxioVisionLE 4.8“ gemessen wurden.

#### III.5.3.4 Apoptose-Nachweis mittels *Cell Death Detection ELISA*

Mit dem *Cell Death Detection ELISA* (*Enzyme linked immunosorbent assay*) wurde eine weitere Methode herangezogen, um Apoptose nachzuweisen und zu quantifizieren.

Mit diesem Assay können Mono- und Oligonukleosomen in der zytoplasmatischen Fraktion von Zelllysaten nachgewiesen werden, denn die unter III.5.3.3 beschriebene Aufspaltung der DNA durch Endonukleasen ereignet sich zwischen den einzelnen Nukleosomen.

Die dadurch entstandenen Mono- und Oligonukleosomen bzw. deren Histon-assoziierten DNA-Fragmente können detektiert werden und der Anteil apoptotischer Zellen quantifiziert werden (Bortner et al., 1995).

Analysiert wurden Netzhäute von Pancortin-defizienten Mäusen im Rahmen von Lichtschadensversuchen.

Dabei wurden die Retinae 30 h nach der Belichtung präpariert, in jeweils 500 µl Lysepuffer aufgenommen und homogenisiert.

Im weiteren Verlauf wurde der ELISA nach folgendem Protokoll des Herstellers durchgeführt:

- Retinae zur Zelllyse 30 min im Lysepuffer bei RT inkubieren
- 10 min bei 20.000 g Abzentrifugieren der festen Zellbestandteile
- 4 µl des Überstandes (zytoplasmatische Fraktion) abnehmen und auf ein Gesamtvolumen von jeweils 20 µl pro Ansatz mit Inkubationspuffer verdünnen
- Herstellen der Immunreagenzlösung mit 5% (v/v) Anti-Histon-Biotin-Antikörper, 5% (v/v) Anti-DNA-Antikörper (Peroxidase-konjugiert) und 90% (v/v) Inkubationspuffer

- Je 20 µl der Probenlösung und 80 µl der Immunreagenzlösung in die Vertiefung der Mikrotiterplatte geben. Dabei wurden auch eine mitgelieferte Positivkontrolle und eine Hintergrundkontrolle (Inkubationspuffer) eingesetzt.
- Mikrotiterplatte mit einer Folie abdecken und 2 h bei RT unter ständigem leichtem Schütteln inkubieren
- 3x 5 min bei RT Waschen mit jeweils 300µl Inkubationspuffer
- Zugabe von 100 µl des Substrates ABTS (2,2'-Azino-di-[3-Ethylbenzthiazolin Sulfonat (6)]) und 10-20 min Inkubation
- Zugabe von 100 µl ABTS-Stop-Lösung
- Photometrische Vermessung bei 405 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 495 nm

Jede Probe wurde als Duplikat analysiert, die Werte gemittelt und die Messwerte des Hintergrundes abgezogen.

#### III.5.3.5 Messung des Rhodopsin-Umsatzes nach Lichtschaden

Unterschiedliche Ausgangsmengen an Rhodopsin und insbesondere eine veränderte Kinetik im Rahmen der Rhodopsin-Regeneration können bei der Neuroprotektion nach Lichtschaden eine wichtige Rolle spielen (Remé et al., 1998a, b; Wenzel et al., 2001).

Beispielsweise kommt es bei gesteigerter Regeneration von Rhodopsin zu einer gesteigerten Absorption von Photonen und folglich zu einem stärkeren Schaden.

Dies wurde im Rahmen von Lichtschadensversuchen mit Pancortin-defizienten Mäusen untersucht, indem die Rohdopsin-Menge in der Retina nach folgender Methode bestimmt wurde (Kueng-Hitz et al., 2000):

Die Tiere wurden bereits zu Beginn der 18-stündigen Dunkeladaptation in vier Gruppen eingeteilt: Die erste Gruppe galt als Ausgangswert für die ursprüngliche Menge an Rhodopsin und wurde ohne Belichtung präpariert.

Die zweite Gruppe diente der Ermittlung der Rhodopsin-Menge unmittelbar nach dem Lichtschaden und die dritte bzw. vierte Gruppe wurde für die Auswertung der Rhodopsin-Menge nach 30 min bzw. 2 h herangezogen.

Wie oben beschrieben wurden 30 min vor der Belichtung die Pupillen wie mit Mydriatikum geweitet und dann der Lichtschaden bei 14500 lux erzeugt, wobei die Belichtungszeit im Rahmen dieses Versuchs nur 10 min dauerte.

Nachdem die Tiere durch zervikale Dislokation getötet worden waren, wurden die Retinae unter Rotlicht wie oben beschrieben präpariert und in 1 ml dH<sub>2</sub>O, aufgenommen. Anschließend wurden die Proben 3 min bei 15000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und 700 µl Hexadecyltrimethyl-ammoniumbromid (CTAB, 1% in dH<sub>2</sub>O) dazugegeben. Daraufhin erfolgte wieder ein Zentrifugationsschritt von 3 min bei 15000 g und es wurden 500 µl des Überstandes in schwarze 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Nun wurden die Proben in einer 100 µl-Küvette (Schichtdicke: 1 cm) photometrisch vermessen und die Absorption des Rhodopsins bei 500 nm bestimmt. Anschließend wurden jeweils die Proben unter einer Neonlampe für 90 sec bei ca. 17000 lux ausgebleicht und als Referenzwert nochmals vermessen. Die Messungen wurden jeweils mindestens fünfmal wiederholt.

Die Menge an Rhodopsin wurde mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ermittelt:

$$Rho = Vol \times \frac{\Delta A_{500}}{e \times l \times n}$$

wobei *Rho* = Menge an Rhodopsin (mol)

*Vol* = Probenvolumen (hier 0,7 ml)

$\Delta A_{500}$  = Differenz zwischen Absorption vor und nach dem Ausbleichen gemessen bei 500 nm

*e* = Extinktionskoeffizient von Rhodopsin bei 500 nm ( $4,2 \times 10^4$  cm x M)

*l* = Schichtdicke der Küvette (hier 1 cm)

*n* = Anzahl der Retinae (hier immer 2)

### III.6 Histologische Arbeitstechniken

#### III.6.1 Einbettung und Herstellung von Paraffinschnitten

Paraffinschnitte wurden für TUNEL-Färbungen hergestellt, die zur Quantifizierung von Lichtschadensversuchen und apoptotischen Ereignissen im Rahmen des ontogenetischen Zelltods dienen.

Für die Einbettung in Paraffin wurden die enukleierten Augen für mindestens 4 h in 4% PFA immersionsfixiert und danach dreimal für 10 min mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Augen 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).

Für die Ausbettung wurden die Augen aus den Einbettförmchen in Ausbettrahmen überführt und mit 65°C warmen Paraffin überschichtet, wobei die Augen aufgrund der Lage der Cornea und des *N. opticus* sagittal ausgerichtet werden konnten.

Danach wurden die Rahmen auf eine Kälteplatte gegeben, um das Paraffin erstarren zu lassen.

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.6.2 Einbettung in Epon und Herstellung von Semidünnschnitten

Die Einbettung in Epon und Herstellung von Semidünnschnitten erfolgte für diverse morphometrische Untersuchungen:

Die *Nn. optici* und *Nn. ischiadici* wurden nach Kontrastierung mit Paraphenylen-diamin für die Ermittlung der jeweiligen Axonanzahl verwendet, desweiteren wurden

Sagittalschnitte von ganzen Augen, die stets die *Papilla nervi optici* enthielten, für die Vermessung von Netzhautschichten angefertigt.

Für die Einbettung in Epon wurden die enukleierten Augen nach der Methode von Ito und Karnovski (Ito, Karnovski, 1968) in EM-Fixans für mindestens 12 h immersionsfixiert und anschließend viermal für mindestens 20 min in Cacodylatpuffer gespült. Es folgte eine Nachfixierung der Augen in 1% Osmiumtetroxid und ein erneutes Spülen mit Cacodylatpuffer, dH<sub>2</sub>O und Ethanol (25, 35, 50, 60, 70%).

Die Augen wurden daraufhin in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70, 80, 90, 100 %) entwässert und im Einbettautomaten nach Standardmethode eingebettet:

- 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 und lichtmikroskopisch betrachtet.

Anschließend wurden von ausgewählten Regionen Ultradünnschnitte (60 nm) mit Hilfe des „*Ultracut E*“-*Ultramikrotoms* angefertigt.

Diese wurden auf Kupfergrids bzw. mit Pioloform überzogenen Slotgrids aufgefangen, mit Uranylacetat (10%, 10 min) und Bleicitrat (5%, 10 min) unter Lichtabschluss kontrastiert.

### III.6.3 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 dH<sub>2</sub>O 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.7 Mikroskopie

Die Analyse der Paraffin- und Semidünnschnitte erfolgte mit Hilfe des *Axio Imager Z1-Mikroskops*.

### III.8 Auswertung und Statistik

Alle numerischen Daten wurden mit dem Programm „*Microsoft® Excel*“ (Microsoft® Corporation, Redmond, USA) durchgeführt.

Für die statistische Analyse wurde der studentische T-Test herangezogen, wobei statistisch signifikante Unterschiede für  $p < 0,05$  (\*) und statistisch hoch signifikante Unterschiede für  $p < 0,01$  (\*\*) bzw.  $p < 0,001$  (\*\*\*) angenommen wurden und über den jeweiligen Fehlerbalken vermerkt wurden.

Die Fehlerbalken stellen jeweils den Standardfehler SEM („*standard error of the mean*“) dar.

Für alle erstellten Abbildungen wurde das Programm „*CorelDraw®*“ (Corel® Corporation, Ottawa, Canada) verwendet.

## IV. Ergebnisse

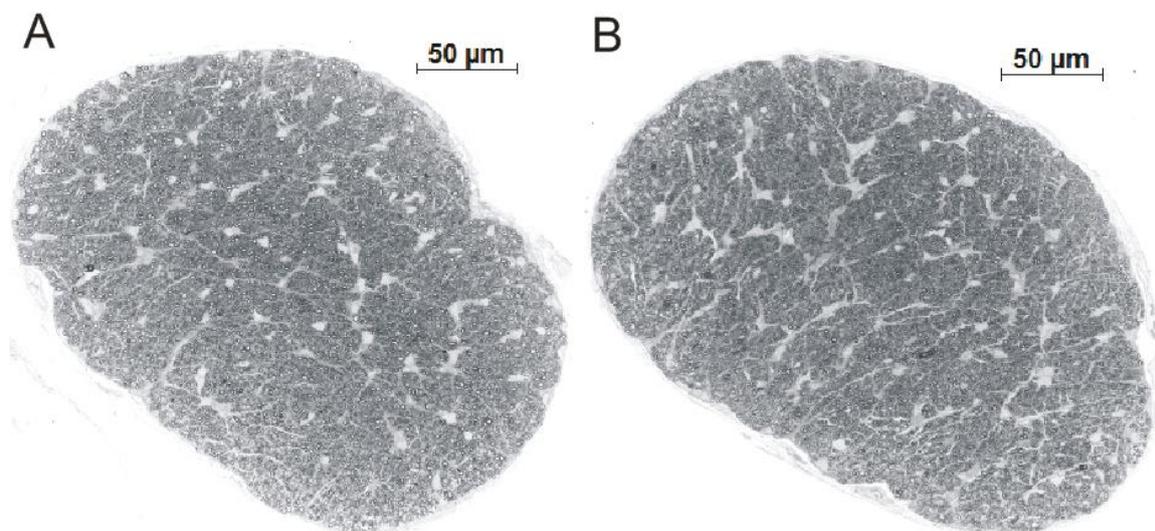
### IV.1 Myocilin

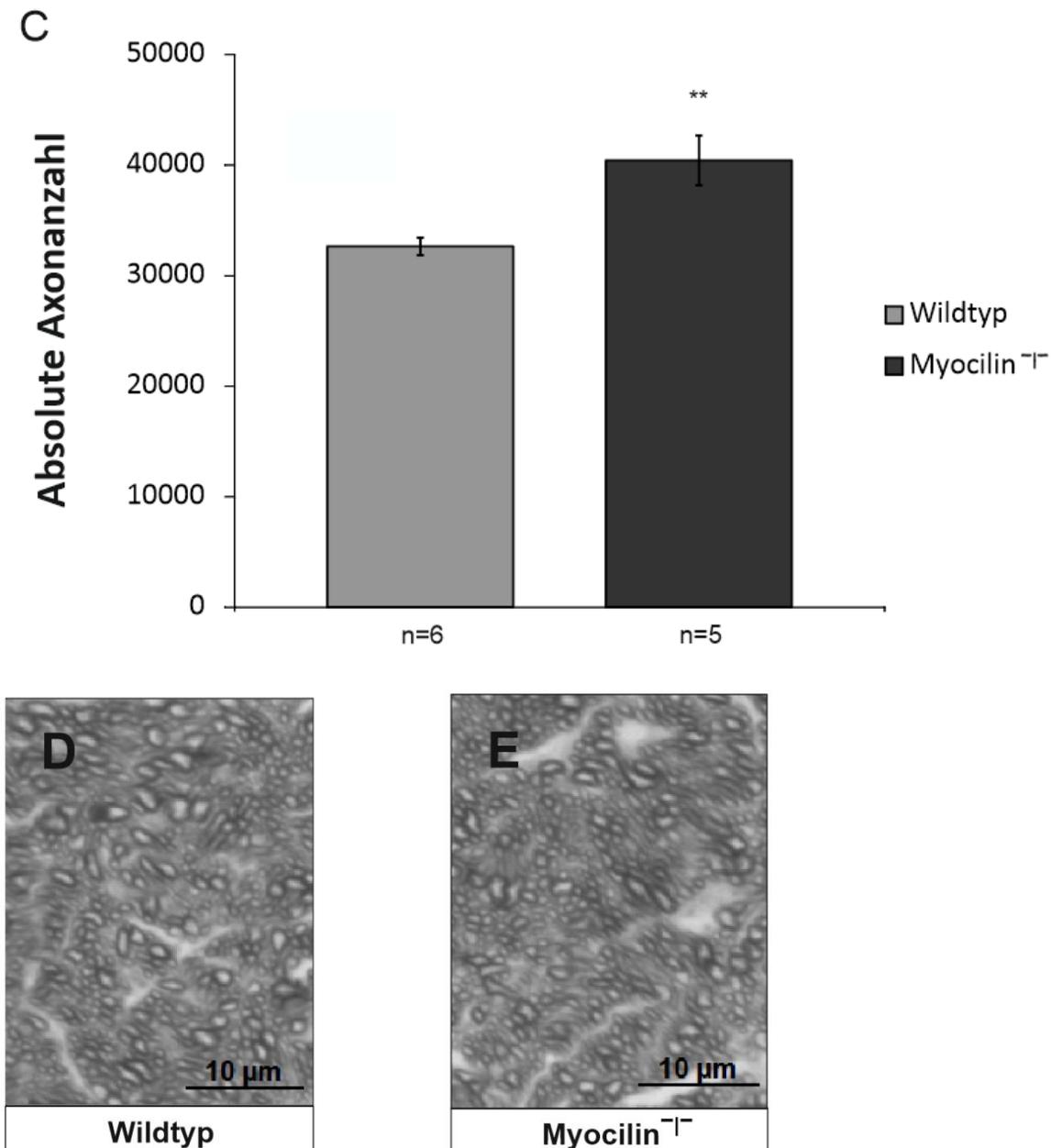
Vorbemerkung: Die Daten, die in den Kapiteln IV.1.1, IV.1.2 und IV.1.3 vorgestellt werden, wurden kürzlich von unserer Arbeitsgruppe publiziert (Koch et al., 2014). Dabei sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die beiden Autoren Marcus A. Koch und Bernd Rosenhammer gleichermaßen als Erstautoren zu betrachten sind, wobei alle in der vorliegenden Arbeit dargestellten Daten ausschließlich von mir erhoben wurden. Sämtliche Abbildungen in den oben genannten Kapiteln der vorliegenden Arbeit (Abbildungen 7-22) entstammen dieser Publikation und wurden aus Gründen der Übersicht und des Zusammenhangs teilweise modifiziert.

#### IV.1.1 Morphologische Charakterisierung der Sehnerven und Netzhäute von Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen

Zur Beurteilung der Morphologie wurden zunächst die Sehnerven von Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtyp-Geschwistertieren untersucht.

Lichtmikroskopische Aufnahmen (*Abb.7 A und B*) zeigen, dass die Struktur der Myocilin<sup>-/-</sup>-Sehnerven in der Übersicht nicht offensichtlich verändert ist im Vergleich zur Sehnervstruktur der Wildtypen. Allerdings fällt auf, dass die *Nn. optici* der Myocilin<sup>-/-</sup>-Tiere etwas dichter gepackt sind als die der Wildtypen. Aus diesem Grund wurde die exakte Anzahl der Axone in den Sehnerven durch Auszählen bestimmt.





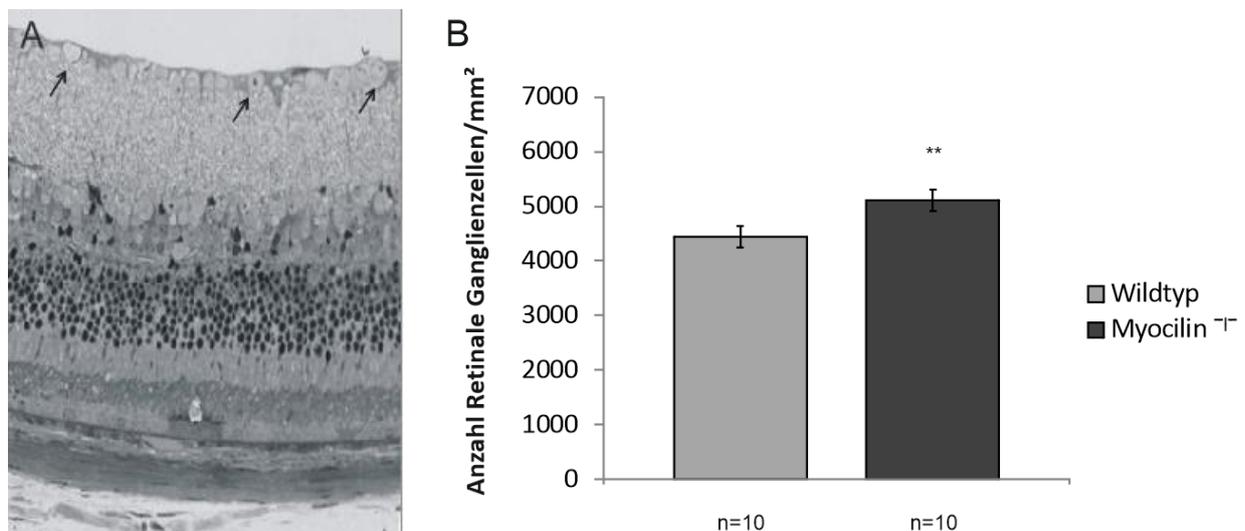
**Abbildung 7: Strukturelle und quantitative Untersuchung von Sehnerven**

Gezeigt sind lichtmikroskopische Sehnerven-Aufnahmen von Wildtypen (A) und Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren (B). Die Sehnerven der Myocilin<sup>-/-</sup>-Tiere sind strukturell intakt und unterscheiden sich nicht von denen der Wildtypen, wenngleich die der Myocilin<sup>-/-</sup>-Tiere etwas dichter wirken. Quantitativ ist die Anzahl der Axone bei den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu den Wildtypen um 23,83% erhöht (C). Mittelwerte ± SEM. \*\*p<0,01. Die Myelinisierung erscheint bei stärkerer Vergrößerung in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren (E) regelrecht und ohne Unterschied zu den Wildtypen (D).

Dabei ließ sich zeigen, dass die absolute Axonanzahl der Sehnerven in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen um 23,83% (p<0,01) im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistertieren erhöht ist (Abb.7 C). Die Myelinisierung der Axone hingegen ist lichtmikroskopisch

betrachtet in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren wie in den Wildtypen regelrecht ausgebildet (Abb.7 D und E).

Zur Unterscheidung eines rein axonalen Schadens von einer neuronalen Ursache wurde weiterhin die Zelldichte der retinalen Ganglienzellen (RGCs) in der Ganglienzellschicht ermittelt. Hierzu wurden in Sagittalschnitten die Perikaryen der RGCs anhand ihrer Größe identifiziert, gezählt und deren Anzahl pro mm<sup>2</sup> Fläche angegeben (Abb.8).

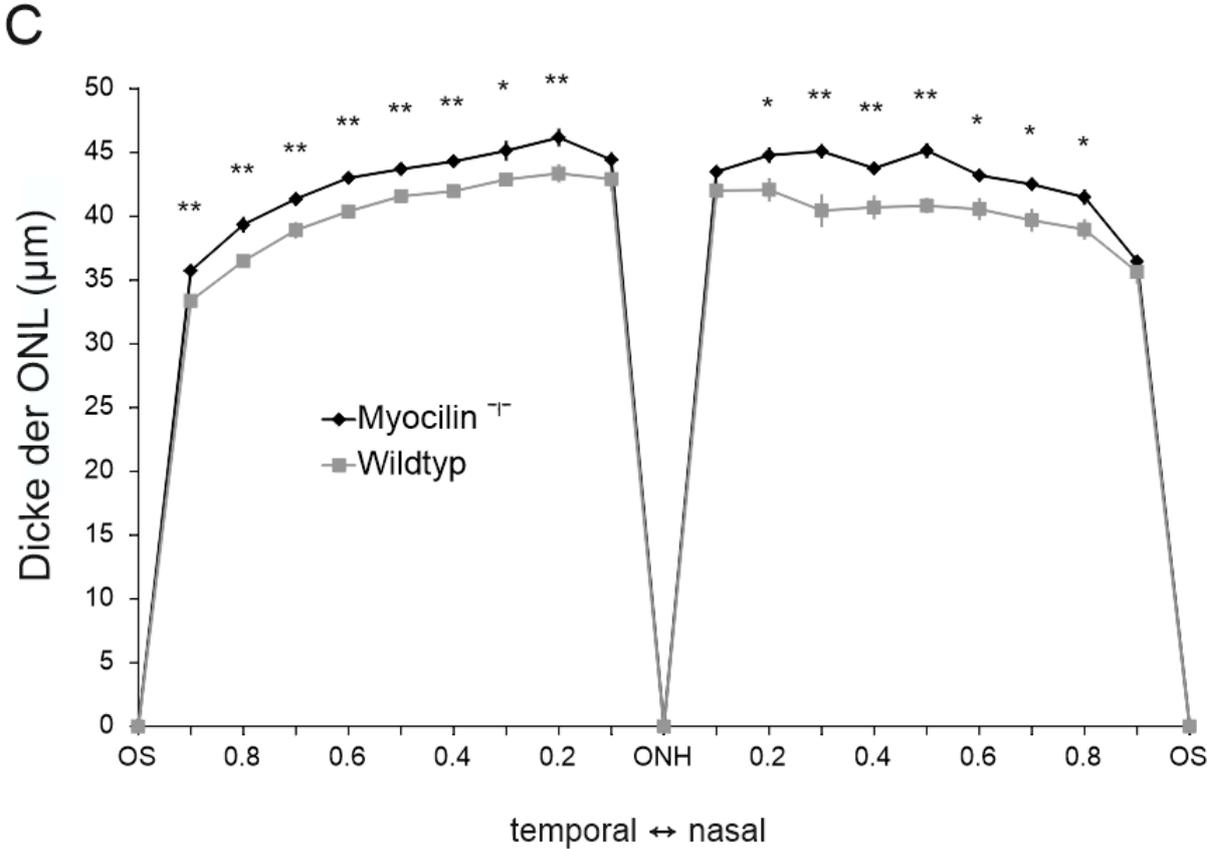
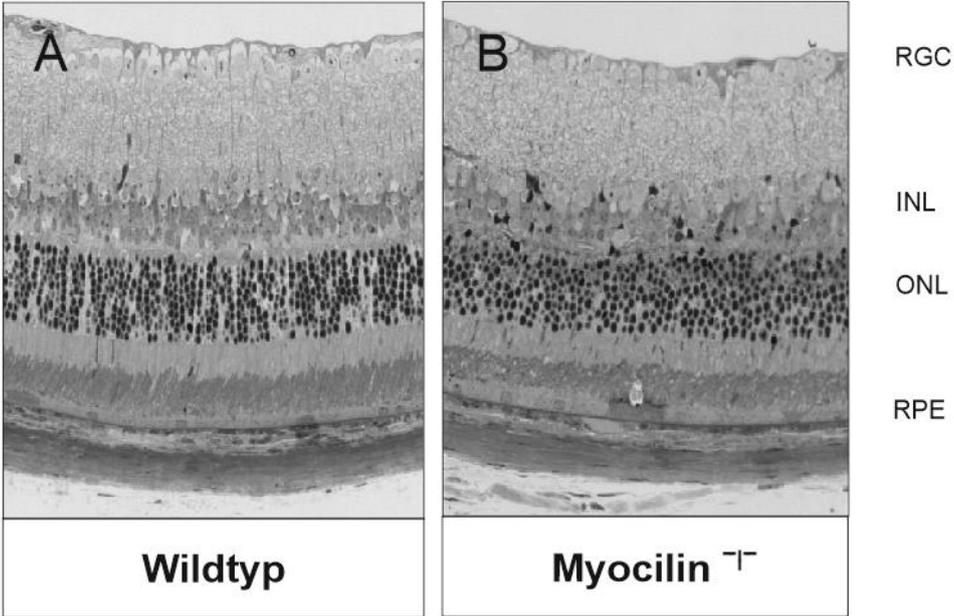


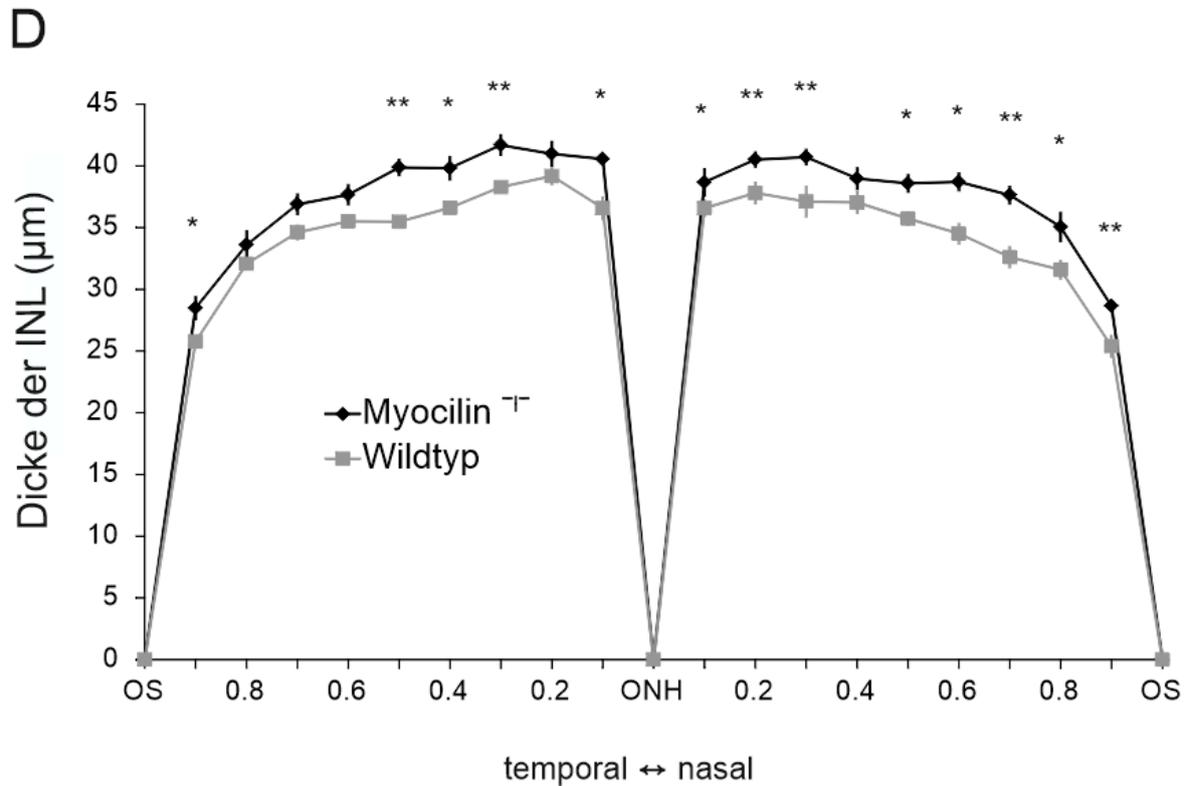
**Abbildung 8: Zelldichte der retinalen Ganglienzellen**

**A)** Die retinalen Ganglienzellen (Pfeile) wurden im Bereich der ganzen Retina gezählt und als Anzahl pro mm<sup>2</sup> Fläche angegeben. **B)** Die Zelldichte ist bei den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu den Wildtypen um 15,01% erhöht. Mittelwerte  $\pm$ SEM. \*\* $p < 0,01$ .

Obwohl auf diese Weise trotz Beachtung der Zellgröße vermutlich einige Amakrine Zellen mit in die Auswertung eingeschlossen wurden, konnte auch hier in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren eine signifikante Erhöhung von 15,01% gegenüber den Wildtypen festgestellt werden ( $p < 0,01$ ).

Zur morphologischen Untersuchung der Netzhaut wurden lichtmikroskopische Aufnahmen von Sagittalschnitten hinzugezogen. Dabei konnte zunächst festgestellt werden, dass in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen sämtliche Schichten der Netzhaut qualitativ regelrecht ausgebildet sind (Abb. 9 A und B).





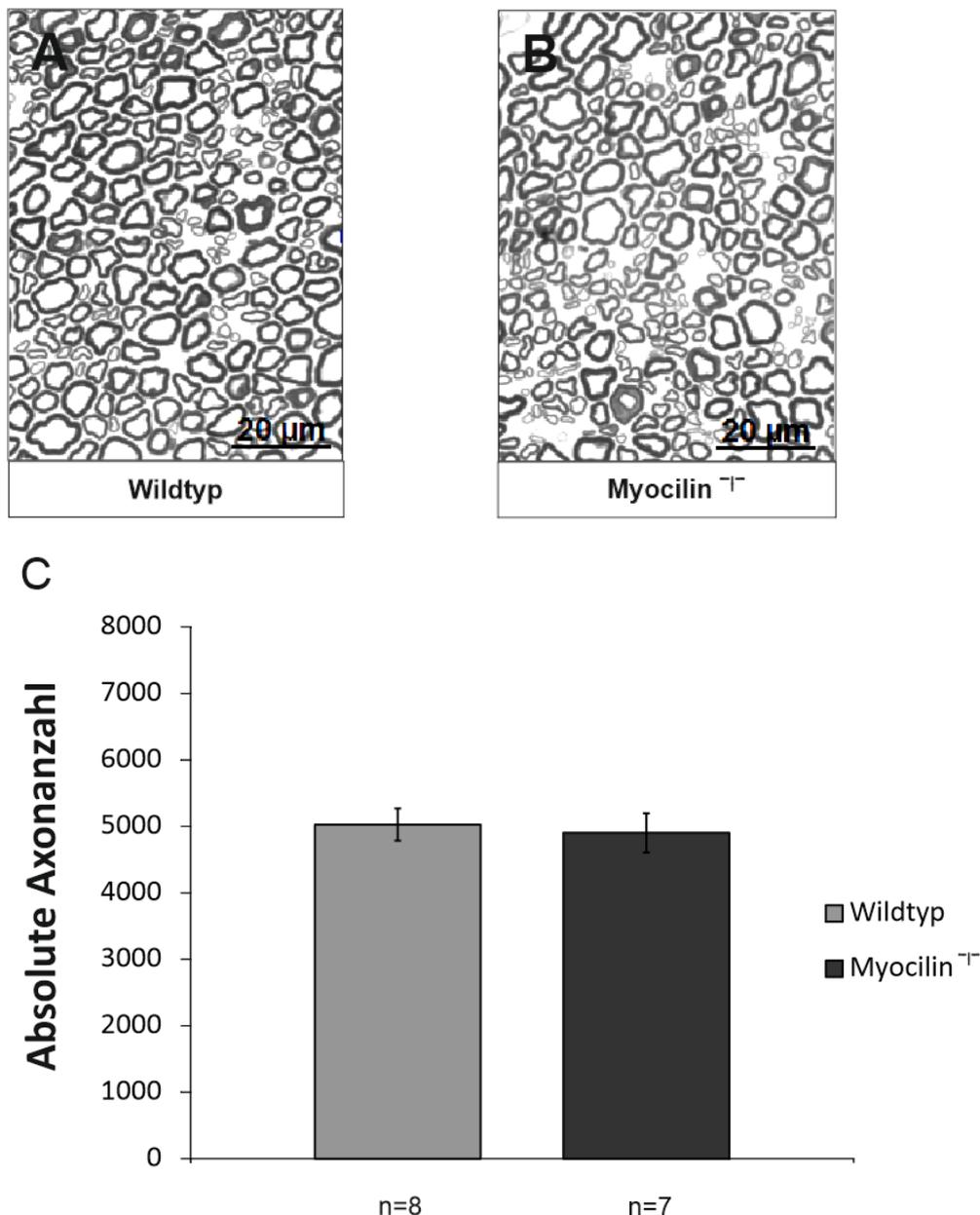
**Abbildung 9: Morphologie der Retina**

Gezeigt werden lichtmikroskopische Netzhaut-Aufnahmen nahe des Sehnervenkopfes, aus denen hervorgeht, dass alle Netzhaut-Schichten der Myocilin<sup>-/-</sup>-Tiere (B) regelrecht ausgebildet sind und sich strukturell nicht von den Wildtypen (A) unterscheiden. Der quantitative Schichtdicken-Vergleich von ONL (C) und INL (D) (jeweils n=10) zeigt, dass die Myocilin<sup>-/-</sup>-Tiere in beiden Fällen mehr Zellen in den jeweiligen Schichten besitzen. Mittelwerte ± SEM. \*p<0,05; \*\*p<0,01. OS=ora serrata, ONH=Sehnervenkopf (optic nerve head), RGC=retinale Ganglienzellen, ONL=äußere Körnerschicht, INL=innere Körnerschicht, RPE=retinales Pigmentepithel.

Die Beurteilung der Menge an Neuronen erfolgte durch Vermessung der Dicken der inneren und äußeren Körnerschicht (INL und ONL) und die Veranschaulichung der Messdaten in sogenannten Spiderdiagrammen. Hierzu wurden die Retinahälften jeweils in zehn Teile aufgeteilt und an jedem Punkt die entsprechende Schichtdicke vermessen. Die Darstellung erfolgte von temporal nach nasal, wobei die Schichtdicke der ora serrata und des Sehnervenaustrittspunkt (optic nerve head, ONH) mit 0 angegeben wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Myocilin<sup>-/-</sup>-Tiere sowohl eine signifikant dickere INL als auch ONL, d.h. mehr Zellen in beiden Schichten besitzen (p<0,05 bzw. p<0,01), wenn auch der Unterschied nicht so ausgeprägt wie im Sehnerv und der Ganglienzellschicht ist (Abb.9 C und D).

IV.1.2 Untersuchung der *Nn. ischiadici* von Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen

Zur Überprüfung der Frage, ob in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren auch periphere Nerven mehr Axone aufweisen, wurde ergänzend zu den Sehnerven die Axonanzahl der *Nn. ischiadici* von Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht und mit den Wildtypen verglichen, zumal Myocilin auch dort bereits nachgewiesen werden konnte (Ohlmann et al., 2003). Die *Nn. ischiadici* beider Gruppen unterscheiden sich jedoch weder strukturell noch quantitativ in ihrer Axonanzahl (Abb. 10).



**Abbildung 10: Strukturelle und quantitative Untersuchung von *Nn. ischiadici***

Die *Nn. ischiadici* von Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren (B) zeigen lichtmikroskopisch keine strukturelle Auffälligkeiten im Vergleich zu denen von Wildtypen (A). Auch die Anzahl der Axone unterscheidet sich nicht (C). Mittelwerte ± SEM.

#### IV.1.3 Untersuchung des Einflusses von fehlendem Myocilin auf den ontogenetischen Zelltod

Da der Beginn der retinalen Myocilin-Expression kurz vor der Geburt mit der histogenetischen Differenzierung der Netzhaut einhergeht, wurde als nächstes überprüft, ob die erhöhte Anzahl an Neuronen in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren durch eine Modulation des programmierten Zelltods während der Entwicklung erklärt werden kann.

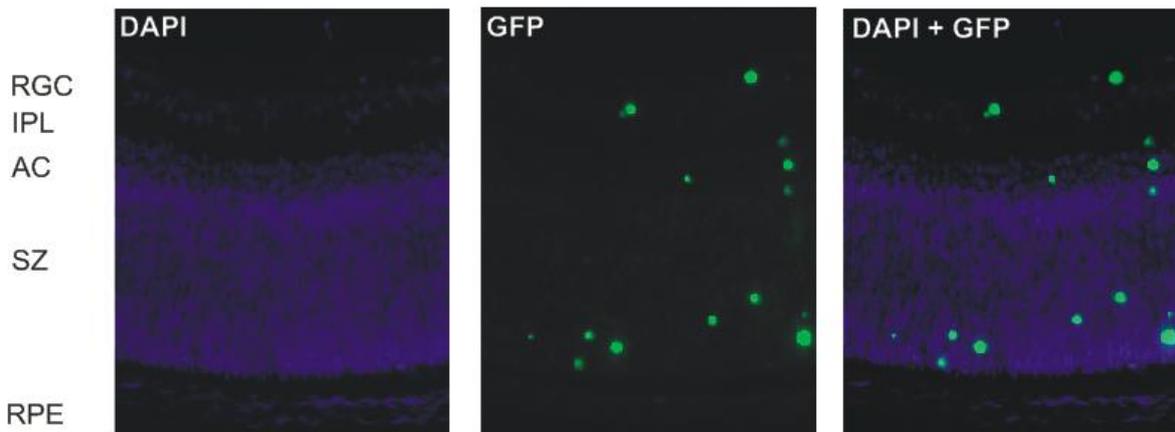
##### IV.1.3.1 TUNEL-Assays von P4-, P9- und P14-Netzhäuten

Unter Berücksichtigung der Myocilin-Expression und der Apoptoseinzidenz während der Netzhautentwicklung wurde die Apoptoserate innerhalb der Retina untersucht. Hierzu wurden TUNEL-Färbungen an drei verschiedenen Zeitpunkten, P4, P9 und P14, durchgeführt und die Apoptoserate in der gesamten Netzhaut sowie spezifisch innerhalb einzelner Schichten quantifiziert.

Zu P4 ließen sich in der murinen Netzhaut, die zu diesem Zeitpunkt erst aus zwei Zellschichten besteht, insgesamt nur wenige TUNEL-positive Zellen nachweisen (*Abb.11*), was die geringe Apoptoseinzidenz zu diesem Zeitpunkt widerspiegelt.

Es fanden sich einige apoptotische Zellen in der Ganglienzellschicht, die im Gegensatz zur ausgereiften Netzhaut noch in mehreren Lagen angeordnet ist, sowie unter den Amakrinen Zellen und den Stammzellen (*Ventricular cells*), aus denen später die Zellen der inneren Körnerschicht und die Photorezeptoren hervorgehen.

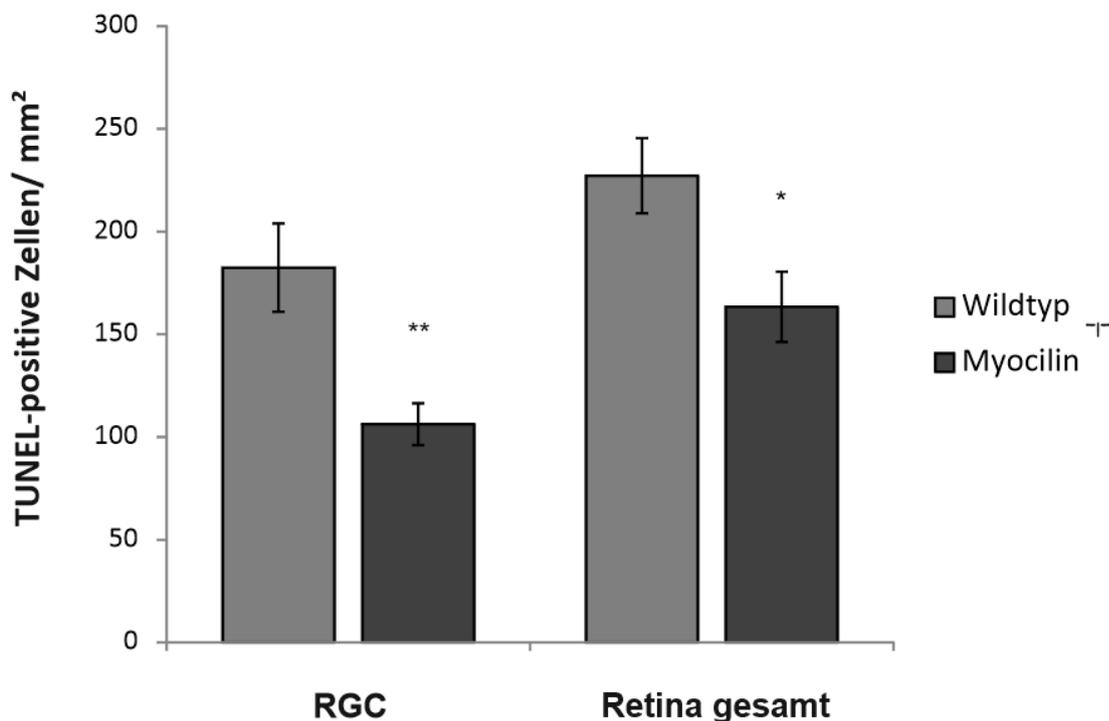
In der statistischen Auswertung (*Abb.12*) zeigten sich bei Betrachtung der gesamten Retina in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant weniger apoptotische Zellen als in den Wildtypen ( $p < 0,05$ ). Noch deutlicher wurde das Ergebnis bei der separaten Auswertung der retinalen Ganglienzellen. Hier wurden bei den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren 42,8% weniger TUNEL-positive Zellen nachgewiesen ( $p < 0,01$ ).



**Abbildung 11: TUNEL-Färbung von P4-Retinae**

Bei der TUNEL-Färbung von Netzhäuten vier Tage alter Mäuse 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. Im GFP-Kanal zeigen sich wenige apoptotische Zellen, die v.a. in der RGC-Schicht und in der Stammzellschicht lokalisiert sind.

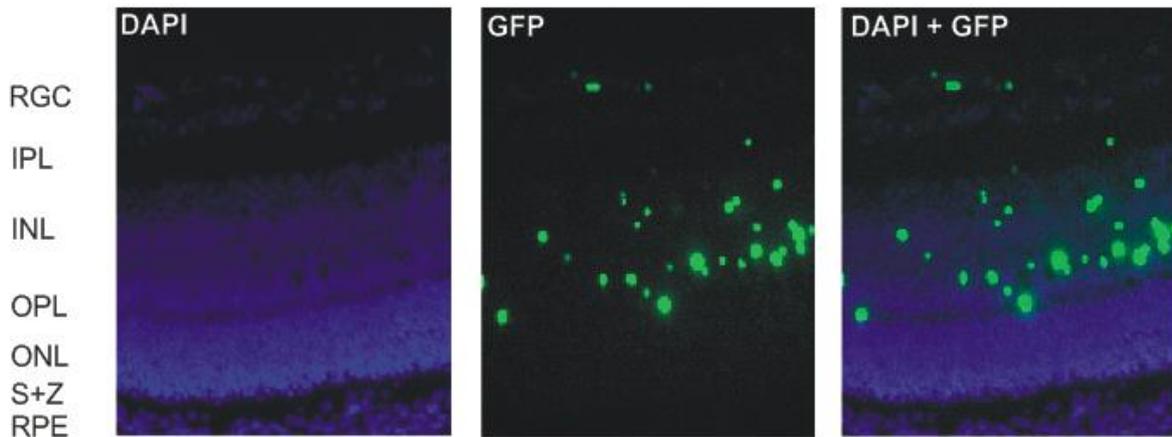
RGC=retinale Ganglienzellen, IPL=innere plexiforme Schicht, AC=Amakrine Zellen, SZ=Stammzellen, RPE=retinales Pigmentepithel.



**Abbildung 12: Anzahl TUNEL-positiver Zellen zum Zeitpunkt P4**

Die Anzahl apoptotischer Zellen ist zum Zeitpunkt P4 in der gesamten Retina der Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäuse vermindert. Bei alleiniger Betrachtung der retinalen Ganglienzellen (RGC) findet sich eine deutliche Erniedrigung der Anzahl von 42,8% gegenüber den Wildtypen.

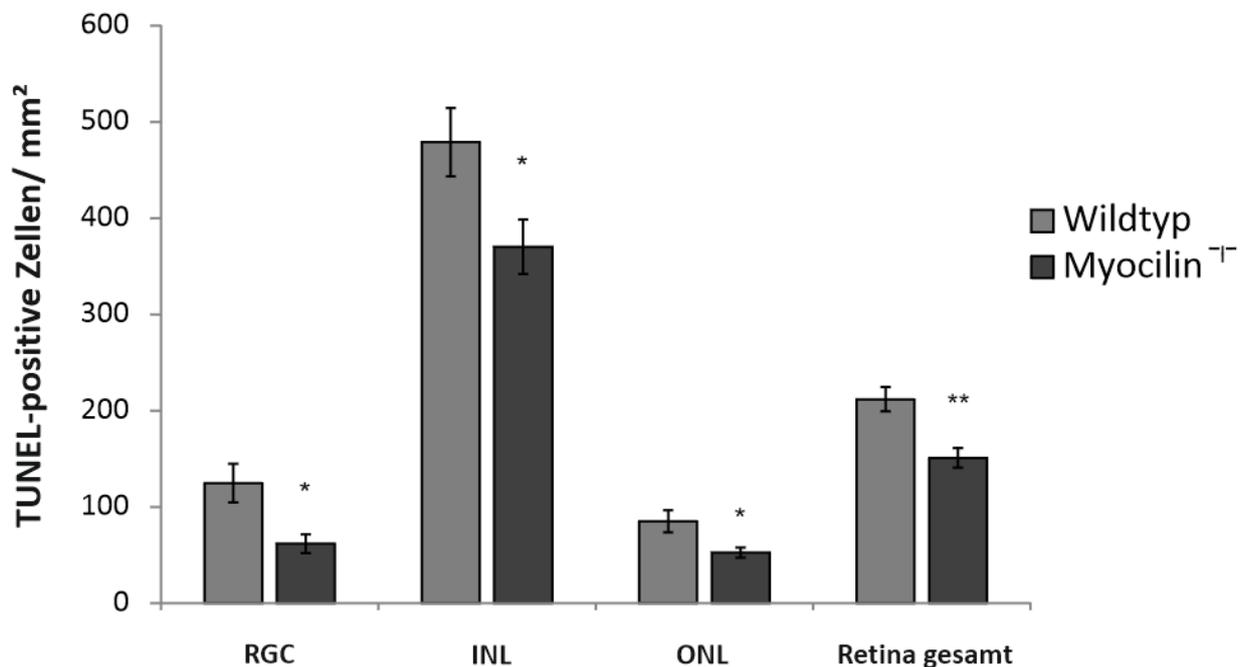
Myocilin<sup>-/-</sup>: n=7; Wildtypen: n=8. Mittelwerte ± SEM. \*p<0,05; \*\*p<0,01.  
RGC=retinale Ganglienzellen.



**Abbildung 13: TUNEL-Färbung von P9-Retinae**

Die Netzhaut am neunten Tag zeigt bereits die Ausbildung aller Schichten der reifen Retina. Im GFP-Kanal finden sich zahlreiche TUNEL-positive Zellen, die die hohe Apoptoserate zu diesem Zeitpunkt widerspiegeln.

RGC=retinale Ganglienzellen, IPL=innere plexiforme Schicht, INL=innere Körnerschicht, OPL=äußere plexiforme Schicht, ONL=äußere Körnerschicht, S+Z=Fortsätze der Stäbchen und Zapfen, RPE=retinales Pigmentepithel.

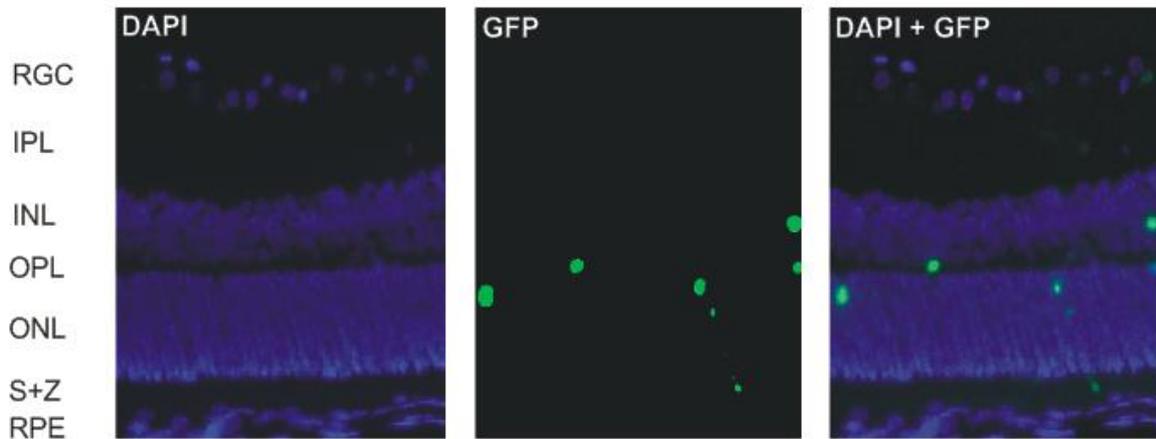


**Abbildung 14: Anzahl TUNEL-positiver Zellen zum Zeitpunkt P9**

Die erniedrigte Apoptoserate in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu den Wildtypen ist zum Zeitpunkt P9 in allen Schichten der Retina nachweisbar.

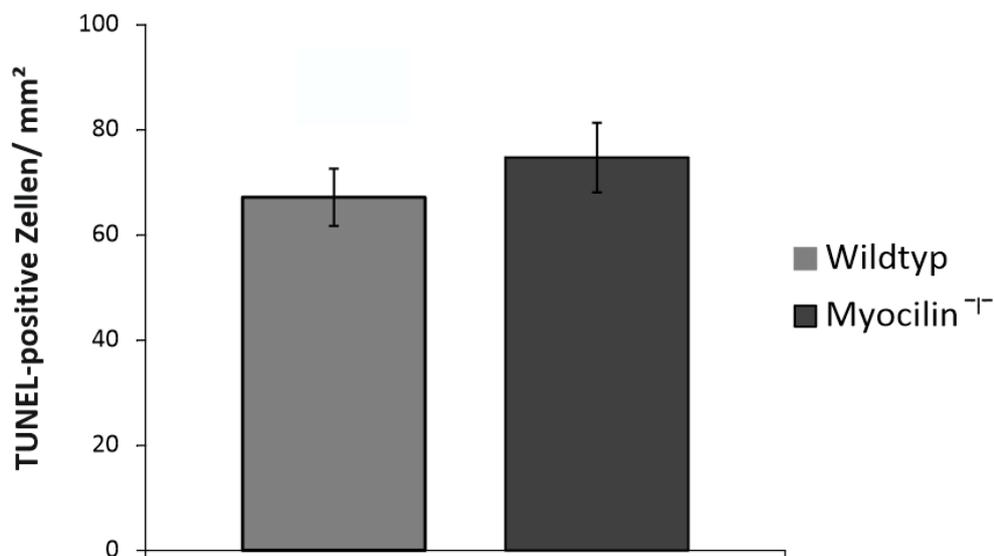
Myocilin<sup>-/-</sup>: n=7; Wildtypen: n=8. Mittelwerte ± SEM. \*p<0,05; \*\*p<0,01.

RGC=retinale Ganglienzellen, INL=innere Körnerschicht, ONL=äußere Körnerschicht.



**Abbildung 15: TUNEL-Färbung von P14-Retinae**

Am 14. Tag sind alle Schichten der murinen Retina gut erkennbar. Im GFP-Kanal sind nur noch vereinzelte apoptotische Zellen nachzuweisen, die Differenzierung ist weitgehend abgeschlossen. RGC=retinale Ganglienzellen, IPL=innere plexiforme Schicht, INL=innere Körnerschicht, OPL=äußere plexiforme Schicht, ONL=äußere Körnerschicht, S+Z=Fortsätze der Stäbchen und Zapfen, RPE=retinales Pigmentepithel.



**Abbildung 16: Anzahl TUNEL-positiver Zellen zum Zeitpunkt P14**

Es besteht kein Unterschied in der Apoptoserate zwischen Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtypen. Myocilin<sup>-/-</sup>: n=8; Wildtypen: n=9. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Deutlich mehr apoptotische Zellen in allen Zellschichten fanden sich zu P9, insbesondere im Bereich der zukünftigen inneren Körnerschicht fiel eine hohe Apoptoseinzidenz auf. (*Abb. 13*).

Bei der quantitativen Auswertung (*Abb. 14*) zeigte sich in allen Schichten eine signifikant erniedrigte Apoptoserate in den Retinae der Myocilin<sup>-/-</sup>-Tiere. Während am vierten Tag v.a. die unterschiedliche Apoptoseinzidenz der retinalen Ganglienzellen beobachtet wurde, konnte hier am neunten Tag zusätzlich eine Divergenz bei den Zellen der zukünftigen inneren und äußeren Körnerschicht festgestellt werden ( $p < 0,05$ ).

Zu P14 ließen sich qualitativ außer in einigen Zellen der inneren Körnerschicht und einigen äußeren Photorezeptoren kaum noch apoptotische Ereignisse nachweisen. (*Abb. 15*). Die statistische Auswertung zeigte zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede mehr in der Anzahl TUNEL-positiver Zellen (*Abb. 16*).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass fehlendes Myocilin offenbar einen Einfluss auf die Apoptoseinzidenz in der sich differenzierenden Netzhaut ausübt.

Bei den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren fanden sich zum Zeitpunkt P4 und P9 signifikant weniger TUNEL-positive Zellen als bei den Wildtypen. Insbesondere konnten die unter IV.1.1 beschriebenen Unterschiede der Sehnerven-Axonanzahl und der Retina-Schichtdicken durch eine verminderte Apoptoserate in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren erklärt werden, die im Falle der retinalen Ganglienzellen v.a. an P4 und im Falle der Zellen der inneren und äußeren Körnerschicht v.a. an P9 beobachtet werden konnte.

#### IV.1.3.2 Untersuchung des Einflusses von fehlendem Myocilin auf diverse Signalwege

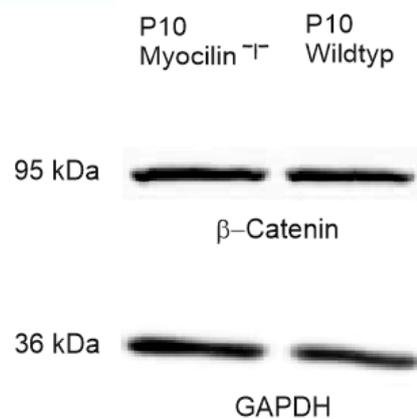
Um den Mechanismus der modulierenden Funktion von Myocilin weiter aufzuklären, wurden verschiedene Signalwege untersucht, die entweder eine wichtige Funktion im Rahmen von Entwicklung und Differenzierung einnehmen, oder von denen eine Interaktion mit Myocilin bekannt ist.

Für die Analysen wurden aufgrund der erhöhten Apoptoserate in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren, die in den Vorversuchen deutlich wurde, Netzhäute von P10-Tieren verwendet.

#### IV.1.3.2.1 Kanonischer *Wnt*-Signalweg

Da Myocilin in der Lage ist, sowohl mit Rezeptoren, aber auch mit Antagonisten des *Wnt*- $\beta$ -Catenin-Signalwegs in Wechselwirkung zu treten (Kwon HS et al., 2009), wurde überprüft, ob der Grund für die verminderte Apoptoseinzidenz in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren in einer gesteigerten Aktivierung dieses neuroprotektiven Signalwegs zu suchen ist.

Die Menge an  $\beta$ -Catenin in der Netzhaut wurde mittels Western-Blot quantifiziert (Abb.17). Hierbei zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen P10-Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren und Wildtypen.



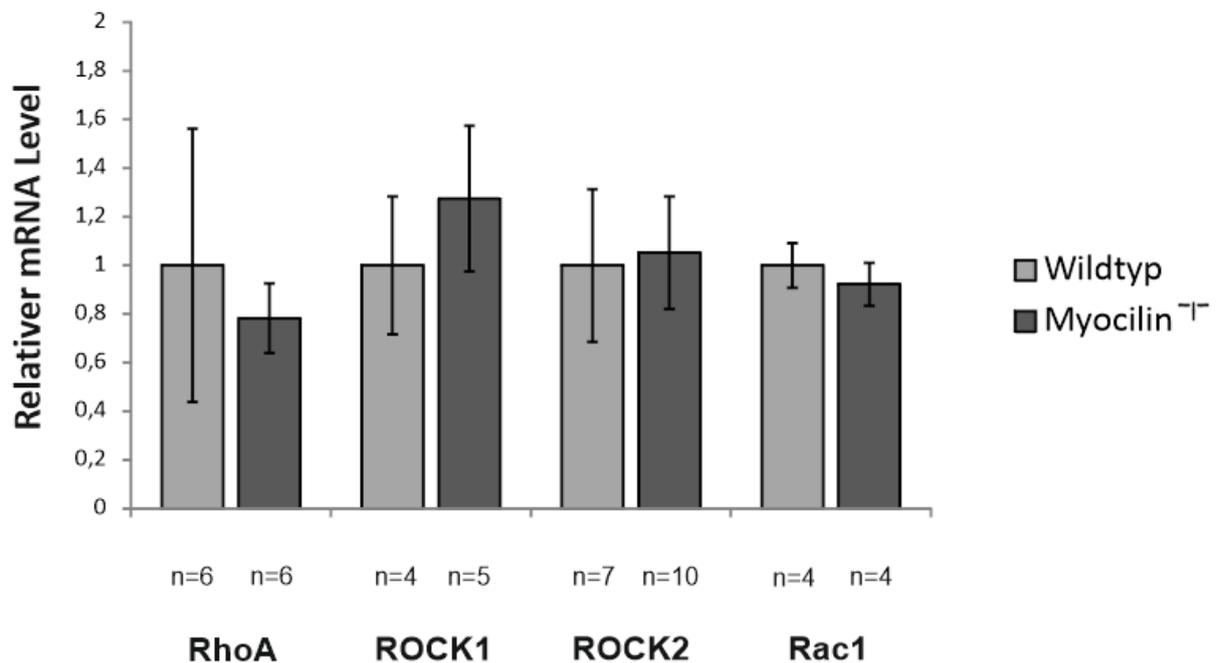
**Abbildung 17: Western Blot-Analysen für  $\beta$ -Catenin**

Der Western Blot zeigt die quantitative Analyse für  $\beta$ -Catenin (95 kDa) in den Proteinen der Netzhaut von P10-Mäusen. Es ist kein Unterschied zwischen Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren und Wildtypen festzustellen.

#### IV.1.3.2.2 Nicht-kanonischer *Wnt*-Signalweg

Der nicht-kanonische *Planar cell polarity pathway* des *Wnt*-Signalwegs vermittelt eine alternative Aktivierung von *Fzd*-Rezeptoren, die über eine Aktivierung der GTPasen *RhoA* und *Rac1* sowie der Kinasen *ROCK 1* bzw. *ROCK 2* und *pJNK* erfolgt.

Mittels quantitativer RT-PCR wurde zunächst die relative Expression von *RhoA*, *ROCK 1*, *ROCK 2* und *Rac1* untersucht. Allerdings war für keines der untersuchten Enzyme ein Unterschied in der Expression zwischen Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtypen festzustellen (Abb.18).

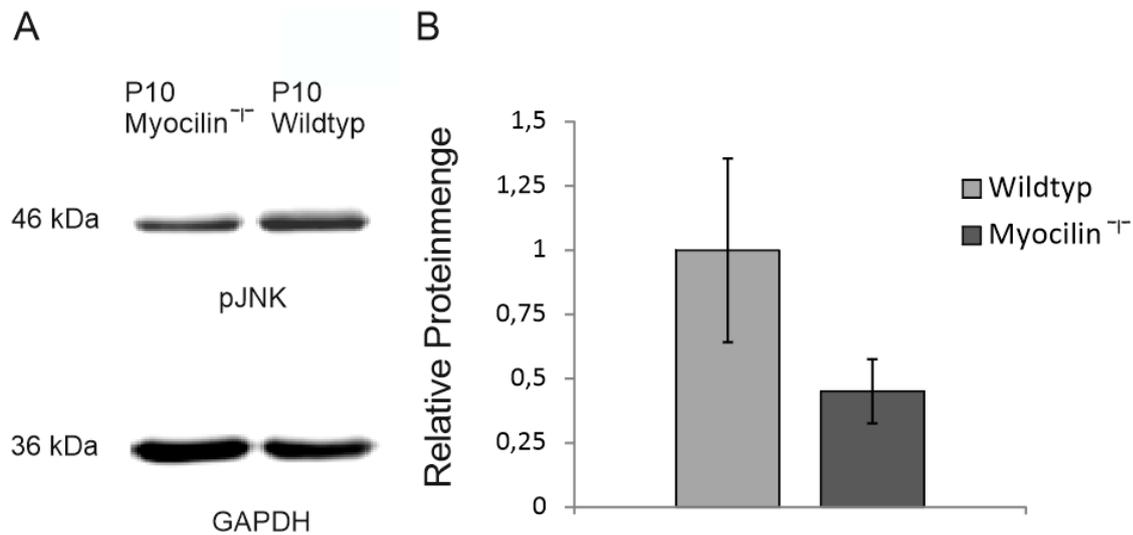


**Abbildung 18: Relative Expression ausgewählter Proteine des Planar cell polarity pathways**

Die Grafik zeigt den relativen mRNA Level verschiedener Proteine des Planar cell polarity pathways. Weder im Falle von RhoA noch von ROCK1, ROCK2 und Rac1 kann ein Unterschied zwischen Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren und Wildtypen gefunden werden.

Desweiteren wurde die Menge an pJNK mittels Western Blot quantifiziert.

Wie aus Abb. 19 A hervorgeht ließ sich zwar eine qualitative Erniedrigung der Menge an pJNK in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren vermuten, allerdings zeigte die statistische Auswertung (Abb. 19 B) quantitativ keinen signifikanten Unterschied zu den Wildtypen.

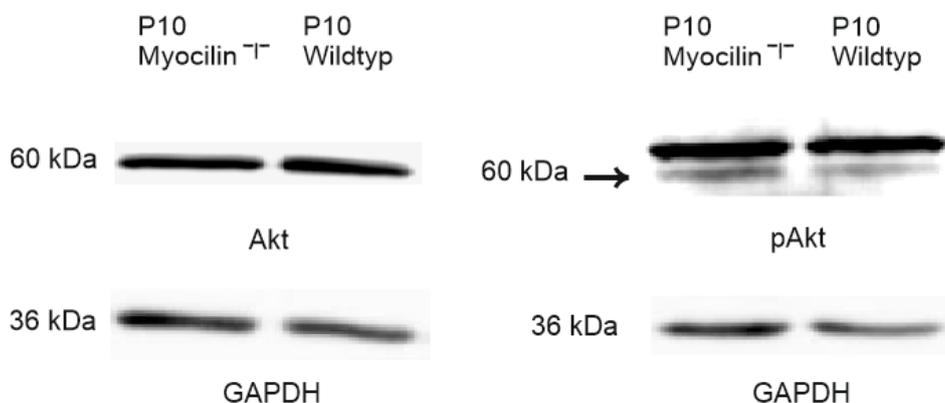


**Abbildung 19: Western Blot-Analysen für pJNK**

Der Western Blot (A) zeigt keine erniedrigte Proteinmenge an pJNK (46 kDa) in der Netzhaut von P10-Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen. In der statistischen Auswertung (B) wird eine verminderte pJNK-Menge um etwa 45% deutlich, es wird aber kein Signifikanzniveau erreicht. Jeweils n=4. Mittelwerte ± SEM

IV.1.3.2.3 PI3-Kinase/Akt-Signalweg

Aufgrund des kürzlich gezeigten Einflusses von Myocilin auf die Zellmigration und der kritischen Beteiligung der Serin-/Threonin-Kinase Akt, wurde die Menge an Akt bzw. der aktivierten phosphorylierten Form pAkt bestimmt. Die Menge an Akt und pAkt in den P10-Retinae wurde mittels Western Blot quantifiziert. Allerdings konnte hierbei kein Unterschied zwischen Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren und Wildtypen festgestellt werden (Abb.20).



**Abbildung 20: Western Blot-Analysen für Akt und pAkt**

Der Western Blot zeigt die quantitative Analyse für Akt (60 kDa) und p-Akt (60 kDa) in den Proteinen der Netzhaut von P10-Mäusen. Es lässt sich kein Unterschied zwischen Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren und Wildtypen darstellen.

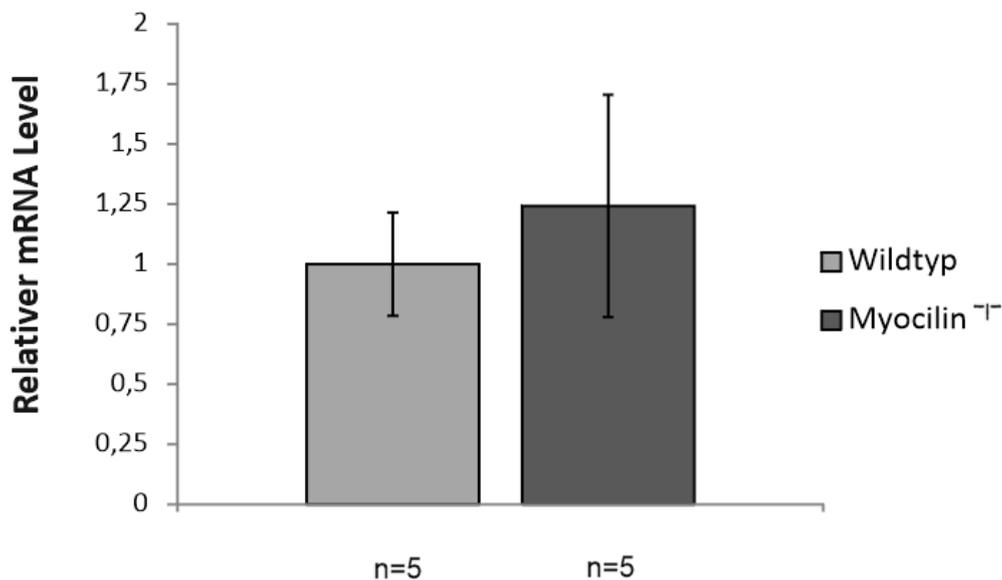
#### IV.1.3.2.4 *Nerve growth factor*- und *Brain-derived neurotrophic factor*-Signalweg

Weiterhin wurden Signalwege untersucht, für die eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Differenzierung der Retina beschrieben wurde.

Hierbei nehmen die zwei Wachstumsfaktoren *Nerve growth factor* (*NGF*) und *Brain-derived neurotrophic factor* (*BDNF*) insbesondere Einfluss auf den programmierten Zelltod, wobei *NGF* eine apoptosefördernde Funktion innezuhaben scheint und *BDNF* eher das Überleben der Neurone fördert (Frade et al., 1996b und 1999).

Die Expression beider Faktoren wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Hierbei konnte keine *BDNF*-Expression in den Netzhäuten von P10-Mäusen nachgewiesen werden.

Die Expression des anderen untersuchten Faktors *NGF* konnte zu gegebenem Zeitpunkt zwar detektiert werden, allerdings war kein signifikanter Unterschied zwischen *Myocilin*<sup>-/-</sup>-Tieren und Wildtypen vorhanden (Abb.21).



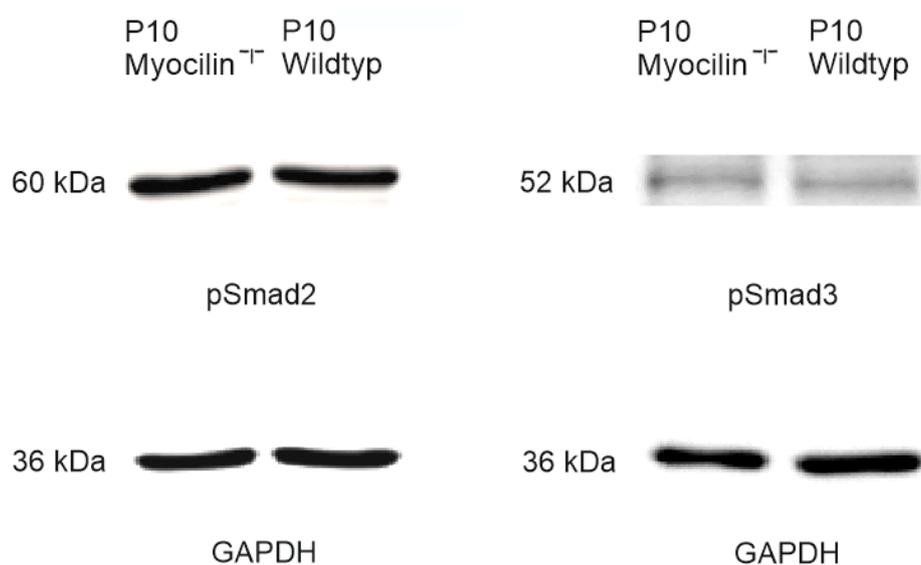
**Abbildung 21: Relative Expression von Nerve growth factor**

Die Grafik zeigt den relativen mRNA Level von Nerve growth factor in *Myocilin*<sup>-/-</sup>-Tieren und Wildtypen. Es kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

IV.1.3.2.5 *Transforming growth factor- $\beta$ -Signalweg*

Mit *Transforming growth factor- $\beta$*  (*TGF- $\beta$* ) ist ein weiterer Wachstumsfaktor bekannt, der im zentralen Nervensystem programmierten Zelltod herbeiführen kann (Krieglstein et al., 2000; Dünker et al., 2001; Schuster et al., 2002; Schuster, Krieglstein, 2002).

Ein möglicher Einfluss von Myocilin auf diesen Signalweg wurde mittels Western Blot untersucht. Hierzu wurden die Mengen an phosphoryliertem *Smad 2* und *Smad 3* (*pSmad 2* und *pSmad 3*) in den Retinae der Myocilin<sup>-/-</sup>-Tiere und der Wildtypen miteinander verglichen, es zeigte sich jedoch auch bei der Betrachtung dieses Signalweges kein Unterschied (Vgl. Abb.22).

**Abbildung 22: Western Blot-Analysen für pSmad 2 und pSmad 3**

Der Western Blot zeigt die quantitative Analyse für pSmad 2 (60 kDa) und pSmad 3 (52 kDa) in den Proteinen der Netzhaut von P10-Mäusen. Es kann kein Unterschied zwischen Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren und Wildtypen festgestellt werden.

#### IV.1.4 Untersuchung eines möglichen Effekts von fehlendem Myocilin in Schadensmodellen

Anhand von zwei gut etablierten Schadensmodellen wurde untersucht, ob Myocilin eine neuroprotektive Wirkung bei adulten Tieren aufweist. Hierzu wurde eine Netzhaut-Schädigung mittels NMDA und Licht erzeugt und die Auswirkungen auf Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäuse und Wildtyp-Geschwistertiere miteinander verglichen.

##### IV.1.4.1 NMDA-induzierte Schädigung von retinalen Ganglienzellen

Zunächst wurde durch Analyse der PBS-Kontroll-Injektionen sichergestellt, dass keine Ganglienzell-Schädigung methodisch durch die Injektion erzeugt wurde.

Die Struktur der Sehnerven blieb in beiden Gruppen intakt (Vgl. *Abb.23 A und B*).

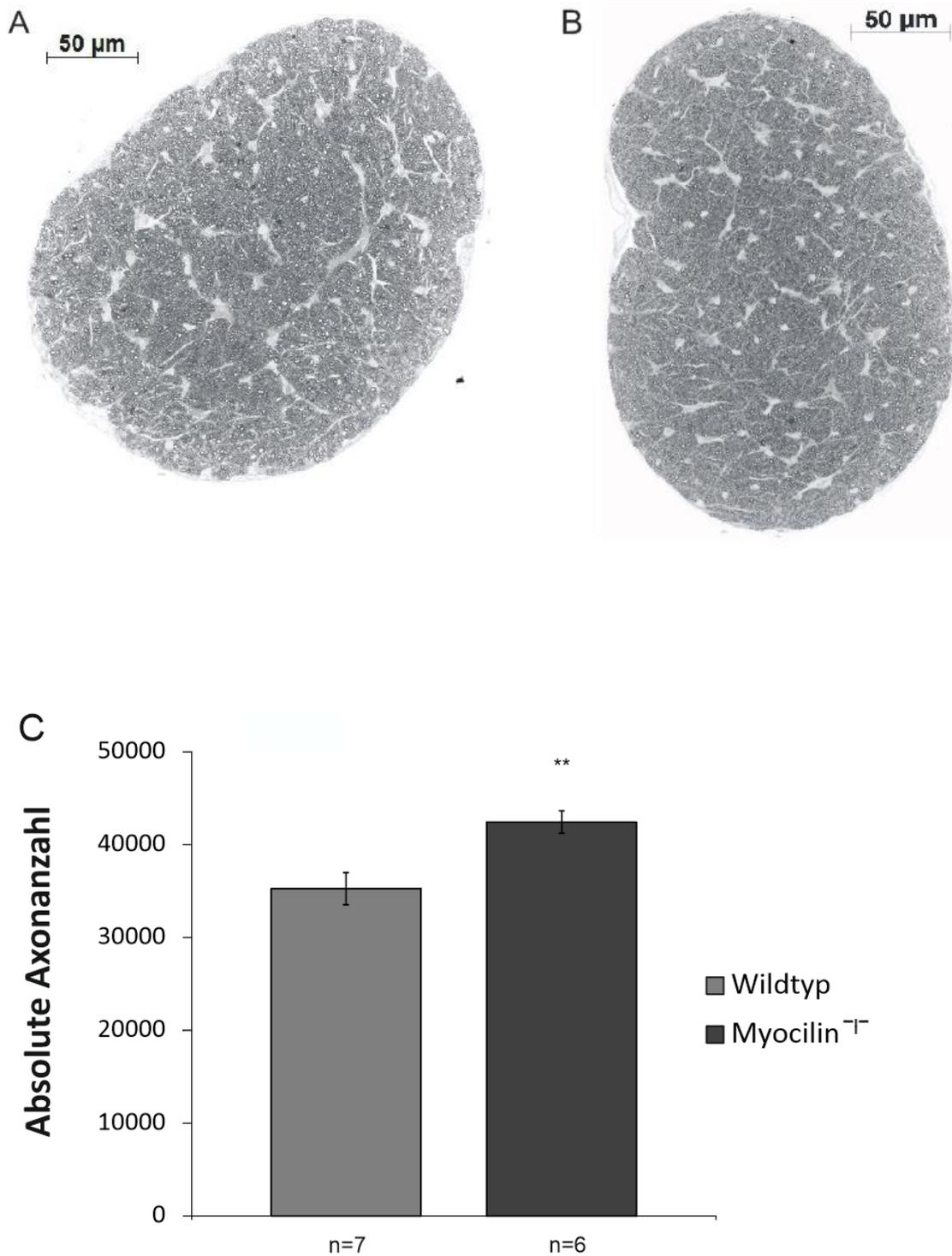
Ferner konnte der in IV.1.1 erhobene Befund bestätigt werden, dass sich die Axonanzahl der Myocilin<sup>-/-</sup>-Tiere deutlich von den Wildtypen unterscheidet (Vgl. *Abb.23 C*), denn auch hier enthält der Sehnerv im Mittel etwa 20% mehr Axone ( $p < 0,01$ ).

Das Ausmaß der Ganglienzell-Schädigung wurde drei Wochen nach der Injektion von 10mM NMDA durch manuelle Zählung der verbleibenden intakten Axone beurteilt. Die quantitativen Ergebnisse der NMDA-Injektionen wurden dabei auf die Resultate der PBS-Injektionen normiert. So wurde der relative Schaden als Verhältnis der verbleibenden Axonanzahl nach NMDA-Injektion zur Axonanzahl nach PBS-Injektion angegeben (Vgl. *Abb.24 C*, Angabe in %).

Aufgrund der exzitatorischen Schädigung der Ganglienzellen konnte lichtmikroskopisch ein massiver Axonverlust des Sehnervs beobachtet werden (Vgl. *Abb.24 A und B*).

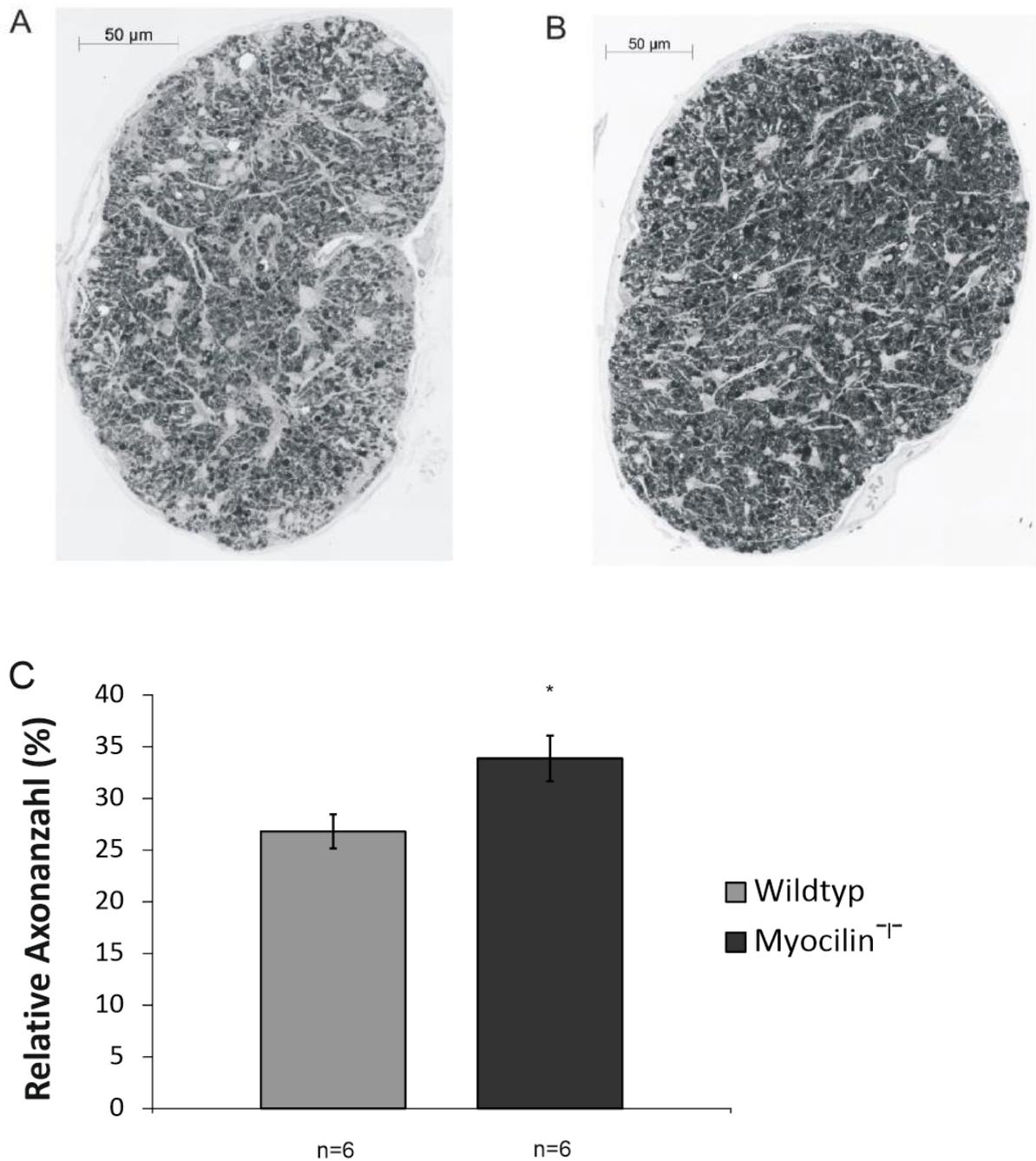
Hierbei war der Schaden bei den Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen um 26,34% signifikant schwächer ausgeprägt als bei den Wildtypen ( $p < 0,05$ ). Während in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren die Anzahl intakter Axone auf 33,87% der ursprünglichen Anzahl vermindert ist, konnten in den Wildtypen nach NMDA-Injektion lediglich 26,81% verbleibende intakte Axone nachgewiesen werden.

Das Fehlen von Myocilin wirkt sich somit protektiv auf die retinalen Ganglienzellen aus.



**Abbildung 23: Lichtmikroskopie und quantitative Auswertung von PBS-Kontrollinjektionen**

Bei Betrachtung der PBS-Kontrollen fällt die etwas dichtere Struktur des Sehnervs der Myocilin<sup>-/-</sup>-Tiere (B) im Vergleich zu den Wildtypen (A) auf. Die statistische Auswertung (C) zeigt eine Erhöhung der Axonanzahl bei den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren um 20,35%. Mittelwerte ± SEM. \*\*p<0,01.



**Abbildung 24: Lichtmikroskopie und quantitative Auswertung von NMDA-Injektionen**

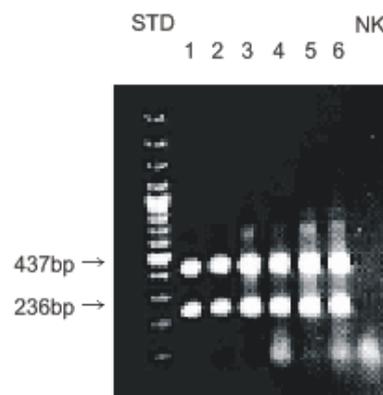
Gezeigt werden Semidünnschnitte von Sehnerven eines Wildtyps (A) und einer KO-Maus (B) nach NMDA-Injektion. Bei den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren sind ein weniger starker Axonverlust und ein geringerer bindegewebiger Umbau erkennbar. Die statistische Auswertung (C) zeigt bei den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren eine um 26,34% erhöhte relative Anzahl von Axonen, die durch die NMDA-Injektion nicht geschädigt wurden. Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .

## IV.1.4.2 Licht-induzierte Schädigung von Photorezeptoren

Vor der Versuchsdurchführung wurde eine bekannte Mutation im RPE65- (*Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein*) Gen ausgeschlossen, die eine deutlich verminderte Empfindlichkeit für Licht-induzierte Photorezeptor-Schädigung zur Folge hat (Wenzel et al., 2001).

Zum Ausschluss dieser Mutation wurden exemplarisch sechs Tiere getestet. Dies erfolgte durch Amplifikation eines entsprechenden DNA-Bereichs und Verdau mit Mwo I. 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 aufgrund der veränderten Basensequenz nicht schneiden konnte.

Wie *Abb.25* zeigt, besaß keines der ausgewählten Tiere die entsprechende Mutation. Somit waren die Voraussetzungen für eine korrekte Durchführung der Lichtschadensversuche gegeben.



***Abbildung 25: Genotypisierung zur Untersuchung der LeuRPE54Met-Mutation***

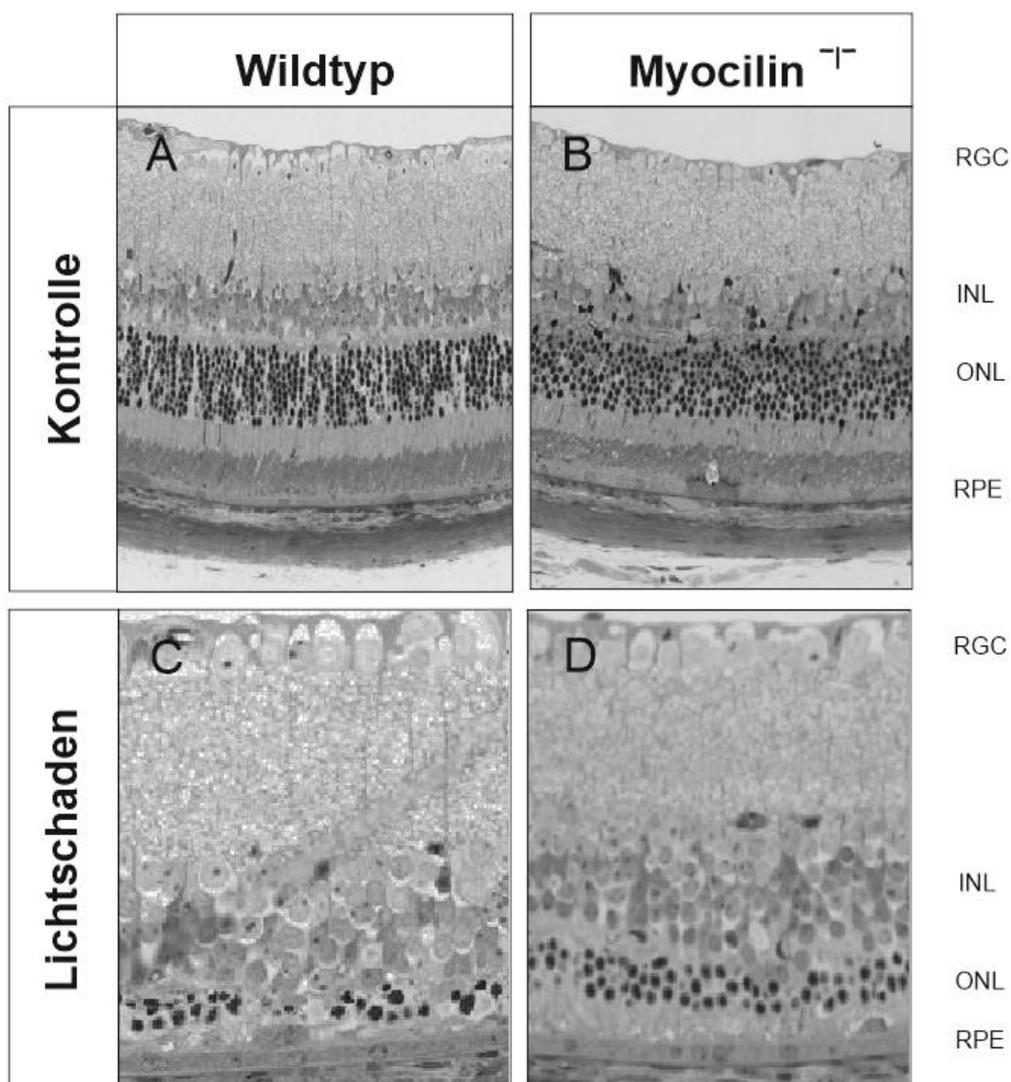
*Das Bild zeigt das Ergebnis der Genotypisierung zur Untersuchung der RPE65-Mutation. Es fanden sich keine mutierten Tiere. STD=Basenpaarstandard. NK=Negativkontrolle.*

Die Beurteilung des Schadens erfolgte im Rahmen dieses Versuches eine Woche nach Belichtung durch Schichtdicken-Vermessung der äußeren Körnerschicht (ONL). Wie beim NMDA-Modell wurden die Ergebnisse auf die ONL-Schichtdicken der unbelichteten Kontrollen normiert, da die Myocilin<sup>-/-</sup>-Tiere ursprünglich eine etwas breitere ONL aufweisen (Vgl. Abschnitt IV.1.1). So ist in *Abb.27* die ONL-Dicke nach Lichtschaden in Prozent der ONL-Dicke von unbelichteten Kontrolltieren angegeben.

Bereits lichtmikroskopisch zeigte sich bei den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren eine erkennbar breitere verbleibende ONL und somit ein geringerer Verlust an Photorezeptoren (Abb.26).

Die quantitative Auswertung mittels Spider-Diagrammen (Abb.27) bestätigte diesen Befund signifikant ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ ).

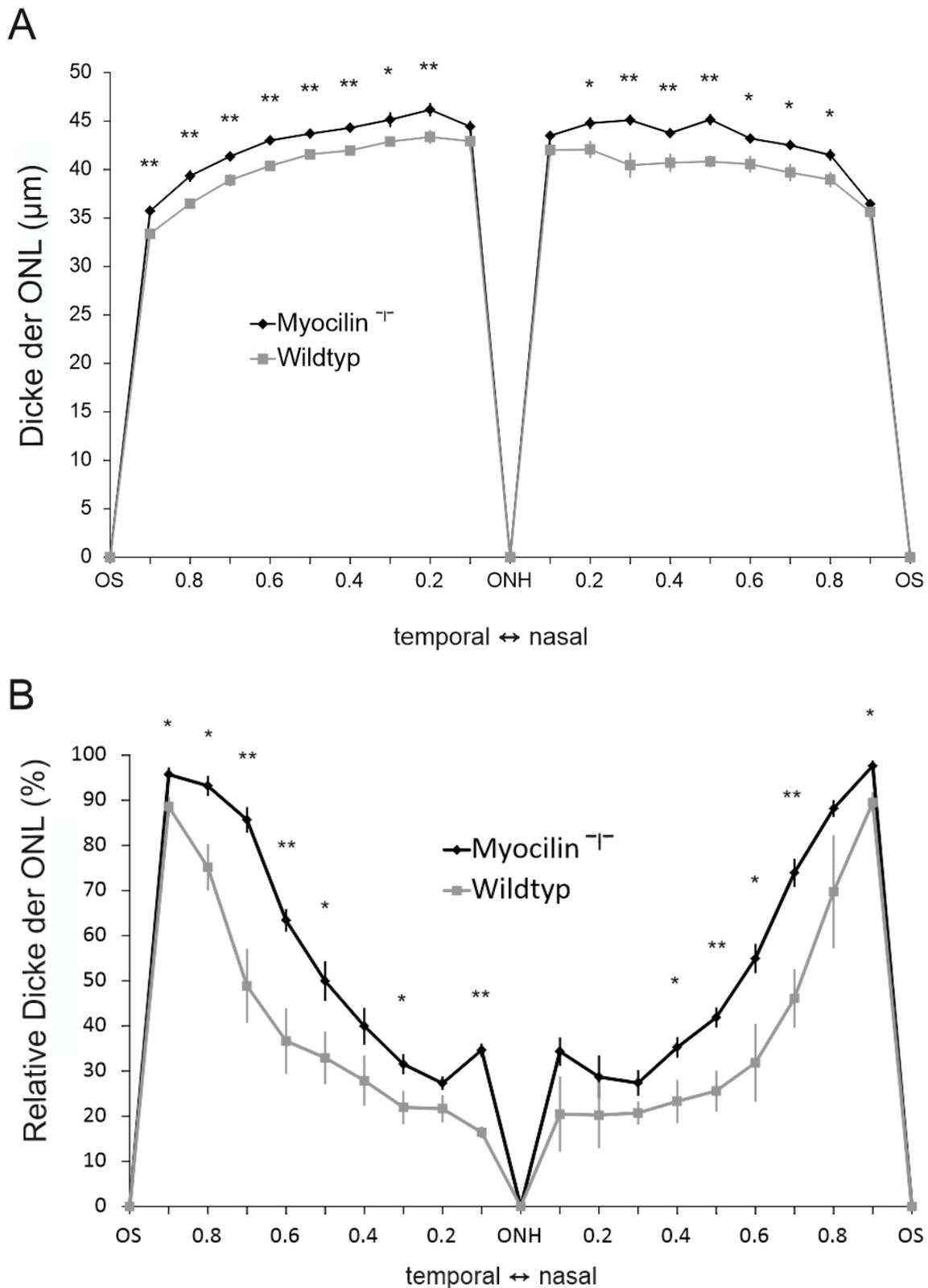
Insgesamt zeigte sich, dass die Myocilin<sup>-/-</sup>-Tiere nicht nur nach NMDA-Injektion, sondern auch nach Licht-induziertem Netzhautschaden vor dem ausgelösten Zelltod geschützt sind.



**Abbildung 26: Lichtmikroskopische Aufnahmen nach Lichtschaden**

Gezeigt werden Semidünnschnitte von Retinae unbelichteter Kontrolltiere (A, B) sowie von Versuchstieren nach Lichtschaden bei 5000 lux für 45 min (C, D).

Nach Lichtschaden zeigt sich bereits lichtmikroskopisch ein deutlicher Unterschied der ONL-Dicke. RGC=retinale Ganglienzellen, INL=innere Körnerschicht, ONL=äußere Körnerschicht, RPE= retinales Pigmentepithel.



**Abbildung 27: Spiderdiagramme der Lichtschadensversuche mit Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen**

Die quantitative Auswertung der Lichtschadensversuche zeigt den deutlichen Unterschied zwischen Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren ( $n=4$ ) und Wildtypen ( $n=3$ ) eine Woche nach Belichtung (**B**) mit einem geringeren Verlust an Photorezeptoren bei den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren.

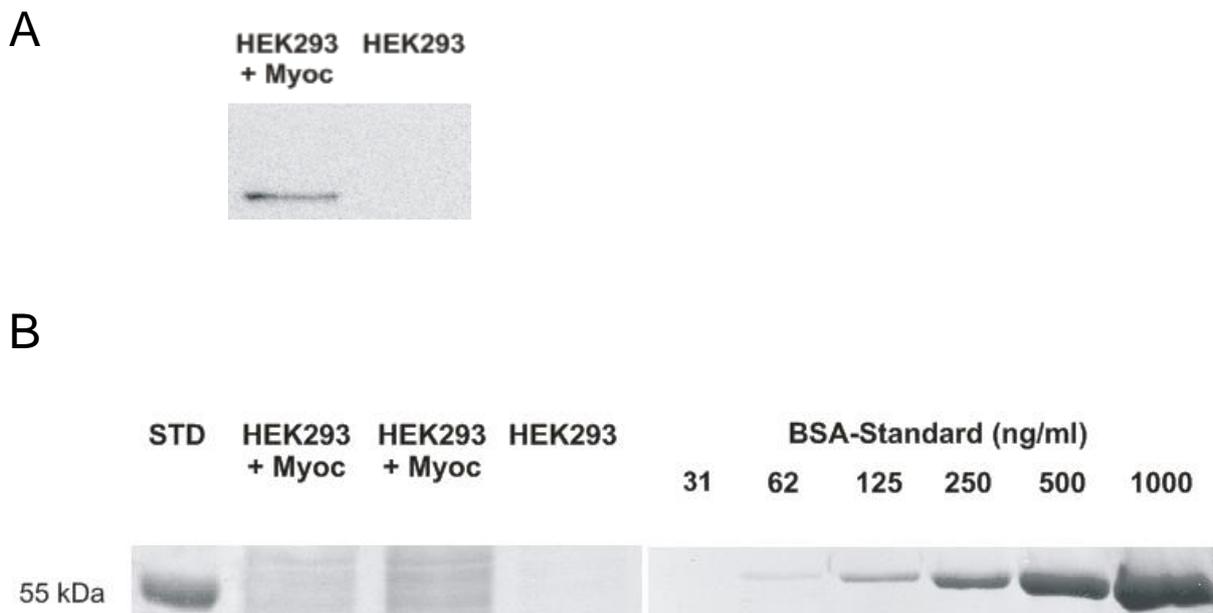
**A** zeigt die unbelichteten Kontrollen, mit einer minimal, aber signifikant dickeren ONL bei den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren (jeweils  $n=10$ ). Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ .

OS=ora serrata, ONH=Sehnervenkopf (optic nerve head), ONL=äußere Körnerschicht.

## IV.1.5 Behandlung von RGC-5-Zellen

Zur Überprüfung der Frage, ob Myocilin in der Lage ist, *in vitro* Apoptose auszulösen oder zu verstärken, wurden RGC-5-Zellen mit Myocilin-haltigem Zellkulturmedium aus einer HEK293-Kultur unter serumfreien Bedingungen inkubiert (siehe Abschnitt III.4).

Mittels Western Blot wurde zunächst das Myocilin im Zellkulturmedium der HEK293-Kultur nachgewiesen (Abb. 28A).



**Abbildung 28: Western Blot-Analyse (A) und Konzentrationsabschätzung von HEK293-Kulturmedien mittels Coomassie-Färbung (B)**

Der Anti-Myocilin-Western Blot (A) zeigt eine Bande bei 55 kDa, die lediglich im Zellkulturmedium der HEK293-Zellen mit Myocilin-Überexpressionsvektor detektiert werden kann.

Die Konzentrationsbestimmung (B, links) mittels Coomassie-Färbung ergibt eine Myocilin-Konzentration in zwei exemplarisch gezeigten Überständen von unter 62 ng/ml, die anhand eines BSA-Standards (B, rechts) abgeschätzt werden kann. STD=Proteinstandard.

Um die Myocilin-Konzentration im Zellkulturmedium abschätzen zu können, wurde ferner eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Anhand eines BSA-Standards wurde eine Konzentration ermittelt, die unter 62 ng/ml lag (Abb. 28B).

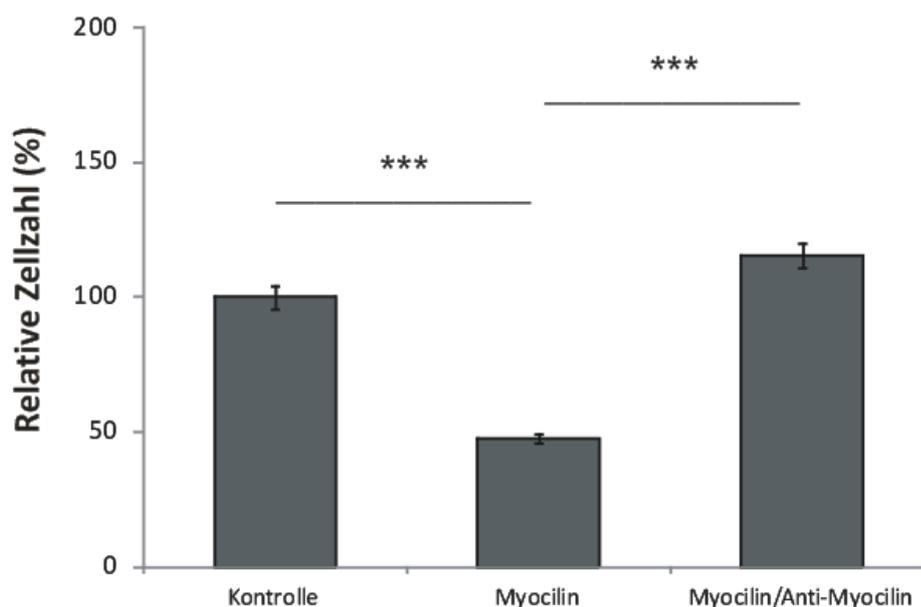
Bei den behandelten RGC-5-Zellen handelt es sich um immortalisierte retinale Ganglienzellen aus der Ratte, die sich trotz der Expression Ganglienzell-typischer Marker erheblich von *in vivo* vorkommenden Ganglienzellen unterscheiden.

Um aussagekräftige *in vitro*-Versuche mit den RGC-5-Zellen durchführen zu können, wurden diese zunächst mit dem unspezifischen Kinase-Inhibitor Staurosporin differenziert und anschließend mit den serumfreien Kulturmedien behandelt. Mit dem Entzug von Serum wurde ein exogener Stress erzeugt, durch den die Zellen in die Apoptose eintreten sollten.

Es konnte hierdurch gezeigt werden, dass 20 h nach Behandlung der RGC-5-Zellen mit Myocilin-haltigem Kulturmedium 47,5% weniger vitale Zellen verblieben waren als nach Behandlung mit dem Kontrollüberstand ohne Myocilin ( $p < 0,001$ ) (Vgl. Abb.29).

Dieser Effekt konnte durch Zugabe eines Myocilin-Antikörpers zum Myocilin-haltigen Überstand vollständig aufgehoben werden ( $p < 0,001$ ) (Vgl. Abb.29).

So konnte bestätigt werden, dass der Effekt sehr wahrscheinlich spezifisch durch Myocilin hervorgerufen wurde.



**Abbildung 29: Quantitative Auswertung der RGC-5-Behandlungen**

Die Auswertung zeigt, dass nach Behandlung mit Myocilin-haltigem konditioniertem Medium nur noch 47,5% der ursprünglichen Zellzahl vorhanden ist. Zugabe eines Anti-Myocilin-Antikörpers blockiert den Effekt vollständig. Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0,001$ .  $n=10$ .

## IV.2 Olfactomedin-1 (Pancortin)

### IV.2.1 Bestätigung des protektiven Effekts von Pancortin nach Licht-induzierter Schädigung von Photorezeptoren in Pancortin-defizienten Mäusen

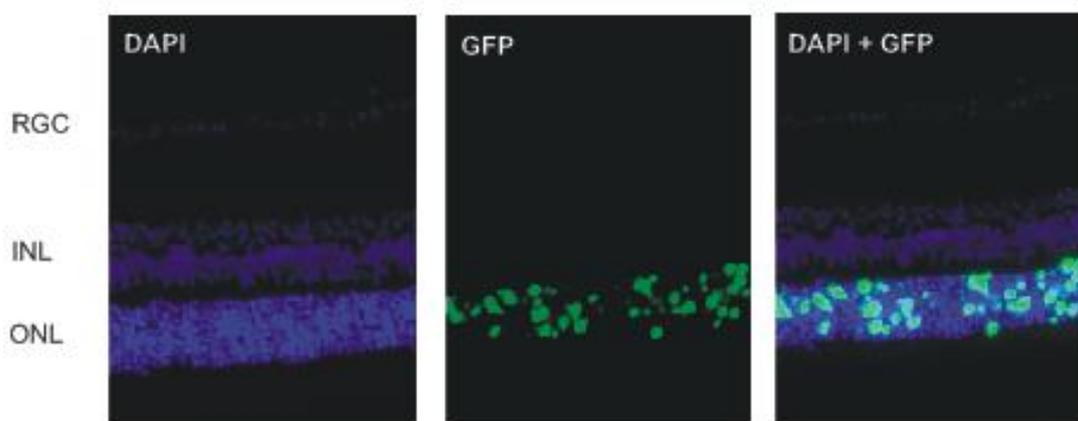
Zur Bestätigung der Vorversuche wurden zwei Verfahren angewandt:

Zum einen wurden apoptotische Zellen mittels TUNEL-Färbungen markiert und deren Anzahl nach Lichtschaden ermittelt. Ferner wurde der Apoptose-Nachweis mit dem *Cell Death Detection ELISA* durchgeführt, der die im Rahmen des Apoptose-Vorgangs entstehenden freien Nukleosomen nachweist.

#### IV.2.1.1 Apoptosenachweis mittels *TUNEL*-Assay

Die apoptotischen Zellen in der ONL wurden 30 h nach Belichtung der Tiere mittels TUNEL-Färbung markiert (*Abb.30*).

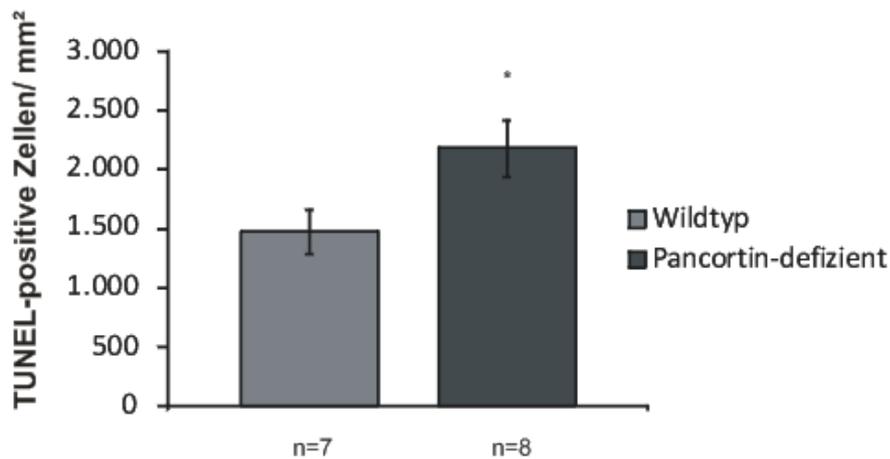
Die quantitative Auswertung erfolgte durch manuelles Auszählen der TUNEL-positiven Zellen und deren Angabe pro mm<sup>2</sup> Fläche.



***Abbildung 30: TUNEL-Färbung nach Lichtschaden***

*Gezeigt ist eine Fluoreszenz-Aufnahme mit erkennbarer Markierung der apoptotischen Zellen in der ONL im GFP-Kanal. RGC=retinale Ganglienzellen, INL=innere Körnerschicht, ONL=äußere Körnerschicht.*

Hierbei konnten die morphometrischen Vorbefunde bestätigt werden, denn die Pancortin-defizienten Tiere besitzen 47,8% mehr apoptotische Zellen in der ONL als die Wildtypen ( $p < 0,05$ ) und werden somit stärker geschädigt (Abb.31).



**Abbildung 31: Quantitative Auswertung der TUNEL-Färbungen**

Die Anzahl apoptotischer Zellen nach Lichtschaden ist bei den Pancortin-defizienten Mäusen um 47,8% erhöht. Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .

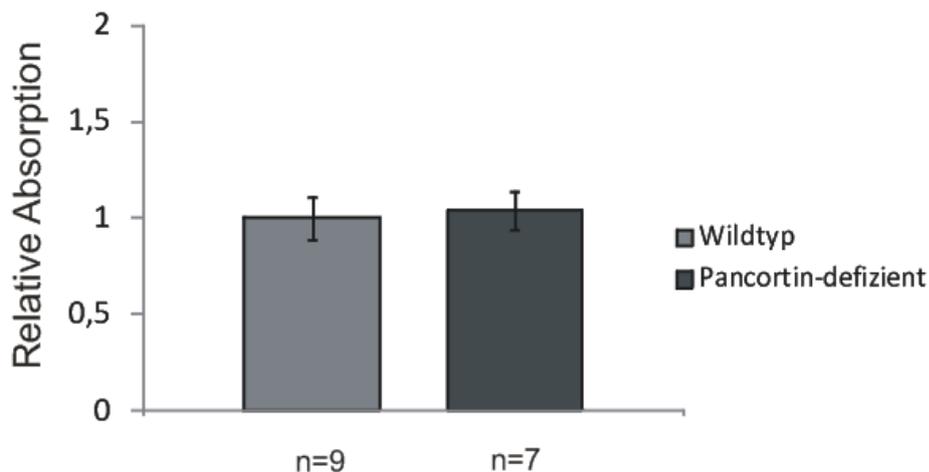
#### IV.2.1.2 Apoptosenachweis mittels *Cell Death Detection ELISA*

Der ELISA wurde ebenfalls 30 h nach Belichtung der Tiere durchgeführt.

Um sicherzustellen, dass in der späteren Auswertung gleiche Proteinkonzentrationen zugrunde gelegt werden, wurde die Proteinmenge in einigen Netzhäuten von Pancortin-defizienten Tieren und Wildtypen durch einen BCA-Assay ermittelt und die ELISA-Ergebnisse im Nachhinein um den entsprechenden Faktor korrigiert.

Bei der photometrischen Auswertung konnte im Gegensatz zu den TUNEL-Färbungen allerdings kein Unterschied zwischen Pancortin-defizienten Tieren und Wildtypen festgestellt werden (Abb.32).

Möglicherweise ist der Assay nicht sensitiv genug, um den Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen nachzuweisen. Die Vorbefunde konnten mit diesem Assay somit nicht bestätigt werden.



**Abbildung 32: Quantitative Auswertung des Cell Death Detection ELISA**

Dargestellt ist die Analyse der freien Nukleosomen 30 h nach Lichtschaden. Es konnte bei einer relativen Absorption von 1,04 kein Anstieg der Anzahl freier Nukleosomen bei den Pancortin-defizienten Tieren gegenüber den Wildtypen ermittelt werden. Die Apoptoserate ist somit unverändert. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

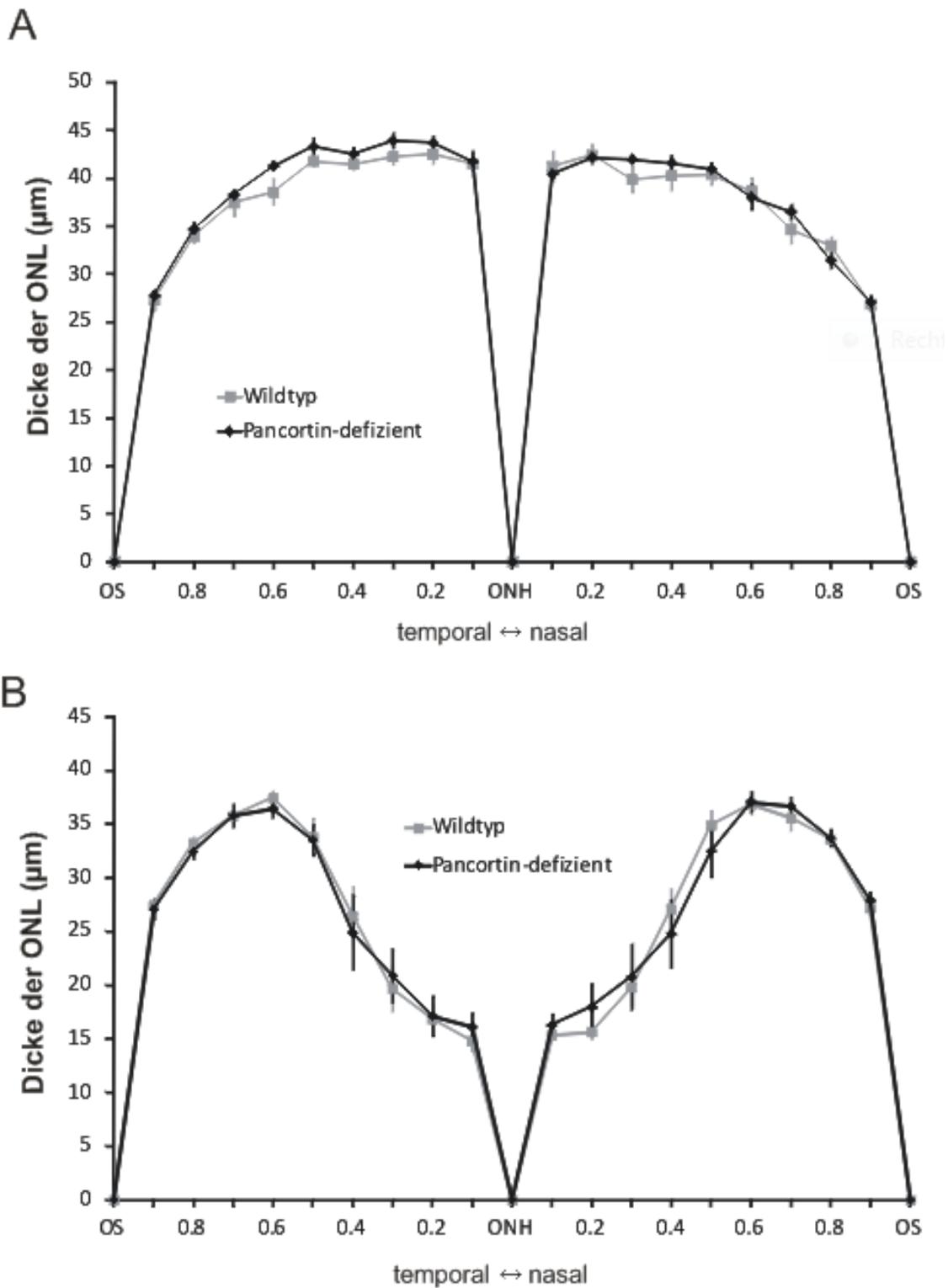
#### IV.2.1.3 Morphologie der äußeren Körnerschicht

Die morphometrischen Vorergebnisse, die eine Woche nach Belichtung der Tiere erhalten wurden, sollten nun nach zwei Wochen nochmals erhoben und bekräftigt werden.

Die Schadensbeurteilung erfolgte erneut durch Vermessung der ONL-Dicke und Darstellung in Spiderdiagrammen.

Zur Kontrolle wurden jeweils fünf unbelichtete Tiere hinzugezogen, bei denen sich in Übereinstimmung mit den Vorversuchen kein Unterschied in der ONL-Dicke fand (Abb.33 A).

Die Auswertung der belichteten Tiere (Abb.33 B) zeigte, dass der retinale Schaden nach 14 Tagen insgesamt stärker ausgeprägt ist als nach sieben Tagen.



**Abbildung 33: Spiderdiagramme der Lichtschadensversuche mit Pancortin-defizienten Mäusen**

**A** Die unbelichteten Kontrolltiere weisen keinen Unterschied in der ONL-Dicke auf (jeweils  $n=5$ ).

**B** Die quantitative Auswertung der Lichtschadensversuche zeigt 14 Tage nach Belichtung keine Unterschiede in der ONL-Dicke zwischen Pancortin-defizienten Mäusen ( $n=8$ ) und Wildtypen ( $n=10$ ). OS=ora serrata, ONH=Sehnervenkopf (optic nerve head).

Die Schichtdicke der Pancortin-defizienten Tiere unterscheidet sich nach 14 Tagen allerdings nicht mehr von den Wildtypen, d.h. der Photorezeptor-Schaden war in beiden Gruppen gleich stark ausgeprägt, wohingegen nach sieben Tagen die Pancortin-defizienten Tiere deutlich massiver geschädigt waren als die Wildtypen (Vgl. Abschnitt I.3).

Durch die Vorversuche wurde die These aufgestellt, dass die Pancortin-defizienten Mäuse empfindlicher auf Lichtschaden reagieren und hierbei stärker geschädigt werden als die Wildtypen. Diese These konnte durch den *TUNEL-Assay* bestätigt werden, nicht jedoch durch den *Cell Death Detection ELISA*.

Ferner wurde im Rahmen der Versuche deutlich, dass der Photorezeptorschaden in den Pancortin-defizienten Mäusen zwar eine Woche nach Belichtung stärker ausgeprägt ist, nach zwei Wochen allerdings kein Unterschied zu den Wildtypen mehr festgestellt werden kann.

#### IV.2.2 Rhodopsin-Umsatz in Pancortin-defizienten Mäusen

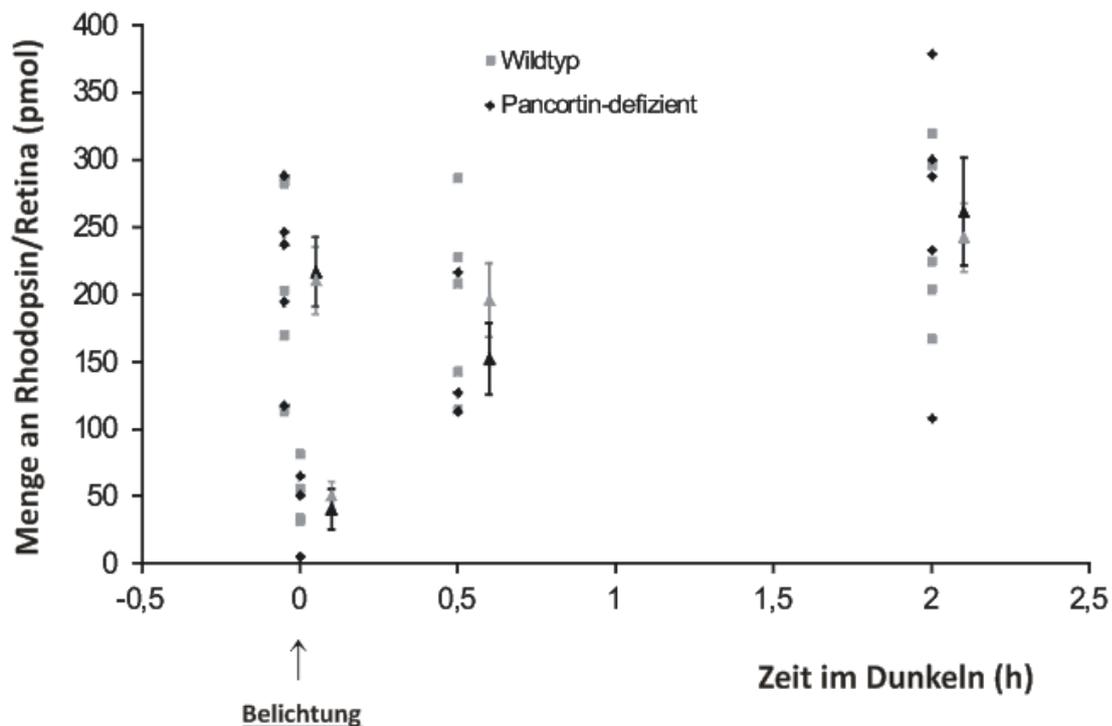
Pancortin ist innerhalb der Retina in der Interphotorezeptormatrix (IPM) lokalisiert, einer Struktur, in der sich wichtige Schritte des Sehzyklus abspielen, die im Rahmen der Rhodopsin-Regeneration von Bedeutung sind (Saari, 2000).

Zur Untersuchung der Frage, ob Pancortin eine wichtige Funktion innerhalb dieser Matrix ausübt und durch eine vermehrte bzw. schnellere Wiederbereitstellung von Rhodopsin die Regeneration nach Lichtschaden beeinflusst, wurden die Ausgangsmenge an Rhodopsin sowie die Kinetik der Regeneration bestimmt.

Dazu wurden die Tiere nach der Dunkeladaptation 10 min belichtet und die Rhodopsinmenge in der Retina zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

Hierbei zeigte sich, dass die Rhodopsin-Ausgangsmenge, die an unbelichteten Kontrolltieren bestimmt wurde, bei den Pancortin-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtypen nicht erhöht ist (Vgl. *Abb.34*). Ferner wurde die Kinetik der Rhodopsin-Regeneration untersucht, indem die Menge an Rhodopsin zu definierten Zeitpunkten nach Erzeugen des Lichtschadens bestimmt wurde, unmittelbar nach Belichtung, eine halbe Stunde sowie zwei Stunden danach.

Abb.34 verdeutlicht, dass zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein Unterschied in der Rhodopsin-Menge vorhanden ist.



**Abbildung 34: Rhodopsin-Ausgangsmenge und -Regeneration**

Die Grafik zeigt die Menge an Rhodopsin in der Netzhaut zu verschiedenen Zeitpunkten: Vor Belichtung, sofort nach Belichtung (Zeitpunkt 0) sowie eine halbe Stunde bzw. zwei Stunden nach Belichtung. Sowohl die Ausgangsmenge, als auch die Regeneration sind bei Pancortin-defizienten Tieren im Vergleich zu den Wildtypen unverändert.

Folglich ist die größere Empfindlichkeit der Pancortin-defizienten Tiere für einen Licht-induzierten Netzhaut-Schaden weder auf eine erhöhte Ausgangsmenge an Rhodopsin noch auf eine veränderte Regenerations-Kinetik zurückzuführen.

## V. Diskussion

### V.1 Myocilin

Myocilin ist ein Mitglied der Familie der Olfactomedine, dessen Funktion trotz zahlreicher Untersuchungen noch nicht entschlüsselt wurde. Mutationen im Myocilin-Gen sind mit einer autosomal-dominant vererbten Form des Offenwinkelglaukom assoziiert (Stone et al., 1997; Adam et al., 1997; Fingert et al., 1999 und 2002; Kwon YH et al., 2009). Bei Fortschreiten der Erkrankung kommt es zu einer progredienten Degeneration von Netzhaut und Sehnerv, weshalb mit Hilfe von Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen versucht wurde, Hinweise für eine Funktion von Myocilin in der Netzhaut zu erlangen. Insgesamt konnte dabei in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sich eine Myocilin-Defizienz in der Retina protektiv auf das Überleben von Neuronen auswirkt und Myocilin offenbar apoptosefördernde Eigenschaften besitzt.

Diese Schlussfolgerung basiert auf (1) der Beobachtung einer erhöhten Zellzahl innerhalb der Netzhaut von Myocilin-defizienten Tieren infolge reduzierter Apoptose im Rahmen des ontogenetischen Zelltods, (2) einem verminderten Neuronenverlust in Myocilin-defizienten Tieren nach Schädigung der Netzhaut durch NMDA und Belichtung und (3) der Tatsache, dass Myocilin *in vitro* ein erhöhtes Absterben von RGC-5-Zellen zur Folge hat.

Adulte Myocilin-defiziente Mäuse weisen entgegen früherer Beobachtungen einen retinalen Phänotyp auf: Die Sehnerven enthalten deutlich mehr Axone und in sämtlichen Schichten der Netzhaut ist eine erhöhte Zellzahl im Vergleich zu den Wildtypen vorzufinden. Dabei ist diese phänotypische Auffälligkeit offenbar auf das Auge begrenzt, was exemplarisch durch die Untersuchung von *Nn. ischiadici* überprüft wurde. Ursächlich hierfür könnte sein, dass Myocilin einerseits sowohl in den Myelinscheiden des Sehnervs als auch in den retinalen Ganglienzellen nachgewiesen werden kann, andererseits aber nicht in den zum *N. ischiadicus* gehörigen  $\alpha$ -Motoneuronen im Rückenmark. Dort ist die Lokalisation des Proteins auf die Myelinscheiden beschränkt (Ohlmann et al., 2003). Vermutlich wird das Protein peripher in den Schwann-Zellen exprimiert.

Die Ursache für die morphologischen Befunde in den adulten Tieren liegt offenbar in der Modulation des ontogenetischen Zelltods, einem wichtigen Phänomen im

Rahmen der Entwicklung und Gewebsdifferenzierung (Jacobson et al., 1997; Metzstein et al., 1998). Tatsächlich wird Myocilin in der Retina zu einem Zeitpunkt exprimiert, der mit der postnatalen Differenzierung der Retina einhergeht (Knaupp et al., 2004). Innerhalb der Netzhaut beginnt die Expression bereits kurz vor der Geburt in den retinalen Ganglienzellen und setzt sich dann zum äußeren Bereich der Retina hin fort. Dort konnte das Protein immunhistochemisch erst ab dem vierzehnten Tag nach der Geburt nachgewiesen werden (Knaupp et al., 2004). Auffallend ist in diesem Zusammenhang die Koinzidenz zwischen Myocilin-Expression und programmiertem Zelltod, denn auch die Apoptosevorgänge innerhalb der Retina beginnen im Bereich der retinalen Ganglienzellen mit einem Apoptose-Maximum zwischen P2 und P4, und greifen dann auf die äußeren Schichten über. Es folgen die Apoptose-Maxima der Amakrinen Zellen zwischen P4 und P7, die der Bipolar- und Müller-Zellen von P8 bis P11 und die der Photorezeptoren ab P6, wobei letztere nur in geringem Ausmaß am ontogenetischen Zelltod teilnehmen (Young, 1984). TUNEL-Färbungen an vier bzw. neun Tage alten Tieren zeigten einen signifikanten Unterschied in der Apoptoserate. Demnach nehmen in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen sowohl die retinalen Ganglienzellen, als auch die Zellen der zukünftigen inneren und äußeren Körnerschicht in geringerem Umfang am programmierten Zelltod teil. Das Fehlen von Myocilin hat also einen protektiven Einfluss auf die sich differenzierende Netzhaut. Vermutlich übt Myocilin im Rahmen der Ontogenese eine apoptosefördernde Funktion aus und trägt auf diese Weise zur physiologischen Differenzierung und Reifung der Netzhaut bei.

Kürzlich publizierte Daten unserer Arbeitsgruppe bestätigen diese Überlegung mit Hilfe eines Rescue-Models. So wurden die Myocilin<sup>-/-</sup>-Tiere mit Myocilin-überexprimierenden Tieren gekreuzt (Myocilin<sup>-/-</sup>/*βB1-Crystallin*-Myocilin), welche Myocilin unter dem linsenspezifischen *βB1-Crystallin*-Promotor (bereits pränatal aktiv) überexprimieren und das Produkt ins Kammerwasser sezernieren. Auf diese Weise wird den Netzhäuten der jeweils homozygoten Tiere das fehlende Myocilin über das Kammerwasser bereitgestellt. In diesem Modell weisen die adulten Myocilin<sup>-/-</sup>/*βB1-Crystallin*-Myocilin-Tiere mit Ausnahme einiger temporalen Bereiche der ONL keine wesentlichen phänotypischen Auffälligkeiten hinsichtlich der Netzhautschichten und des Sehnervs auf (Koch et al., 2014).

Außerdem weisen unsere Daten auf eine entscheidende Rolle von *Bcl-2-like protein 1* (*BCL2L1*, *Bcl-xL*) hin, einem Protein der *Bcl-2*-Familie mit anti-apoptotischer

Funktion. Es konnte gezeigt werden, dass die Protein-Mengen und relativen mRNA-Level von *BCL2L1* in *Myocilin*<sup>-/-</sup>-Tieren zum Zeitpunkt P10 signifikant erhöht sind. Im oben bereits erklärten Rescue-Modell konnten hingegen keine Unterschiede zwischen den *Myocilin*<sup>-/-</sup>/*βB1-Crystallin*-*Myocilin*-Tieren und den Wildtypen an P10 nachgewiesen werden. Somit scheint die Modulation des intrinsischen Apoptosewegs eine kritische Rolle zu spielen (Koch et al., 2014).

Zur Aufdeckung des genauen Mechanismus, der diese pro-apoptotische Funktion vermittelt, wurden in P10-Mäusen verschiedene Signalwege untersucht, die (1) entweder bereits in Zusammenhang mit *Myocilin* gebracht worden sind oder die (2) eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und Differenzierung spielen.

*Ad (1):* Wie bereits erwähnt moduliert *Myocilin* den *Wnt*-Signalweg durch Interaktion mit Rezeptoren der *Frizzled-* (*Fzd*-) Familie, sowie durch Wechselwirkung mit den *Wnt*-Antagonisten *Secreted frizzled-related proteins* (*sFRP*) und dem *Wnt inhibiting factor-1* (*WIF-1*). Insbesondere der nicht-kanonische Weg scheint durch *Myocilin* aktiviert zu werden, was in kultivierten Trabekelwerkzellen zur vermehrten Ausbildung von Stressfasern führt (Kwon HS et al., 2009). Der *Wnt*-Signalweg, v.a. der kanonische  $\beta$ -Catenin-Weg, spielt jedoch auch eine bedeutende Rolle bei der Augenentwicklung (Zilinski et al., 2004; Stigloher et al., 2006). Diverse Arbeiten zeigen, dass eine korrekte Aktivierung des Signalwegs im Rahmen der Organogenese u.a. notwendig für Zellproliferation und verschiedene Differenzierungsvorgänge ist (Megason et al., 2002; Saint-Jeannet et al., 1997; Ikeya et al., 1997; Hall et al., 2000; Wang et al., 2002; Lyuksyutova et al., 2003).

Beim kanonischen Signalweg führt die Bindung des Liganden an den *Frizzled*-Rezeptor (*Fzd*) und den Co-Rezeptor *LRP5/6* (*LDL-related protein 5/6*) zur Aktivierung des Proteins *Dishevelled*. Dieses inhibiert die Aktivität der Glykogen-Synthase-Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), welche ansonsten  $\beta$ -Catenin phosphoryliert und für die Degradation durch Proteasomen markiert. Durch die Inhibition der GSK-3 $\beta$  wird die Menge an  $\beta$ -Catenin im Zellkern erhöht, wo es zusammen mit den DNA-gebundenen Faktoren *TCF/LEF* die Transkription der entsprechenden Zielgene aktiviert (Widelitz, 2005).

Durch das Ausschalten des Myocilin-Gens könnten z.B. andere Aktivatoren des *Wnt*-Signalweges, wie *Wnt*-Proteine oder auch andere Mitglieder der Olfactomedin-Familie, kompensatorisch vermehrt exprimiert werden.

Der nicht-kanonische *Wnt*-Signalweg stellt einen alternativen Weg der Aktivierung von *Fzd*-Rezeptoren dar, der nicht an den Co-Rezeptor *LRP5/6* (*LDL-related protein 5/6*) gebunden ist.

Hierbei werden zwei Formen der nicht-kanonischen Signalweiterleitung unterschieden: Beim *Wnt/Ca<sup>2+</sup>*-Weg führt die Bindung des Liganden über einen G-Proteingekoppelten Mechanismus zur Aktivierung der Phospholipase C, woraufhin über weitere Kaskaden die intrazelluläre *Ca<sup>2+</sup>*-Konzentration stark ansteigt, was verschiedenste Folgen für die Zelle hat.

Beim sogenannten *Planar cell polarity pathway* hat die Bindung der Liganden die Aktivierung der kleinen GTPasen *Rac1* und *RhoA* zur Folge. *Downstream targets*, also nachgeschaltete Elemente dieser Kaskade, sind im Falle von *RhoA* die Kinasen *ROCK 1* und *2* (*Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1 and 2*), sowie im Falle von *Rac1* die Kinase *JNK* (*c-Jun-N-terminale-Kinase*) bzw. ihre phosphorylierte Form *pJNK* (*phospho-JNK*) (Montcouquiol et al., 2006).

Dieser Signalweg ist v.a. an der Ausbildung und Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts beteiligt, was funktionell bedeutsam ist für die Zelladhäsion, Zellmigration und Zellpolarität (Shulman et al., 1998; Yamanaka, 2002). Jedoch gibt es auch Hinweise, dass über diesen Weg Einfluss auf Apoptose genommen wird, speziell die vermehrte Aktivierung von *JNK* kann Apoptose begünstigen (Cross et al., 2000; Lin, 2003; Xia et al., 1995).

Kürzlich wurde ein Einfluss Myocilins auf die Zellmigration beschrieben, welcher durch Aktivierung des *Integrin-focal adhesion kinase (FAK)*-Signalweges vermittelt wird. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei die Serin-/Threonin-Kinase *Akt*, die mittels Phosphorylierung durch die Phosphatidylinositid-3-(PI3-) Kinase aktiviert wird (Kwon, Tomarev, 2011).

Zu den zahlreichen Funktionen, die *Akt* zu vermitteln vermag, gehört neben dem proliferationsfördernden Einfluss auf den Zellzyklus auch die Begünstigung des Überlebens von Zellen durch Beeinflussung des mitochondrialen Apoptoseweges. Dies geschieht durch direkte Hemmung der pro-apoptotisch wirkenden Proteine *Bax* und *Bad* sowie durch indirekte Stimulierung des anti-apoptotischen Proteins *Bcl-2* (Jomary et al., 2006). So wäre es ähnlich wie im Falle des *Wnt*-Signalweges

denkbar, dass überschießende kompensatorische Mechanismen in den Myocilin-KO-Tieren greifen und eine vermehrte Stimulation des PI3-Kinase-/Akt-Signalweges zur Folge haben. Dies würde zu einer geringeren Apoptoserate während der Phase des programmierten Zelltods führen.

*Ad (2):* Ein wichtiger Mechanismus in der Generation reifer Neuronen aus retinalen neuroepithelialen Vorläuferzellen sowie in der Differenzierung der Retina durch programmierten Zelltod ist die Expression zahlreicher Wachstumsfaktoren, wie z.B. *Insulin-growth factor 1* (Frade et al., 1996a), *Sonic hedgehog* (Levine et al., 1997), *Neuregulin-1* (Zhao, Lemke, 1998), *Fibroblast growth factor 1* (Guillemot, Cepko, 1992) und *Fibroblast growth factor 2* (Pittack et al., 1997).

Diese beeinflussen entweder parakrin oder auch durch retrograden axonalen Transport ausgehend vom Zielgewebe die entsprechenden Schritte (Neurotrophin-Hypothese) (Purves, 1988).

Zwei dieser Faktoren, *Nerve growth factor (NGF)* und *Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)*, nehmen insbesondere Einfluss auf den programmierten Zelltod, wobei das in der Retina exprimierte *NGF* eine apoptosefördernde Funktion innezuhaben scheint und das im retinalen Pigmentepithel exprimierte *BDNF* eher das Überleben der Neurone fördert (Hofer, Barde, 1988; Frade et al., 1996b und 1999). Beide Faktoren vermitteln ihre Wirkungen über die Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren (*trk*), wobei *NGF* präferentiell an den Rezeptor *trkA* bindet und *BDNF* an *trkB*. Außerdem binden beide Faktoren mit geringerer Affinität an den Rezeptor *p75* (Rodríguez-Tébar et al., 1990 und 1992).

Ein weiterer wichtiger Wachstumsfaktor, der in der Lage ist, im zentralen Nervensystem programmierten Zelltod zu induzieren, ist *Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )* (Krieglstein et al., 2000). Darüber hinaus ist *TGF- $\beta$*  funktionell an zahlreichen anderen Prozessen beteiligt, wie z.B. an der Kontrolle des Zellzyklus, Differenzierungsvorgängen, Angiogenese und Formation der extrazellulären Matrix (Massague et al., 2000). *TGF- $\beta$*  wird während der Zeit des programmierten Zelltods in zahlreichen neuronalen Geweben exprimiert, darunter auch in der sich entwickelnden Retina (Krieglstein et al., 1998; Dünker et al., 2001).

Seine Wirkung vermittelt *TGF- $\beta$*  durch Bindung an heteromere Komplexe von spezifischen Typ I und II *TGF- $\beta$* -Serin-/Threonin-Kinase-Rezeptoren:

Hierbei wird der Typ I Rezeptor nach Bindung des Liganden durch den konstitutiv aktiven Typ II Rezeptor phosphoryliert und das Signal u.a. über die Proteine *Smad 2* und *Smad 3* weiter übertragen, indem *Smad 2* und *Smad 3* nach Phosphorylierung in den Zellkern wandern und als Transkriptionsfaktoren dienen (Itoh et al., 2000).

Zusammenfassend ließ sich durch Analyse von Protein-Mengen und relativen Gen-Expressionen in keinem der untersuchten Signalwege eine eindeutige Erklärung für die verminderte Apoptoserate finden.

Ein Trend fiel allerdings im Rahmen der *pJNK*-Western-Blots auf. Aufgrund des hohen Standardfehlers und der geringen Fallzahl bei der Versuchsdurchführung würde sich eine Wiederholung dieses Versuches unter Verwendung weiterer Versuchstiere durchaus anbieten, was im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht möglich war. Eine erhöhte *pJNK*-Menge in den *Myocilin*<sup>-/-</sup>-Tieren könnte nämlich in der Tat eine Erklärung für die geringere Apoptoserate darstellen, denn wie oben erwähnt ist die Aktivierung von *JNK* mit Apoptose assoziiert (Cross et al., 2000; Lin, 2003; Xia et al., 1995), sodass umgekehrt eine verminderte Aktivierung von *JNK* in den *Myocilin*<sup>-/-</sup>-Tieren eine verminderte Apoptoserate zur Folge haben könnte.

*JNK* ist ein Mitglied der *MAPK* (*mitogen activated protein kinase*) – Superfamilie (Hibi et al., 1993). Seine Isoformen *JNK1* und *JNK2* werden ubiquitär im Körper exprimiert, während *JNK3* überwiegend in neuronalem Gewebe nachgewiesen wird (Davis et al., 2000; Chang, Karin, 2001; Lin, 2003). Die Aktivierung von *JNK* erfolgt durch eine Phosphorylierungskaskade unter Beteiligung von *MAPK*-Kinasen, die ihrerseits wiederum durch Kinasen aktiviert werden (Karin, 1995). Dabei ereignet sich dieser Vorgang nicht nur im Rahmen des dargestellten nicht-kanonischen *Wnt*-Signalwegs, sondern auch durch Wachstumsfaktoren (Hibi et al., 1993), Zytokine (Westwick et al., 1994) oder Stress-Faktoren (Cano et al., 1994).

Die Hauptfunktion von *JNK* besteht in der Phosphorylierung und somit Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie *c-Jun*, *p53*, *c-Myc*, aber auch von Molekülen, die keine Transkriptionsfaktoren darstellen, wie z.B. von Mitgliedern der *Bcl-2*-Familie (Hibi et al., 1993; Davis, 2000; Chang, Karin, 2001; Lin, 2003; Maundrell et al., 1997; Yu et al., 2004). Aufgrund der Vielzahl der Aktivatoren und Effektoren ist es nicht verwunderlich, dass der *JNK*-Signalweg zahlreiche Zellfunktionen wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung moduliert, insbesondere kann er auf die Apoptose sowohl fördernd, als auch hemmend wirken, je nach Zelltyp und Stimulus (Liu, Lin,

2005). Frühere Versuche zeigten jedoch, dass *JNK* im Rahmen der Entwicklung in der Tat eine apoptosefördernde Rolle einnehmen kann. So wurde an kultivierten Netzhaut-Zellen von E7-Hühner-Embryonen nachgewiesen, dass der TGF $\beta$ -induzierte Zelltod durch Aktivierung von *JNK* vermittelt wird (Schuster et al., 2002). Darüber hinaus konnte anhand von *JNK1/2*<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt werden, dass sich eine *JNK*-Defizienz in einer herabgesetzten Apoptoserate während der Hirnentwicklung äußert (Kuan et al., 1999). In diesem Sinne wäre es denkbar, dass auch in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen eine herabgesetzte Aktivierung von *JNK* zu verminderter Apoptose während der Ontogenese führt.

Allerdings wäre ebenso denkbar, dass Myocilin seine Funktion gänzlich ohne Beteiligung eines Rezeptors ausübt, sondern von den entsprechenden Zielzellen aufgenommen wird und dort eine direkte Wirkung auf Apoptose-Vorgänge nimmt. Weitere Versuche, insbesondere *in vitro*-Experimente, müssen diese Frage klären.

Myocilin-Defizienz wirkt sich offenbar nicht nur in der Netzhautentwicklung protektiv aus, sondern auch in der adulten Retina, was im Rahmen der durchgeführten Schadensmodelle deutlich wurde.

Einerseits wurden die retinalen Ganglienzellen mit NMDA geschädigt, einer Substanz, die durch massiven Ca<sup>2+</sup>-Einstrom zum exzitotoxischen Untergang der Zellen führt, andererseits wurde durch exzessive Bestrahlung der Tiere in den Photorezeptoren Apoptose induziert. Vor der Belichtung wurde eine bekannte Mutation im sogenannten RPE65-Gen ausgeschlossen, die eine deutlich verminderte Empfindlichkeit für Licht-induzierte Photorezeptor-Schädigung zur Folge hat. Hierbei ist an Position 450 der Aminosäuresequenz die Aminosäure Leucin durch Methionin ersetzt (*LeuRPE65Met*), wodurch in diesen Mäusen vermutlich durch einen posttrans-lationalen Mechanismus die Menge des RPE65-Protein (*Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein*) reduziert ist (Wenzel et al., 2001). Dieses Protein, das spezifisch im retinalen Pigmentepithel (RPE) exprimiert wird (Redmond et al., 1998), nimmt eine essenzielle Funktion im Sehzyklus bei der metabolischen Regeneration des Rhodopsin ein, das wie bereits erläutert eine Schlüsselrolle bei der Absorption von Photonen innehat. Beispielsweise sind RPE65<sup>-/-</sup>-Mäuse vollständig unempfindlich gegen Lichtschaden (Grimm et al., 2000). Durch eine reduzierte Menge des RPE65-Proteins wird folglich die Kinetik der Rhodopsin-Regeneration

und somit die Empfindlichkeit für Lichtschaden entscheidend verändert. Die Untersuchung einiger Versuchstiere zeigte jedoch keine Mutation im RPE65-Gen.

In beiden Schadensmodellen waren die Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäuse geschützter als die Wildtypen, was insofern bemerkenswert ist, als Myocilin unter Stressbedingungen vermehrt exprimiert wird und darüber hinaus mit dem *Wnt*-Signalweg interagiert.

Eine Aktivierung dieses Signalweges hat sowohl *in vivo* als auch *in vitro* einen neuroprotektiven Effekt (De Ferrari, 2003; Toledo; 2008). Unter dieser Annahme sollten die Myocilin<sup>-/-</sup>-Tiere durch fehlendes Myocilin und verminderte Stimulation des Signalweges empfindlicher auf den erzeugten Schaden reagieren. Die Myocilin<sup>-/-</sup>-Tiere tragen hingegen einen weniger ausgeprägten Schaden davon.

Eine kompensatorisch vermehrte Expression von anderen Aktivatoren des *Wnt*-Signalweges, möglicherweise sogar von anderen Mitgliedern der Olfactomedine wäre eine denkbare Erklärung. Eine Untersuchung der  $\beta$ -Catenin-Spiegel nach Lichtschaden in den Netzhäuten der entsprechenden Tiere wird diese Frage ebenso klären müssen, wie die Frage, ob die Myocilin-Expression generell durch die konkret durchgeführten Schadens-Experimente verändert wird.

Darüber hinaus könnte ebenso wie beim ontogenetischen Zelltod die Aktivierung von *JNK* herabgesetzt sein. Diese Überlegung wird durch die Tatsache gestützt, dass der *JNK*-Signalweg nicht nur eine pro-apoptotische Rolle während der Entwicklung zu spielen kann, sondern eine generelle apoptosefördernde Funktion auszuüben scheint. Dies wird z.B. dadurch deutlich, dass embryonale Maus-Fibroblasten mit *JNK1*- und *JNK2*-Defizienz resistent gegenüber UV-Licht-induzierter Apoptose sind (Tournier et al., 2000). Desweiteren erwiesen sich *JNK3*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Bereich des Hippokampus als resistent gegenüber Apoptose, die durch Kainat hervorgerufen wurde, einem Glutamat-Rezeptor-Agonisten, der ähnlich wie NMDA zum exzitotoxischen Untergang von Zellen führt (Yang et al., 1997). Auch bei weiteren Schadensmodellen wie dem NMDA-induzierten Netzhautschaden (Munemasa et al., 2005 und 2006) und einer direkten Verletzung des Sehnervs (*optic nerve crush*) (Fernandez et al., 2012) wurde gezeigt, dass die Aktivierung von *JNK* und dem Transkriptionsfaktor *c-Jun* entscheidend zur Apoptose-Einleitung beiträgt.

Andererseits konnten Grimm et al. nachweisen, dass sowohl die Apoptose-Vorgänge während der Ontogenese als auch Apoptose in Reaktion auf Licht-induzierte Photorezeptor-Schädigung unabhängig waren von einer N-terminalen *c-Jun*-Phosphory-

lierung und auch die Phosphorylierung von *JNK* änderte sich durch den Lichtschaden nicht (Grimm et al., 2001).

Viele Signalwege spielen bei der Reaktion des Organismus auf eine Schädigung der Netzhaut eine Rolle, darunter auch die Expression zahlreicher neuroprotektiver Wachstumsfaktoren, wie z.B. *Leukemia inhibitory factor*, *Endothelin-2*, *Fibroblast growth factor-2*, *Brain-derived neurotrophic growth factor*, *Ciliary neurotrophic growth factor*, *Vascular endothelial growth factor*, *Lens epithelium-derived growth factor* und *Pigment epithelium-derived growth factor* (Mey, Thanos, 1993; Unoki, LaVail, 1994; Wen et al., 1995; Gao, Hollyfield, 1996; Cayouette et al., 1998; Ogata et al., 2001, Inomata et al., 2003, Schuettauf et al., 2004; Rattner, Nathans, 2005; Joly et al., 2007 und 2008; Seitz et al., 2010). Die Abwesenheit von Myocilin könnte eine veränderte Expression ein oder mehrerer dieser Faktoren zur Folge haben, die zu einer verminderten Apoptoserate in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen führt. Weitere Untersuchungen hierzu sind bereits in Planung.

Schließlich konnte ein apoptosefördernder Effekt von Myocilin auch *in vitro* nachgewiesen werden. Hierzu wurden differenzierte RGC-5-Zellen verwendet, die sich gut zum Vergleich mit *in vivo*-Verhältnissen eignen. Die Behandlung der Zellen mit serumfreiem, Myocilin-haltigem Medium hatte ein vermehrtes Absterben zur Folge im Vergleich zur Behandlung mit Kontroll-Medium. Dabei konnte der Effekt durch einen Myocilin-Antikörper vollständig aufgehoben werden, was dafür spricht, dass der nachgewiesene Effekt sehr wahrscheinlich spezifisch durch Myocilin hervorgerufen wurde.

Frühere *in vitro*-Experimente zeigten bereits, dass Transfektion von mutiertem Myocilin in PC12-Zellen und RGC-5-Zellen mit einer erhöhten Apoptoserate einherging (Koga et al., 2010). Außerdem hatte auch Transfektion von Wildtyp-Myocilin mit anschließender Apoptose-Induktion durch anti-Fas eine erhöhte Apoptoserate zur Folge (Sakai et al., 2007). Somit scheint sowohl endogenes, als auch exogen zugeführtes Myocilin Apoptose verstärken zu können, was darauf hindeuten könnte, dass Myocilin seine Funktion nicht rezeptorvermittelt ausübt, sondern von den behandelten Zellen internalisiert wird und eine direkte Wirkung in der Zelle entfaltet. Koga et al. konnten im Rahmen ihrer Arbeit allerdings zeigen, dass Myocilin unter normalen Kulturbedingungen nicht von Zellen aufgenommen wird

(Koga et al., 2010). Ob dies auch unter serumfreien Bedingungen der Fall ist, müssen weitere Experimente klären, denn es ist durchaus denkbar, dass der Entzug von Wachstumsfaktoren zu einer unspezifischen Aufnahme von Proteinen führt, die unter normalen Kulturbedingungen nicht erfolgt.

Insgesamt zeigte sich bei den durchgeführten Versuchen, sowohl zum ontogenetischen Zelltod als auch im Rahmen der Schadensmodelle, dass sich die Myocilin-Defizienz in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren schützend auswirkt, ganz im Gegensatz zu der Annahme, dass Myocilin neuroprotektive Eigenschaften aufweist. Im Umkehrschluss könnte man Myocilin eine generelle apoptosefördernde Funktion zuschreiben.

Interessanterweise wurde kürzlich eine solche Möglichkeit diskutiert:

Myocilin liegt in Trabekelwerkszellen an Mitochondrien assoziiert vor (Wentz-Hunter et al., 2003). Konkret wird es über die äußere Mitochondrien-Membran in den intermembranösen Raum transportiert und lagert sich dort der äußeren und inneren Membran an. Durch Behandlung von Trabekelwerkszellen mit Dexamethason konnte ebenso wie nach Transfektion eines Myocilin-Überexpressionsvektors eine Depolarisation der Mitochondrienmembran in den Zellen erzeugt werden (Sakai et al., 2007). Eine derartige Potentialerniedrigung wird wiederum als ein frühes Ereignis im Rahmen apoptotischer Ereignisse gesehen (Zamzami et al., 1995; Susin et al., 1999; Zamzami, Kroemer, 2001). Weitere Versuche zeigten jedoch, dass alleinige Transfektion eines (Wildtyp-) Myocilin-Überexpressionsvektors in PC12- und RGC-5-Zellen nicht zu einer erhöhten Apoptoserate führte (Koga et al., 2010). Allerdings ließ sich nach zusätzlicher Apoptose-Induktion durch anti-Fas tatsächlich eine vermehrte Apoptoserate im Vergleich zu nicht transfizierten Zellen beobachten. So könnte man annehmen, dass Myocilin in diesem Zusammenhang nicht direkt ursächlich für die Apoptoseeinleitung ist, sondern durch Beeinflussung des mitochondrialen Membranpotentials eine Art Sensibilisierung für apoptotische Stimuli hervorruft (Sakai et al., 2007). Zu beachten ist jedoch, dass diese Eigenschaft von Myocilin zellspezifisch zu sein scheint, denn der beschriebene Effekt konnte zwar in humanen Trabekelwerkszellen, nicht jedoch in Fibroblasten der Cornea erzielt werden. Eine mitochondriale Assoziation von Myocilin ist andererseits nicht nur für Trabekelwerkszellen, sondern beispielsweise auch für Astrozyten beschrieben (Noda et al., 2000), sodass eine ähnliche Funktion durchaus auch in anderen Zelltypen, wie z.B. in Zellen der Retina, denkbar wäre.

Der Befund, dass die Abwesenheit von Myocilin in der Retina vor Apoptose schützt, könnte durch das Fehlen von intrazellulärem Myocilin und somit der fehlenden Triggerung der apoptotischen Stimuli, die in den durchgeführten Versuchen erzeugt wurden, erklärt werden. Denn sowohl nach NMDA-Injektion bzw. nach Lichtschaden als auch im Rahmen der untersuchten postnatalen Differenzierungsvorgänge stehen Apoptoseereignisse im Mittelpunkt.

Interessanterweise traten in den letzten Jahren Ansätze in den Vordergrund, dass es sich auch bei der Glaukom-Erkrankung selbst um eine komplexe mitochondriale Erkrankung handeln könnte. Ähnlich wie bei anderen Mitochondrien-assoziierten Erkrankungen, z.B. der hereditären *Leber-Optikusatrophie* und der autosomal-dominant vererbten *Optikusatrophie* (Howell, 2003; Alexander et al., 2000) konnten bei Patienten mit Primärem Offenwinkelglaukom zahlreiche Mutationen im Bereich der mitochondrialen DNA festgestellt werden, die bei gesunden Kontrollpersonen nicht vorhanden waren. Darüber hinaus zeigten 21% der Patienten eine Dysfunktion der mitochondrialen Atmungskette (Abu-Amero et al., 2006). Außerdem konnten in Lymphoblasten von Patienten mit POAG funktionelle Alterationen im Bereich der Atmungskette und ATP-Synthese nachgewiesen werden (Lee et al., 2012). Wenn man die Tatsache bedenkt, dass bei Patienten mit Mutationen im Myocilin-Gen der physiologische Sekretionsmechanismus gestört ist und Myocilin in der Zelle akkumuliert, wäre es denkbar, dass Myocilin durch zusätzliche Störung der regelrechten Mitochondrien-Funktion zum Verlust von retinalen Ganglienzellen führen könnte.

## V.2 Olfactomedin-1 (Pancortin)

Der Großhirn-Cortex von Pancortin-defizienten Mäusen ist bei Induktion von Ischämie vor einer neuronalen Schädigung geschützt. Hierbei scheint der mitochondriale Apoptoseweg eine entscheidende Rolle einzunehmen. So bildet Pancortin-2 in Reaktion auf die Ischämie zusammen mit *WAVE 1* und *Bcl-xL* (Cheng et al., 2007) einen Komplex, der letztendlich zur erhöhten Cytochrom c-Freisetzung und Apoptose führt. Fehlt funktionsfähiges Pancortin-2, so kann dieser Komplex nicht gebildet werden und die Tiere sind vor Apoptose geschützt.

Um die Frage zu beantworten, ob diese Tiere im Bereich der Netzhaut, dem neuronalen Gewebe des Auges, ebenso weniger empfindlich auf eine Schädigung reagieren, wurde in Vorversuchen der Arbeitsgruppe eine Licht-induzierte Schädigung der Photorezeptoren hervorgerufen. Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass das Pancortin-Gen in diesen Tieren keineswegs wie behauptet ausgeknockt ist, sondern dass diese Tiere ein mutiertes Protein ohne die Exone M2 und Y exprimieren. Immunhistochemisch konnte Pancortin in der Interphotorezeptormatrix zwischen Photorezeptoren und retinalem Pigmentepithel lokalisiert werden, was auf eine Funktion für die Integrität dieser komplexen Struktur hinweist.

Es zeigte sich jedoch, dass die Pancortin-defizienten Tiere nach Belichtung einen größeren Schaden erlitten als die Wildtypen. Dies wurde durch Vermessung der Dicke der äußeren Körnerschicht eine Woche nach Belichtung nachgewiesen.

Dieser Vorbefund wurde in der vorliegenden Arbeit durch TUNEL-Färbungen, die 30 Stunden nach Belichtung durchgeführt wurden, bestätigt, der *Cell Death Detection ELISA* konnte den Befund allerdings nicht stützen. Möglicherweise ist dieser Assay nicht sensitiv genug, um den prozentual nicht allzu ausgeprägten Unterschied zwischen den beiden Gruppen nachzuweisen.

Insgesamt treten offenbar die Photorezeptoren in den Pancortin-defizienten Mäusen durch den Lichtschaden lediglich früher in die Apoptose ein als in den Wildtypen, denn zwei Wochen nach Belichtung zeigte sich in den Wildtypen ein ebenso großer Schaden wie in den Pancortin-defizienten Tieren. Möglicherweise können aufgrund der Pancortin-Defizienz frühe Reparaturmechanismen nicht greifen, die in den Wildtypen zu einem verzögerten Zelluntergang führen.

Im Gegensatz zur Ischämie-Induktion im Gehirn scheint eine Beteiligung Pancortins am mitochondrialen Apoptoseweg nach Licht-induzierter Schädigung der Photorezeptoren weniger von Bedeutung zu sein, obwohl dieser nachgewiesenermaßen in der Netzhaut aktiv ist. Vermutlich spielt er jedoch nur bei ischämischer Netzhautschädigung eine Rolle (Zhang et al., 2005).

Aufgrund der Lokalisation von Pancortin könnte man aber eine funktionelle Rolle innerhalb der Interphotorezeptormatrix (IPM) annehmen.

Die IPM stellt eine komplexe Struktur aus Wachstumsfaktoren, Metalloproteasen und Proteoglykanen dar, die vielfältige Funktionen auszuüben scheint, u.a. scheint sie am Austausch von Nährstoffen (Gonzales-Fernandez et al., 2003) und am Erhalt von Photorezeptoren (Hollyfield et al., 1989) beteiligt zu sein: In Zellkulturversuchen wurde bereits gezeigt, dass sich die IPM positiv auf das Überleben von Photorezeptoren auswirkt (Hewitt et al., 1990).

Auch beim Sehvorgang nimmt die IPM eine bedeutende Rolle ein: Die Regeneration des Rhodopsins im Rahmen des Sehzyklus erfolgt durch Interaktion von Photorezeptoren und retinalem Pigmentepithel (Saari, 2000). Hierbei müssen die entsprechenden Metabolite vermutlich unter Beteiligung des Proteins *IRBP* (*interphotoreceptor retinoid-binding protein*) genau jene Interphotorezeptormatrix passieren, sodass auch das dort lokalisierte Pancortin die Regeneration entscheidend beeinflussen könnte. Eine gesteigerte Regenerationskinetik kann bei der Neuroprotektion nach Lichtschaden eine wichtige Rolle spielen (Remé et al., 1998a, b; Wenzel et al., 2001) und als Erklärung für den größeren Schaden bei den Pancortin-defizienten Tieren nach Belichtung in Betracht kommen.

Aufgrund dieser Überlegungen wurden die Ausgangsmenge von Rhodopsin und seine Regeneration im Sehzyklus nach zehnminütiger Belichtung untersucht. Es zeigte sich jedoch, dass sowohl die Ausgangsmenge an Rhodopsin als auch die Regeneration bei den Pancortin-defizienten Tieren unverändert sind gegenüber den Wildtypen. So dient dieser Punkt nicht zur Beantwortung der Frage, warum die Pancortin-defizienten Tiere zunächst empfindlicher auf Lichtschaden reagieren.

Pancortin scheint ebenso wie Myocilin den *Wnt*-Signalweg zu modulieren (Nakaya et al., 2008; Kwon HS et al., 2009). Wie im Abschnitt V.1 beschrieben, ist die neuroprotektive Rolle dieses Signalweges gut bekannt.

So wäre es durchaus denkbar, dass fehlendes Pancortin in den defizienten Mäusen eine verminderte Stimulation des *Wnt*-Signalweges zur Folge hat, was sich wie in unserem Befund in einer größeren Schädigung der Photorezeptoren nach Belichtung äußert.

Andererseits zeigen die Lichtschadensversuche mit den Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen einen gegenläufigen Effekt, denn diese sind vor einer Licht-induzierten Schädigung der Photorezeptoren besser geschützt als die Wildtypen.

Aufgrund der Tatsache, dass beide Proteine Mitglieder der Olfactomedin-Familie sind, scheint es fragwürdig, ob hier tatsächlich die Modulation des *Wnt*-Signalweges, die für beide Proteine nachgewiesen wurde, zur Erklärung herangezogen werden kann.

Neben dem *Wnt*-Signalweg gibt es, wie unter V.1 beschrieben, zahlreiche protektiv wirkende Wachstumsfaktoren, die als Reaktion auf Licht-induzierte Schädigung der Photorezeptoren exprimiert werden.

Eine veränderte Expression dieser Faktoren in den Pancortin-defizienten Tieren könnte ebenso zur Erklärung der stärkeren Schädigung herangezogen werden.

Versuche, die zur Beantwortung dieser Fragen dienen sollen, sind bereits in Planung.

## VI. Zusammenfassung

Myocilin und Olfactomedin-1 (Pancortin) sind Proteine der Olfactomedin-Familie, deren Funktionen bisher weitgehend unbekannt sind. In der vorliegenden Arbeit wurde daher mit Hilfe von Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen versucht, Erkenntnisse über deren Funktion zu gewinnen. Da beide Proteine in der Netzhaut lokalisiert sind und im Falle von Myocilin Gen-Mutationen beim Menschen zur schwerwiegenden Glaukom-Erkrankung führen können, die mit einer Schädigung der Netzhaut einhergeht, wurde ein besonderes Augenmerk auf dieses Gewebe gelegt. Morphologische Untersuchungen von Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen deckten einen neuen, bisher unbekanntem Phänotyp auf: So enthalten deren Sehnerven mehr Axone und deren Netzhäute mehr Neuronen in allen Schichten im Vergleich zu den Wildtypen. Der Grund für diesen Befund scheint eine Modulierung des ontogenetischen Zelltods zu sein. TUNEL-Färbungen zeigten, dass Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten weniger apoptotische Zellen in der Netzhaut aufweisen als die Wildtypen. In weiteren Versuchen wurde deutlich, dass sich die Myocilin-Defizienz nicht nur in der Entwicklung protektiv auswirkt, sondern auch nach Schädigung der retinalen Ganglienzellen durch NMDA und der Photorezeptoren durch Licht. Die Vermutung, dass Myocilin eine pro-apoptische Rolle spielen könnte, wurde durch *in vitro*-Experimente bestätigt, in denen RGC-5-Zellen mit Myocilin-haltigem Überstand aus HEK293-Zellen behandelt wurden und dabei in höherem Maße in Apoptose eintraten als die Zellen mit Kontrollbehandlungen. Der Versuch, Signalwege zu identifizieren, die während der Entwicklung für das Überleben der Neurone in den Myocilin<sup>-/-</sup>-Tieren verantwortlich sind, blieb insgesamt ohne eindeutiges Ergebnis.

Im Gegensatz zu Myocilin<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigen Pancortin-defiziente Mäuse, die eine mutierte Form des Proteins exprimieren, keine morphologischen Auffälligkeiten in der Netzhaut. Vorversuche der Arbeitsgruppe legen allerdings nahe, dass diese Tiere sensibler auf eine Licht-induzierte Schädigung der Photorezeptoren reagieren als Wildtypen. Dieser Befund wurde anhand von TUNEL-Färbungen voll bestätigt. Die Vermutung, dass Pancortin aufgrund seiner Lokalisation in der Interphotorezeptor-matrix die Rhodopsin-Regeneration beeinflusst, konnte nicht bestätigt werden.

Insgesamt wurde in der Arbeit deutlich, dass die beiden untersuchten Olfactomedine unterschiedliche, aber spezifische Wirkungen auf die Netzhaut aufweisen.

## VII. Summary

Myocilin and Olfactomedin-1 (Pancortin) are two proteins of the Olfactomedin family whose functional properties are widely unknown. Using Myocilin- and Pancortin-deficient mice the aim of this study was to investigate the functional role of those proteins.

As both proteins are located within the retina and mutations in the Myocilin gene are associated with glaucoma, a severe disease leading to retinal degeneration and irreversible blindness, special emphasis was given to this structure.

Morphological data demonstrate an ocular phenotype in Myocilin<sup>-/-</sup> mice: In those animals the number of axons within the optic nerve and the number of neurons in the retina is increased compared to wildtype littermates. These findings may be explained by a modulation of the ontogenetic or programmed cell death. TUNEL-stainings at different stages of retinal development confirm a reduction of apoptotic cells in Myocilin<sup>-/-</sup> mice compared to wildtypes. Moreover, Myocilin<sup>-/-</sup> mice are not only protected against apoptotic cell death during development, but also against retinal damage by NMDA-injection and light damage. The assumption of a pro-apoptotic role of Myocilin was checked by *in vitro* experiments. Therefore RGC-5 cells were treated with a Myocilin-containing medium under serum-free conditions in order to induce apoptosis. In this experiment the incidence of apoptosis was increased compared to treatment with a control medium. Several signaling pathways were checked to identify a mechanism which may be responsible for the neuronal survival in Myocilin<sup>-/-</sup> mice during development. The experiments however revealed no significant alterations in the transgenic animals.

In contrast to Myocilin<sup>-/-</sup> mice, Pancortin-deficient mice expressing a mutant form of Pancortin show no morphological abnormalities in the retina. Previous investigations by our group lead to the assumption that Pancortin-deficient mice are more sensitive towards light damage compared to wildtypes. This could be confirmed by TUNEL stainings showing an increased number of apoptotic photoreceptors in the transgenic animals. Though localized within the interphotoreceptor matrix Pancortin does not affect Rhodopsin regeneration.

To sum up the data revealed different but specific effects of olfactomedins on the retina.

## VIII. Anhang

### VIII.1 Literaturverzeichnis

Abu-Amero KK, Morales J, Bosley TM (2006): "Mitochondrial abnormalities in patients with primary open-angle glaucoma". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 47(6):2533-41.

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.

Alexander C, Votruba M, Pesch UE, et al. (2000): "OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28". *Nat Genet*; 26:211–215.

Alvarado J, Murphy C, Juster R. (1984): "Trabecular meshwork cellularity in POAG and nonglaucomatous normals". *Ophthalmology*; 91:564–579.

Alward WL, Kwon YH, Kawase K, Craig JE, Hayreh SS, Johnson AT et al. (2003): "Evaluation of optineurin sequence variations in 1,048 patients with open-angle glaucoma". *Am J Ophthalmol*; 136:904–910.

Armaly MF (1963): "Effect of corticosteroids on intraocular pressure and fluid dynamics". *Arch Ophthalmol*; 70:494–499.

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.

Aung T, Ebenezer ND, Brice G, Child AH, Prescott Q, Lehmann OJ et al. (2003): "Prevalence of optineurin sequence variants in adult primary open angle glaucoma: implications for diagnostic testing". *J Med Genet*; 40(8):e101.

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

Becker B, Hahn KA (1964): "Topical corticosteroids and heredity in primary open-angle glaucoma". *Am J Ophthalmol*; 57:543–551.

Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski, JA (1995): "The role of DNA fragmentation in apoptosis". *Trends Cell Biol*; 5(1):21-26.

Bron A, Chaine G, Villain M, Colin J, Nordmann JP, Renard JP, Rouland JF (2008): "Risk factors for primary open-angle glaucoma.". *J Fr Ophtalmol*; 31(4):435-44.

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

Caballero M, Borrás T (2001): "Inefficient processing of an olfactomedin-deficient myocilin mutant: potential physiological relevance to glaucoma". *Biochem Biophys Res Commun*; 282:662–670.

Cano E, Hazzalin CA, Mahadevan LC (1994): "Anisomycin-activated protein kinases p45 and p55 but not mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2 are implicated in the induction of c-fos and c-jun". *Mol Cell Biol*; 14:7352–7362.

Cayouette M, Behn D, Sendtner M, Lachapelle P, Gravel C (1998): "Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse". *J Neurosci*; 18:9282–9293.

Chang L, Karin M (2001): "Mammalian MAP kinase signalling cascades". *Nature*; 410: 37-40.

Charles I, Khalyfa A, Kumar DM, Krishnamoorthy RR, Roque RS, Cooper N, Agarwal N (2005): "Serum deprivation induces apoptotic cell death of transformed rat retinal ganglion cells via mitochondrial signaling pathways". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 46:1330-1338.

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.

Chomczynski P (1993): "A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples". *BioTechniques*; 15(3):532-534, 536-537.

Clark AF, Kawase K, English-Wright S, Lane D, Steely HT, Yamamoto T, Kitazawa Y, Kwon YH, Fingert JH, Swiderski RE, Mullins RF, Hageman GS, Alward WL, Sheffield VC, Stone EM (2001a): "Expression of the glaucoma gene myocilin (MYOC) in the human optic nerve head". *FASEB J*; 15:1251–1253.

Clark AF, Steely HT, Dickerson JE Jr, English-Wright S, Stropki K, McCartney MD, Jacobson N, Shepard AR, Clark JI, Matsushima H, Peskind ER, Leverenz JB, Wilkinson CW, Swiderski RE, Fingert JH, Sheffield VC, Stone EM (2001b): "Glucocorticoid induction of the glaucoma gene MYOC in human and monkey trabecular meshwork cells and tissues". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 42:1769–1780.

Connolly SE, Hores TA, Smith LE, D'Amore PA (1988): "Characterization of vascular development in the mouse retina". *Microvas Res*; 36:275.

Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM (2000): "Serine/threonine protein kinases and apoptosis". *Exp Cell Res*; 256: 34–41.

Cuadros MA, Rios A (1988): "Spatial and temporal correlation between early nerve fiber growth and neuroepithelial cell death in the chick embryo retina", *Anat Embryol*; 178:543–551.

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.

Davis RJ (2000): "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases". *Cell*; 103: 239-52.

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.

Deiner MS, Kennedy TE, Fazeli A, Serafini T, Tessier-Lavigne M, Sretavan DW (1997): "Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia". *Neuron*; 19:575.

Dünker N, Schuster N, Kriegelstein K (2001): "TGF-beta modulates programmed cell death in the retina of the developing chick embryo". *Development*; 128:1933-1942

Eshed Y, Feinberg K, Poliak S, Sabanay H, Sarig-Nadir O, Spiegel I, Bermingham JR, Peles E (2005): "Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier". *Neuron*; 47(2):215-229.

Eshed Y, Feinberg K, Carey DJ, Peles E (2007): "Secreted gliomedin is a perinodal matrix component of peripheral nerves". *J Cell Biol*; 177(3):551-562.

Eysel U, Grüsser-Cornehls U (2004) in: Schmidt, Lang, Thews: „Physiologie des Menschen“. 29. Auflage, 368-407, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Fernandes KA, Harder JM, Fornarola LB, Freeman RS, Clark AF, Pang IH, John SW, Libby RT (2012): "JNK2 and JNK3 are major regulators of axonal injury-induced retinal ganglion cell death". *Neurobiol Dis*; 46(2):393-401.

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.

Frade JM, Marti E, Bovolenta P, Rodríguez-Pena MA, Perez-Garcia D, Rohrer H, Edgar D, Rodríguez-Tébar A (1996a): "Insulin-like growth factor-I stimulates neurogenesis in chick retina by regulating expression of the alpha 6 integrin subunit". *Development*; 122:2497–2506.

Frade JM, Rodríguez-Tébar A, Barde YA (1996b): "Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor". *Nature*; 383: 166–168.

Frade JM, Barde YA (1999): "Genetic evidence for cell death mediated by nerve growth factor and the neurotrophin receptor p75 in the developing mouse retina and spinal cord". *Development*; 126:683-690.

Frassetto LJ, Schlieve CR, Lieven CJ, Utter AA, Jones MV, Agarwal N, Levin LA (2006): "Kinase-dependent differentiation of a retinal ganglion cell precursor". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 47(1):427-38.

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.

Gao H, Hollyfield JG (1996): "Basic fibroblast growth factor: increased gene expression in inherited and light-induced photoreceptor degeneration". *Exp Eye Res*; 62:181–189.

Gobeil S, Rodrique M-A, Moisan S, Nguyen TD, Polansky JR, Morissette J, Raymond V (2004): "Intracellular sequestration of hetero-oligomers formed by wild-type and glaucoma-causing myocilin mutants". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 45:3560–3567.

Goldwich 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.

Grimm C, Wenzel A, Behrens A, Hafezi F, Wagner EF, Remé CE (2001): "AP-1 mediated retinal photoreceptor apoptosis is independent of N-terminal phosphorylation of c-Jun". *Cell Death Differ*; 8(8):859-67.

Guillemot F, Cepko CL (1992): "Retinal fate and ganglion cell differentiation are potentiated by acidic FGF in an in vitro assay of early retinal development. *Development*; 114:743-754.

Hall AC, Lucas FR, Salinas PC (2000): "Axonal remodeling and synaptic differentiation in the cerebellum is regulated by WNT-7a signaling". *Cell*; 100: 525-535.

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.

Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M (1993): "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain". *Genes Dev*; 7:2135-48.

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, Vacquier VD (2003): "Amassin, an olfactomedin protein, mediates the massive intercellular adhesion of sea urchin coelomocytes". *J Cell Biol*; 160(4):597-604. VI. Anhang 114.

Hofer, MM, Barde, YA (1988): "Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death *in vivo*". *Nature*; 331:261-262.

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.

Howell N (2003): "LHON and other optic nerve atrophies: the mitochondrial Connection". *Dev Ophthalmol*; 37:94-108.

Ikeya M, Lee SM, Johnson JE, McMahon AP, Takada S (1997): "Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors". *Nature*; 389: 966–970.

Inomata H, Haraguchi T, Sasai Y (2008): "Robust stability of the embryonic axial pattern requires a secreted scaffold for chordin degradation". *Cell*; 134(5):854-865.

Inomata Y, Hirata A, Koga T, Kimura A, Singh DP, Shinohara T, Tanihara H (2003): "Lens epithelium-derived growth factor: neuroprotection on rat retinal damage induced by N-methyl-D-aspartate". *Brain Res*; 991:163–170.

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

Itoh S, Itoh, F, Goumans, MJ, ten Dijke, P (2000): "Signaling of transforming growth factor- $\beta$  family members through Smad proteins". *Eur J Biochem*; 267: 6954-6967.

Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997): "Programmed cell death in animal development". *Cell*; 88:347–354.

Joe MK, Sohn S, Hur W, Moon Y, Choi YR, Kee C (2003): "Accumulation of mutant myocilins in ER leads to ER stress and potential cytotoxicity in human trabecular meshwork cells". *Biochem Biophys Res Commun*; 312:592–600.

Joly S, Pernet V, Chemtob S, Di Polo A, Lachapelle P (2007): "Neuroprotection in the juvenile rat model of light-induced retinopathy: evidence suggesting a role for FGF-2 and CNTF". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 48:2311–2320.

Joly S, Lange C, Thiersch M, Samardzija M, Grimm C (2008): "Leukemia inhibitory factor extends the lifespan of injured photoreceptors *in vivo*". *J Neurosci*; 28:13765–13774.

Jomary C, Cullen J, Jones SE (2006): "Inactivation of the Akt survival pathway during photoreceptor apoptosis in the retinal degeneration mouse". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 47(4):1620-9.

Juryneć 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.

Kanagavalli J, Pandaranayaka PJ, Krishnadas SR, Krishnaswamy S, Sundaresan P (2007): "In vitro and in vivo study on the secretion of the Gly367Arg mutant myocilin protein". *Mol Vis*; 13:1161–1168.

Karavanich CA, Anholt RR (1998): "Molecular evolution of olfactomedin". *Mol Biol Evol*; 15(6):718-726.

Karin M (1995): "The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases". *J Biol Chem*; 270:16483-6.

Kaufman MH, Bard JBL (1999): "The Anatomical Basis of Mouse Development". Harcourt Brace, San Diego.

- 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.
- Kirsch J (2007), in: Duale Reihe Anatomie, 1054-1080, Thieme Verlag, Stuttgart, 2007.
- 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*; 242(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
- 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.
- Kriegstein K, Farkas L, Unsicker K (1998): "TGF- $\beta$  regulates the survival of ciliary ganglionic neurons synergistically with ciliary neurotrophic factor and neuro-trophins". *J Neurobiol*; 37:563-572.
- Kriegstein K, Richter S, Farkas L, Schuster N, Dünker N, Oppenheim RW, Unsicker K (2000): „Reduction of endogenous transforming growth factors beta prevents ontogenetic neuron death". *Nat Neurosci*; 3(11):1085-90.
- Krishnamoorthy RR, Agarwal P, Prasanna G, Vopat K, Lambert. W, Sheedlo HJ, Pang IH, Shade D, Wordinger RJ, Yorio T, Clark AF, Agarwal N (2001): "Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line". *Mol Brain Res*; 86: 1–12.
- Kuan CY, Yang D, Samanta Roy DR, et al. (1999): "The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development". *Neuron*; 22:667-76.
- Kueng-Hitz N, Grimm C, Linsel N, Hafezi F, He L, Fox DA, Remé CE, Niemeyer G, Wenzel A (2000): "The retina of c-fos-/- mice: electrophysiologic, morphologic and biochemical aspects". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 41(3):909-16.
- 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.

Laemmli UK (1970): “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”. *Nature*; 227(5259):680-685.

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.

Lee S, Sheck L, Crowston JG, Van Bergen NJ, O'Neill EC, O'Hare F, Kong YX, Chrysostomou V, Vincent AL, Trounce IA (2012): “Impaired complex-I-linked respiration and ATP synthesis in primary open-angle glaucoma patient Lymphoblasts”. *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 53:2431–2437.

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.

Levine EM, Roelink H, Turner J, Reh TA (1997): “Sonic hedgehog promotes rod photoreceptor differentiation in mammalian retinal cells in vitro”. *J Neurosci*; 17:6277–6288.

Lin A (2003): “Activation of the JNK signaling pathway: breaking the break on apoptosis”. *Bioessays*; 25:1-8.

Liu J, Lin A (2005): “Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword”. *Cell Res*; 15:36–42.

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.

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.

Lockshin RA, Zakeri Z (2001): “Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory”. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2:545–550.

Loria PM, Hodgkin J, Hobert O (2004): "A conserved postsynaptic transmembrane protein affecting neuromuscular signaling in *Caenorhabditis elegans*". *J Neurosci*; 24(9):2191-2201.

Lüllmann-Rauch R (2006): Taschenlehrbuch Histologie, 2. Auflage, 581-589, Thieme Verlag, Stuttgart.

Lutjen-Drecoll E, May CA, Polansky JR, Johnson DH, Bloemendal H, Nguyen TD (1998): "Localization of the stress proteins alpha B-crystalline and trabecular meshwork inducible glucocorticoid response protein in normal and glaucomatous trabecular meshwork". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 39:517-525.

Lyuksyutova AI, Lu CC, Milanesio N, King LA, Guo N, Wang Y, Nathans J, Tessier-Lavigne M, Zou Y (2003): "Anterior-posterior guidance of commissural axons by Wnt-frizzled signaling". *Science*; 302: 1984-1988.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook, J (1989): "Molecular cloning : a laboratory manual". Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.

Massague J, Chen YG (2000): "Controlling TGF- $\beta$  signaling". *Genes Dev*; 14:627-644.

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

Maudrell K, Antonsson B, Magnenat E, et al. (1997): "Bcl-2 undergoes phosphorylation by c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinases in the presence of the constitutively active GTPbinding protein Rac1". *J Biol Chem*; 272:25238-42.

Megason SG, McMahon AP (2002): "A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS". *Development*; 129: 2087-2098.

Mertts M, Garfield S, Tanemoto K, Tomarev SI (1999): "Identification of the region in the N-terminal domain responsible for the cytoplasmic localization of MYOC/TIGR and its association with microtubules". *Lab Invest*; 79:1237-1245.

Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR (1998): "Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future". *Trends Genet*; 14:410-416.

Mey J, Thanos S (1993): "Intravitreal injections of neurotrophic factors support the survival of axotomized retinal ganglion cells in adult rats in vivo". *Brain Res*; 602:304-317.

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.

Montcouquiol M, Crenshaw EB 3rd, Kelley MW (2006): "Noncanonical Wnt signaling and neural polarity". *Annu Rev Neurosci*; 29:363-86.

Moreno TA, Bronner-Fraser M (2001): "The Secreted Glycoprotein Noelin-1 Promotes Neurogenesis in *Xenopus*. *Developmental Biology*; 240(2):340-360.

Moreno TA, Bronner-Fraser M (2005): "Noelins modulate the timing of neuronal differentiation during development". *Developmental Biology*; 288(2):434-447.

Munemasa Y, Ohtani-Kaneko R, Kitaoka Y, Kuribayashi K, Isenoumi K, Kogo J, Yamashita K, Kumai T, Kobayashi S, Hirata K, Ueno S (2005): "Contribution of mitogen-activated protein kinases to NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina". *Brain Res*; 1044:227–240.

Munemasa Y, Ohtani-Kaneko R, Kitaoka Y, Kumai T, Kitaoka Y, Hayashi Y, Watanabe M, Takeda H, Hirata K, Ueno S (2006): "Pro-apoptotic role of c-Jun in NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina". *J Neurosci Res*; 83(5):907-18.

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.

Noda S, Mashima Y, Obazawa M, Kubota R, Oguchi Y, Kudoh J, Minoshima S, Shimizu N (2000): "Myocilin expression in the astrocytes of the optic nerve head". *Biochem Biophys Res Commun*; 276:1129–1135.

O'Brien ET, Ren X-O, Wang Y (2000): "Localization of myocilin to the Golgi apparatus in Schlemm's canal cells". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 41:3842–3849.

Ogata N, Wang L, Jo N, Tombran-Tink J, Takahashi K, Mrazek D, Matsumura, M (2001): "Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury". *Curr Eye Res*; 22:245–252.

Ohlmann A, Goldwisch A, Flugel-Koch C, Fuchs AV, Schwager K, Tamm ER (2003): "Secreted glycoprotein myocilin is a component of the myelin sheath in peripheral nerves". *Glia*; 43:128–140.

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

Pei YF, Rhodin JAG (1970): "The prenatal development of the mouse eye". *Anat Rec*; 168:105.

Peters DM, Herbert K, Biddick B, Peterson JA (2005): "Myocilin binding to Hep II domain of fibronectin inhibits cell spreading and incorporation of paxillin into focal adhesions". *Exp Cell Res*; 303:218–228.

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

Pittack C, Grunwald GB, Reh TA (1997): "Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos". *Development*; 124:805–816.

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.

Polansky JR, Fauss DJ, Zimmerman CC (2000): "Regulation of TIGR/MYOC gene expression in human trabecular meshwork cells". *Eye*; 14(Pt 3B):503–514.

Purves D (1988): "Body and brain. Atrophic theory of neural corrections". Cambridge, MA: Harvard University Press.

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

Rattner A, Nathans J (2005): "The genomic response to retinal disease and injury: evidence for endothelin signaling from photoreceptors to glia". *J Neurosci*; 25:4540–4549.

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.

Remé CE, Grimm C, Hafezi F, Marti A, Wenzel A (1998a): "Apoptotic cell death in retinal degenerations". *Prog Retin Eye Res*; 17:443– 464.

Remé CE, Hafezi F, Munz K, Reinboth JJ (1998b): "Light damage to the retina and pigment epithelium". In: *The pigment epithelium, current aspects of function and disease* (Marmor MF, Wolfensberger TJ, eds), 563–586. New York: Oxford UP.

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.

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.

Rodríguez-Tébar A, Dechant G, Barde YA (1990): "Binding of brain-derived neurotrophic factor to the nerve growth factor receptor". *Neuron* 4:487–492.

Rodríguez-Tébar A, Dechant G, Gotz R, Barde YA (1992): "Binding of neurotrophin-3 to its neuronal receptors and interactions with nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor". *EMBO J*; 11:917–922.

Russell P, Tamm ER, Grehn FJ, Picht G, Johnson M (2001): "The presence and properties of myocilin in the aqueous humor". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 42:983–986.

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.

Saint-Jeannet JP, He X, Varmus HE, Dawid IB (1997): "Regulation of dorsal fate in the neuraxis by Wnt-1 and Wnt-3a". *Proc Natl Acad Sci USA*; 94:13713–13718.

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.

Schuettauf F, Vorwerk C, Naskar R, Orlin A, Quinto K, Zurakowski D, Dejneka NS, Klein RL, Meyer EM, Bennett J (2004): "Adeno-associated viruses containing bFGF or BDNF are neuroprotective against excitotoxicity". *Curr Eye Res*; 29:379–386.

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

Schuster N, Dünker N, Krieglstein K (2002): "Transforming growth factor-beta induced cell death in the developing chick retina is mediated via activation of c-jun N-terminal kinase and downregulation of the anti-apoptotic protein Bcl-xL". *Neuroscience Letters*; 330:239–242.

Schuster, N, Krieglstein, K (2002): "Mechanisms of TGF-beta mediated apoptosis". *Cell Tissue Res.*, 307:1–14.

Seitz R, Hackl S, Seibuchner T, Tamm ER, Ohlmann A (2010): „Norrin mediates neuroprotective effects on retinal ganglion cells via activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway and the induction of neuroprotective growth factors in Muller cells". *J Neurosci*; 30(17):5998-6010.

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.

Shulman JM, Perrimon N, Axelrod JD, (1998): "Frizzled signaling and the developmental control of cell polarity". *Trends Genet*; 14:452–458.

Skuta GL, Morgan RK, et al (1996): "Corticosteroid-induced glaucoma". In: Ritch, R., editor. *The Glaucomas*. Mosby-Year Book; St. Louis; p. 1177-1188.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): "Measurement of protein using bicinchoninic acid". *Anal Biochem*; 150(1):76-85.

Smith RS, Zabaleta A, Savinova OV, John SW (2001): "The mouse anterior chamber angle and trabecular meshwork develop without cell death". *BMC Devel Biol*; 1:3.

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.

Stamer WD, Roberts BC, Howell DN, Epstein DL (1998): "Isolation, culture, and characterization of endothelial cells from Schlemm's canal". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 39:1804–1812.

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.

Strauss O (2005): "The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function". *Physiological Reviews*; 85:845-881.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999): "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor". *Nature*; 397:441–446.

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.

- Tamm ER (2002): "Myocilin and glaucoma: facts and ideas". *Prog Retin Eye Res*; 21(4):395-428.
- 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, Wistow G, Raymond V, Dubois S, Malyukova I (2003): "Gene expression profile of the human trabecular meshwork: NEIBank sequence tag analysis". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 44(6):2588-2596.
- 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.
- Tournier C, Hess P, Yang DD, et al. (2000): "Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway". *Science*; 288:870-4.
- Ueda J, Wentz-Hunter K, Cheng E, Fukuchi T, Abe H, Yue Y (2000): "Ultra-structural localization of myocilin in human trabecular meshwork cells and tissues". *J Histochem Cytochem*; 48:1321-1329.
- Unoki K, LaVail MM (1994): "Protection of the rat retina from ischemic injury by brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, and basic fibroblast growth factor". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 35:907-915.
- 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.
- Wang L, Zhuo Y, Liu B, Huang S, Hou F, Ge J (2007): "Pro370Leu mutant myocilin disturbs the endoplasmic reticulum stress response and mitochondrial membrane potential in human trabecular meshwork cells". *Mol Vis*; 13:618-625.
- Wang Y, Thekdi N, Smallwood PM, Macke JP, Nathans J (2002): "Frizzled-3 is required for the development of major fiber tracts in the rostral CNS". *J Neurosci*; 22: 8563-8573.
- Wen R, Song Y, Cheng T, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM, Steinberg RH (1995): "Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina". *J Neurosci*; 15:7377-7385.

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.

Wentz-Hunter K, Shen X, Yue BY (2003): "Distribution of myocilin, a glaucoma gene product, in human corneal fibroblasts". *Mol Vis*; 9:308–314.

Westwick JK, Weitzel C, Minden A, Karin M, Brenner DA (1994): "Tumor necrosis factor alpha stimulates AP-1 activity through prolonged activation of the c-Jun kinase". *J Biol Chem*; 269:26396–26401.

Widelitz R (2005): "Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: Recent progress". *Growth Factors*; 23(2):111–116.

Wordinger RJ, Clark AF (1999): "Effects of glucocorticoids on the trabecular meshwork: towards a better understanding of glaucoma". *Prog Retin Eye Res*; 18:629–667.

Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995): "Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis". *Science*; 270:1326–1331.

Yam GH, Gaplovska-Kysela K, Zuber C, Roth J (2007): "Aggregated myocilin induces russell bodies and causes apoptosis: implications for the pathogenesis of myocilin-caused primary open-angle glaucoma". *Am J Pathol*; 17:100–109.

Yamanaka H, Moriguchi T, Masuyama N, Kusakabe M, Hanafusa H, Takada R, Takada S, Nishida E (2002): "JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates". *EMBO Rep*; 3:69–75.

Yang DD, Kuan CY, Whitmarsh AJ, et al. (1997): "Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *jnk3* gene". *Nature*; 389:865-70.

Young RW (1984): "Cell death during differentiation of the retina in the mouse". *J Comp Neurol*; 229(3):362-73.

Yu C, Minemoto Y, Zhang J, et al. (2004): "JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD". *Molecular Cell*; 13:329-40.

Yuan C, Zins EJ, Clark AF, Huang AJW (2007): "Suppression of keratoepithelin and myocilin by small interfering RNAs (siRNA) in vitro". *Mol Vis*; 13:2083–2095.

Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, Susin SA, Petit PX, Mignotte B, Kroemer G (1995): "Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death". *J Exp Med*; 182:367–377.

Zamzami N, Kroemer G (2001): "The mitochondrion in apoptosis: How Pandora's box opens". *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2:67–71.

Zeng LC, Liu F, Zhang X, Zhu ZD, Wang ZQ, Han ZG, Ma WJ (2004): "hOLF44, a secreted glycoprotein with distinct expression pattern, belongs to an uncharacterized olfactomedin-like subfamily newly identified by phylogenetic analysis". *FEBS Lett*; 571:74–80.

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.

Zhang Y, Cho C, Atchaneeyasakul L, McFarland T, Appukuttan B, Stout JT (2005): "Activation of the mitochondrial apoptotic pathway in a rat model of central retinal artery occlusion". *Invest Ophthalmol Vis Sci*; 46(6):2133-2139.

Zhao JJ, Lemke G (1998): "Selective disruption of neuregulin-1 function in vertebrate embryos using ribozyme-tRNA transgenes". *Development*; 125: 1899–1907.

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.....	12
Abbildung 2: Schematisches Diagramm der Entstehung der Pancortin-Isoformen...	17
Abbildung 3: Schematischer Querschnitt durch das menschliche Auge .....	21
Abbildung 4: Zelltypen und Verschaltungen in der Netzhaut.. .....	23
Abbildung 5: Zelltod-Inzidenz in verschiedenen Retina-Schichten nach der Geburt.	27
Abbildung 6: Aufbau des Semidry-Blots .....	54
Abbildung 7: Strukturelle und quantitative Untersuchung von Sehnerven .....	73
Abbildung 8: Zelldichte der retinalen Ganglienzellen.....	74
Abbildung 9: Morphologie der Retina .....	75
Abbildung 10: Strukturelle und quantitative Untersuchung von <i>Nn. ischiadici</i> .....	77
Abbildung 11: TUNEL-Färbung von P4-Retinae.....	79
Abbildung 12: Anzahl TUNEL-positiver Zellen zum Zeitpunkt P4 .....	79
Abbildung 13: TUNEL-Färbung von P9-Retinae.....	80
Abbildung 14: Anzahl TUNEL-positiver Zellen zum Zeitpunkt P9 .....	80
Abbildung 15: TUNEL-Färbung von P14-Retinae.....	81
Abbildung 16: Anzahl TUNEL-positiver Zellen zum Zeitpunkt P14 .....	81
Abbildung 17: Western Blot-Analysen für $\beta$ -Catenin.....	83
Abbildung 18: Relative Expression ausgewählter Proteine des <i>Planar cell polarity pathways</i> .....	84
Abbildung 19: Western Blot-Analysen für <i>pJNK</i> .....	85
Abbildung 20: Western Blot-Analysen für <i>Akt</i> und <i>pAkt</i> .....	85
Abbildung 21: Relative Expression von <i>Nerve growth factor</i> .....	86
Abbildung 22: Western Blot-Analysen für <i>pSmad 2</i> und <i>pSmad 3</i> .....	87
Abbildung 23: Lichtmikroskopie und quantitative Auswertung von PBS-Kontrollinjektionen .....	89
Abbildung 24: Lichtmikroskopie und quantitative Auswertung von NMDA-Injektionen .....	90
Abbildung 25: Genotypisierung zur Untersuchung der <i>LeuRPE54Met</i> -Mutation .....	91
Abbildung 26: Lichtmikroskopische Aufnahmen nach Lichtschaden .....	92
Abbildung 27: Spiderdiagramme der Lichtschadensversuche mit Myocilin <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	93

---

Abbildung 28: Western Blot-Analyse (A) und Konzentrationsabschätzung von HEK293-Kulturmedien mittels Coomassie-Färbung (B).....	94
Abbildung 29: Quantitative Auswertung der RGC-5-Behandlungen .....	95
Abbildung 30: TUNEL-Färbung nach Lichtschaden.....	96
Abbildung 31: Quantitative Auswertung der TUNEL-Färbungen .....	97
Abbildung 32: Quantitative Auswertung des <i>Cell Death Detection ELISA</i> .....	98
Abbildung 33: Spiderdiagramme der Lichtschadensversuche mit Pancortin- defizienten Mäusen.....	99
Abbildung 34: Rhodopsin-Ausgangsmenge und -Regeneration .....	101

**VIII.3 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien .....	29
Tabelle 2: Geräte .....	30
Tabelle 3: Reagenzien .....	31
Tabelle 4: Enzyme und Kits .....	34
Tabelle 5: Puffer und Lösungen .....	34
Tabelle 6: Gele .....	37
Tabelle 7: Primäre Antikörper .....	38
Tabelle 8: Sekundäre Antikörper .....	38
Tabelle 9: Oligonukleotid-Primer .....	39
Tabelle 10: Kulturbedingungen der verwendeten Zellen .....	40
Tabelle 11: Ansatz der Myocilin-PCR .....	41
Tabelle 12: Myocilin-PCR-Programm .....	42
Tabelle 13: Ansatz der Pancortin-PCR .....	43
Tabelle 14: Pancortin-PCR-Programm .....	43
Tabelle 15: Ansatz der <i>LeuRPE65Met</i> -PCR .....	44
Tabelle 16: <i>LeuRPE65Met</i> -PCR-Programm .....	44
Tabelle 17: Reaktionsansatz für die cDNA-Herstellung .....	48
Tabelle 18: Programm der reversen Transkription .....	48
Tabelle 19: <i>Real-Time</i> PCR-Programm .....	50
Tabelle 20: Verwendete Antikörper und Kurzprotokolle .....	55

**VIII.4 Abkürzungsverzeichnis**

μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
°C	Grad Celsius
A	Ampere; Adenin
Abb.	Abbildung
ad	zu
APS	Ammoniumpersulfat
BCL2L1	<i>Bcl-2-like protein 1</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
c	centi (10 <sup>-2</sup> )
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 <sub>2</sub> O /ddH <sub>2</sub> O	einfach/doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
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>

---

FBS	Fötales Rinderserum ( <i>fetal bovine serum</i> )
Fwd	vorwärts ( <i>forward</i> )
Fzd	<i>Frizzled</i>
g	Gramm; Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GNB2L	<i>Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like</i>
h	Stunde
HEK	menschliche embryonale Nierenzellen ( <i>human embryonic kidney cells</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
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
LRP5/6	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i>
m	milli ( $10^{-3}$ ), Meter
M; M.	molar (mol/l); Musculus (Muskel)
min	Minute(n)
mind.	mindestens
mm	Mus musculus (Hausmaus)
MM	Magermilchpulver
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
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
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> )
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
Rev	rückwärts (reverse)
RGC	retinale Ganglienzellen ( <i>retinal ganglion cells</i> )
RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
RIPA	<i>Radio immuno precipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK 1/2	<i>Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1/2</i>
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
TEMED	N-N-N'-N'-Tetramethylenethyldiamin
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
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
$\infty$	unendlich

### VIII.5 Danksagung

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei Herrn Prof. Dr. med. Ernst Tamm für die Ermöglichung der Promotion, für die Vergabe des interessanten Themas, für die Anregung und Überwachung der Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation sowie für die Übernahme des Erstgutachtens.

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

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer, Freund und Helfer Herrn Dr. Marcus Koch, der mir nicht nur fachlich zu jeder Tages- und Nachtzeit hilfsbereit zur Seite stand, sondern auch durch unzählige gemeinsame Anatomie-Kurse, Weißwurst-Frühstücke und ständige Versorgung mit Gummibärchen meine Promotion auf freundschaftliche Art und Weise bereicherte.

Ferner danke ich Frau Dr. Dr. Barbara Braunger für die vielen anregenden Diskussionen und Hilfestellungen bei allen Problemen, die im Laufe der Promotion auftraten.

Insbesondere möchte ich mich bei Elke Stauber, Angelika Pach, Silvia Babl, Margit Schimmel und Corinna Unger für ihre tatkräftige Anleitung und Unterstützung bei allen Arbeiten in der Histologie, Zellkultur und Molekularbiologie bedanken.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Humananatomie und Embryologie danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und die gute Atmosphäre. Hier möchte ich v.a. Stephanie Leopold, Markus Götz, Eva Diepold, Sebastian Koschade, Johanna Hausberger, Christiane Sippl und Magdalena Schneider für die zahlreichen Kaffeepausen und lustigen Stunden innerhalb und außerhalb des Labors danken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich nicht nur während meiner Promotion sondern während meines ganzen Medizinstudiums liebevoll und mit unendlicher Geduld unterstützt hat.

### **VIII.6 Erklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der 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 oder 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 In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den 11.08.2014

---

Bernd Rosenhammer