

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR HUMANANATOMIE UND EMBRYOLOGIE
PROF. DR. MED. ERNST R. TAMM
DER FAKULTÄT FÜR
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Bedeutung von Pax 6 bei der Entwicklung des Kammerwinkels und der
Entstehung des juvenilen Glaukoms**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Silvia Bedö, geborene Holzmann
2012

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR HUMANANATOMIE UND EMBRYOLOGIE
PROF. DR. MED. ERNST R. TAMM
DER FAKULTÄT FÜR
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Bedeutung von Pax 6 bei der Entwicklung des Kammerwinkels und der
Entstehung des juvenilen Glaukoms**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Silvia Bedö, geborene Holzmann
2012

Dekan: Prof. Dr. Reinhard Sterner

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ernst R. Tamm
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Olaf Strauß

Tag der mündlichen Prüfung 26.06.2012

INHALTSVERZEICHNIS

<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	6 -7
<u>EINLEITUNG</u>	8-15
<u>Augenentwicklung</u>	8-9
<u>Kammerwasserzirkulation</u>	10 -11
<u>PAX 6</u>	11-12
<u>Glaukom</u>	12-16
<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	16-19
<u>Mauslinien</u>	16
<u>Anfertigung von Semidünnschnitten, Licht- und Elektronenmikroskopie</u>	17-18
<u>Messung des Augeninnendrucks</u>	18-19
<u>ERGEBNISSE</u>	20-37
<u>Fehlerhafte Ausdifferenzierung der vorderen Augenkammer bei Pax6^{flox/+}; Le-</u>	
<u>Cre- Mäusen</u>	20-27
<u>Erhöhter Augeninnendruck bei Pax6^{flox/+}; Le- Cre- Mäusen</u>	28-30
<u>Schäden an den Axonen der Sehnerven bei Pax6^{flox/+}; Le- Cre- Mäusen</u> .	31-37
<u>DISKUSSION</u>	38-46
<u>Rolle der Pax6 Haploinsuffizienz im Kammerwinkel</u>	38-39
<u>Erhöhter Augeninnendruck und Glaukom</u>	40-41
<u>Aniridie und Glaukom</u>	42-43
<u>Peters Anomalie</u>	43-44
<u>Kontrolle der Entwicklung des Kammerwinkels durch molekulare Signale der</u>	
<u>Linse</u>	44-46
<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	47-57
<u>DANKSAGUNG</u>	58
<u>CURRICULUM VITAE</u>	59-62

ZUSAMMENFASSUNG

Heterozygote Mutationen in Pax 6, einem Transkriptionsfaktor, der während der Evolution in besonderem Maße bewahrt wurde, sind ursächlich für Aniridie, ein autosomal-dominant vererbter Entwicklungsdefekt des Auges, der gehäuft mit einem juvenilen Glaukom assoziiert ist. Defekte in der Morphogenese des Iridokornealwinkels, wie eine mangelnde Ausdifferenzierung des Trabekelwerks, das Fehlen des Schlemm Kanals und die Blockade des Kammerwinkels durch Irisgewebe, wurden als wahrscheinliche Ursache für das Glaukom beschrieben und vergleichbare Defekte wurden in heterozygoten Pax 6-defizienten Mäusen beobachtet. Wir entwickelten Mausmodelle, bei denen es zu einer Cre/LoxP-vermittelten Defizienz eines einzelnen Pax6 Allels in Linse und Hornhautepithel, bzw. in den aus dem distalen Augenbecher hervorgehenden Geweben kommt. Mit Hilfe dieser Modelle sollte analysiert werden in welchen Geweben beide Pax6 Allele exprimiert werden müssen, um die normale Entwicklung des Kammerwinkels zu kontrollieren. Die somatische Deaktivierung eines der Pax6 Allele, ausschließlich auf Linsen- und Hornhautepithelzellen, führte zur Unterbrechung der Ausbildung des Trabekelwerks und des Schlemm Kanals, sowie zu einer zunehmenden Adhäsion zwischen der Irisperipherie und der Kornea im juvenilen Auge, was schließlich den kompletten Verschluss des Kammerwinkels im erwachsenen Auge zur Folge hatte. Die strukturellen Veränderungen des Kammerwinkels verursachten einen kontinuierlichen Anstieg des Augeninnendrucks, welcher degenerative Veränderungen an den Axonen des Sehnerven sowie ein Glaukom nach sich zog. Demgegenüber führte die selektive Deaktivierung eines einzelnen Pax6 Allels im distalen Augenbecher nicht zu offensichtlichen Veränderungen im Kammerwinkel. Wir folgern hieraus, dass Defekte des Kammerwinkels durch nichtautonome Mechanismen, geschuldet der Haploinsuffizienz von Pax6 in Linsenzellen verursacht werden. Pax6 scheint die

Ausbildung von Signalmolekülen in den Linsenzellen zu kontrollieren, welche die morphogenetischen Prozesse während der Ausprägung des Kammerwinkels regulieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits in der Zeitschrift *Human Molecular Genetics* veröffentlicht. (83)

EINLEITUNG

Augenentwicklung

Am Anfang jeglicher Sinneswahrnehmung steht der Reiz. Die erstaunlichen Evolutionsschritte des Lebens, Orientierung, Integration und Überleben in der Umwelt sind und waren nur durch eine fortlaufende Reizaufnahme und Verarbeitung möglich. In der Evolutionsgeschichte hat das Licht von allen Reizen die größte Effektivität bewiesen und ein langer Weg, von der einfachen Lichtorientierung wie beispielsweise die Unterscheidung von Hell und Dunkel bei den Pflanzen bis hin zum komplexen Aufbau des menschlichen Auges liegt hinter uns. Die Evolution benötigte mehr als 3 Milliarden Jahre um den optischen Apparat in seiner heutigen Form zu entwickeln. Im Lauf der Phylogenese haben sich die Augen beinah aller Lebewesen aus derselben Urform differenziert. Da die vielfältigen Lebensformen unseres Planeten jedoch unterschiedlichsten Lebensbedingungen und äußeren Einflüsse unterworfen sind, wurde hierbei eine Vielzahl von Wegen beschritten und jeder Tierstamm hat sein individuelles Auge ausgebildet.

Allen Augentypen ist jedoch gemeinsam, dass sie einen Sehfärbstoff enthalten, der Lichtquanten absorbiert. Das Auftreffen der Lichtquanten auf die Sehfärbstoffmoleküle führt über die Freisetzung von Energie zur Erregung der Fotorezeptoren und der Lichtreiz wird als Nervenimpuls an die übergeordneten neuronalen Zentren weitergeleitet, wo er verarbeitet wird. Im Laufe unserer Evolution bildeten sich so, je nach Verwendungszweck, die unterschiedlichen Augentypen heraus.

Der Weg verlief vom Flachauge für Hell- und Dunkelwahrnehmung, über Pigmentbecher- und Grubenaugen, die bereits das Richtungssehen

ermöglichten, bis hin zum Blasenauge, welches nach dem Prinzip einer Lochkamera zum Bildsehen befähigt und schließlich zum Linsenauge der Wirbeltiere.

Die Entwicklung des Vertebratenauges ist auf molekularer Ebene im Vergleich zur Entwicklung des Komplexauges bei Insekten noch schlecht verstanden. Doch weiß man aufgrund von Vergleichen der Gen-Sequenz von Wirbeltieren mit der der *Drosophila melanogaster* Fliege, dass eine Vielzahl von Genen die bei der Entwicklung des Komplexauges der Insekten eine Rolle spielen, auch bei den Vertebraten von Bedeutung sind. Als prominentestes Beispiel ist hier *eyeless/Pax 6* zu nennen.

Das Wirbeltierauge ist ein inverses Auge, welches aus einem neuralen und einem epidermalen Anteil besteht. In der Embryonalentwicklung werden im Bereich der verdickten kranialen Neuralleiste, welche die drei Gehirnbälchen bildet, zunächst die sogenannten Augenbälchen sichtbar. Hierbei handelt es sich um bilaterale Ausstülpungen des Diencephalons, die sich zum optischen Stiel verlängern und später als optische Vesikel bezeichnet werden. Diese stoßen an bestimmte Bereiche des Ektoderms und induzieren die Linsenentwicklung. Etwa zur gleichen Zeit stülpt sich der distale Bereich des optischen Vesikels ein und formt den Augenbecher. Dadurch kommen zwei Epithelschichten übereinander zu liegen. Das proximale Epithel bildet die Pigmentzellschicht und aus der distalen Epithelschicht, auch neuroretinale Zellschicht genannt, formt sich die Retina mit ihren Fotorezeptor-, Horizontal-, Amakrinen-, Bipolaren-, Ganglien- und Gliazellen. (84)

Kammerwasserzirkulation

Das Kammerwasser wird von den Epithelzellen des Ziliarkörpers gebildet und zirkuliert im Bereich des vorderen Auges in zwei Abschnitten, der vorderen und hinteren Augenkammer. Der Durchfluss von der hinteren in die vordere Augenkammer erfolgt zwischen Linse und Irisrückseite durch die Pupille. Die vordere Augenkammer liegt in der vorderen Bulbushälfte, begrenzt ist sie durch die Kornea, den Kammerwinkel, die Iris und die Linse. Das in ihr befindliche Kammerwasser gehört zu den brechenden Medien im Auge und stellt zusammen mit der Hornhaut, der Linse und dem Glaskörper, einen wesentlichen Teil des optischen Abbildungssystems dar.

Der Kammerwinkel, oder *Angulus iridocornealis* wird, wie der Name schon sagt, durch die Iriswurzel, die Kornea und den Ziliarkörper begrenzt. Dort befindet sich das Trabekelwerk (*Trabeculum corneosclerale*), ein bindegewebiges Maschenwerk, durch dessen Spalträume das Kammerwasser in den *Sinus venosus sclerae*, den sogenannten Schlemm Kanal drainiert wird. Dieses zwischen Kornea und Sklera verlaufende Gefäß leitet das Kammerwasser über die intra- und episkleralen Venen in den Körperkreislauf zurück. Durch eine Blockade bzw. Abflussstörung des Kammerwassers im Bereich des Kammerwinkels kommt es zu einem Anstieg des Augeninnendrucks, was zu einer Schädigung der lichtempfindlichen Rezeptoren und nervösen Strukturelemente und schließlich zu einem Glaukom führen kann. Das Kammerwasser fließt aber nicht nur über den Kammerwinkel in den Schlemm Kanal, sondern wird zudem über sogenannte „*collector channels*“ und Kammerwasservenen von den vorderen Ziliarvenen direkt in den Schlemm Kanal geleitet, so dass ein stetiger Abfluss in das episklerale Venennetz gewährleistet ist.

Die hintere Augenkammer ist durch das Pigmentblatt der Iris, die Ziliarfortsätze, die vordere Glaskörpergrenzmembran und die Linse vom restlichen Auge abgetrennt. Wie bereits beschrieben steht sie über die Pupille mit der vorderen Augenkammer in Verbindung. (84 – 85)

PAX 6

Der Transkriptionsfaktor Pax 6 ist ein in der Evolutionsgeschichte hoch konservierter Transkriptionsfaktor.

Pax 6 ist als Mitglied der Pax- Proteinfamilie, die allesamt zwei DNA bindende Domänen besitzen, durch die PD (Paired Domäne) charakterisiert. Die sogenannte Paired Box (Pax) wurde zuerst in der *Drosophila melanogaster* Fliege identifiziert. Auf der Suche nach Paired Box Genen in anderen Lebewesen wurden bei der Maus und den Menschen bisher insgesamt neun entdeckt.

Das Pax 6 Protein der Maus hat ein Molekulargewicht von 48 kDa und besteht aus 422 Aminosäuren. Im Einzelnen ist der Transkriptionsfaktor in vier Domänen unterteilt (Abb. 1). Am Aminoterminal befindet sich immer die Paired Domäne (PD), 128 Aminosäuren lang, gefolgt von einer Glutamin/Glycin reichen Linker Region (L), 78 Aminosäuren lang, und der Paired Homöodomäne (HD), 60 Aminosäuren lang, sowie einer Prolin-, Serin-, Threonin-reichen Transaktivierungsdomäne (TAD), 153 Aminosäuren lang, am Carboxylende. Durch alternatives Spleißen kann es zum Einbau von zusätzlichen 15 Aminosäuren kommen (Exon 5a).

N

C

PD 128AS	L 78AS	HD 60AS	TAD 153AS
----------	--------	---------	-----------

Abb. 1. Schematische Zeichnung der Struktur von Pax6. Paired Domäne (PD), Linker Region (L), Homöodomäne (HD), Transaktivierungsdomäne (TAD).

Sowohl in der Embryonalentwicklung und der Gewebsausdifferenzierung der Vertebraten als auch der Invertebraten spielt Pax 6 über die Aktivierung genetischer Programme eine wesentliche Rolle. Beispielsweise steuert er, wie auch in der folgenden Arbeit dargelegt, die Entwicklung des Auges, der Nase, des Gehirns und der Pankreasinseln. Dies wurde anhand genetisch veränderter Mausmodelle untersucht. (86)

Glaukom

Der Begriff Glaukom stammt aus dem altgriechischen und wurde von Aristoteles geprägt. Umgangssprachlich wird das Glaukom als grüner Star bezeichnet. Unter diesem Begriff werden ätiologisch unterschiedliche Erkrankungen zusammengefasst die über den Verlust von Nervenfasern eine Schädigung des *Nervus opticus* zur Folge haben. Dies ist bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf als Exkavation an der Papille sichtbar.

Als bedeutender Risikofaktor wird ein erhöhter Augeninnendruck angesehen. Die dadurch verursachte Nervenschädigung führt zu charakteristischen Ausfällen des Gesichtsfeldes und bei nicht rechtzeitiger Diagnose und Therapie letztendlich zur Erblindung des Auges.

Grob unterscheidet man zwischen dem primären Glaukom, welches nicht die Folge einer anderen Augenerkrankung ist und dem sekundären Glaukom, welches als Ursache eine andere Augenerkrankung hat oder iatrogen auftritt.

In den Industrienationen ist das Glaukom nach der diabetischen Retinopathie die zweithäufigste Erblindungsursache. (Tab. 1). Global gesehen haben ca. 15-20% aller Blinden ihr Augenlicht durch ein Glaukom verloren. In Deutschland liegt die Prävalenz des Glaukoms bei ca. 15% der Bevölkerung. Rund 10% der über 40jährigen Bundesbürger weisen als Risikofaktor für die Entwicklung eines Glaukoms einen erhöhten Augeninnendruck auf. Somit zählt die Früherkennung des Glaukoms zu einer der wichtigsten Aufgaben unseres Gesundheitssystems. (85)

Tabelle. 1.

Verlauf von Glaukom Prävalenz- und Inzidenz in Deutschland		
	2010	2030
Glaukom Kranke	690.000	900.000
Neuerkrankungen pro Jahr	44.600	60.000
Erblindungen pro Jahr	1500	2000

Der normale intraokulare Druck liegt zwischen 10mmHg und 21mmHg. Tagesabhängige Schwankungen von bis zu 5mmHg sind normal. Jüngere Menschen haben im Allgemeinen einen etwas geringeren Augeninnendruck als ältere, so dass man bei Erwachsenen durchschnittlich von einem Augeninnendruck von 15mmHg ausgehen kann. Dieser im Vergleich zu dem mittleren Gewebedruck fast aller anderen menschlichen Organe hohe Druck

wird für die korrekte optische Abbildung benötigt, denn er gewährleistet eine glatte Hornhautoberfläche, sowie die gleichmäßige Ausrichtung der retinalen Fotorezeptoren und des Pigmentepithels auf der Bruch- Membran und sorgt für einen gleichbleibenden Abstand zwischen Hornhaut, Linse und Netzhaut. Erzeugt wird der Augeninnendruck vom Kammerwasserfluss und durch den Abflusswiderstand im Trabekelwerk. Das Kammerwasser, *Humor aquosus*, wird im Ziliarkörper des Auges gebildet und in die hintere Augenkammer sezerniert. Das Gesamtvolumen des Kammerwassers in Vorder- und Hinterkammer beträgt ca. 0,2- 0,4ml. Pro Minute wird ungefähr 1-2% des Kammerwassers ersetzt. Neben der Aufrechterhaltung des Augeninnendrucks und somit der Augapfelform dient das Kammerwasser zur Ernährung der angrenzenden Strukturen, insbesondere von Linse und Hornhaut. Überdies spielt es, durch seinen hohen Ascorbinsäuregehalt bei der Detoxifikation des Augeninneren eine wichtige Rolle. Wie bereits erwähnt fließt das Kammerwasser über die Pupille von der Hinterkammer in die Vorderkammer. Hierbei gilt es den ersten physiologischen Widerstand, den Pupillarwiderstand zu überwinden. Der Widerstand entsteht durch das Anliegen der Iris an der Linsenvorderfläche. Um die Kammerwasserzirkulation zu ermöglichen muss ein ausreichend hoher Druck aufgebaut werden, der imstande ist die Iris von der Linse abzuheben. Durch diese physiologische Blockade erfolgt die Abgabe des Kammerwassers von der Hinterkammer in die Vorderkammer nicht kontinuierlich, sondern stoßweise pulsierend. Bei einem Pupillarblock, also einer Erhöhung des Pupillendurchflusswiderstandes kommt es zu einem Druckanstieg in der Hinterkammer, wobei sich die Iris an ihrer Wurzel wie ein Segel nach vorne bläht und das Trabekelwerk verlegt. Dieser Mechanismus ist entscheidend für die Pathogenese des Winkelblockglaukoms. Ursache für eine solche Winkelblockprädisposition bzw. die Erhöhung des Pupillardurchflusswiderstandes kann zum einen ein verstärkter Kontakt zwischen Pupillenrand und Linse sein, wie dies z.B. bei kleinen Augen und

damit verbundener geringer Achsenlänge der Fall ist. Ähnlich verhält es sich bei großer Linse, bei Miose oder hinteren Synechien, einer Verklebung von Iris und Linse. Zum anderen muss man an eine erhöhte Viskosität des Kammerwassers bei Entzündungen oder Blutungen denken. Aus dem Kammerwinkel in der vorderen Augenkammer fließt das Kammerwasser zu etwa 85% durch das Trabekelwerk in den Schlemm Kanal. Hier befindet sich der zweite physiologische Widerstand. Einen erhöhten Widerstand in diesem Bereich findet man beim Offenwinkelglaukom. Zu ca. 15% fließt das Kammerwasser über das uveosklerale Gefäßsystem in den allgemeinen venösen Kreislauf (85). Eine Zusammenfassung der Glaukomformen ist in Tab. 2 dargestellt.

Tabelle. 2. Glaukomformen im Überblick

Glaukom Formen	Ursache	Häufigkeit
Primäre Glaukome	Meist sporadisch, polygenetische Ursachen werden wegen familiärer Häufung vermutet	95%
Primäres Offenwinkelglaukom (<i>Glaucoma chronicum simplex</i>)	Abflussbehinderung im Trabekelwerk; Ursache nicht abschließend geklärt	90%
Primäres Winkelblockglaukom	Verlegung des Kammerwinkels/Trabekelwerks durch Irisgewebe	5%
Kindliches/kongenitales Glaukom des Säuglings/Kleinkindes	Abflussbehinderung im Trabekelwerk durch unvollständige oder fehlerhafte Differenzierung des Trabekelwerks	15%
Sekundäre Glaukome	Iatrogen oder als Folge anderer Augen- oder Allgemeinerkrankungen	4-8%
Sekundäres Offenwinkelglaukom	Verlegung des Trabekelwerks durch Erythrozyten, Pigment-, oder Entzündungszellen sowie Pseudoexfoliationsmaterial z.B. Pigmentdispersionsglaukom,	2-4%

	Pseudoexfoliationsglaukom	
Sekundäres Winkelblockglaukom	Verlegung des Trabekelwerkes durch vordere Synechien, Narben, neugebildete Gefäße z.B. Neovaskularisationsglaukom (häufig bei <i>Diabetes mellitus</i>)	2-4%

MATERIAL UND METHODEN

Mauslinien

$Pax6^{flox/flox}$, Le-Cre, und α -Cre Mäuse wurden wie in den Quellen beschrieben gezüchtet (26, 77). $Pax6^{flox/+}$; $Pax6^{flox/+}$; Le-Cre und Wurfgeschwister der Kontrollgruppe ($Pax6^{flox/+}$ oder $Pax6^{+/+}$; Le-Cre) wurden durch Kreuzen von $Pax6^{flox/+}$ mit Le-Cre Mäusen gezüchtet. $Pax6^{flox/+}$; $Pax6^{flox/+}$; α -Cre Wurfgeschwister der Kontrollgruppe ($Pax6^{flox/+}$ oder $Pax6^{+/+}$; α -Cre) wurden durch das Kreuzen von $Pax6^{flox/+}$ mit α -Cre Mäusen gezüchtet. Der Tag der Geburt wurde als P1 festgesetzt. Die Mäuse wurden von Ruth Ashery-Padan und Noa Davis, Tel Aviv University, Israel zur Verfügung gestellt. Die Analysen wurden bei den F1 Nachkommen, aus einer Verpaarung des genetischen Hintergrunds von ICR und FVB/NJ Mäusen durchgeführt. Die FVB/NJ Mäuse sind ein Albinostamm, der im Allgemeinen für die Erzeugung von transgen veränderten Mausstämmen benutzt wird. Dieser Stamm ist homozygot für das retinale Degenerationsallel $Pde6b^{rd1}$.

Anfertigung von Semidünnschnitten, Licht- und Elektronenmikroskopie

Die Augen der neugeborenen Mäuse wurden jeden Tag, vom ersten postnatalen Tag P1 bis P14 beobachtet und ausgewertet. Überdies wurden die Augen von drei Wochen, 1, 3 und 6 Monaten alten Mäusen untersucht. Die Augen wurden enukleiert und in Karnovsky Lösung (2,5% Glutaraldehyd und 2,5% Paraformaldehyd in 0,1M Kakodylatpuffer) für 24h fixiert (78). Nach der Spülung mit 0,1 molarem Kakodylatpuffer, erfolgte die Nachfixation in einer Lösung aus 1% OsO₄ und 0,8% Kaliumferrozyanid in 0,1 molarem Kakodylatpuffer für zwei Stunden bei 4°C.

Die Augen wurden anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und in Epon eingebettet (Serva, Heidelberg, Germany). Semidünnschnitte (1 µm) wurden auf unbeschichteten Glasplatten gesammelt und mit Methylenblau/Azur II gefärbt. Ultradünnschnitte wurden auf unbeschichteten Kupfergitternetzen befestigt und mit Uranylazetat und Blei-Zitrat angefärbt. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Zeiss EM 10 A Elektronenmikroskop untersucht. Die myelinisierten Sehnervenaxone wurden mittels 1,4-p-Phenylendiamin (PPD, Roth) Färbung der in Epon eingebetteten Semidünnschnitte sichtbar gemacht. 1% PPD in 98% Ethanol wurde frisch hergestellt und vor Gebrauch bei Tageslicht drei Tage gelagert, bis sich die Lösung verdunkelt hatte. Die Lösung ist in Dunkelheit bei 4°C eine Woche lang stabil. Querschnitte der Sehnerven wurden für 2-3 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt und die Färbung mit 100% Ethanol differenziert. Um die Anzahl der Axone bei 3 und 6 Monate alten Tieren zu bestimmen, wurden PPD gefärbte Querschnitte mittels Hellfeld-Mikroskopie sichtbar gemacht. Ein 100x Ölimmersionsobjektiv wurde für die höchste Auflösung benutzt. Bei vier Wochen alten Tieren, bei denen die Myelinscheiden der Axone der Sehnerven immer noch dünn sind, wurde die gesamte Fläche der Sehnervenquerschnitte

gezählt und analysiert. Myelinisierte Axone wurden identifiziert und softwareunterstützt gezählt.

Messung des Augeninnendrucks

Der Augeninnendruck wurde invasiv bei 12 Wochen alten Pax6flox/+;Le-Cre Mäusen (Gewicht 27-30g) und ihren Wurfgeschwistern der Kontrollgruppe gemessen (81,82). Die Messungen erfolgten täglich zur gleichen Zeit. Mittels intramuskulärer Injektion einer Mischung aus Ketamin als Hydrochlorid (100 mg/kg, Parke-Davis, Freiburg, Deutschland) und Xylazin (5 mg/kg, Bayer Leverkusen, Leverkusen, Deutschland) wurden die Tiere in Tiefschlaf gesetzt und auf eine chirurgische Arbeitsfläche gelegt. Das Auge wurde unter dem Mikroskop betrachtet und die Spitze der Mikronadel (Größe 30G) wurde in einen Tropfen PBS auf der Augenoberfläche positioniert. Zu diesem Zeitpunkt wurde der gemessene Druck gleich Null gesetzt. Die Spitze der Nadel wurde manuell in die vordere Augenkammer unter permanenter Messung des Augeninnendruckes geschoben. Die Augeninnendrucke erreichten für gewöhnlich nach einer Sekunde höherer intraokulärer Werte, geschuldet der Einführung der Nadel, ein Plateau. Wenn das Plateau über eine Minute einen konstanten Wert erreicht hatte, wurde dem Auge von außen ein milder zusätzlicher Druck zugeführt, um die Durchgängigkeit der Mikronadel zu bestätigen.

Diese Manipulationen führten zu einigen Druckspitzen, die dann wieder auf das Ausgangsplateau zurückkehrten. Die Nadel wurde daraufhin aus der vorderen Augenkammer zurückgezogen; Für die Einbeziehung der Daten wurde ein rascher Rückgang des Druckes auf Null gefordert. Die ursprünglichen Messergebnisse wurden in cmH₂O kalibriert. Für die statistische Analyse wurde ein Student-t-Test verwendet. Zudem erfolgte eine nichtinvasive Messung des

Augeninnendruckes an sedierten Mäusen (100mg/kg Ketamin und 10mg/kg Xylazin i.p. Injektion). Die Messungen wurden täglich zur gleichen Zeit mittels TonoLab Tonometer durchgeführt (Tiolat, Helsinki, Finnland). Jedes Ergebnis wurde aus 6 Messungen automatisch gemittelt. Hochabweichende und kaum abweichende Ergebnisse wurden ausgeschlossen. Ein Durchschnitt von 5 Ergebnissen wurde als ein Ergebnis betrachtet. Die vorgestellten Ergebnisse sind der Durchschnitt von zehn Augen pro Genotyp zu jedem Zeitpunkt. Vergleichbare Daten wurden von zusätzlichen Wurfgeschwistern gewonnen, jedoch wegen der Unvollständigkeit der Analyse aus der Studie ausgeschlossen.

Die Messungen wurden zusammen mit Dr. Markus Kroeber unter seiner Anleitung durchgeführt.

ERGEBNISSE

Fehlerhafte Ausdifferenzierung der vorderen Augenkammer bei Pax6^{flox/+};Le-Cre-Mäusen

Die Ausdifferenzierung des Kammerwinkels in der vorderen Augenkammer erfolgt bei der Maus innerhalb der ersten beiden Lebenswochen. (15) Initial ist der Winkel durch eine dichte Masse von mesenchymalen Zellen ausgefüllt, die sich am Anfang der zweiten Lebenswoche voneinander zu trennen beginnen. Während dieser Zeit tauchen Blutgefäße in der unmittelbar angrenzenden Sklera auf. Diese Vorgänge unterscheiden sich bei den Augen der mutierten Pax6^{flox/+}; Le-Cre Mäusen und deren Wurfgeschwister in der Kontrollgruppe nicht offensichtlich. Beide zeigten am 9 postnatalen Tag mesenchymale Zellen und angrenzende Skleralgefäße in ihren Kammerwinkeln (P) 9 (Abb. 2A, B). Ein deutlicher Unterschied zwischen den mutierten Mäusen und der Kontrollgruppe bestand im Hinblick auf die Größe des Kammerwinkels. Dieser war bei Pax6^{flox/+}; Le-Cre Mäusen deutlich enger (Abb. 2A, B). Während der zweiten Lebenswoche differenzieren sich die mesenchymalen Zellen und Gefäße im Kammerwinkel aus und bilden das Trabekelwerk und den Schlemm Kanal. Die Morphogenese beider Strukturen ist bis zum Ende der dritten Lebenswoche abgeschlossen. (15) Die Ausdifferenzierung des Trabekelwerks und des Schlemm Kanals erfolgte in den Augen der Pax6^{flox/+}; Le-Cre Mäuse nicht. In der vierten Lebenswoche waren beide Strukturen nur in den Augen der Wurfgeschwister der Kontrollgruppe vorhanden (Abb. 2C) und fehlten vollständig bei den mutierten Tieren des gleichen Wurfs. Zudem legte sich bei den Pax6^{flox/+}; Le-Cre Mäusen die Iriswurzel an die Hornhaut an, was einen vollständigen Verschluss des Kammerwinkels zur Folge hatte (Abb. 2D).

In vier Wochen alten Le-Cre Mäusen, die in Parallelexperimenten untersucht wurden, fand sich im Wesentlichen eine normale Histologie des vorderen Augenabschnittes und des Kammerwinkels. Diese unterschied sich nicht offensichtlich von der von Pax6^{flox/+} Mäuse (nicht dargestellt). Im Alter von drei Monaten bildete die Iriswurzel bei Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen einen dichten Rasen von Epithelzellen, welcher sich an die Hornhautperipherie anlagerte und diese komplett bedeckte (Abb. 2F, H), während der Kammerwinkel bei den Wurfgeschwistern der Kontrollgruppe weit offen war (Abb. 2E, G).

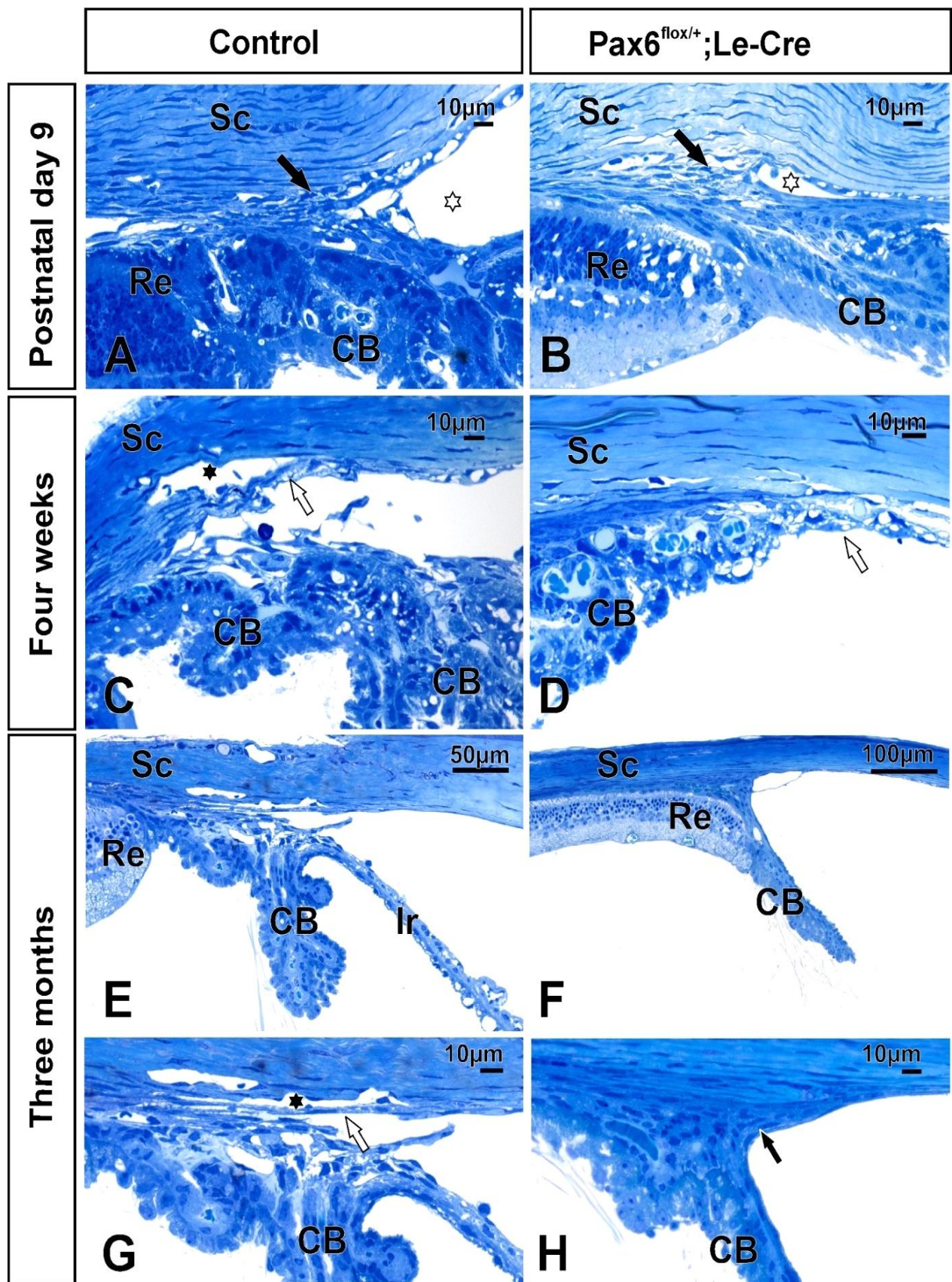


Abb. 2. Die Entwicklung des Kammerwinkels ist in den Augen von $Pax6^{flox/+}; lens-Cre$ Mäusen beeinträchtigt. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Semidünnschnitten von Kontrolltieren ($Pax6^{flox/+}$) (A,C,E,G) und $Pax6^{flox/+}; lens-Cre$ Wurfgeschwistern (B,D,F,H) am 9 postnatalen (P) Tag (A,B), und im Alter von vier Wochen (C,D) und drei Monaten (E-H). **A,B.** Am P9 zeigen sowohl die $Pax6^{flox/+}; lens-Cre$ Mäuse, als auch die Tiere der Kontrollgruppe mesenchymale Zellen (schwarze Pfeile) und benachbarte sklerale Blutgefäße in ihren Kammerwinkeln. Die Größe des Kammerwinkels (Sternchen) ist bei $Pax6^{flox/+}; Le-Cre$ Mäusen deutlich kleiner (A, B). **C, D.** Im Alter von vier Wochen sind das Trabekelwerk (weißer Pfeil in C) und der Schlemm Kanal (Sternchen in C) bei den Kontrolltieren voll entwickelt (C), bei den mutierten Wurfgeschwistern aber im Wesentlichen nicht vorhanden (D). Überdies hat sich die Iriswurzel der Kornea angeheftet und verursacht so einen kompletten Verschluss des Kammerwinkels in den Augen von $Pax6^{flox/+}; Le-Cre$ Mäusen (weißer Pfeil D). **E-H.** Bei den 3 Monate alten $Pax6^{flox/+}; Le-Cre$ Mäusen bildet die Iriswurzel einen dichten Rasen aus epithelialen Zellen (schwarzer Pfeil in H), welcher sich an die Peripherie der Kornea anlagert und diese komplett bedeckt (F und H, H ist eine höhere Vergrößerung eines Bereiches angrenzend an F), während der Kammerwinkel in der Kontrollgruppe weit offen ist (E, G, G ist eine höhere Vergrößerung von E). Die Struktur des Trabekelwerks und des Schlemm Kanals (Sternchen in G) ist in der Kontrollgruppe im Wesentlichen normal. Re. Retina; CB. Ziliarkörper; Sc. Sklera; Ir. Iris. Abbildung aus Kroeber et al. (83).

In dem Gebiet, in welchem sich in der Kontrollgruppe das Trabekelwerk und der Schlemm Kanal befanden (Abb. 3A), wurden bei den mutierten Mäusen unter dem Elektronenmikroskop spindelförmige Zellen beobachtet, die in eine dichte extrazelluläre Matrix eingebettet waren (Abb. 3B). Die Spindelzellen

standen in unmittelbarem Kontakt zu den Epithelzellen der Iris, während die extrazellulären Fasern, die die Zellen umgaben, in die der Sklera und Kornea übergingen. Die elektronenmikroskopische Analyse unterstützte somit die Ergebnisse der histologischen Untersuchung und bestätigte das vollständige Fehlen des Trabekelwerks und des Schlemm Kanals in den Augen der mutierten Pax6^{fl^{ox}/+}; Le-Cre Mäuse.

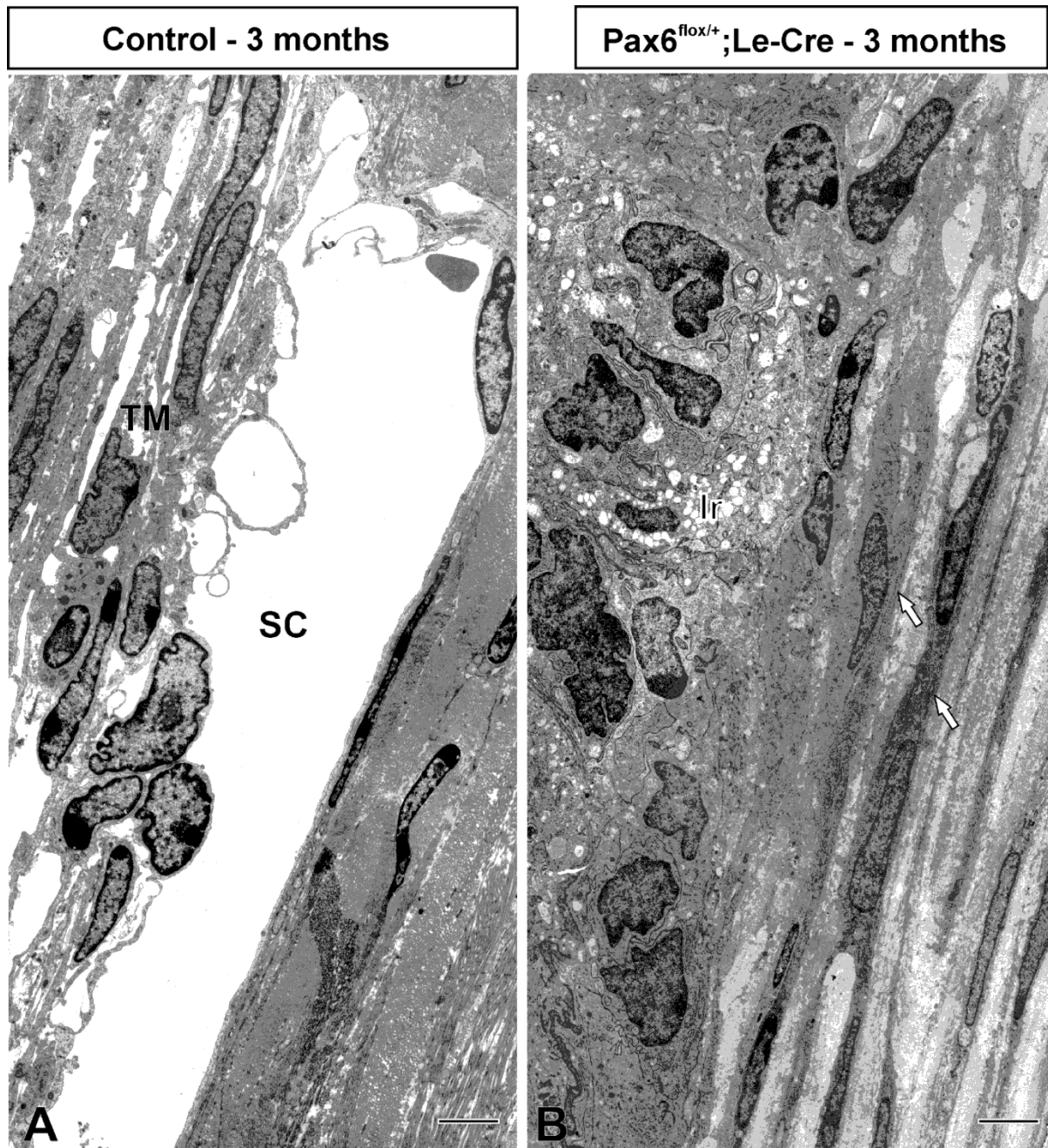


Abb. 3 Elektronenmikroskopische Darstellung des Trabekelwerks (TM) und des Schlemm Kanals (SC) in einem 3 Monate alten Kontrolltier (A), und der

dementsprechenden Region bei einer ebenso alten $Pax6^{flox/+};Le-Cre$ Maus (B). Bei den 3 Monate alten $Pax6^{flox/+}; Le-Cre$ Mäusen fehlen das Trabekelwerk und der Schlemm Kanal. **A.** Bei dem Kontrollauge, zeigen die Lamellen des Trabekelwerks (TM) und der Schlemm Kanal (SC) im Wesentlichen eine normale Struktur. **B.** In der Region, die der Stelle entspricht wo sich das TM und der SC bei den Kontrolltieren befinden, zeigen sich bei den mutierten Mäusen spindelförmige Zellen (Pfeile) die in eine dichte extrazelluläre Matrix eingebettet sind. Die spindelförmigen Zellen stehen in direktem Kontakt mit den Epithelzellen der Iris, (Ir), während die extrazellulären Fasern, die die Zellen umgeben mit denen der Sklera und Kornea zusammenhängen. Abbildung aus Kroeber et al. (83).

Strukturelle Anomalitäten in den Augen der $Pax6^{flox/+};Le-Cre$ Mäuse waren nicht auf die Peripherie der vorderen Augenkammer begrenzt, sondern wurden auch in deren Zentrum beobachtet. Bei neugeborenen Mäusen trennte sich die Linse vom Linsenstiel während der Entwicklung des Auges nicht und blieb der Kornea während der ersten Lebensstage angeheftet. In Folge dessen gab es einen Defekt in dem zentralen Stroma der Hornhaut, durch welchen sich das Hornhautepithel ausdehnte und in Kontakt mit der vorderen Linsenkapsel trat (Abb. 4A). Das Hornhautendothel fehlte in diesem Gebiet. Nach der dritten Lebenswoche hatte sich die Linse normalerweise von der Hornhaut gelöst (Abb. 4B). In der Mitte der Hornhaut, wo der Linsenstiel persistierte und sich das Hornhautendothel nicht herausgebildet hatte, blieb die vordere Spitze der Iris der Hornhautinnenseite angeheftet (Abb. 4B). Unter höherer Vergrößerung sah man, dass Irisgewebe und lockere extrazelluläre Matrix den zentralen Defekt im Hornhautstroma, durch die der Linsenstiel in den ersten Lebenstagen persistierte, ausfüllten. In einigen Augen konnte man ein Bläschen in der Mitte des zentralen Hornhautstromas sehen, welches von Epithelzellen umgeben war, welche die strukturellen Eigenschaften von Hornhautepithel zeigten und

wahrscheinlich von Zellen des persistierenden Linsenstiels abstammten (Abb. 4D).

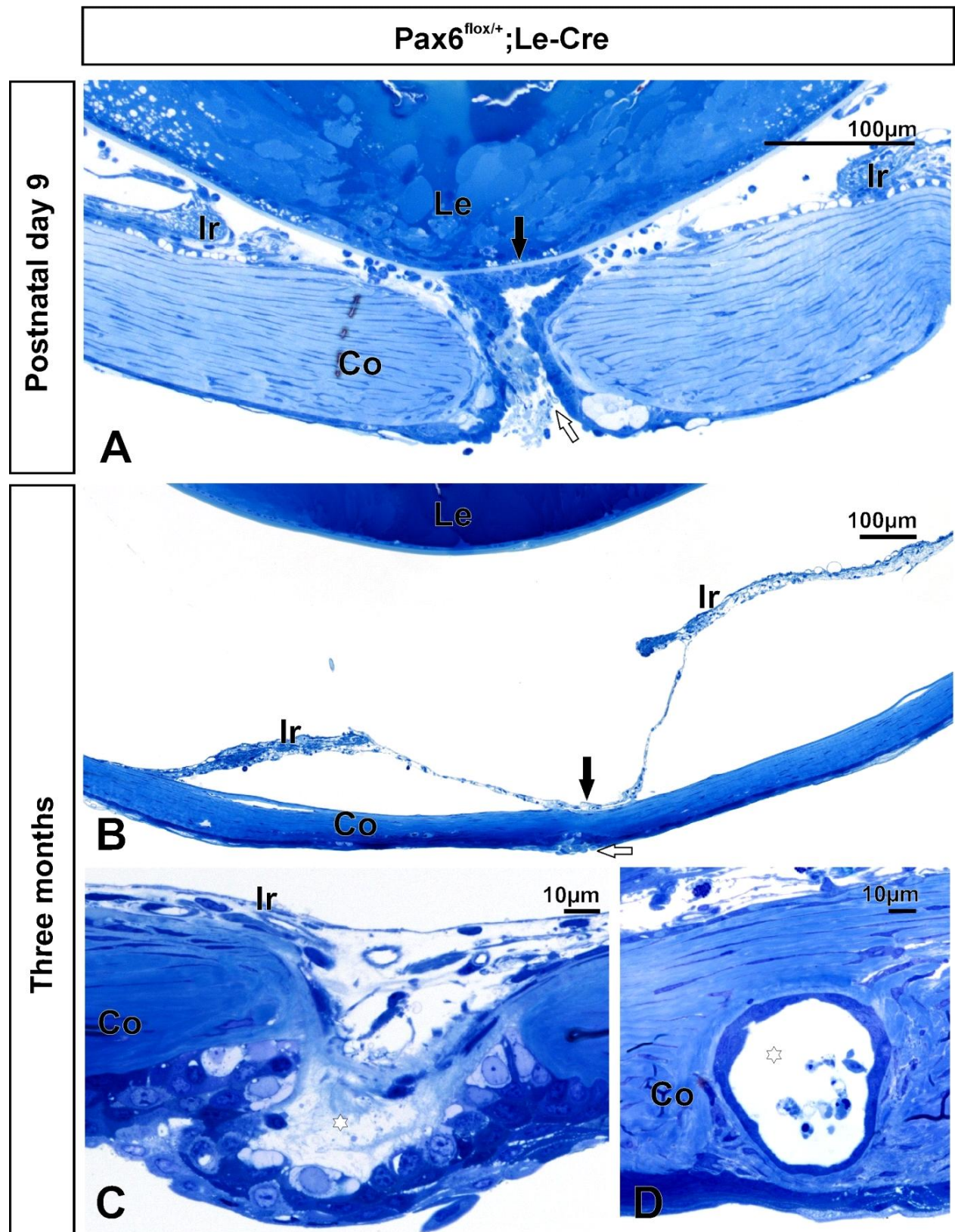


Abb. 4 Peters - Anomalie bei $Pax6^{flox/+};Le-Cre$ Mäusen. **A.** Am P9 ist die Linse (Le) der Kornea angeheftet (Co), und es besteht ein Defekt im zentralen Stroma der Kornea (weißer Pfeil) durch den das Korneaepithel sich ausbreitet und in Kontakt mit der vorderen Linsenkapsel gelangt (schwarzer Pfeil). Das Korneaendothel fehlt in diesem Bereich. **B.** Im Alter von 3 Monaten ist die Linse (Le) von der Kornea (Co) getrennt. Im Zentrum der Kornea ist die vordere Spitze der Iris (Ir) der inneren Seite der Kornea angeheftet (schwarzer Pfeil) und das Korneaendothel fehlt in diesem Gebiet. An der gegenüberliegenden Seite der Kornea besteht ein kleiner Defekt im Stroma, welcher mit epithelialen Zellen ausgefüllt ist. (weißer Pfeil). **C.** Drei Monate alte $Pax6^{flox/+}; Le-Cre$ Maus, bei der Irisgewebe und extrazelluläre Matrix (Sternchen) einen zentralen Defekt im Zentrum der Kornea ausfüllen. **D.** Drei Monate alte $Pax6^{flox/+}; Le-Cre$ Maus mit einem Vesikelbläschen (Sternchen) in der Mitte des zentralen Kornea - Stromas, welches von epithelialen Zellen, welche die strukturellen Charakteristika von Korneaepithelzellen zeigen, umgeben ist. Abbildung aus Kroeber et al. (83).

Augen von drei bis vier Wochen alten $Pax6^{flox/+};\alpha Cre$ Mäusen, die in Parallelexperimenten untersucht wurden, zeigten einen offenen Kammerwinkel und keinen offensichtlichen Defekt im Trabekelwerk und im Schlemm Kanal (nicht dargestellt)

Erhöhter Augeninnendruck bei Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen

Da sich die üblichen Abflusswege des Kammerwassers, das Trabekelwerk und der Schlemm Kanal bei Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen nicht ausbilden und der Kammerwinkel durch die Iriswurzel blockiert ist, waren wir daran interessiert herauszufinden, ob die strukturellen Hindernisse des Kammerwasserabflusses einen erhöhten Augeninnendruck nach sich ziehen. Zu diesem Zweck haben wir den Augeninnendruck invasiv mittels einer Kanüle in der vorderen Augenkammer gemessen. Da bei den mutierten Mäusen sowohl die Wurzel als auch die vordere Spitze der Iris der Hornhaut anlagen, wurde die Kanüle an der Stelle der Kornea eingeführt, an der noch ein kleiner Anteil der vorderen Augenkammer vorhanden war. Der Augeninnendruck wurde bei 72 der zehn Wochen alten Tiere gemessen (41 Wurfgeschwister der Kontrollgruppe, 31 mutierte Wurfgeschwister). Sowohl bei den mutierten Mäusen, als auch in der Kontrollgruppe zeigte sich eine normale Verteilung des Augeninnendrucks (Abb. 5A) welcher im Vergleich zur Kontrollgruppe ($19,33 \pm 1,94$, Mittelwert \pm Standardabweichung) in den Augen der mutierten Mäuse signifikant erhöht war ($p < 0,0001$; $26,13 \pm 4,62$ Mittelwert \pm Standardabweichung) (Abb. 5B).

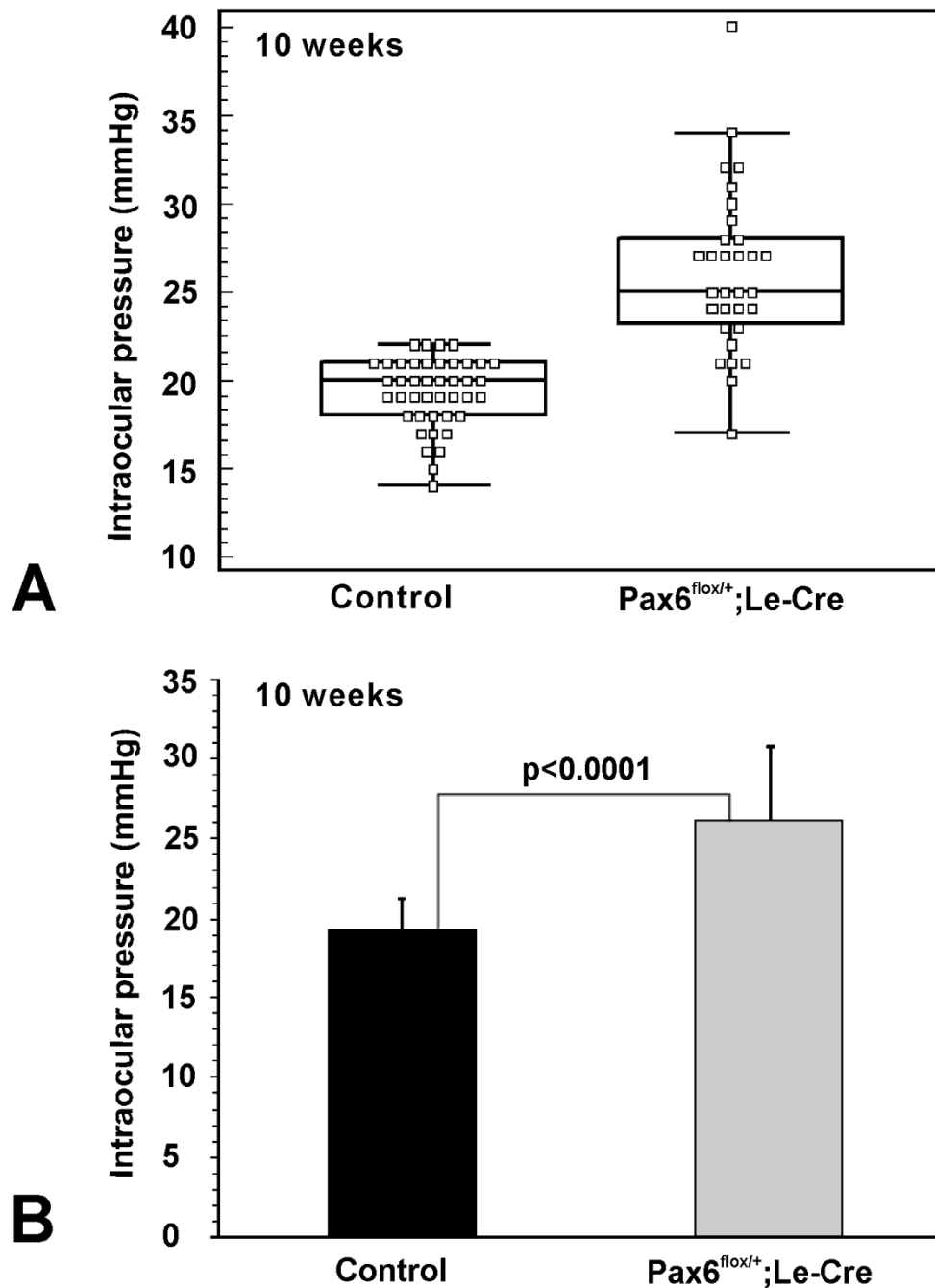


Abb. 5 Im Alter von 10 Wochen zeigen die Pax6^{flox/+}; Le-Cre Mäuse einen Anstieg des Augeninnendrucks (IOP). Der IOP wurde bei 72 Mäusen invasiv gemessen (41 Kontrolltiere und 31 mutierte Wurfgeschwister). **A.** Die Box-Whisker Plot/Kastengrafik zeigt die mittlere, obere und untere Quartile und die kleinsten und größten Werte in der Verteilung. **B.** Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikant nach T-Test. Abbildung aus Kroeber et al. (83).

Zur weiteren Untersuchung wurde die Veränderung des Augeninnendrucks über die Zeit, bei 3 bis 5,5 Monate alten Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen, nicht-invasiv mittels Tonometrie gemessen. In Übereinstimmung mit den Daten aus der invasiven Messung war der Augeninnendruck bei den 3 bis 5,5 Monate alten Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen, verglichen mit den Mäusen der Kontrollgruppe, signifikant erhöht (Abb. 6). Ein Teil der nicht-invasiven Druckmessungen wurde in Israel von M. Shela – Goraly und R. Ofri durchgeführt.

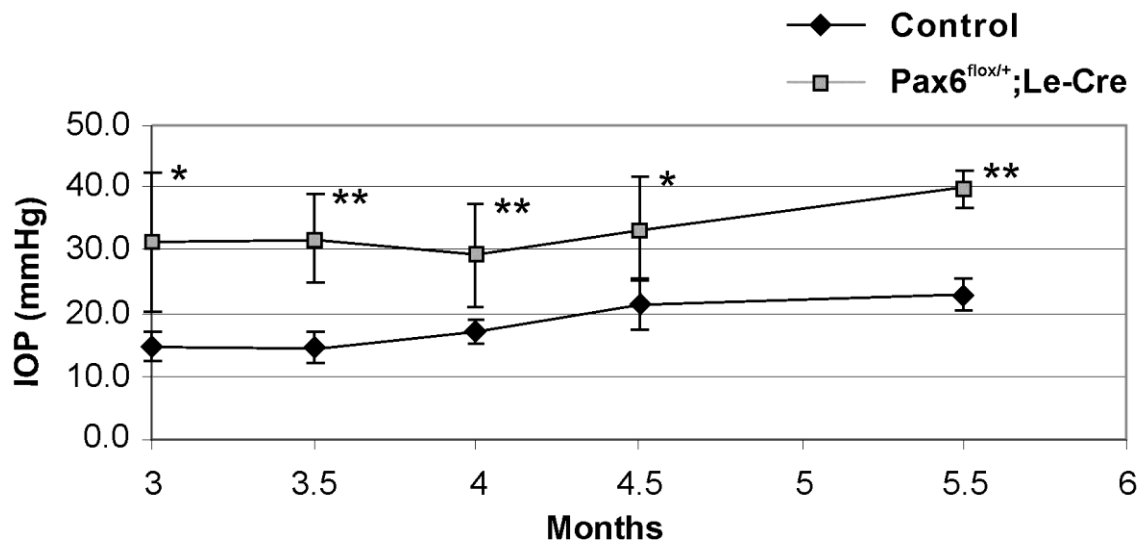


Abb. 6 Der Augeninnendruck (IOP) ist in den Augen von Pax6^{flox/+}; Le-Cre Mäusen stetig erhöht. Im Alter zwischen 3 und 5,5 Monaten wurde der Augeninnendruck bei Kontrollmäusen und den mutierten Wurfgeschwistern nicht invasiv gemessen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung, gemessen wurde bei 10 Augen pro Genotyp an jedem Zeitpunkt. Die Studentsche *t*-Verteilung wurde für die statistische Analyse aufgeführt, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**).Abbildung aus Kroeber et al. (83).

Schäden an den Sehnerven der Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäuse

Um in Erfahrung zu bringen, ob die kontinuierliche Erhöhung des Augeninnendruckes über einige Monate hinweg zu einer Schädigung der Axone des Sehnerven im Sinne eines Glaukoms führt, untersuchten wir die Sehnerven von sechs Monate alten Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen unter dem Licht- sowie Elektronenmikroskop und verglichen sie mit ihren Wurfgeschwistern der Kontrollgruppe. In Ultradünnschnitten von Sehnerven bei Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen, in denen Myelinscheiden mittels Paraphenyldiamin markiert wurden, konnten zahlreiche dunkle Flecke beobachtet werden, die bei Wildtyp - Mäusen extrem selten auftraten (Abb. 7A, B). In der nachfolgenden Untersuchung der Flecke unter dem Elektronenmikroskop sah man degenerative Axone, die dichte und unregelmäßige Windungen von Myelin zeigten (Abb. 7C, D).

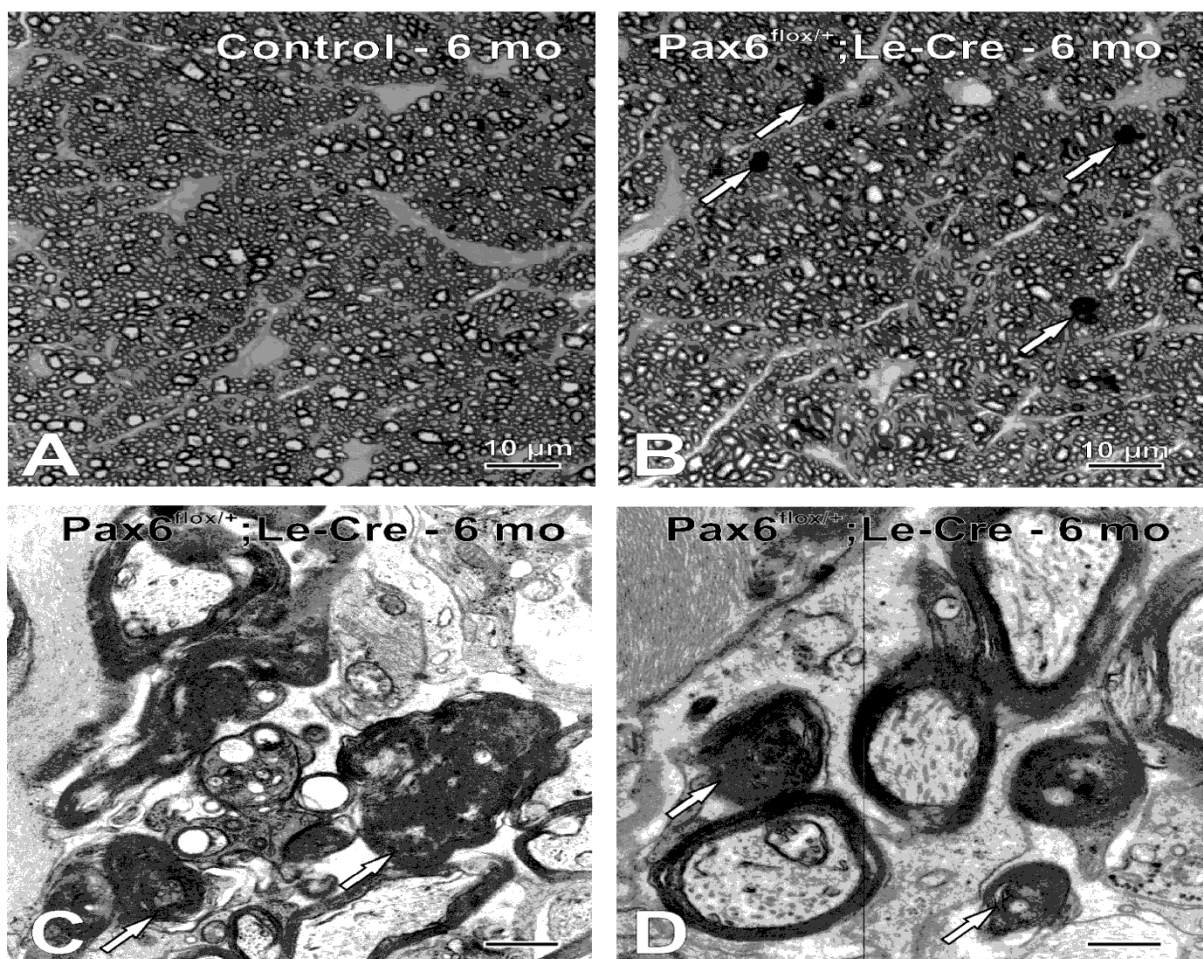


Abb. 7 In den Sehnerven von 6 Monate alten $Pax6^{flox/+}; Le-Cre$ Mäusen findet man eine Vielzahl degenerierter Axone. **A,B.** Querschnitte von Sehnerven von Kontroll- und $Pax6^{flox/+}; Le-Cre$ Mäusen, gefärbt mit Paraphenyldiamin. **B.** Es befinden sich eine Vielzahl dunkler Flecke (weiße Pfeile) in dem Sehnerven der $Pax6^{flox/+}; Le-Cre$ Maus. **C,D.** Elektronenmikroskopische Darstellung von derselben Region wie in B. Die dunklen Flecke, die durch Färbung mit Paraphenyldiamin sichtbar gemacht wurden, repräsentieren degenerative Axone, die dichte und unregelmäßige Windungen aus Myelin bilden (Pfeile). Abbildung aus Kroeber et al. (83).

Darüber hinaus waren die Axone der Sehnerven bei den $Pax6^{flox/+}; Le-Cre$ Mäusen nicht so dicht angeordnet wie bei den Wildtyp - Mäusen (Abb. 8A, B).

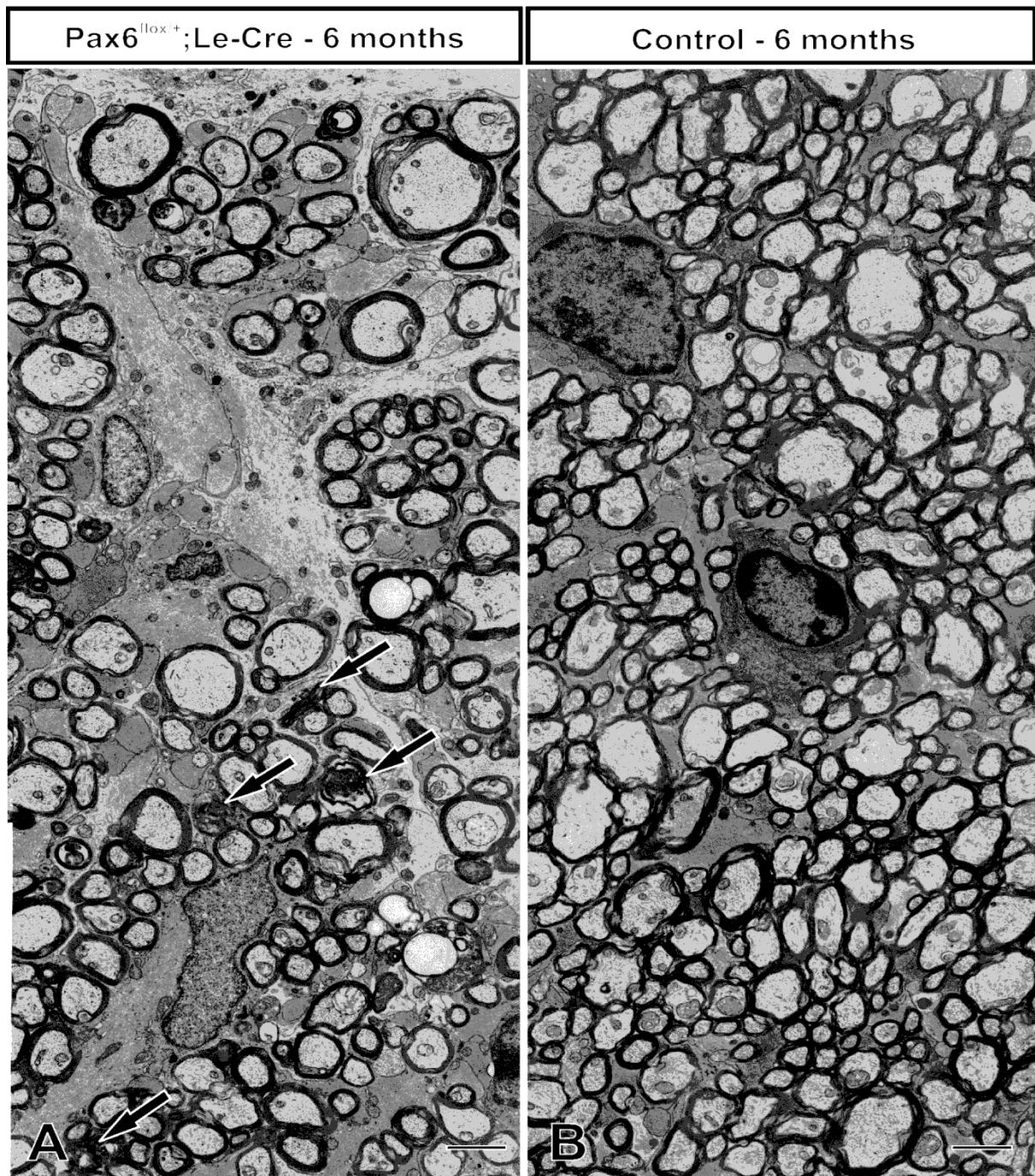


Abb. 8 Elektronenmikroskopische Darstellungen der Querschnitte von Sehnerven bei sechs Monate alten Pax6^{lox/+};Le-Cre- (A) und Kontrollmäusen(B). Im Sehnerven der Pax6^{lox/+};Le-Cre Maus sind die Axone weniger dicht angeordnet und eine Vielzahl von degenerativ veränderten Axonen ist sichtbar (Pfeile). Abbildung aus Kroeber et al. (83).

Demgegenüber fand sich unter dem Licht- sowie Elektronenmikroskop bei den erst vier Wochen alten Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen, sowie deren Kontrollgruppe, kein Anhalt für degenerative Veränderung der Axone im Sehnerven. Im nächsten Schritt wollten wir unsere qualitativen Ergebnisse mittels quantitativer Daten bekräftigen. Weil die Linsen und Augen bei Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen kleiner sind als bei den Wurfgeschwistern der Wildtypen (19), wollten wir als Erstes wissen, ob die Sehnerven in einem kleinen Auge kleiner sind, unabhängig von jeglichen glaukomatösen Schäden. Tatsächlich zeigte die morphometrische Analyse der Sehnerven im Querschnitt, dass die Nerven mit zunehmendem Alter sowohl bei Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen als auch bei den Wildtypen dicker werden, jedoch die Fläche der Sehnerven bei den Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen, unabhängig vom Alter ungefähr 30-35% kleiner ist als bei den Wildtypen (Abb. 9A). Als nächstes testeten wir, ob eine geringere Größe des Sehnerven gleichzeitig auch weniger Axone bedeutet. Hierfür zählten wir von vier Wochen alten Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen und deren Wildtypen alle Axone der Sehnerven im Querschnitt unter dem Elektronenmikroskop (Abb. 9C). Wir wählten das Alter von vier Wochen, da bei Mäusen in diesem Alter die Axone des Sehnerven bereits myelinisiert sind und wir in diesem Stadium weder bei Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen, noch bei den Wildtypen degenerative Veränderungen von Axonen in den Sehnerven beobachten konnten.

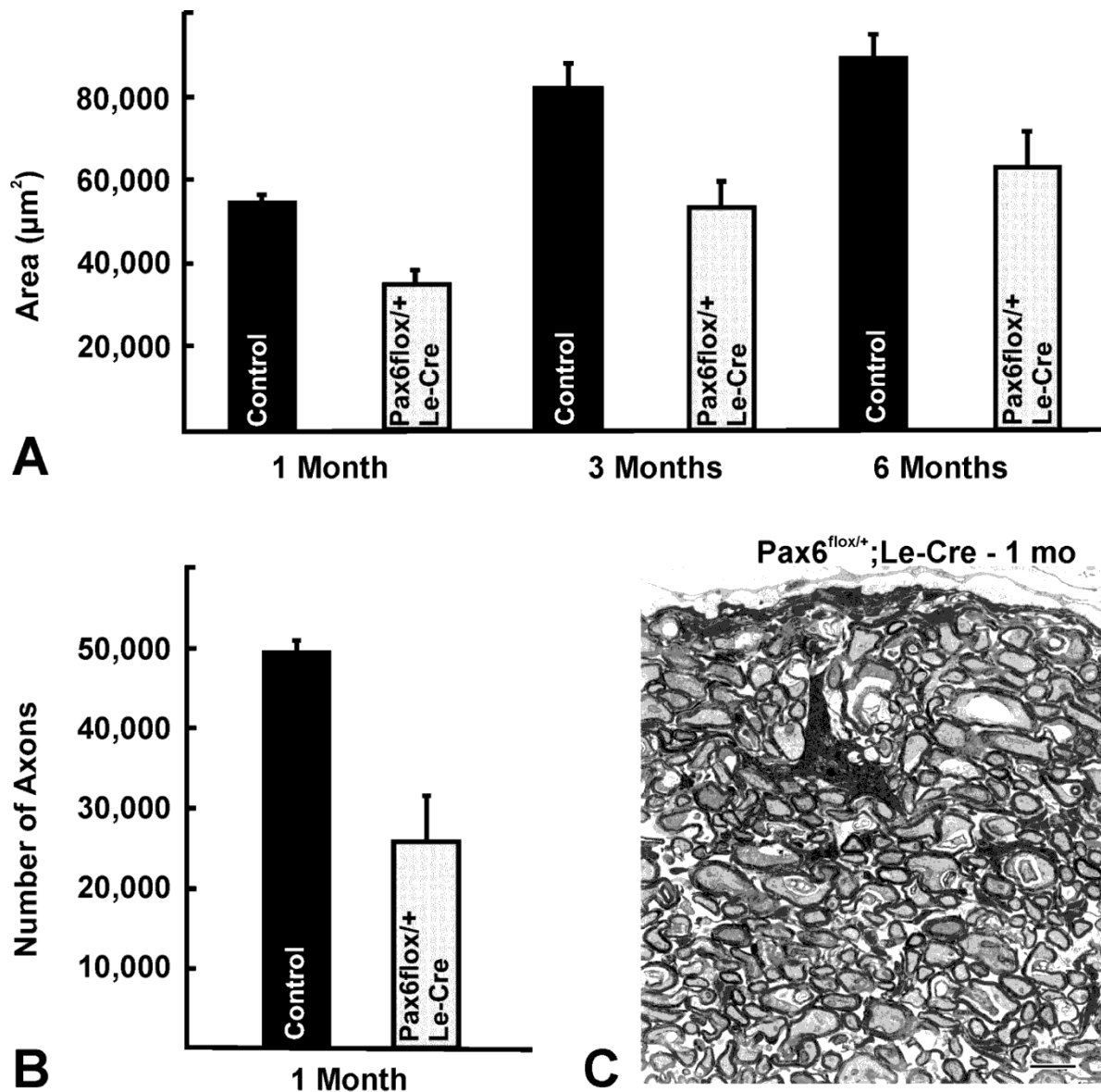


Abb. 9 Die Sehnerven von Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen sind flächenmäßig kleiner und enthalten weniger Axone als die der Kontrolltiere. **A.** Die Querschnittfläche von Sehnerven, Mittelwert \pm Standardabweichung (ein Monat: $n = 2$ sowohl für Kontroll- als für mutierte Mäuse; drei Monate: $n = 5$ für Kontroll- und $n = 4$ für mutierte Mäuse; sechs Monate; $n = 4$ für Kontroll- und $n = 5$ für mutierte Mäuse). **B.** Die Anzahl der Axone im Sehnerven von ein Monat alten Pax6^{flox/+};Le-Cre- und Kontrollmäusen ($n = 2$ sowohl für Kontroll- als auch für mutierte Mäuse). **C.** Die elektronenmikroskopische Darstellung eines Sehnervenquerschnittes einer ein Monate alten Pax6^{flox/+};Le-Cre Maus, zeigt

myelinisierte Axone und das Fehlen von axonalen Degenerationen. Abbildung aus Kroeber et al. (83).

Es wurden $49,354 \pm 1,440$ Axone in den Sehnerven der Wildtypen gezählt, jedoch nur $25,961 \pm 5,476$ bei Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen (Abb. 9B). Wir schlossen daraus, dass verglichen mit den Wildtypen die Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäuse mit kleineren Sehnerven, die weniger Axone beinhalten, geboren werden. Daher scheinen absolute Maßzahlen ungeeignet, um bei mutierten Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen die glaukomatösen Schäden am Sehnerven zu identifizieren. Deshalb beschlossen wir alternativ dazu das Verhältnis zwischen der Anzahl der degenerativen Axone, die in den Paraphenylendiamin Semidünnschnitten gefunden worden sind und der Gesamtzahl der Axone zu berechnen (Abb. 8B). Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass es signifikant ($p < 0,05$) mehr degenerierte Axone pro Gesamtzahl der Axone in den Sehnerven bei sechs Monate alten mutierten Mäusen gibt (Abb. 10). Dies unterstützte die Annahme, dass die Zunahme des Augeninnendrucks zu glaukomatösen Schäden am Sehnerven bei Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen führt. Die quantitative Auswertung erfolgte zusammen mit Michaela Kritzenberger.

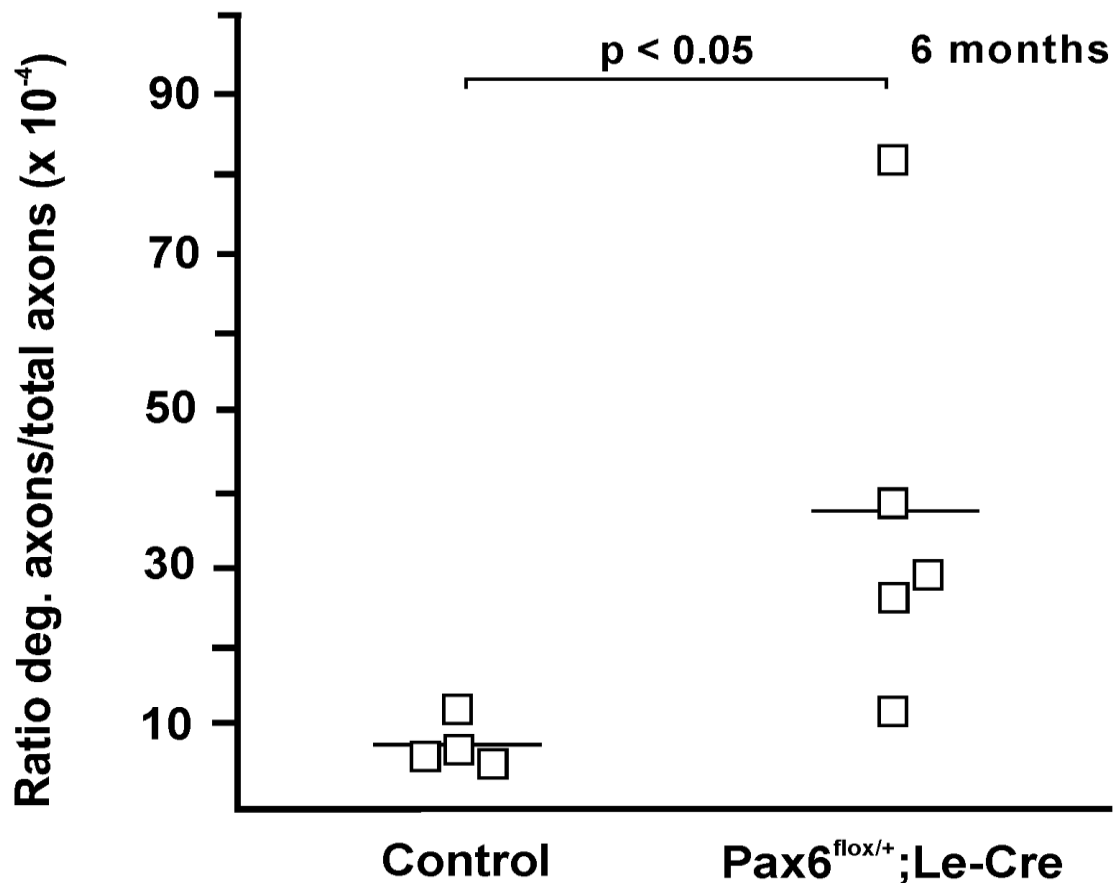


Abb. 10 Der Anteil von degenerierten Axone im Bezug auf die Gesamtzahl der Axone ist bei sechs Monate alten Pax6^{lox/+};Le-Cre Mäusen höher als bei den Wurfgeschwistern in der Kontrollgruppe. $n = 4$ bei Kontrolltieren ; $n = 5$ bei mutierten Tieren. Die T Verteilung wurde für die statistische Analyse aufgeführt. Abbildung aus Kroeber et al. (83).

DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Arbeit war es der Frage nachzugehen, ob der Transkriptionsfaktor Pax 6 bei der Entwicklung des vorderen Augenabschnittes, insbesondere des Kammerwinkels, eine essentielle Bedeutung hat und diese die Entstehung eines Glaukoms begünstigt.

Aus unserer experimentellen Arbeit lässt sich tatsächlich folgern, dass die Expression von Pax6 in der sich entwickelnden Linse und Hornhaut eine kritische Rolle für die Ausbildung der Abflusssysteme des Kammerwassers im Kammerwinkel spielt. Die somatische Deaktivierung eines Allels von Pax6 ausschließlich in Linsen- und Hornhautepithelzellen führt sowohl zur kompletten Unterbrechung der Ausbildung des Trabekelwerkes und des Schlemm Kanals, als auch zu einer stärkeren Anheftung zwischen der Irisperipherie und der Hornhaut im jugendlichen Auge. Dies hat den vollständigen Verschluss des Kammerwinkels im erwachsenen Auge zur Folge. Die strukturellen Veränderungen im Kammerwinkel verursachen eine stetige Zunahme des Augeninnendrucks, die letztendlich zu degenerativen Veränderungen bei den Axonen des Sehnerven und zu einem Glaukom führt.

Die Rolle der Pax6 Haploinsuffizienz im Kammerwinkel ist nicht zellautonom

Die Transkription von Pax6 wird von zahlreichen Transkriptionsfaktoren kontrolliert (20-23). Eine Genregion, die den ektodermalen Enhancer des Pax6 Promoters beinhaltet generiert die Expression von Cre in Le-Cre transgenen Mäusen (24). Das Rekombinationsmuster, das über die Le-Cre transgene Linie vermittelt wird, wurde in früheren Studien beschrieben. Es beinhaltet die

Linsenzellen, die Epithelschicht der Hornhaut sowie einige amakrine Zellen in der inneren Kernschicht der Retina (19). Der Schlemm Kanal ist ein modifiziertes Blutgefäß (25), welches sich aus dem Mesoderm entwickelt, während das Trabekelwerk von mesenchymalen Zellen der kranialen Neuralleiste abstammt (15,18). Da in Zellen der Neuralleiste oder Zellen mesodermalen Ursprungs keine Cre-vermittelte Rekombination beobachtet wurde, schlossen wir daraus, dass die Defekte in der Entwicklung des Kammerwinkels bei Pax6^{flox/+};Le-Cre Mäusen nicht durch zellautonome, sondern eher durch nichtautonome Mechanismen der Pax6 Haploinsuffizienz in Zellen außerhalb des Kammerwinkels verursacht werden.

Das Hornhautepithel bedeckt die äußere Oberfläche der Hornhaut und die amakrinen Zellen der Retina befinden sich relativ fern von den Geweben des Kammerwinkels. Daraus schließen wir, dass die Expression beider Pax6 Allele in der Linse notwendig ist, damit sich das Trabekelwerk und der Schlemm Kanal ausbilden und der Kammerwinkel sich entwickelt. In α -Cre Mäusen, treibt der distale Pax6 Retina Enhancer die Expression von Cre an (26), was zur spezifischen Auslöschung eines Pax6 Allels im distalen Augenbecher bei Pax6^{flox/+}; α -Cre Tieren und zur Ausbildung einer hypoplastischen Iris führt (19). Unsere Daten zeigen, dass eine Pax6 Haploinsuffizienz im distalen Augenbecher die Ausprägung des Trabekelwerks und des Schlemm Kanals nicht beeinflusst und weisen darauf hin, dass der distale Augenbecher und die davon abstammenden Gewebe, wie die Iris und der Ziliarkörper, nur eine untergeordnete Rolle in der Entwicklung des Kammerwinkels spielen.

Erhöhter Augeninnendruck und Glaukom in *Pax6^{lox/+};lens-Cre* Mäusen

Das Trabekelwerk und der Schlemm Kanal bilden die trabekulären Abflusswege des Kammerwassers (9). Das Kammerwasser wird vom Epithel der Ziliarkörper aktiv in die hintere Augenkammer sezerniert und fließt durch die Pupille in die vordere Augenkammer (27). Wenn das Kammerwasser die Abflusswege des Trabekelwerks passiert hat, fließt es in das episklerale venöse System außerhalb des Auges. Die Abflusswege des Trabekelwerks sind wichtig, da sie als Abflusswiderstand für das Kammerwasser dienen (8,28). Der intraokulare Druck wird als Folge dieses Widerstandes aufgebaut, bis er hoch genug ist um den Abfluss des Kammerwassers durch das Trabekelwerk in den Schlemm Kanal zu erlauben. Es ist nicht verwunderlich, dass die strukturellen Defekte im trabekulären Abfluss und der Verschluss des Kammerwinkels in *Pax6^{lox/+};lens-Cre* Mäusen zu einer hochsignifikanten und substantiellen Zunahme (ca.25%) des Augeninnendrucks führen.

Die Zunahme scheint jedoch gering, verglichen mit dem Anstieg des Augeninnendrucks bei menschlichen Patienten mit akutem Winkelblock, die Augeninnendruckzunahmen von mehr als 100% aufweisen können. Bei *Pax6^{lox/+};lens-Cre* Mäusen verhindern höchstwahrscheinlich Kompensationsmechanismen eine stärkere Zunahme des Augeninnendrucks. Solche Mechanismen könnten die uveosklerale oder unkonventionelle Abflussroute beinhalten, die für Kammerwasser im Kammerwinkel im Bereich der vorderen Insertion der Iris/des Ziliarkörpers offen steht (29), da sich dort keine komplette Endothel- bzw. Epithelschicht befindet, die die vordere Oberfläche der Iris/des Ziliarkörpers im Mausauge bedeckt (30). Wie Daten von Aihara und Kollegen zeigen (31), verlässt fast 80% des Kammerwassers das normale Mausauge über den uveoskleralen Weg. Das weist darauf hin, dass der uveosklerale Abfluss beim Mausauge substantiell höher ist, als bei anderen untersuchten Säugetierarten wie Menschen, Affen und Kaninchen (29).

In zahlreichen prospektiv, randomisierten, klinischen Multizenterstudien erwies sich der Augeninnendruck als der größte Risikofaktor für die Entstehung eines Glaukoms und Axonschäden am Sehnervenkopf (32-37). Gleichsam führt das Ansteigen des Augeninnendrucks auch bei zahlreichen gentechnisch veränderten Mauslinien zu einer glaukomatösen Sehnervenschädigung (38-41). Diese glaukomatöse Schädigung sind bei Mäusen und Menschen durch einen Verlust, von Axonen in den Sehnerven und retinalen Ganglienzellen charakterisiert, ein Parameter, der in *Pax6^{flox/+};lens-Cre* Mäusen schwer zu bewerten war.

Die spezifische Auslöschung eines Pax6 Allels in der Linse und in der Hornhaut führt zur Entwicklung von Augen, die, verglichen mit der Kontrollgruppe, kleiner sind und kleinere Sehnerven mit weniger Axonen haben. Dies zeigt sich sogar bei jungen Tieren, bei denen sich noch kein glaukomatöser Schaden manifestiert hat. Im Alter von sechs Monaten beinhalten die Sehnerven von *Pax6^{flox/+};lens-Cre* Mäusen zahlreiche, degenerierte Axone mit strukturellen Eigenschaften ähnlich derer, die in andern Mausmodellen vom Glaukom beschrieben wurden (42). Auf einer relativen Skala ist die Zahl der degenerativen Axone allerdings signifikant höher als in den Augen der Kontrollgruppe. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass der Anstieg des Augeninnendrucks bei *Pax6^{flox/+};lens-Cre* Mäusen glaukomatöse Sehnervenschäden verursacht.

Aniridie und Glaukom

Die genaue Ursache für die Entwicklungsfehler, die bei Menschen mit Aniridie zu der Ausbildung eines juvenilen Glaukoms führen, ist unklar. Grant und Walton (43) führten mittels Gonioskopie Untersuchungen bei Patienten mit Aniridie und Glaukom, sowie bei Patienten mit Aniridie ohne Glaukom durch und fanden heraus, dass sich das Irisstroma nach vorne in Richtung des Trabekelwerks ausdehnt. Zunächst werden synechienartige Anheftungen gebildet gefolgt von einer mehr homogenen Platte, die eventuell einen Verschluss des Kammerwinkels verursacht. Demgegenüber bewies die histopathologische Analyse von Augen zweier Kinder mit Aniridie und Wilms Tumor, dass mit der partiellen Deletion des kurzen Armes von Chromosom 11 (44), auf dem sich Pax6 befindet (45, 46), eine abnormale Ausdifferenzierung des Trabekelwerks und ein vollständiges Fehlen des Schlemm Kanals assoziiert ist. Vergleichbare Untersuchungen wurden bereits früher in zahlreichen histopathologischen Fallberichten beschrieben, in denen der Genotyp für Aniridie nicht bestimmt worden war (47-50). Augenscheinlich scheinen zwei Mechanismen das juvenile Glaukom bei Aniridie zu verursachen bzw. dazu beizutragen. Diese sind ein primärer Entwicklungseffekt in den trabekulären Abflusswegen, gefolgt von einem sekundären Verschluss des Kammerwinkels.

Diese Hypothese wird durch unsere Daten über die *Pax6^{flox/+};lens-Cre* Mäuse stark unterstützt, welche die gleichen zwei Mechanismen, die fehlerhafte Differenzierung des Trabekelwerks und des Schlemm Kanals, sowie den Verschluss des Kammerwinkels durch die iridokorneale Adhäsion der Irisperipherie, aufwiesen. Bei *Pax6^{flox/+};lens-Cre* Mäusen führten die strukturellen Veränderungen im Kammerwinkel zu Sehnervenschäden und zum Glaukom. Dies dürfte auch bei menschlichen Patienten mit Aniridie der Fall sein. Eine Reihe von Ereignissen, angefangen von einem primärem Strukturdefekt in den trabekulären Abflusswegen, gefolgt von einem

sekundären Verschluss des Kammerwinkels dürfte auch erklären, warum das Glaukom bei Aniridie unmittelbar nach der Geburt nicht zu beobachten ist, sich jedoch im Jugendalter ausbildet. Der uveoskleraler Ausfluss, der 25-57% des gesamten Kammerwasser Abflusses bei gesunden Individuen zwischen 20-30 Jahren ausmacht (51-53), kann den Funktionsmangel der trabekulären Abflusswege eine gewisse Zeit kompensieren. Jedoch führt der permanente Verschluss des Kammerwinkels nicht nur zu einem Verschluss der trabekulären Abflusswege, sondern minimiert überdies den Zugang zum uveoskleralen Abflussweg und führt schließlich zu einem substanziellen Anstieg des Augeninnendrucks und zu einem Glaukom.

Selbstverständlich ist die Variation des strukturellen Phänotyps im Kammerwinkel bei dem heterogenen genetischen Hintergrund von Menschen größer, als bei dem übersichtlicheren genetischen Hintergrund der für die Studie genutzten Mauslinien. Diese Tatsache könnte auch erklären warum ein deutlicher Prozentsatz an Patienten mit Aniridie kein Glaukom entwickelt. Überdies gibt es Hinweise darauf, dass die spezifische Art der Mutation von Pax6 einen Effekt auf den Schweregrad des individuellen Phänotyps hat (54).

Peters Anomalie in *Pax6^{lox/+};lens-Cre* Mäusen

In den Augen von neugeborenen *Pax6^{lox/+};lens-Cre* Mäusen, beobachteten wir durchwegs Adhäsionen zwischen Hornhaut und Linse und den Phänotyp der Peters Anomalie, was die Ergebnisse einer vorangehenden Studie bekräftigte (19). Bei genauerer Untersuchung, entdeckten wir, dass sich die Epithelschichten der Hornhaut und der Linse nicht getrennt hatten und über einen Defekt im zentralen Hornhautstroma in Verbindung standen.

Ein vergleichbarer Phänotyp fand sich in Mäusen mit Mängeln bei anderen Transkriptionsfaktoren, wie Pitx3, Foxe3, Sip1, und Sox11 (55-61), die zu

regulatorischen Prozessen bei der Entwicklung des vorderen Auges beitragen. Bei heterozygoten Pax6-Mangel Mäusen gibt es Hinweise darauf, dass die Entwicklung des Phänotyps der Peters Anomalie mit einer verzögerten Bildung der Linsenplakode während der frühen Augenentwicklung verknüpft ist (62). Wir beobachteten in der aktuellen Studie, dass sich die Linse von jungen erwachsenen *Pax6^{flox/+};lens-Cre* Mäusen schließlich von der Hornhaut trennt und nur relativ kleine Defekte im Stroma der zentralen Hornhaut verbleiben. Offensichtlich sind Adhäsionen zwischen Linse und Hornhaut kein permanentes Bild bei *Pax6^{flox/+};lens-Cre* Mäusen. Die Trennung zwischen Linse und Hornhaut ist verzögert, aber beide Gewebe trennen sich letztendlich, wenn die Entwicklung des vorderen Auges abgeschlossen ist. Adhäsionen zwischen Hornhaut und Linse und einem persistierenden Linsenstiel sind gewöhnlich bei Patienten mit Aniridie nicht zu sehen (6,7), obwohl von einigen Fällen mit Pax6 Mutationen und Peters Anomalie berichtet wurde (63).

Molekulare Signale der Linse kontrollieren die Entwicklung des Kammerwinkels

Da *Pax6^{flox/+};lens-Cre* Mäuse eine selektive Reduktion der Pax6 Expression in Epithelzellen der Linse und Hornhaut, sowie in amakrinen Zellen aufweisen, scheint es am wahrscheinlichsten, dass die verminderte Pax6 Menge in Linsenzellen für die strukturellen Veränderungen in der Entwicklung des Kammerwinkels verantwortlich ist. Es ist weiter folgerichtig anzunehmen, dass Pax6 die Transkription von Signalmolekülen in Linsenzellen kontrolliert, die benötigt werden, um die Sequenz der molekularen Ereignisse, die während der Entwicklung des Kammerwinkels auftreten, zu steuern. Solche Moleküle könnten von Linsenzellen ins Kammerwasser sezerniert werden um Zielzellen im Kammerwinkel zu erreichen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie

benutzten Wolf und Kollegen DNS Mikroarrays, um Gene zu identifizieren, die in der Linse von neugeborenen heterozygoten Pax6 Mäusen und Wildtyp - Mäusen verschieden exprimiert werden (64). Unter den als herunter reguliert identifizierten Genen bei heterozygoten Pax6-Mangel Mäusen war das Gen, welches den Transforming Growth Factor- β 2 (TGF- β 2) encodiert.

Zusätzliche Experimente zeigten, dass der Locus, der TGF- β 2 encodiert, welcher von Pax6 positiv reguliert wird, im Linsenchromatin durch Pax6 besetzt war. Überdies wurden, mittels *in vitro* Assays, mindestens drei Pax6 Bindungsstellen in der TGF- β 2 Promoterregion identifiziert. Insgesamt wiesen die Ergebnisse stark darauf hin, dass die Transkription von TGF- β 2 der unmittelbaren Kontrolle durch Pax6 untersteht. TGF- β 2 ist ein Mitglied einer Familie von dimeren, polypeptiden Wachstumsfaktoren. Im Kammerwasser des normalen Auges findet man TGF- β 2, welches aus den Epithelzellen des Ziliarkörpers (65) und der Linse (66-68) sezerniert wird, in relativ hoher Konzentration (69-71). Die physiologische Rolle von TGF- β 2 im Kammerwasser scheint eng mit der immunsuppressiven Umgebung der vorderen Augenkammer (72, 73) und dem Phänomen der Vorderkammer-assoziierten abweichenden Immunantwort (ACAID) verbunden zu sein. Darüber hinaus gibt es substantielle Belege, dass TGF- β 2 die Umwandlung der extrazellulären Matrix in Trabekelwerk reguliert (74).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Wirkung von TGF- β 2 für die Umwandlung der extrazellulären Matrix in Trabekelwerk während der Entwicklung des Kammerwinkels benötigt wird. Somit führt vermutlich eine verminderte Konzentration von TGF- β 2 im Kammerwasser, verursacht durch die Verminderung von Pax6 in den Linsenzellen, sowohl bei Pax6^{flox/+};lens-Cre Mäusen, als auch bei menschlichen Patienten mit Aniridie zu einer Fehlentwicklung des Kammerwinkels. Eine Anheftung der Linse an die Kornea und die phänotypische Ausprägung der Peters Anomalie wurden bei TGF- β 2-

defizienten Mäusen (75), ähnlich wie bei den Pax6^{flox/+};lens-Cre Mäusen, beobachtet. TGF- β 2- defiziente Mäusen sterben bei der Geburt aufgrund kardialer Defekte (76) und somit einige Tage vor Abschluss der Ausdifferenzierung des Kammerwinkels im Mausauge (15). Da die uns bisher vorliegenden Ergebnisse sehr stark darauf hindeuten, dass TGF- β 2 das Schlüsselmolekül zur Kontrolle der Morphogenese des Kammerwinkels ist, wird in unserem Labor derzeit mit Hochdruck an der Entwicklung unterschiedlicher Mauslinien gearbeitet, um diese Frage abschließend zu klären.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Gehring, W.J. (2002) The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. *Int. J. Dev. Biol.*, **46**, 65-73.
- 2 Ashery-Padan, R. and Gruss, P. (2001) Pax6 lights-up the way for eye development. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 706-714.
- 3 Chow, R.L. and Lang, R.A. (2001) Early eye development in vertebrates. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **17**, 255-296.
- 4 Kozmik, Z. (2008) The role of Pax genes in eye evolution. *Brain Res. Bull.*, **75**, 335-339.
- 5 Mintz-Hittner, H.A. (1996) Aniridia. In Ritch, R., Shields, M.B. and Krupin, T. (eds.), *The glaucomas*. Mosby, St. Louis, pp. 859-874.
- 6 Brauner, S.C., Walton, D.S. and Chen, T.C. (2008) Aniridia. *Int. Ophthalmol. Clin.*, **48**, 79-85.
- 7 Lee, H., Khan, R. and O'Keefe, M. (2008) Aniridia: current pathology and management. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)*, **86**, 708-715.
- 8 Johnson, M. (2006) 'What controls aqueous humour outflow resistance?'. *Exp. Eye Res.*, **82**, 545-557.
- 9 Tamm, E.R. (2009) The trabecular meshwork outflow pathways: structural and functional aspects. *Exp. Eye Res.*, **88**, 648-655.
- 10 Baulmann, D., Ohlmann, A., Flügel-Koch, C., Goswami, S., Cvekl, A. and Tamm, E.R. (2002) Pax6 heterozygous eyes show defects in chamber angle

differentiation that are associated with a wide spectrum of other anterior eye segment abnormalities. *Mech. Dev.*, **118**, 3-17.

11 Grindley, J.C., Davidson, D.R. and Hill, R.E. (1995) The role of *pax-6* in eye and nasal development. *Development*, **121**, 1433-1442.

12 Walther, C. and Gruss, P. (1991) Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development*, **113**, 1435-1449.

13 Koroma, B.M., Yang, J.M. and Sundin, O.H. (1997) The Pax-6 homeobox gene is expressed throughout the corneal and conjunctival epithelia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **38**, 108-120.

14 Nishina, S., Kohsaka, S., Yamaguchi, Y., Handa, H., Kawakami, A., Fujisawa, H. and Azuma, N. (1999) PAX6 expression in the developing human eye. *Br. J. Ophthalmol.*, **83**, 723-727.

15 Cvekl, A. and Tamm, E.R. (2004) Anterior eye development and ocular mesenchyme: new insights from mouse models and human diseases. *Bioessays*, **26**, 374-386.

16 Tamm, E.R. (2004) Genetic changes and their influence on structure and function of the eye in glaucoma. In Grehn, F.J. and Stamper, R. (eds.), *Essentials in Ophthalmology. Glaucoma*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

17 Ramaesh, T., Collinson, J.M., Ramaesh, K., Kaufman, M.H., West, J.D. and Dhillon, B. (2003) Corneal abnormalities in Pax6^{+/-} small eye mice mimic human aniridia-related keratopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 1871-1878.

18 Kanakubo, S., Nomura, T., Yamamura, K., Miyazaki, J., Tamai, M. and Osumi, N. (2006) Abnormal migration and distribution of neural crest cells in

Pax6 heterozygous mutant eye, a model for human eye diseases. *Genes Cells*, **11**, 919-933.

19 Davis-Silberman, N., Kalich, T., Oron-Karni, V., Marquardt, T., Kroeber, M., Tamm, E.R. and Ashery-Padan, R. (2005) Genetic dissection of Pax6 dosage requirements in the developing mouse eye. *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 2265-2276.

20 Kammandel, B., Chowdhury, K., Stoykova, A., Aparicio, S., Brenner, S. and Gruss, P. (1999) Distinct cis-essential modules direct the time-space pattern of the Pax6 gene activity. *Dev. Biol.*, **205**, 79-97.

21 Griffin, C., Kleinjan, D.A., Doe, B. and van Heyningen, V. (2002) New 3' elements control Pax6 expression in the developing pretectum, neural retina and olfactory region. *Mech. Dev.*, **112**, 89-100.

22 Kleinjan, D.A., Seawright, A., Mella, S., Carr, C.B., Tyas, D.A., Simpson, T.I., Mason, J.O., Price, D.J. and van Heyningen, V. (2006) Long-range downstream enhancers are essential for Pax6 expression. *Dev. Biol.*, **299**, 563-581.

23 Morgan, R. (2004) Conservation of sequence and function in the Pax6 regulatory elements. *Trends Genet.*, **20**, 283-287.

24 Dimanlig, P.V., Faber, S.C., Auerbach, W., Makarenkova, H.P. and Lang, R.A. (2001) The upstream ectoderm enhancer in Pax6 has an important role in lens induction. *Development*, **128**, 4415-4424.

25 Ethier, C.R. (2002) The inner wall of Schlemm's canal. *Exp. Eye Res.*, **74**, 161-172.

- 26 Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F. and Gruss, P. (2001) Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell*, **105**, 43-55.
- 27 Do, C.W. and Civan, M.M. (2009) Species variation in biology and physiology of the ciliary epithelium: similarities and differences. *Exp. Eye Res.*, **88**, 631-640.
- 28 Overby, D.R., Stamer, W.D. and Johnson, M. (2009) The changing paradigm of outflow resistance generation: towards synergistic models of the JCT and inner wall endothelium. *Exp. Eye Res.*, **88**, 656-670.
- 29 Alm, A. and Nilsson, S.F. (2009) Uveoscleral outflow--a review. *Exp. Eye Res.*, **88**, 760-768.
- 30 Tamm, E.R. and Kellenberger, A. (2008) Aqueous humor dynamics and trabecular meshwork. In Chalupa, L.M. and Williams, R.W. (eds.), *Eye, Retina, and Visual System of the Mouse*. MIT Press, Cambridge, pp. 129-134.
- 31 Aihara, M., Lindsey, J.D. and Weinreb, R.N. (2003) Aqueous humor dynamics in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 5168-5173.
- 32 TheAGISInvestigators (2000) The advanced glaucoma intervention study (AGIS): 7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. *Am. J. Ophthalmol.*, **130**, 429-440.
- 33 CollaborativeNormal-TensionGlaucomaStudyGroup (1998) The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. *Am. J. Ophthalmol.*, **126**, 498-505.

- 34 Leske, M.C., Heijl, A., Hussein, M., Bengtsson, B., Hyman, L. and Komaroff, E. (2003) Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial. *Arch. Ophthalmol.*, **121**, 48-56.
- 35 CollaborativeNormal-TensionGlaucomaStudyGroup (1998) Comparison of glaucomatous progression between untreated patients with normal-tension glaucoma and patients with therapeutically reduced intraocular pressures. . *Am. J. Ophthalmol.*, **126**, 487-497.
- 36 Higginbotham, E.J., Gordon, M.O., Beiser, J.A., Drake, M.V., Bennett, G.R., Wilson, M.R. and Kass, M.A. (2004) The Ocular Hypertension Treatment Study: topical medication delays or prevents primary open-angle glaucoma in African American individuals. *Arch. Ophthalmol.*, **122**, 813-820.
- 37 Gordon, M.O., Beiser, J.A., Brandt, J.D., Heuer, D.K., Higginbotham, E.J., Johnson, C.A., Keltner, J.L., Miller, J.P., Parrish, R.K., 2nd, Wilson, M.R. *et al.* (2002) The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma. *Arch. Ophthalmol.*, **120**, 714-720; discussion 829-730.
- 38 Anderson, M.G., Smith, R.S., Hawes, N.L., Zabaleta, A., Chang, B., Wiggs, J.L. and John, S.W. (2002) Mutations in genes encoding melanosomal proteins cause pigmentary glaucoma in DBA/2J mice. *Nat. Genet.*, **30**, 81-85.
- 39 Senatorov, V., Malyukova, I., Fariss, R., Wawrousek, E.F., Swaminathan, S., Sharan, S.K. and Tomarev, S. (2006) Expression of mutated mouse myocilin induces open-angle glaucoma in transgenic mice. *J. Neurosci.*, **26**, 11903-11914.
- 40 Howell, G.R., Libby, R.T. and John, S.W. (2008) Mouse genetic models: an ideal system for understanding glaucomatous neurodegeneration and neuroprotection. *Prog. Brain Res.*, **173**, 303-321.

- 41 Gould, D.B., Marchant, J.K., Savinova, O.V., Smith, R.S. and John, S.W. (2007) Col4a1 mutation causes endoplasmic reticulum stress and genetically modifiable ocular dysgenesis. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 798-807.
- 42 Howell, G.R., Libby, R.T., Jakobs, T.C., Smith, R.S., Phalan, F.C., Barter, J.W., Barbay, J.M., Marchant, J.K., Mahesh, N., Porciatti, V. *et al.* (2007) Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic nerve early in DBA/2J glaucoma. *J. Cell Biol.*, **179**, 1523-1537.
- 43 Grant, W.M. and Walton, D.S. (1974) Progressive changes in the angle in congenital aniridia, with development of glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.*, **78**, 842-847.
- 44 Margo, C.E. (1983) Congenital aniridia: a histopathologic study of the anterior segment in children. *J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus*, **20**, 192-198.
- 45 Ton, C.C., Miwa, H. and Saunders, G.F. (1992) Small eye (Sey): cloning and characterization of the murine homolog of the human aniridia gene. *Genomics*, **13**, 251-256.
- 46 Jordan, T., Hanson, I., Zaletayev, D., Hodgson, S., Prosser, J., Seawright, A., Hastie, N. and van Heyningen, V. (1992) The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nat. Genet.*, **1**, 328-332.
- 47 Collins, T. (1893) Congenital defects of the iris and glaucoma. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.*, **13**, 128-139.
- 48 Bergmeister, R. (1904) Zwei Fälle von angeborener Irideremie. *v. Graefes Arch. Ophthalm.*, **59**, 31-45.
- 49 Callahan, A. (1949) Aniridia with ectopia lentis and secondary glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.*, **32**, 28-40.

- 50 Duke-Elder, S. (1964) Hypoplasia of the iris: Aniridia. In Duke-Elder, S. (ed.), *System of ophthalmology. Vol. III. Normal and abnormal development. Part 2: Congenital disorders*. Henry Kimpton, London, pp. 565-572.
- 51 Townsend, D.J. and Brubaker, R.F. (1980) Immediate effect of epinephrine on aqueous formation in the normal eye as measured by fluorophotometry. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **196**, 256-266.
- 52 Mishima, H.K., Kiuchi, Y., Takamatsu, M., Racz, P. and Bito, L.Z. (1997) Circadian intraocular pressure management with latanoprost: diurnal and nocturnal intraocular pressure reduction and increased uveoscleral outflow. *Surv. Ophthalmol.*, **41 Suppl 2**, S139-144.
- 53 Toris, C.B., Camras, C.B. and Yablonski, M.E. (1999) Acute versus chronic effects of brimonidine on aqueous humor dynamics in ocular hypertensive patients. *Am. J. Ophthalmol.*, **128**, 8-14.
- 54 Hingorani, M., Williamson, K.A., Moore, A.T. and van Heyningen, V. (2009) Detailed ophthalmologic evaluation of 43 individuals with PAX6 mutations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **50**, 2581-2590.
- 55 Semina, E.V., Murray, J.C., Reiter, R., Hrstka, R.F. and Graw, J. (2000) Deletion in the promoter region and altered expression of Pitx3 homeobox gene in aphakia mice. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 1575-1585.
- 56 Rieger, D.K., Reichenberger, E., McLean, W., Sidow, A. and Olsen, B.R. (2001) A double-deletion mutation in the Pitx3 gene causes arrested lens development in aphakia mice. *Genomics*, **72**, 61-72.
- 57 Varnum, D.S. and Stevens, L.C. (1968) Aphakia, a new mutation in the mouse. *J. Hered.*, **59**, 147-150.

- 58 Medina-Martinez, O., Brownell, I., Amaya-Manzanares, F., Hu, Q., Behringer, R.R. and Jamrich, M. (2005) Severe defects in proliferation and differentiation of lens cells in Foxe3 null mice. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 8854-8863.
- 59 Blixt, A., Landgren, H., Johansson, B.R. and Carlsson, P. (2007) Foxe3 is required for morphogenesis and differentiation of the anterior segment of the eye and is sensitive to Pax6 gene dosage. *Dev. Biol.*, **302**, 218-229.
- 60 Yoshimoto, A., Saigou, Y., Higashi, Y. and Kondoh, H. (2005) Regulation of ocular lens development by Smad-interacting protein 1 involving Foxe3 activation. *Development*, **132**, 4437-4448.
- 61 Wurm, A., Sock, E., Fuchshofer, R., Wegner, M. and Tamm, E.R. (2008) Anterior segment dysgenesis in the eyes of mice deficient for the high-mobility-group transcription factor Sox11. *Exp. Eye Res.*, **86**, 895-907.
- 62 van Raamsdonk, C.D. and Tilghman, S.M. (2000) Dosage requirement and allelic expression of PAX6 during lens placode formation. *Development*, **127**, 5439-5448.
- 63 Hanson, I.M., Fletcher, J.M., Jordan, T., Brown, A., Taylor, D., Adams, R.J., Punnett, H.H. and van, H., V (1994) Mutations at the PAX6 locus are found in heterogeneous anterior segment malformations including Peters' anomaly. *Nat. Genet.*, **6**, 168-173.
- 64 Wolf, L.V., Yang, Y., Wang, J., Xie, Q., Braunger, B., Tamm, E.R., Zavadil, J. and Cvekl, A. (2009) Identification of pax6-dependent gene regulatory networks in the mouse lens. *PLoS One*, **4**, e4159.
- 65 Helbig, H., Kittredge, K.L., Coca-Prados, M., Davis, J., Palestine, A.G. and Nussenblatt, R.B. (1991) Mammalian ciliary-body epithelial cells in culture

produce transforming growth factor-beta. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **229**, 84-87.

66 Allen, J.B., Davidson, M.G., Nasisse, M.P., Fleisher, L.N. and McGahan, M.C. (1998) The lens influences aqueous humor levels of transforming growth factor-beta 2. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **236**, 305-311.

67 Gordon-Thomson, C., de Iongh, R.U., Hales, A.M., Chamberlain, C.G. and McAvoy, J.W. (1998) Differential cataractogenic potency of TGF-beta1, -beta2, and -beta3 and their expression in the postnatal rat eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **39**, 1399-1409.

68 Wallentin, N., Wickstrom, K. and Lundberg, C. (1998) Effect of cataract surgery on aqueous TGF-beta and lens epithelial cell proliferation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **39**, 1410-1418.

69 Granstein, R.D., Staszewski, R., Knisley, T.L., Zeira, E., Nazareno, R., Latina, M. and Albert, D.M. (1990) Aqueous humor contains transforming growth factor-b and a small (<3500 daltons) inhibitor of thymocyte proliferation. *J. Immunol.*, **144**, 3021-3027.

70 Jampel, H.D., Roche, N., Stark, W.J. and Roberts, A.B. (1990) Transforming growth factor-b in human aqueous humor. *Curr. Eye Res.*, **9**, 963-969.

71 Cousins, S.W., McCabe, M.M., Danielpour, D. and Streilein, J.W. (1991) Identification of transforming growth factor-beta as an immunosuppressive factor in aqueous humor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **32**, 2201-2211.

72 Streilein, J.W., Ksander, B.R. and Taylor, A.W. (1997) Immune deviation in relation to ocular immune privilege. *J. Immunol.*, **158**, 3557-3560.

- 73 Streilein, J.W. (1999) Immunoregulatory mechanisms of the eye. *Prog. Retin. Eye Res.*, **18**, 357-370.
- 74 Fuchshofer, R. and Tamm, E.R. (2009) Modulation of extracellular matrix turnover in the trabecular meshwork. *Exp. Eye Res.*, **88**, 683-688.
- 75 Saika, S., Liu, C.Y., Azhar, M., Sanford, L.P., Doetschman, T., Gendron, R.L., Kao, C.W. and Kao, W.W. (2001) TGFbeta2 in corneal morphogenesis during mouse embryonic development. *Dev. Biol.*, **240**, 419-432.
- 76 Sanford, L.P., Ormsby, I., Gittenberger-de Groot, A.C., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L. and Doetschman, T. (1997) TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non- overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development*, **124**, 2659-2670.
- 77 Ashery-Padan, R., Marquardt, T., Zhou, X. and Gruss, P. (2000) Pax6 activity in the lens primordium is required for lens formation and for correct placement of a single retina in the eye. *Genes Dev.*, **14**, 2701-2711.
- 78 Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy. *J. Cell Biol.*, **27**, 137-138.
- 79 Richardson, K.C., Jarret, L. and Finke, H. (1960) Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol.*, **35**, 313-323.
- 80 Schultze, W.H. (1972) Über das Paraphenylendiamin in der histologischen Färbetechnik und über eine neue Schnelfärbemethode der Nervenmarkscheide am Gefrierschnitt. *Zentralbl. Pathol.* , **36**, 639-640.
- 81 John, S.W., Hagaman, J.R., MacTaggart, T.E., Peng, L. and Smithes, O. (1997) Intraocular pressure in inbred mouse strains. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **38**, 249-253.

- 82 Zillig, M., Wurm, A., Grehn, F.J., Russell, P. and Tamm, E.R. (2005) Overexpression and properties of wild-type and Tyr437His mutated myocilin in the eyes of transgenic mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **46**, 223-234.
- 83 Kroeber M., Davis N., Holzmann S., Kritzenberger M., Shela - Goraly M., Ofri R., Ashery - Padan R., Tamm E. (2010) Reduced expression of Pax6 in lense and cornea of mutant mice leads to failure of chamber angle development and juvenile glaucoma. *Human molecular genetics*
- 84 Krey, Bräuer (1998) Augenatlas zur Physiologie und Pathophysiologie des Auges. *Chibert*
- 85 Gerhard K. Lanng (1998) Augenheilkunde. *Thieme*
- 86 Weizmann Wissenschaftsinstitut. Genetische Aufschlüsselung. Pax 6

DANKSAGUNG

Für die Ermöglichung dieser Dissertation, tatkräftige Unterstützung, stets freundschaftliche Zusammenarbeit und Motivation gilt mein Dank allen Lehrstuhlmitarbeitern für Humananatomie und Embryologie.

Insbesondere:

Prof. Dr. med. Ernst R. Tamm dem Leiter des Instituts für Anatomie und Embryologie, der durch seine Anleitung, Anregungen, Unterstützung und Motivation diese Arbeit ermöglicht hat.

Dr. rer. nat. Markus Kröber für die initiale Betreuung meiner Arbeit und viele geduldige Erklärungen

Margit Schimmel und Elke Stauber, den technischen Assistentinnen und guten Seelen des Labors ohne deren tatkräftige Unterstützung und Zuspruch ich meine Arbeit nicht hätte durchführen können. Vielen Dank für euer immer offenes Ohr und eure Freundschaft.

Angelika Pach, Katarina Fizia, Tina Steil, die mir mit anregenden Gesprächen viele Stunden im Labor verkürzt haben.

Fr. Inge Köberlein für ihre ehrliche Anteilnahme, Erinnerungshilfen an den Chef und Fürsorge seit dem 1. Semester.

Meinem Ehemann für seine Hilfe, Motivation und Geduld in jeder Hinsicht.

