

Untersuchungen zur funktionellen Rolle des Proteins WDR36 und seine Beteiligung bei der Pathogenese des Glaukoms



Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rerum naturalis)
der naturwissenschaftlichen Fakultät III
-Biologie und Vorklinische Medizin-
der Universität Regensburg

Durchgeführt am Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie
der Universität Regensburg

Vorgelegt von
Martin Gallenberger
aus Kösching

Regensburg, Juni 2012

Diese Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Ernst R. Tamm.

Promotionsgesuch eingereicht am 14.06.2012

Unterschrift:

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: PD Dr. Rudolf Fuchshofer

1. Gutachter: Prof. Dr. Ernst R. Tamm

2. Gutachter: Prof. Dr. Herbert Tschochner

3. Prüfer: Prof. Dr. Richard Warth

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Das Glaukom.....	1
1.2 Glaukom-assoziierte Gene	3
1.2.1 Myocilin (<i>MYOC</i>)	4
1.2.2 Optineurin (<i>OPTN</i>)	4
1.2.3 Neurotrophin 4 (<i>NTF-4</i>)	5
1.2.4 WD-repeat Protein 36 (<i>WDR36</i>).....	6
1.3 Prozessierung der ribosomalen RNA (rRNA)	9
2 Zielsetzung.....	12
3 Material und Methoden.....	13
3.1 Materiallisten	13
3.1.1 Reagenzienliste	13
3.1.2 Enzyme	15
3.1.3 Reaktions-Kits	16
3.1.4 Oligonukleotidprimer.....	16
3.1.5 Plasmide.....	19
3.1.6 Bakterien	20
3.1.7 Größenstandards	20
3.1.8 Geräte	20
3.1.9 Verbrauchsmaterialien.....	22
3.1.10 Antikörper.....	23
3.1.11 Rezepte für Puffer und Gele.....	23
3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden	27
3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	27
3.2.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen und PCR clean-up.....	28
3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese.....	28
3.2.4 Chemische Transformation von <i>E. coli</i>	28
3.2.5 Enzymatischer Verdau von Plasmid-DNA	29

3.2.6 Ligation.....	29
3.2.7 Klonierung von Überexpressionsplasmiden	29
3.2.7.1 Klonierung des pcDNA3.1-myc-his-Wdr36-Vektors	29
3.2.7.2 Klonierung des Vektors pGEX-4T-3-Wdr36	30
3.2.8 DNA-Sequenzanalyse	30
3.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	30
3.2.10 RNA-Isolierung	31
3.2.11 Herstellung von cDNA (complementäre DNA).....	31
3.2.12 Durchführung der quantitativen Real-Time Reverse Transkription-PCR .	
.....	33
3.2.13 Northern-Blot.....	35
3.2.13.1 Generierung der Sonden.....	35
3.2.13.2 Durchführung der Northern-Blot Analysen	36
3.2.14 Design und Synthese der verwendeten siRNAs.....	38
3.3 Generierung von gentechnisch modifizierten murinen embryonalen Stammzelllinien zu Etablierung einer konditionalen <i>Wdr36</i> -defizienten Maus.....	40
3.3.1 Recombineering	40
3.3.1.1 Verwendete PCR-Programme	41
3.3.1.2 Induktion der Expression	42
3.3.1.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien und Elektroporation	43
3.3.1.4 Selektion und Verifizierung der Integration	43
3.3.2 Elektroporation des linearisierten Vektors in murine embryonale Stammzellen	44
3.3.3 Nachweis genetisch modifizierter embryonaler Stammzellen.....	44
3.3.3.1 Long-Range-PCR	44
3.3.3.2 LacZ Färbung	45
3.4 Zellkultur	46
3.4.1 Allgemeine Zellkulturtechniken.....	46
3.4.2 Zellzahlbestimmung.....	46
3.4.3 Transfektion von Zellen	46
3.4.3.1 Transfektion von Vektoren	46
3.4.3.2 Transfektion von siRNA	47
3.4.4 Zellkulturbasierende Versuche	47
3.4.4.1 Pulse-Chase Experiment	47

3.4.4.2 Bestimmung apoptotischer Zellen mit dem 'Cell Death Detection ELISA'	49
3.4.4.3 Statistische Analyse des DNA Gehalts mittels Propidiumiodid-Färbung	50
3.4.4.4 Immunzytochemische Färbungen	51
3.5 Tiere und tierexperimentelles Arbeiten	52
3.5.1 Allgemeine Tierhaltungsbedingungen	52
3.5.2 DNA Isolierung aus Mausschwänzen	52
3.5.3 Verwendete Versuchstierlinien und deren Genotypisierung	52
3.5.4 Intraokuläre Injektionen	54
3.5.4.1 Intravitreale Injektion von NMDA	54
3.5.4.2 Induktion eines experimentellen Glaukoms durch intrakamerale Injektion von Polystyren-Microbeads	55
3.5.5 Bestimmung des intraokulären Drucks	56
3.5.6 Bestimmung der Gesamtzahl der retinalen Ganglienzellen	57
3.5.7 Isolierung und Kultivierung von Maus-Zygoten	57
3.5.8 Injektion von siRNA in Maus-Zygoten	59
3.6 Proteinbiochemische Methoden	60
3.6.1 Co-Immunopräzipitation	60
3.6.2 Bakterielle Expression von GST-Wdr36 und Vorbereitung für Pulldown-Assays	61
3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	61
3.6.4 Semidry Blotting	62
3.6.5 Nachweis spezifischer Proteinbanden	63
3.6.6 Coomassie-Färbung	63
3.7 Histologische Methoden	64
3.7.1 Eponeinbettung und Herstellung von Semidünnschnitten	64
3.7.2 Histologische Färbungen	64
3.7.2.1 Richardson-Färbung	64
3.7.2.2 Paraphenylendiamin-Färbung	65
3.8 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	65
3.9 Auswertung und Statistik	65

4 Ergebnisse	66
4.1 Analyse des Phänotyps von homozygoten <i>Wdr36</i> -defizienten Mäusen	66
4.2 Phänotypische Analyse der Mikroinjektionsversuche	69
4.3 Subzelluläre Lokalisierung von WDR36	72
4.4 Funktion von WDR36 auf zellulärer Ebene.....	75
4.4.1 Expressionsanalyse.....	75
4.4.2 Etablierung eines Knock-down der WDR36 Expression in HTM-N Zellen	76
4.4.3 Wachstumsverhalten der HTM-N Zellen nach WDR36 Depletion	77
4.4.4 Untersuchung der Apoptoserate nach WDR36 Depletion	78
4.4.5 Northern-Blot Analyse zur Beteiligung von WDR36 an der 18S rRNA Prozessierung.....	81
4.4.6 Pulse-Chase Analysen zur Beteiligung von WDR36 an der 18S rRNA Prozessierung.....	83
4.4.7 Untersuchung von PWP2 als möglichem Interaktionspartner von WDR36	86
4.4.8 Untersuchung von möglichen Interaktionspartnern mittels GST-Pulldown	87
4.5 Heterozygot <i>Wdr36</i> -defiziente Mäuse	88
4.5.1 Phänotyp der heterozygoten <i>Wdr36</i> -defizienten Mäuse.....	88
4.5.2 Analyse der rRNA Prozessierung im Auge von heterozygoten <i>Wdr36</i> -defizienten Mäusen.....	89
4.5.3 Untersuchung der Vulnerabilität retinaler Ganglienzellen in heterozygoten <i>Wdr36</i> -defizienten Mäusen	91
4.5.3.1 NMDA induzierte exzitotoxische Schädigung von retinalen Ganglienzellen	92
4.5.3.2 Induktion eines experimentellen Glaukoms durch Vorderkammer-injektion von Polystyren-Microbeads.....	94
4.5.3.3 Induktion eines Glaukoms durch Verpaarung mit βB1-CTGF-Mäusen	98
4.6 Untersuchungen zur pCAGGS- <i>Wdr36</i> _Del605-607-Mauslinie	100
4.6.1 Genetic rescue	100
4.6.2 Phänotyp der heterozygoten <i>Wdr36</i> -defizienten Del605-607 Maus ..	102

4.6.2.1 NMDA induzierte exzitotoxische Schädigung von retinalen Ganglionzellen der heterozygoten <i>Wdr36</i> defizienten_Del605-607 Maus	104
4.7 Generierung einer konditionellen <i>Wdr36</i> -defizienten embryonalen Stammzelllinie	106
4.7.1 Theoretische Überlegungen	106
4.7.2 Generierung des Zielvektors	107
4.7.2.1 Subklonieren des zu modifizierenden genomischen Bereichs von <i>Wdr36</i>	108
4.7.2.2 Insertion eines Kanamycin-Resistenzgens in Vektor step1	110
4.7.2.3 Rekombination der loxP-sites in Vektor step2	112
4.7.2.4 Insertion eines Chloramphenicol-Resistenzgens in Vektor step3 ..	113
4.7.2.5 Insertion einer β-geo-Kassette in Vektor step4A.....	115
4.7.3 Nachweis der homologen Rekombination in ES-Zellen mittels Long-Range-PCR	118
4.7.4 Nachweis der β-Galaktosidase Aktivität in den gentechnisch modifizierten murinen ES-Zellen.....	120
5 Diskussion	121
5.1 WDR36 ist ein essentielles Protein.....	121
5.2 Depletion von WDR36 führt in Zellen zur Apoptose	123
5.3 WDR36 als <i>bona fide</i> Komponente des Small-Subunit Prozessoms.....	124
5.4 Heterozygote <i>Wdr36</i> -defiziente Mäuse haben keine höhere Anfälligkeit für glaukomatóse Schäden.....	127
5.5 Überexpression von mutiertem <i>Wdr36</i> führt zu keiner Änderung des Phänotyps <i>Wdr36</i> -defizienter Mäuse	130
5.6 WDR36 und das Glaukom	131
6 Zusammenfassung.....	133
7 Anhang.....	135
7.1 Literaturverzeichnis	135
7.2 Abkürzungsverzeichnis.....	147
7.3 Abbildungsverzeichnis.....	150
7.4 Tabellenverzeichnis.....	153

Inhaltsverzeichnis

7.5	Danksagung	155
7.6	Erklärung	156

1 Einleitung

1.1 Das Glaukom

Das Glaukom ist die weltweit zweithäufigste Ursache für einen Sehverlust (Quigley, 1996). Es wird erwartet, dass bis zum Jahr 2020 ca. 80 Millionen Menschen am Glaukom erkranken und weiterhin etwa 11 Millionen Menschen daran erblinden werden (Quigley and Broman, 2006). Unter der Bezeichnung Glaukom wird eine heterogene Gruppe von Störungen zusammengefasst, bei denen es charakteristisch zu einer strukturellen Schädigung des Sehnervs und damit einhergehend zu typischen Gesichtsfeldausfällen kommt (Foster et al., 2002).

Das primäre Offenwinkelglaukom (POWG) stellt die häufigste Form der Glaukomerkrankungen dar. So sind etwa 1–2% der westlichen Bevölkerung im Alter von über 40 Jahren vom primären Offenwinkelglaukom betroffen (Tuck and Crick, 1998). Das primäre Offenwinkelglaukom ist eine chronisch neurodegenerative Erkrankung des Auges, bei der es zu einem progredienten Verlust an Axonen der retinalen Ganglienzellen des *Nervus opticus* kommt, wobei der Kammerwinkel ein normales Erscheinungsbild zeigt. Klinisch ist es durch eine Exkavation des Sehnervkopfes und durch Gesichtsfeldausfälle charakterisiert.

Auch wenn ein erhöhter Augeninnendruck nicht zu den definierenden Kriterien gehört (Foster et al., 2002), konnte doch in umfangreichen randomisierten, prospektiven Multizentrum-Studien gezeigt werden, dass ein erhöhter intraokulärer Druck der maßgeblichste belegbare pathogene Risikofaktor für die Ausbildung eines Glaukoms ist (Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group, 1998; The AGIS Investigators, 2000; Gordon et al., 2002; Leske et al., 2003). Der Augeninnendruck beträgt beim Menschen im Normalfall 15mmHg, bei POWG-Patienten kann er jedoch auch Werte über 22mmHg annehmen. Ein physiologischer Augeninnendruck ist notwendig, um die Form des Auges zu stabilisieren und so scharfes Sehen zu ermöglichen. Aufrechterhalten wird der Augeninnendruck durch gleichmäßigen Zu- und Abfluss von Kammerwasser, welches im Epithel des Ziliarkörpers gebildet und in die hintere Augenkammer sezerniert wird. Über die Pupille fließt das Kammerwasser

in die vordere Augenkammer, von dort fließt es über das Trabekelwerk in den Schlemm Kanal und schließlich über die episkleralen Venen ab (trabekulärer Abfluss). Geringe Mengen des Kammerwassers (ca. 15%) werden ausserdem über den uveoskleralen Abfluss abtransportiert, wobei das Kammerwasser durch den Ziliarmuskel, dann zwischen Ziliarmuskel und Sklera fließt und schließlich transskleral abgegeben wird (Lang, 2008; Sachsenweger, 2003; vergleiche hierzu auch Abb. 1). Ist nun der Kammerwasserabfluss gestört, kommt es zu einer Erhöhung des Augeninnendrucks, welcher zu einer strukturellen Veränderung an der *Lamina cribrosa* führen kann (Burgoyne and Downs, 2008; Roberts et al., 2009). Dies resultiert wiederum in einer mechanischen Belastung der Axone der retinalen Ganglienzellen bei ihrem Durchtritt durch die *Lamina cribrosa*, was zu einer Störung des retrograden axonalen Transports führt und schließlich die Apoptose der retinalen Ganglienzellen einleitet (Quigley, 1999).

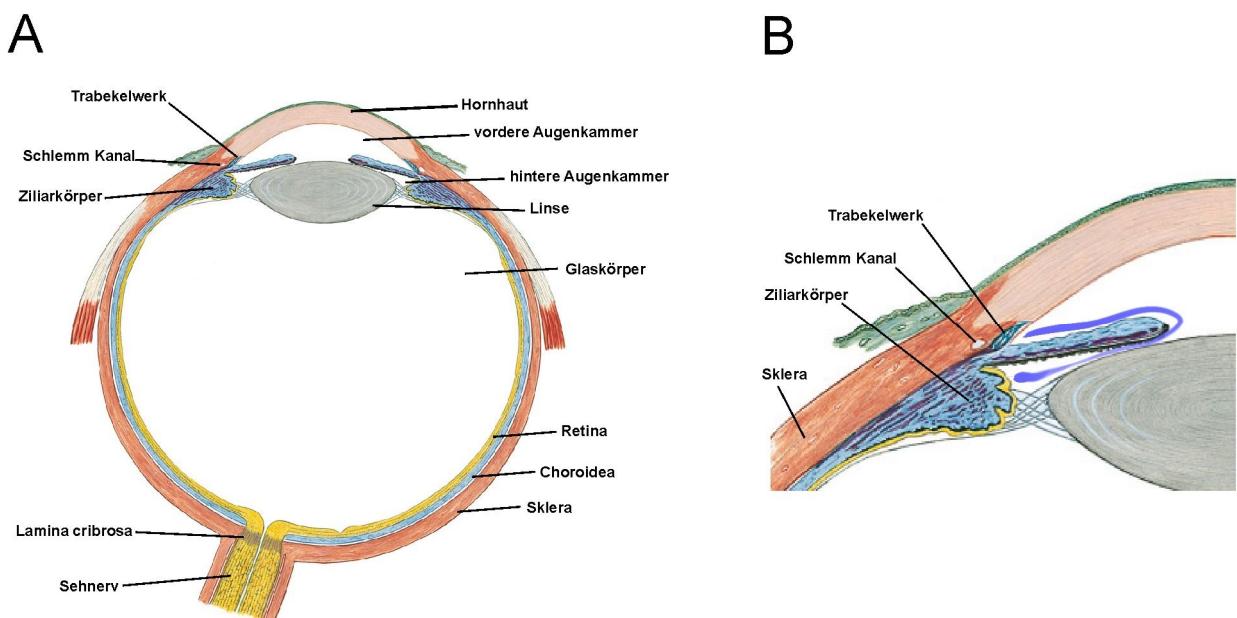


Abb. 1: Schematische Darstellung zum Aufbau des Auges (A) und des Kammerwasser-abflusses (B).

Abbildungen adaptiert aus Sobotta (2010): Atlas der Anatomie des Menschen. 23. Auflage.

Es werden aber auch andere Faktoren diskutiert, die das Risiko ein Glaukom auszubilden, erhöhen sollen. Zu diesen Risikofaktoren zählen die Erkrankung an *Diabetes mellitus*, Gefäßerkrankungen oder ein hohes Lebensalter (Bonovas et al., 2004b; Tuck and Crick, 1998). Weiterhin bergen auch Raucher ein erhöhtes Risiko an einem Glaukom zu erkranken (Bonovas et al., 2004a). Ferner ist die Gefahr der Ausbildung eines Glaukoms auch abhängig von der Zugehörigkeit zu einer ethnischen Gruppe, so ist das Risiko bei Schwarzen bis zu 5-mal höher als bei Kaukasiern (Tielsch et al., 1991).

Bei Glaukompatienten ist eine genetische Prädisposition für die Ausbildung dieser Krankheit klar belegt (Sarfarazi, 1997). So konnten verschiedene Studien zeigen, dass bei Verwandten ersten Grades einer betroffenen Person ein 3-9-fach erhöhtes Risiko besteht am POWG zu erkranken (Tielsch et al., 1994; Weih et al., 2001; Wensor et al., 1998; Wolfs et al., 1998; Wu et al., 2006).

1.2 Glaukom-assoziierte Gene

Beim primären Offenwinkelglaukom zeigt sich üblicherweise ein komplexes, nicht-Mendelsches Vererbungsmuster. Jedoch wurden auch Familien identifiziert, bei denen ein autosomal-dominantes oder autosomal-rezessives Vererbungsmuster der Erkrankung gefunden wurde (Allingham et al., 2009; Fan and Wiggs, 2010). Kopplungsanalysen in betroffenen Familien haben bislang zur Identifizierung von 25 chromosomal Loci geführt, die mit dem POWG in Zusammenhang gebracht werden. Aus diesen wurden von der Human Genome Organization (HUGO; Genf, Schweiz) bislang 15 näher benannt (GLC1A-GLC1O). Untersuchungen dieser genomischen Loci konnten bislang zur Identifizierung von Mutationen in den vier Genen *MYOC* (GLC1A), *OPTN* (GLC1E), *WDR36* (GLC1G) und *NTF-4* (GLC1O) führen, die anscheinend jeweils für bestimmte Formen des Offenwinkelglaukoms ursächlich sind (Ray and Mookherjee, 2009).

1.2.1 Myocilin (*MYOC*)

Das erste identifizierte Glaukom-assoziierte Gen war Myocilin (*MYOC*), welches auf Chromosom 1 in der Region q21-q31 lokalisiert ist (GLC1A) (Fingert et al., 1999; Sheffield et al., 1993). Mutationen in den kodierenden Regionen dieses Gens werden mit 3-5% der POWG-Patienten (Allingham et al., 2009) bzw. sogar mit 8-36% der an einem Juvenilen Offenwinkelglaukom leidenden Patienten in Zusammenhang gebracht (Shimizu et al., 2000; Wiggs et al., 1998). Wie viele unabhängige Studien zeigen, sind Mutationen in *MYOC* auch mit einem erhöhten Augeninnendruck assoziiert (Alward et al., 1998; Challa et al., 2002; Mackey et al., 2003).

Untersuchungen zeigten, dass Myocillin in vielen okulären und nicht-okulären Geweben exprimiert wird (Fingert, 2002). Im Auge ist die höchste Expression in der Iris, der Sklera und im Trabekelwerk auszumachen (Adam et al., 1997; Ortego et al., 1997; Rao et al., 2000). Das Gen *MYOC* codiert für ein sezerniertes Protein mit einer molekularen Masse von 55-57kDa, aufgebaut aus 504 Aminosäuren. Bislang ist die Rolle von Myocilin bei der Pathogenese des POWG noch unbekannt (Challa, 2008; Resch and Fautsch, 2009), es gibt allerdings Anzeichen, dass Mutationen in *MYOC* zu einer Veränderung in der Sekretion dieses Proteins führen können (Jacobson et al., 2001; Liu and Vollrath, 2004). Im Tiermodell konnte weder nach Deletion von *MYOC* noch bei Überexpression von Myocilin ein erhöhter Augeninnendruck oder die Ausbildung eines Glaukoms beobachtet werden (Kim et al., 2001; Zillig et al., 2005). Die Expression der Tyr437His Mutation ergab jedoch pathologische Veränderungen, wie sie von Glaukompatienten bekannt sind (Zode et al., 2011).

1.2.2 Optineurin (*OPTN*)

Als weiteres Glaukom-assoziiertes Gen wurde Optineurin (*OPTN*) identifiziert. *OPTN* ist auf Chromosom 10p15-p14 lokalisiert (GLC1E) und wurde bei Untersuchungen in Familien gefunden, in denen das POWG in autosomal-dominant vererbter Form vorliegt. Die meisten der Patienten zeigen einen normalen intraokulären Druck, sie leiden also an einem Normaldruckglaukom (NTG) (Rezaie et al., 2002; Sarfarazi et al., 1998).

OPTN wird in verschiedenen okulären und nicht-okulären Geweben exprimiert (Kroeber et al., 2006; Li et al., 1998). Im Auge konnte die Expression in Geweben wie Cornea, Trabekelwerk, Iris, Linse, dem retinalen Pigmentepithel, dem nicht pigmentierten Ziliarepithel, dem Sehnerv und den retinalen Ganglienzellen nachgewiesen werden (Kamphuis and Schneemann, 2003; Kroeber et al., 2006; Rezaie et al., 2002; Rezaie and Sarfarazi, 2005; Rezaie et al., 2005; Vittitow and Borras, 2002). Optineurin ist ein mit dem Golgi-Apparat assoziiertes Protein und gilt als Bindungspartner von MyosinVI (Sahlender et al., 2005), welches an endo- und exozytotischen Vorgängen beteiligt ist (Buss et al., 2001; Warner et al., 2003). Weiterhin wird berichtet, dass Optineurin auch mit Rab8 und Huntingtin interagiert, zwei weiteren am Vesikeltransport beteiligten Proteinen (Faber et al., 1998; Hattula and Peranen, 2000). Die Depletion von Optineurin ebenso wie dessen Überexpression führt in Zellkulturexperimenten zu einer Fragmentierung des Golgi-Apparates und einer Zunahme der Apoptoserate der Zellen (Park et al., 2006; Sippl et al., 2011). Im Tiermodell führt die Überexpression der Glaukom-assoziierten Optineurin-Variante E50K zu einem Verlust von retinalen Ganglienzellen und der Zerstörung von Synapsen in der peripheren Retina, wodurch es zum Ausdünnen der retinalen Nervenfaserschicht im Sehnerv kommt. Auch konnte bei diesen Mäusen eine erhöhte Apoptoserate in der Retina sowie eine verstärkte Degeneration der gesamten Retina nachgewiesen werden. Zugleich zeigten die Tiere keine Veränderung bezüglich des Augeninnendrucks (Chi et al., 2010a).

1.2.3 Neurotrophin 4 (*NTF-4*)

Auch Neurotrophin-4 wird als Glaukom-assoziiertes Gen diskutiert. Das Gen *NTF-4* befindet sich auf Chromosom 19q13.33, einem genomischen Locus, der anhand genomweiter Kopplungsstudien als Glaukom-relevant identifiziert wurde. Pasutto und Kollegen berichteten von sieben heterozygoten Mutationen in *NTF-4*, die bei 1,7% der untersuchten europäischen POWG-Patienten nachgewiesen wurden (Pasutto et al., 2009). Eine weitere Analyse von Liu und Kollegen zeigte hingegen das Auftreten mehrerer nicht-synonymer Mutationen im *NTF-4*-Gen der Kontrollgruppe, weshalb sie einen kausalen Zusammenhang zwischen Mutationen in *NTF-4* und dem POWG ausschließen (Liu et al., 2010). *NTF-4* ist ein Mitglied der Neurotrophin Genfamilie

(Skaper, 2008) und es besteht die Hypothese, dass die Glaukom-assoziierten Sequenzvarianten in einer verringerten Affinität des Proteins für den NTF-4 spezifischen Tyrosin Kinase Rezeptor B (TrkB) resultieren können, wodurch es zu einer verringerten Aktivierung von TrkB kommt (Pasutto et al., 2009).

1.2.4 WD-repeat Protein 36 (*WDR36*)

Im Jahr 2005 wurde auf Chromosom 5 im Bereich 5q22.1 ein weiterer Glaukom-relevanter chromosomal Locus identifiziert. Dieser GLC1G benannte Locus wurde bei Untersuchungen an einer am POWG leidenden Familie identifiziert und umfasst einen ca. 2Mb großen Bereich. Für die kritische Region dieses Locus sind sieben Gene (*MAN2A1*, *AK125070*, *BC017169*, *TSLP*, *WDR36*, *CAMK4* und *STARD4*) nachgewiesen, zudem sind für diesen Bereich zumindest drei weitere Gene (*LOC153778*, *LOC441101* and *LOC441102*) vorhergesagt. Anhand von DNA-Sequenzanalysen wurde schließlich *WDR36* als Glaukom-assoziiertes Gen identifiziert (Monemi et al., 2005). Nachfolgende Studien bestätigten das Auftreten verschiedener nicht-synonymer *WDR36* Mutationen bei Patienten mit POWG, jedoch wurden diverse Sequenzvarianten auch in den Kontrollgruppen gefunden (Fan et al., 2009; Fingert et al., 2007; Frezzotti et al., 2010; Hauser et al., 2006; Hewitt et al., 2006; Miyazawa et al., 2007; Pasutto et al., 2008; Weisschuh et al., 2007). Allerdings besteht offenbar ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von *WDR36* Sequenzvarianten und einem ausgeprägteren Krankheitsbild (Hauser et al., 2006). Im Allgemeinen deuten die Ergebnisse der klinischen Studien vermehrt darauf hin, dass *WDR36* ein sog. „genetic modifier“ ist und Mutationen in diesem Gen eher an der Anfälligkeit an einem Glaukom zu erkranken beitragen, als die Erkrankung direkt zu verursachen (Allingham et al., 2009; Hauser et al., 2006).

Expressionsanalysen an humanem Gewebe ergaben eine starke Expression von *WDR36* in Herz, Gehirn, Placenta, Lunge, Leber, Niere Skelettmuskel und Pankreas. Im Auge konnte eine *WDR36* Expression in Linse, Iris, Sklera, Ziliarmuskeln, Ziliarkörper, Trabekelwerk, Retina und Sehnerv nachgewiesen werden. Untersuchungen an Mausgewebe ergaben eine ubiquitäre Expression und zeigten zudem, dass *Wdr36* bereits in 7 Tage alten Embryonen exprimiert wird (Monemi et al.,

2005). Bei Zebrafischen konnte ebenfalls eine ubiquitäre Expression in embryonalen und adulten Geweben ermittelt werden (Skarie and Link, 2008).

WDR36 ist ein 23 Exone umfassendes Gen, das für ein 951 Aminosäuren langes Protein codiert. Bei bioinformatischen Analysen wurden vier bekannte Proteinmotive nachgewiesen: das G-β WD40 repeat, eine AMP-abhängige Synthetase- und Ligase-Domäne, eine Cytochrom cd1-Nitrit-Reduktase ähnliche Domäne sowie eine Utp21 spezifische WD40 assozierte Domäne (Monemi et al., 2005).

Wie der Name *WDR36* bereits angibt, handelt es sich bei diesem Protein um ein Mitglied der WD-repeat Protein-Familie. Diese Proteinfamilie ist in allen eukaryotischen Organismen zu finden und in unterschiedliche zelluläre Funktionen involviert. So sind WD-repeat Proteine unter anderem an der Zellteilung, der Transkription von Genen, der Zelldifferenzierung, der Signaltransduktion, der mRNA Modifizierung, der rRNA Prozessierung oder dem Vesikel-Transport beteiligt. Als charakteristisches Motiv dieser Proteinfamilie zählt das WD40-repeat. Dieses Motiv ist ein hoch konservierter 44 - 60 Aminosäuren langer Bereich, der üblicherweise mit einem Glycin-Histidin (GH) Dipeptid beginnt und einem Tryptophan-Aspartat (WD) Dipeptid endet. In der Regel besitzen WD-repeat Proteine 4 - 16 dieser WD-repeats, die sich meist in sogenannte β-Propeller falten. WD-repeat Proteine sind im Allgemeinen nicht enzymatisch aktiv, vielmehr geht man davon aus, dass sie Multiprotein-Komplexe koordinieren, wobei die WD-repeats als Ansatzpunkte für Proteine und Protein-Interaktionen dienen (Li and Roberts, 2001; Smith et al., 1999; Valeyev et al., 2008). Strukturberechnungen ergaben, dass *WDR36* 14 WD-repeats besitzt, die sich in zwei miteinander verbundene β-Propellerstrukturen falten, wobei jeder β-Propeller aus sieben WD-repeats aufgebaut ist (Abb. 2) (Footz et al., 2009).



Abb. 2: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von WDR36.

Die Darstellung zeigt die von Footz und Kollegen vorgeschlagene Faltung von WDR36 in zwei miteinander verbundene β -Propellerstrukturen mit jeweils sieben WD-repeats (Footz et al., 2009). Abbildung von <http://www.scienzeniche.com/?s=wdr36&submit=>.

BLASTp Analysen zeigten zudem eine Sequenzhomologie von WDR36 zu dem Hefeprotein Utp21 (U Three Protein 21) (Skarie and Link, 2008). Auf Grund der Sequenzhomologie sowie der strukturellen Ähnlichkeit wird mittlerweile auch von einer funktionellen Homologie von WDR36 zu Utp21 ausgegangen (Footz et al., 2009; Skarie and Link, 2008). Utp21 ist ein in *Saccharomyces cerevisiae* essentielles Protein (Footz et al., 2009) und Bestandteil des Small Subunit Prozessoms (SSU-Prozessom) (Bernstein et al., 2004). Das SSU-Prozessom ist ein Multiproteinkomplex aus ca. 72 Proteinen und damit assoziierten RNAs. Dieser Multiproteinkomplex ist aus mehreren Sub-Komplexen aufgebaut, Utp21 ist Bestandteil des Utp- β Sub-Komplexes und an der Reifung der 18S rRNA beteiligt (Bernstein et al., 2004; Champion et al., 2008; Lim et al., 2011). Eine Depletion von Utp21 verhindert bei *S. cerevisiae* die erfolgreiche Prozessierung der rRNA (Bernstein et al., 2004). Vergleichbar damit konnte am Zebrafisch eine Verzögerung der 18S rRNA Reifung nach Knock-down von Wdr36 festgestellt werden (Skarie and Link, 2008). Die Expression von Utp21 mit Glaukom-assoziierten Mutationen hat jedoch keinen offensichtlichen Einfluss auf die Prozessierung der 18S rRNA (Footz et al., 2009). Bei gleichzeitiger Mutation des Gens Sti1 kann allerdings ein Einfluss mancher Utp21 Mutationen auf die Zellproliferation von *S. cerevisiae* beobachtet werden (Footz et al., 2011; Footz et al., 2009).

Im Tiermodell zeigte einzig die Überexpression einer an die D658G Mutation im Menschen adaptierte Modifizierung des murinen Wdr36 (Wdr36 Del605-607) einen okulären Phänotyp. Trotz normaler Augeninnendruckwerte konnte in diesen transgenen Tieren eine progressive Degeneration der peripheren Retina beobachtet werden. Eine genauere Betrachtung zeigte überdies, dass das Auswachsen der Axone der retinalen Ganglienzellen bei transgenen Tieren reduziert ist (Chi et al., 2010b).

1.3 Prozessierung der ribosomalen RNA (rRNA)

Ribosomen sind für die Proteinbiosynthese in der Zelle essentiell. Die aus zwei Untereinheiten aufgebauten Ribosomen sind Multiprotein-Komplexe, die zudem vier Formen ribosomaler RNAs enthalten. Während in der großen Untereinheit (60S) eukaryotischer Zellen die 28S (25S bei *S. cerevisiae*), die 5,8S und die 5,0S rRNA zu finden sind, ist die 18S rRNA Bestandteil der kleinen Untereinheit (40S). Während die 5,0S rRNA von der RNA-Polymerase III transkribiert wird, werden die übrigen rRNAs als ein langes polycistronisches Primärtranskript (47S rRNA) von der RNA-Polymerase I synthetisiert. Die Transkription der 47S rRNA findet im fibrillären Zentrum bzw. an dessen Grenze zur dichten fibrillären Komponente des Nukleolus statt. Das Primärtranskript wird in mehreren Schritten gespalten und durch Interaktionen mit nukleolären Ribonukleoproteinen (small nucleolar ribonucleoproteins, snoRNPs) sowie weiteren prozessierenden Proteinen posttranskriptionell modifiziert. Schließlich lagern sich die ribosomalen Proteine an die reifen rRNAs, wodurch die beiden Ribosomenuntereinheiten gebildet werden, die dann aus dem Nukleus ins Zytoplasma der Zelle transportiert werden (Boisvert et al., 2007; Abb. 3).

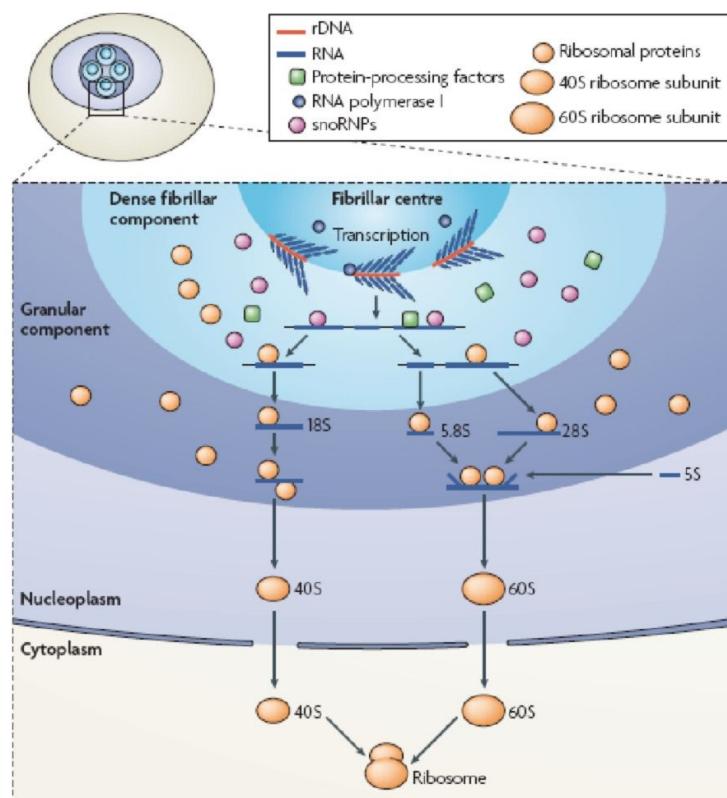


Abb. 3: Modell der Ribosomenbiogenese.

Die Transkription des rRNA Primärtranskripts findet im fibrillären Zentrum bzw. an dessen Grenze zur dichten fibrillären Komponente des Nukleolus statt. Die pre-rRNA Transkripte werden daraufhin in der dichten fibrillären Komponente prozessiert und posttranskriptionell modifiziert. Die abschließende Reifung des pre-ribosomalen Ribonukleoproteins und die Assemblierung mit den ribosomalen Proteinen finden schließlich in der granulären Komponente des Nukleolus statt. Durch Anlagerung der 5.8S, 28S und 5S rRNA an ribosomale Proteine entsteht die 60S Ribosomenuntereinheit. Die Assemblierung von ribosomalen Proteinen an die 18S rRNA führt zur Bildung der 40S Untereinheit. Die beiden Untereinheiten werden schließlich ins Zytoplasma der Zelle transportiert, wo sie sich an mRNA anlagern und ein funktionelles Ribosom bilden. Abbildung und Beschriftung nach Boisvert et al., 2007.

Die Prozessierung des primären rRNA Transkripts ist ein komplexer Vorgang. In humanen Zellen wird dabei die 47S rRNA zuerst an beiden Enden des Primärtranskripts an den Restriktionsschnittstellen 01 und 02 zur 45S pre-rRNA verkürzt. Von dieser ausgehend erfolgt die Reifung der pre-rRNA über zwei unterschiedliche Prozessierungswägen. In Prozessierungsweg 1 wird die Reifung durch Abspaltung der 5`ETS an den Schnittstellen A0 und 1 fortgesetzt. Die daraus entstehende 41S rRNA wird dann an der Schnittstelle 2 in die 21S und 32S Vorläufer gespalten. Die 21S rRNA wird schließlich durch weitere Restriktionsschnitte zur reifen 18S rRNA prozessiert, der 32S Vorläufer wird durch weitere Spaltungen in ITS2 zu den reifen 5.8S und 28S rRNAs. Im alternativen Prozessierungsweg beginnt die Prozessierung durch Spaltung im ITS1 Bereich der 45S pre-rRNA. Durch Spaltung an Schnittstelle 2 entstehen die Vorläufer 30S und 32S rRNA, welche durch weitere

Restriktionsschnitte schließlich zur 18S, der 5.8S und der 28S rRNA reifen (Abb. 4). Die Prozessierung in murinen Zellen ist der in humanen Zellen sehr ähnlich (Mullineux and Lafontaine, 2012; vergleiche hierzu auch Abb. 22).

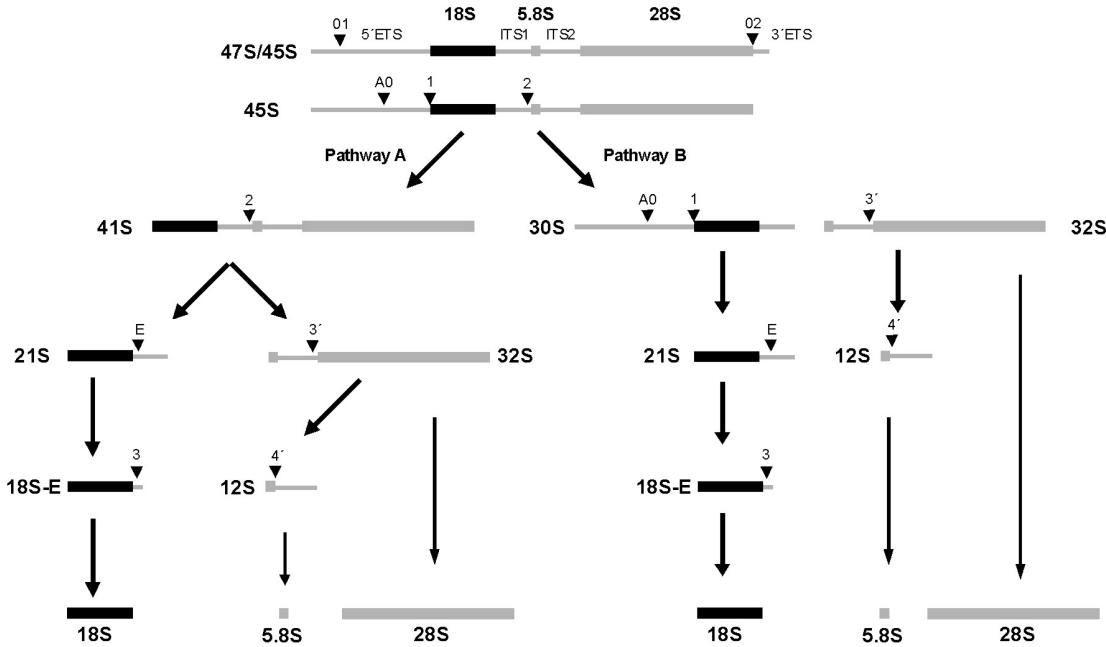


Abb. 4: Vereinfachte schematische Darstellung der pre-rRNA Prozessierung in humanen Zellen.
Gezeigt sind die einzelnen Prozessierungsschritte und die zugehörigen Restriktionsschnittstellen.
Vereinfacht nach Hadjilová et al., 1993; Rouquette et al., 2005 und Mullineux and Lafontaine, 2012.

2 Zielsetzung

Mutationen in *WDR36* gelten als mögliche Ursache für die Ausbildung eines Glaukoms beim Menschen. Tatsächlich ist aber wenig über die Funktion des Proteins *WDR36* in humanen bzw. in Säugerzellen bekannt.

Daher sollte in dieser Arbeit die biochemische Funktion von *WDR36* in humanen Zellen untersucht werden. Dabei sollte der Hypothese nachgegangen werden, dass *WDR36* ein funktionell zu *Utp21* homologes Protein und folglich an der Ribosomenbiogenese beteiligt ist. Anhand von gentechnisch veränderten Mauslinien sollte die Rolle von *Wdr36* bei der Pathogenese eines Glaukoms bestimmt werden. Dazu sollte einerseits der Phänotyp der homozygoten *Wdr36*-defizienten Mäuse ermittelt werden. Ferner sollte unter Verwendung verschiedener Schadensmodelle der Einfluss einer verringerten *Wdr36* mRNA Expression auf die Viabilität der retinalen Ganglienzellen heterozygoter *Wdr36*-defizienter Mäuse untersucht werden. Schließlich sollten auch Analysen einer *Wdr36*-Überexpressions-Mauslinie zur Aufklärung von *Wdr36* als möglichem Glaukomgen beitragen. Zudem sollte die Generierung einer konditionellen *Wdr36* Knock-out Mauslinie vorgenommen werden, die eine gewebsspezifische Deletion von *Wdr36* erlaubt.

Im Einzelnen wurden folgende Ziele verfolgt:

1. Das Aufklären des Phänotyps der offensichtlich embryonal letalen homozygoten *Wdr36*-defizienten Mäuse.
2. Die subzelluläre Lokalisierung von *WDR36* in humanen Zellen.
3. Die Untersuchung der biochemischen Funktion von *WDR36* in humanen Zellen und seine mögliche Beteiligung an der Ribosomenbiogenese.
4. Die Analyse der Auswirkung einer verringerten *Wdr36* Expression in den Augen heterozygoter *Wdr36*-defizienter Mäuse hinsichtlich der Ribosomenbiogenese.
5. Die Untersuchung einer möglichen veränderten Viabilität der retinalen Ganglienzellen bei heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen anhand verschiedener Schadensmodelle.
6. Die Analyse der Effekte einer Überexpression von mutiertem *Wdr36* in Mäusen im Hinblick auf die Ribosomenbiogenese und die Viabilität der retinalen Ganglienzellen.
7. Die Generierung einer konditionellen *Wdr36*-defizienten Mauslinie.

3 Material und Methoden

3.1 Materiallisten

3.1.1 Reagenzienliste

Tab. 1: Reagenzienliste.

BEZEICHNUNG	BEZUGSQUELLE
1,4-p-Phenyldiamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
10x PCR-Puffer	Qiagen, Hilden
Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Biozym Scientific, Oldendorf
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidisulfat (APS) 10% w/v	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Merck, Darmstadt
Casyton	Roche/Innovatis, Bielefeld
CDP-Star	Roche, Mannheim
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie®BrillantBlueR-250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Diethylenpyrocarbamat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DL-Dithiothreitol (DTT), min. 99%Titration	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Bioline, Luckenwalde
Dodecylsulfat "SDS"	Serva, Heidelberg
Dulbecco's Modified Eagle Medium	PAA, Pasching, AUS
Epon	Serva, Heidelberg
Essigsäure, glazial	Merck, Darmstadt

Material und Methoden

Ethanol, absolut	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
Fluorescein	Qiagen, Hilden
Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation, Hamburg
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
G418	Roth, Karlsruhe
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Immobilon™ Western HRP-Substrat	Millipore Corporation, Billerica, USA
IPTG	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhexacyanidoferat(III)	Merck, Darmstadt
Kaliumhexacyanidoferat(II)-Trihydrat	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Ketamin	Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte (WDT), Garbsen
LB Broth	Usb Corporation, Cleveland, USA
Lipofectamin™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (25mM)	Qiagen, Hilden
Maleinsäure	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Methylenblau	Roth, Karlsruhe
N,N,N`N`,-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

PBS 1x	PAA, Pasching, AUS
PeqgoldTriFast®-Reagenz	PeqLab, Erlangen
Penicillin-Streptomycin	PAA, Pasching, AUS
Protease-Inhibitor-Mix M	Serva, Heidelberg
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamid-stammlösung mit 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37% (HCl)	Merck, Darmstadt
scrambled siRNA human/mouse	Dharmacon, Bonn
SYBR-Green I	Qiagen, Hilden
Tergitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris Ultrapure, MB Grade	UsbCorporation,Cleveland,USA
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA, 0,05%	Invitrogen, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasser Rotisolv (RNase-frei)	Roth, Karlsruhe
Xylazin	Serumwerk Bernburg, Bernburg

3.1.2 Enzyme

Tab. 2: Verwendete Enzyme.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon Rot
Taq DNA Polymerase	Bioline, Luckenwalde
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland

3.1.3 Reaktions-Kits

Tab. 3: Verwendete Reaktions-Kits.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Cell Death Detection ELISA	Roche, Mannheim
DIG Northern Starter Kit	Roche, Mannheim
DNA Isolation Kit for genomic DNA	AppliChem, Darmstadt
NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey Nagel, Düren
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad, München
QIAGEN Plasmid Maxi Kit, Endotoxin free	Qiagen, Hilden
Silencer® siRNA Starter Kit	Ambion, Darmstadt

3.1.4 Oligonukleotidprimer

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Invitrogen, Karlsruhe synthetisiert.

Tab. 4: Auflistung der verwendeten Nukleotidprimer.

Genotypisierungsprimer		
Primer	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
M50 (Wdr36 5'-flank)	fwd	GACCTCCCTGAAAATGAGTCAC
M51 (Wdr36-lacZ)	rev	AATGGGATAGGTTACGTTGGTG
M52 (Wdr36-Intron)	rev	GGATAGCGAGCAAATATGAAGG
iNested	fwd	CAACCAAGAGGAAACCAACC
iNested lacZ	rev	CAACCAAGAGGAAACCAACC
iNested Intron	rev	CTAAGTGCAAGGGCACAAGG
Myc geno fwd	fwd	CAGAAACTCATCTGAAGAGGATCTGTAG
CAG rev No2	rev	TTGTTCATGGCAGCCAGCATATGGCATATG
Japan Nested 1	fwd	GTGAGCAGGGAAGCCTACAG
Japan Nested 1	rev	AGGTGGGAGCCTACTGACA

Material und Methoden

Japan Nested 2	fwd	TGTTGCCATTGGTCTTGTGT
Japan Nested 2	rev	AAGCACTATGCCCCATTCTG
SV 40	fwd	GTGAAGGAACCTTACTTCTGTGGTG
SV 40	rev	GTCCTTGGGTCTTCTACCTTCTC
5'flank Long-Range	fwd	AATTACGTTCGTGCCAAGG
5'flank Long-Range	rev	TTCCCATGAATTCCAAGCTC
3'flank Long-Range	fwd	TGAATGAACTGCAGGACGAG
3'flank Long-Range	rev	CTCACCAAGCAGCAAAGTGTG

Quantitative real-time RT-Primer			
Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
BAX	Homo sapiens	fwd	ATGTTTCTGACGGCAACTTC
BAX	Homo sapiens	rev	ATCAGTTCCGGCACCTTG
GNB2L	Homo sapiens	fwd	GCTACTACCCCGCAGTTCC
GNB2L	Homo sapiens	rev	CAGTTCCACATGATGATGGTC
CDKN1A	Homo sapiens	fwd	TCACTGTCTTGTACCCTTGTGC
CDKN1A	Homo sapiens	rev	GGCGTTGGAGTGGTAGAAA
TP53	Homo sapiens	fwd	AGGCCTTGGAACTCAAGGAT
TP53	Homo sapiens	rev	CCCTTTGGACTTCAGGTG
WDR36	Homo sapiens	fwd	AGTTTGCGCAAGGATCAAGC
WDR36	Homo sapiens	rev	TCCAGAATTGAGTAATCCTTCACT
Wdr36	Mus musculus	fwd	TGTCAGTAAGGCTCCACCT
Wdr36	Mus musculus	rev	CATCCCAGTCACTTGACGA
LaminA	Mus musculus	fwd	AGCAAAGTGCCTGAGGAGTT
LaminA	Mus musculus	rev	ACAAGTCCCCCTCCTTCTTG

siRNA-Primer			
Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
siWDR36 1	Homo sapiens	fwd	AAGCGCCGGTTCTATGTAACACCT GTCTC
siWDR36 1	Homo sapiens	rev	AATGTTACATAGAACCGGGGCCCT GTCTC

siWDR36 2	Homo sapiens	fwd	AATTGCCGGACTGACATTTCTCCT GTCTC
siWDR36 2	Homo sapiens	rev	AAAGAAATGTCAGTCCGGAACCT GTCTC
siWdr36	Mus musculus	fwd	AAGCGCCGCTTCTACGTGACGCC TGTCTC
siWdr36	Mus musculus	rev	AACGTCACGTAGAAGCGGCCGCC TGTCTC

Sonden-Primer			
Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
ITS-1	Homo sapiens	fwd	GAGAACTCGGGAGGGAGAC
ITS-1-T7	Homo sapiens	rev	TAATACGACTCACTATAAGGGAGAC GCCCTAGCGGGAAG
mmlTS-1	Mus musculus	fwd	CGAGGTGTCTGGAGTGAGGT
mmlTS-1-T7	Mus musculus	rev	TAATACGACTCACTATAAGGCATG GAGTCTGAGGGAGAGC

Recombineering		
Rekombination	Oligoaufbau	Sequenz 5' nach 3'
Step 1 Template: p15A-amp-pHSVtk- DTA-rpsL-BSD	5'-homologiearm- p15A-amp-pHSVtk- DTA-rpsL-BSD_fwd	acatctctcaggagatgaagtgaagtggagaggg gtttcttcacagctcTTAATAAGATGATCTTCT TGAGATCG
	5'-homologiearm- p15A-amp-pHSVtk- DTA-rpsL-BSD_rev	aatttcaataactttaactgagaaaaagaagtacac ttcagctagaaaTTACCAATGCTTAATCAGT GAGG
Step 2 Template: pR6K-PGK-EM7- loxP-1_fwd	5'-homologiearm- <u>Smal-restriction site</u> - pR6K-PGK-EM7-neo- loxP-1_fwd	gcatttgctgccagaccagggtttgcattagtcctg catggtggttacccggGGCGAGCTCAGAC CATAACT

neo-loxP-1		
	5'-homologiearm-pR6K-PGK-EM7-neo-loxP-1_rev	cacagtgtcatgtggaaagtcagaagacagccac aggaattgattctctGCGCAACGCAATTAAATG ATA
Step 4A	<u>5'-homologiearm1-homologiearm2-</u> pR6K-cm_fwd	ggttcccagaaccacatcaggtggctcacaactg cctggcggtttcgagcatgttctgcgttagtgtcagctcat <u>ccGGTGCGAATAAGGGACAGTGA</u>
Template: pR6K-cm	<u>5'-homologiearm1-homologiearm2-</u> pR6K-cm_rev	cctgagaagagggagacacattccctggaactgta <u>gttagtgtccatcatcctgttaggttagacgcacqaa</u> <u>cagaGAAGTCCAGCTGCAGCCTTTG</u>

3.1.5 Plasmide

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Plasmide.

Plasmidbezeichnung	Bezugsquelle
pcDNA™3.1/myc-His A	Invitrogen, Karlsruhe
pGEX4-T3	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
pSC101-BAD-gbaA-tet	GeneBridges, Dresden
p15A-amp-pHSVtk-DTA-rpsL-BSD	GeneBridges, Dresden
pR6K-PGK-EM7-neo-loxP-1	GeneBridges, Dresden
pSC101-BAD-Cre-tet	GeneBridges, Dresden
pR6K-cm	GeneBridges, Dresden
pR6K-cm-sA-IRES-lacZneo-loxP-FRT	GeneBridges, Dresden
Bac Klon RPCIB731L23256Q	Imagenes, Berlin

3.1.6 Bakterien

Tab. 6: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme.

Bezeichnung	Bezugsquelle
DH5-α	New England Biolabs, Frankfurt
GB05	GeneBridges, Dresden
GB05-red	GeneBridges, Dresden
GB05-pir	GeneBridges, Dresden
XL1-Blue	Stratagene, Cedar Creek, USA

3.1.7 Größenstandards

Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Größenstandards.

Bezeichnung	Bezugsquelle
GeneRuler 100 bp ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
1 kb Ladder	New England Biolabs, Frankfurt
PageRuler™PrestainedProteinLadder	Fermentas, St. Leon-Rot
ssRNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt

3.1.8 Geräte

Tab. 8: Liste der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen
C1-1	Herolab, Wiesloch
Casy Zellzähler	Roche/Innovatis, Bielefeld
Durchflusszytometer CA-III	Partec, Münster
Easy-Cast-B	Owl Scientific inc., VWR, Darmstadt
Einbettautomat EM TP	Leica, Wetzlar
FLA-5000	Fujifilm,Düsseldorf
Gene Pulser X Cell	BioRad, München

Material und Methoden

Hera Cell 150 Brutschrank	Heraeus, Hanau
Hera Safe Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
Hybridizer HB-1000	UVP Laboratory Products, Upland, USA
Inolab pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
IQ5 Multicolor Real-time PCR Detection	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
Mettler AE163 Feinwaage	Mettler Toledo, Giessen
Mikroskop Axiolmager.Z1	Zeiss, Göttingen
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA
Model 45-101-I ClassII Electrophoresis System	Peqlab Biotechnologie GmbH,Erlangen
NanoDROP 2000c	Peqlab, Erlangen
OPTIMAX 2010	Protec, Oberstenfeld
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Kelheim
PowerShot G5 Digitalkamera	Canon, Krefeld
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Peqlab Biotechnologie GmbH,Erlangen
Sunrise-Basic ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH, Grodig, AUS
Systec V75 Autoklav	Systec GmbH, Wettenburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultracut E-Ultramikrotom	Reichert-Jung, Kirchseeon
UV-Durchlichtschirm	Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc.,NewYork,USA
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf, Hamburg

3.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tab. 9: Auflistung der Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Bezugsquelle
3MM Blotting ("Whatman")-Papiere	Neolab, Heidelberg
BD Falcon Cultureslides, 4-Chambers	BD Bioscience, Heidelberg
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nürnbrecht
Cell Scraper (Zellschaber)	Sarstedt, Nürnbrecht
Deckgläser, 24 x 60mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
EasyFlasks Nunclon™ Δ T25, T75	Nunc, Roskilde, DEN
„Falcon“ Reaktionsgefäße 15ml, 50ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Glaswaren	Schott, Roth, VWR
Handschuhe Latex	Roth, Karlsruhe
Handschuhe Nitril	VWR, Darmstadt
Kodak BioMax MS Film	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Microseal® „B“ Film	Biorad, München
Multidishes Nunclon™ Δ 6-well	Nunc, Roskilde, DEN
Multi-Reaktionsgefäße 0,5ml; 1,5ml; 2,0ml	Roth, Karlsruhe
Nylon-Membran	Roche, Mannheim
Omnifix sterile Einmalspritzen	B. Braun, Wertheim
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
PCR Cups	Biozym, Oldendorf
PCR Plates, 96-well iCycler IQ	Biorad, München
Personna Rasierklingen	American Safety Razor Company, Verona, USA
Petrischalen	Sarstedt, Nürnbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnbrecht
Powderfree Sempercare Handschuhe	Sempermed, Wien, AUS
PVDF-Western Blot Membran	Roche, Mannheim
Rotilabo 0,22µm Spritzenfilter	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nürnbrecht

Sterican Einmal-Injektions-Kanüle	B. Braun, Wertheim
SuperFrost®Plus Objekträger	Menzel-Gläser, Braunschweig

3.1.10 Antikörper

Tab. 10: Liste der verwendeten Antikörper.

primäre Antikörper	Bezugsquelle
rabbit anti-WDR36, polyklonal	Abcam, Cambridge
mouse anti-c-Myc, monoklonal	Biomol, Hamburg
mouse anti-B23, polyklonal	Abcam, Cambridge
mouse anti-PWP2H, polyklonal	Abcam, Cambridge

sekundäre Antikörper	Bezugsquelle
goat anti-rabbit-IG, Alexa 488 konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe
donkey anti-mouse-IG, Cy3 konjugiert	Jackson Immuno Research
chicken anti-mouse, HRP konjugiert	Santa Cruz, California, USA

3.1.11 Rezepte für Puffer und Gele

Tab. 11: Auflistung von Puffern und Lösungen.

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
0,1 M Phosphatpuffer	P1: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$: 35,6g auf 2l P2: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$: 13,8g auf 1l P1:P2 = 5:1 pH 7,4
4% PFA (Paraformaldehyd)	4g PFA 100ml PhP unter Rühren und Erwärmen lösen pH 7,4
5x Glycerolpuffer (PCR)	1mM Cresolrot 60% Glycerol (autoklaviert) mit Reinstwasser auffüllen

Material und Methoden

10x Elektrodenpuffer	250mM Tris/HCl 400mM Glycin 1% (w/v) SDS in H ₂ O dest. lösen
20x SSC	175.3g NaCl 88.2g Natriumcitrat pH mit HCl auf 7,5 (20°C) einstellen; ad 1l
Bakterien-Lysepuffer	2ml 10xPBS 200µl Triton-X-100 200µl PMSF 20µl Leupeptin 5mM DTT ad 20ml mit H ₂ O dest.
Coomassie-Entfärbelösung	500ml Methanol 10ml Essigsäure mit H ₂ O dest. auffüllen; ad 1l
Cacodylatpuffer	10,7 g Cacodylsäure in 0,5l H ₂ O pH 7,2
Coomassie-Färbelösung	40ml Methanol 2ml Essigsäure 0,2g Coomassie-Brilliant Blue R250 mit H ₂ O dest. auffüllen; ad 100ml
Embryo-Lysepuffer	50mM Tris/HCl, pH 8,0 0.5% Triton X-100 Proteinase K (500 µg/ml)
EM-Fixans	2,5 % Paraformaldehyd 2,5 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer
DIG Block, 10x	50g DIG Blocking Reagent 500ml Maleinsäurepuffer unter Erhitzen lösen

Material und Methoden

HBS,1x	14mM Hepes 0,9% NaCl pH 7,4; autoklaviert
lacZ Färbelösung	72ml lacZ Waschpuffer 3ml X-Gal (25mg/ml in DMSO) 0,159g K ₄ Fe(CN) ₆ x 3H ₂ O 0,123g K ₃ Fe(CN) ₆
lacZ Waschpuffer	1ml 1M MgCl ₂ 5ml 1% NaDC 5ml 2% Tergitol 489ml 0,1M Phosphatpuffer pH 7,3
Maleinsäurepuffer	0,1M Maleinsäure 0,15M NaCl mit NaOH auf pH7,5 (20°C) einstellen
Maleinsäurewaschpuffer	1l Maleinsäurepuffer 3ml Tween20
Mausschwanz-Lysepuffer	50mM KCl 10mM Tris-HCl, pH 8,3 2mM MgCl ₂ 0,1mg/ml Gelatine 0,45% Nonidet P-40 0,45% Tween 20 Proteinase K (500 µg/ml)
Methylenblau-Lösung	0,03% (w/v) Methylenblau 0,3M Natriumacetat pH 5,2
MOPS, 10x	200mM MOPS 80mM Natriumacetat 10mM EDTA pH 7,0; sterilfiltriert

Material und Methoden

Northern-Proben-Puffer	110µl H ₂ O (DEPC) 50µl 10x MOPS 90µl Formaldehyd 250µl Formamid
PBS, 10x	80g Natriumchlorid 2g Kaliumchlorid 14,4g Na ₂ HPO ₄ 2,4g KH ₂ PO ₄ mit H ₂ O dest. ad 1l, pH 7,4; autoklavieren
SDS-Lösung, 10% (w/v)	10g SDS in H ₂ O dest. lösen; ad 100ml
SDS-PAGE-Laupuffer, 10x	250mM Tris/HCl 400mM Glycin 1% (w/v) SDS in H ₂ O dest. lösen; ad 1l
SDS-Probenpuffer, 4x	0,25M Tris/HCl, pH 6,8 30% Glycerin 8% (w/v) SDS 0,02% (w/v) Bromphenolblau 0,3M DTT bzw. 10% β-Mercaptoethanol
TBE, 10x	108g Tris 55g Borat 40ml 0,5M EDTA mit H ₂ O dest. ad 1l, pH 8
TBS, 10x	30g Tris 80g Natriumchlorid 2g Kaliumchlorid pH mit HCl auf 7,4 (20°C) einstellen mit H ₂ O dest. ad 1l, autoklavieren
TBST, 1x	100ml 10x TBS 0,05% (v/v) Tween 20 mit H ₂ O dest. ad 1l

Transferpuffer, 10x	5,8g Tris 2,9g Glycin 200ml Methanol 3,7ml 10% (w/v) SDS in H ₂ O dest. lösen, ad 1l
---------------------	---

Tab. 12: Gelrezepte für Acrylamid-Gele.

Gele für SDS-PAGE	Sammelgel	Trenngel 8% (80-130kDa)
	(1ml Ansatz)	(5 ml Ansatz)
H ₂ O dest.	0,68 ml	2,3 ml
Rotiphorese® Gel 30	0,17 ml	1,3 ml
Tris/HCl, 1 M, pH 6,8	0,13 ml	-
Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8	-	1,3 ml
10% SDS	0,01 ml	0,05 ml
10% APS	0,01 ml	0,05 ml
TEMED	0,001 ml	0,003 ml

3.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

3.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* Bakterien wurde der NucleoSpin® Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel entsprechend den Angaben des Herstellers benutzt.

Die Isolierung großer Plasmidmengen wurde mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi Kits bewerkstelligt. Die Aufreinigung erfolgte dabei stets nach der Anleitung „Plasmid or Cosmid DNA Purification Using the EndoFree Plasmid Maxi Kit“ (QIAGEN® Plasmid Purification Handbook, 2003).

3.2.2 Isolierung von DNA aus Agarosegelen und PCR clean-up

Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen und die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kits der Firma Macherey-Nagel entsprechend der Anleitung des Herstellers.

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung linearer DNA-Fragmente. Dazu wurde 1g Agarose in 100ml 1x TBE durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und daraufhin auf 55°C abgekühlt. Anschließend wurden 5µl einer 0,01%-igen Ethidiumbromid-Lösung zugesetzt und das Gel gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde dieses in der Elektrophoresekammer mit 1x TBE überschichtet und die Proben geladen. Die Auftrennung der DNA erfolgte je nach Fragmentgröße für 30-120min bei einer konstanten Spannung von 120V. Da das im Gel enthaltene Ethidiumbromid mit der DNA interkaliert, konnten die DNA-Fragmente unter UV-Bestrahlung in einem Transilluminator mit Kamera detektiert und dokumentiert werden.

3.2.4 Chemische Transformation von *E. coli*

Bei der chemischen Transformation wurden 100µl chemisch kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut, 10µl Ligationsansatz zugegeben und dieser Ansatz für 20min auf Eis gestellt. Dann wurde der Ansatz für 45s bei 42°C inkubiert und schließlich für 2min auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden anschließend in 1ml SOC-Medium überführt und unter Schütteln (350 Upm) für 1h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit geeignetem Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.5 Enzymatischer Verdau von Plasmid-DNA

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt am Main) bezogen und gemäß den Herstellerangaben verwendet. Bei einem Doppelverdau wurde die beim Online-Tool „Double Digest Finder“ (<http://www.neb.com/nebcomm/DoubleDigestCalculator.asp>) effizienteste Variante gewählt. Der Verdau erfolgte bei analytischen Restriktionen meist für 1-2h. Anschließend wurde der Verdau durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

3.2.6 Ligation

Bei der Ligation eines linearisierten Vektors mit einem weiteren linearen DNA-Fragment wurde das Insert im 6-fachen molaren Überschuss eingesetzt und mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 17,5µl aufgefüllt. Schließlich wurden noch 2µl 10x T4-DNA-Ligase Puffer und 0,5µl T4-DNA Ligase zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 16°C inkubiert. Nach der Ligation wurden 10µl des Ansatzes zu chemisch kompetenten Bakterien gegeben, eine Transformation durchgeführt und die Bakterien auf Platten mit Selektionsmedium ausplattiert. Von diesen wurden Einzelkolonien gepickt, deren Plasmid-DNA gewonnen und über Restriktionsverdau und DNA-Sequenzanalyse die Richtigkeit des insertierten DNA-Fragments überprüft.

3.2.7 Klonierung von Überexpressionsplasmiden

3.2.7.1 Klonierung des pcDNA3.1-myc-his-Wdr36-Vektors

Die Klonierungsstrategie wurde mit dem Programm ‘Vector NTI’ der Firma Invitrogen (Karlsruhe) entwickelt. Die cDNA von Wdr36 wurde aus dem Plasmid pcDNAT3.1V5-His-A-mmWDR36, das von Dr. Markus Kröber kloniert wurde, gewonnen. Sowohl dieses als auch der Zielvektor pcDNA3.1-myc-his wurden mit den Restriktionsenzymen BamHI und Xhol verdaut, die linearisierten Fragmente über ein Agarose-Gel gereinigt und schließlich aus diesem isoliert. Nach Ligation der beiden Fragmente wurde der Ansatz in DH5α-Bakterien transformiert, diese auf LB_{Amp}-Agarplatten (Ampicillin 100µg/ml) ausplattiert und schließlich Klone gepickt. Aus

diesen wurde Plasmid-DNA isoliert und die Insertion der Wdr36 cDNA mittels Restriktionsverdau und DNA-Sequenzanalyse verifiziert.

3.2.7.2 Klonierung des Vektors pGEX-4T-3-Wdr36

Die Klonierungsstrategie wurde ebenfalls mit dem Programm 'Vector NTI' der Firma Invitrogen (Karlsruhe) entwickelt. Bei der Klonierung des pGEX-4T-3-Wdr36-Vektors wurde die cDNA von Wdr36 erneut aus dem Vektor pcDNAT3.1V5-His-A-mmWDR36 durch Verdau mit BamHI und Xhol gewonnen. Ebenso wurde der Vektor pGEX-4T-3 mit diesen Enzymen verdaut und die linearen Fragmente über ein Agarose-Gel aufgereinigt. Nach der Gel-Isolierung und Ligation der Fragmente wurde das Plasmid in chemisch kompetente XL1-Blue Bakterien transformiert. Nach Selektion mit Ampicillin wurden Einzelklone gepickt, daraus Plasmid-DNA gewonnen und die Insertion der Wdr36 cDNA mittels Restriktionsverdau und DNA-Sequenzanalyse verifiziert.

3.2.8 DNA-Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzanalyse aller Plasmide und PCR-Produkte erfolgte durch die Firma GeneArt (Regensburg, Deutschland).

3.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde mit Hilfe des NanoDrop-1000 Spectrophotometers durchgeführt.

Zur Qualitätskontrolle von RNA-Isolaten wurde das Verhältnis E_{260}/E_{280} verwendet. E_{260} gibt hierbei das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, E_{280} das Absorptionsmaximum von Proteinen an. Für alle Experimente wurde nur RNA mit einem E_{260}/E_{280} -Quotienten von 1,6 - 2,0 verwendet.

3.2.10 RNA-Isolierung

Zur Isolierung von RNA aus Geweben und Zellen wurde die Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987) angewendet. Der Aufschluss der Zellen und das Lösen der Zellkomponenten erfolgte mit Hilfe des peqGold-TriFastTM-Reagenz. Es handelt sich hierbei um eine einphasige Lösung aus Phenol mit Guanidinithiocyanat, die durch Zugabe von Chloroform in eine organische und eine wässrige Phase getrennt werden kann, wodurch die RNA von Proteinen isoliert wird.

Zellen wurden mit je 500µl peqGold-TriFastTM-Reagenz pro Well aus 6-Well-Platten geerntet. Zur Isolierung von RNA aus Mausaugen wurden diese zu 500µl peqGold-TriFastTM-Reagenz in ein 2,0ml Reaktionsgefäß gegeben und mittels eines Mikrohomogenisators zerkleinert. Die Ansätze wurden kurz gevortext und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 100µl Chloroform pro 500µl peqGold-TriFastTM-Reagenz zugesetzt, die Ansätze erneut kurz gevortext und für weitere 2min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde die Suspension für 15min bei 4°C und 12000 x g zentrifugiert, die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß mit 250µl Isopropanol überführt. Um die RNA auszufällen, wurden die Ansätze über Nacht bei -20°C gelagert. Schließlich wurden die Ansätze für 15min bei 4°C und 13000 x g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 500µl 70% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5min, 7500 x g, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet für 5min bei Raumtemperatur getrocknet. Je nach Größe des Pellets wurde es in 10 - 20µl RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

3.2.11 Herstellung von cDNA (complementäre DNA)

Durch das Enzym Reverse Transkriptase kann RNA in die stabilere cDNA umgewandelt werden. Auf diese Weise bleiben die Informationen, die in der mRNA gespeichert waren, konserviert und lassen sich über PCR-Techniken analysieren. Zur cDNA-Synthese wurde das 'iScript cDNA Synthesis Kit' verwendet. Es kam eine reverse Transkriptase ohne RNase-Aktivität zum Einsatz.

Um Verunreinigungen der RNA abschätzen zu können, wurden je RNA-Probe zwei Ansätze, einmal mit reverser Transkriptase (+RT) und einmal ohne reverse Transkriptase (-RT), entsprechend nachfolgendem Protokoll angesetzt.

Tab. 13: Reaktionsansatz zur Herstellung von cDNA aus RNA.

Reaktionsansatz	+RT	-RT
iScript™ Reverse Transkriptase	0,5µl	-
5x iScript™ Reaction Mix	2,0µl	2,0µl
RNA	0,5µg	0,5µg
Nuklease-freies Wasser	ad 10µl	ad 10µl

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

Tab. 14: Thermocycler-Programm zur Herstellung von cDNA aus RNA.

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

Die cDNA-Synthese erfolgt im zweiten Schritt bei 42°C. Im dritten Schritt wurde die Reverse Transkriptase bei 85°C inaktiviert. Die für quantitative RT-PCR-Analysen verwendete cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.2.12 Durchführung der quantitativen Real-Time Reverse Transkription-PCR

Mit der quantitativen Real-Time RT-PCR (qPCR) wurden die Expressionslevel von Genen untersucht. Dabei wird die exponentielle Vermehrung eines PCR-Produkts kontinuierlich und fluoreszenzbasiert gemessen. Hierzu wurde SYBR-Green I verwendet, ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die entstehenden PCR-Produkte eingelagert wird. Durch einen Laser angeregt, kann die Intensität der emittierten Fluoreszenz über einen Detektor ermittelt werden. Da sich SYBR-Green ausschließlich in doppelsträngige DNA einlagert und ungebunden nur schwach fluoresziert, kann die emittierte Fluoreszenz als proportional zur vorhandenen DNA-Menge betrachtet werden. Der „cycle-threshold“ (C_T)-Wert zeigt den Zyklus an, bei dem die emittierte Fluoreszenz den Hintergrundwert überschreitet. Ab diesem Zyklus kann eine exponentielle Zunahme des PCR-Produkts beobachtet werden. Da der C_T -Wert von der eingesetzten cDNA-Konzentration des zu untersuchenden Gens abhängig ist, kann über ihn eine quantitative Aussage über die ursprünglich eingesetzte mRNA-Menge des jeweiligen Gens gemacht werden. Um eventuelle Fehler durch entstandene Primerdimere ausschließen zu können, wird nach der Amplifikation eine Schmelzkurve der Produkte erstellt.

Zur relativen Quantifizierung wurde das jeweilige untersuchte Gen zu einem Referenzgen ins Verhältnis gesetzt. In den vorgenommenen Untersuchungen wurde die Expression von GNB2L (HTM-N Zellen) bzw. LaminA (Mausgewebe) als jeweilige Referenzen herangezogen. Die qPCR Analysen erfolgten in einem ‘iQ5 Multicolor Real-Time-PCR Detection System’ in Kombination mit dem iCycler von Biorad. Für jedes Gen wurden pro Lauf und zu untersuchender cDNA-Probe (+RT) zwei Reaktionsansätze durchgeführt. Zudem wurde je cDNA-Probe ein –RT Ansatz pipettiert, um mögliche DNA-Kontaminationen der cDNA ausschließen zu können. Des Weiteren wurde je Primerpaar eine Wasser/Negativkontrolle durchgeführt. Jede Probe (+RT, -RT und die Wasser/Negativkontrolle) wurde entsprechend nachfolgendem Reaktionsschema angesetzt und in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert.

Tab. 15: Reaktionsansatz für einen qPCR-Ansatz mit dem HotStarTaq-Kit.

qPCR-Reaktionsansatz (1x)	
Probe (+RT, -RT, H ₂ O-Kontrolle)	0,15µl
10x PCR-Puffer	1,5µl
MgCl ₂ (25mM)	0,6µl
dNTP (25mM)	0,12µl
SYBR-Green I (7,4% (v/v) in DMSO)	0,19µl
Fluorescein	0,015µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,06µl
RNAse-freies Wasser	ad 15µl

Anschließend wurde zu jedem Ansatz 5µl Primer-Mix (0,17µl fwd + 0,17µl rev Primer [1 µM] und 4,66 µl RNAse-freies Wasser) mit spezifischen Primern für das zu untersuchende Gen gegeben, die Mikrotiterplatte mit einer Klebefolie (Microseal® „B“Film, BioRad, München) abgedichtet und die Proben kurz zentrifugiert. Dann wurde die Platte in das Gerät eingesetzt und die Probenanordnung auf der Platte eingegeben. Die qPCR wurde mit nachfolgendem PCR-Programm durchgeführt.

Tab. 16: PCR-Programm zur Durchführung der qPCR.

qPCR-Cyclerprogramm		
Schritt	Temperatur	Dauer
Aktivierung der Taq-Pol	95°C	15min
40x		
Denaturierung	95°C	10s
Annealing und Elongation	60°C	40s
	95°C	1min
	55°C	1min
81x		
Erstellen einer Schmelzkurve	55°C + 0,5°C je Zyklus	6s

Die Daten wurden mit Hilfe der 'iQ Optical System Software Version 3.0a' (Biorad, München) erhoben und mit dem Tabellenkalkulationsprogramm 'Exel' ausgewertet. Die relative Expression wurde nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet (Livak and Schmittgen, 2001).

3.2.13 Northern-Blot

Bei der Northern-Blot Analyse wird RNA auf einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt. Daraufhin wird die RNA auf eine Nylonmembran übertragen, auf der die zu untersuchenden RNAs mittels spezifischer Sonden markiert wird und somit die relative RNA-Menge quantifiziert werden kann.

3.2.13.1 Generierung der Sonden

Zur Generierung der Northern-Sonden wurde genomische DNA (gDNA) verwendet, da die zu amplifizierende ITS-1 Region in reifer rRNA nicht mehr enthalten ist, in gDNA jedoch in der gewünschten Sequenz und ohne Intronbereiche vorliegt. Als Template der hsITS-1 Sonde diente gDNA aus HTM-N Zellen, für die mmITS-1 Sonde wurde gDNA aus einem CD1-Mausschwanzlysat verwendet. Im ersten Schritt wurden mittels PCR die Matrizen für die Sonde amplifiziert.

Tab. 17: Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm für die ITS1-Sonden-PCR.

ITS1-Sonden-PCR		PCR-Cyclerprogramm		
		Schritt	Temperatur	Dauer
10x PCR Puffer	50µl	Initiation	94°C	1 min
MgCl ₂ (25mM)	30µl	35x		
dNTP (10mM)	10µl	Denaturierung	94°C	30s
ITS1 fwd (10µM)	10µl	Annealing	55°C	30s
T7-ITS1 rev (10µM)	10µl	Elongation	72°C	60s
Taq-Polymerase	10µl			
gDNA (1:25)	20µl	End-Elongation	72°C	10min
H ₂ O	ad 500µl		10°C	∞

Die Ansätze wurden dann über ein 1%-iges Agarosegel aufgetrennt, das Amplikon ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert. Die Markierung der Sonden erfolgte mit Hilfe des 'DIG RNA Labeling Kit' entsprechend der Angaben im „DIG Application Manual for Filter Hybridization“ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim). Dabei wird das PCR-Amplikon durch die T7-RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert und die im Reaktionsansatz vorhandenen DIG-markierten UTP-Moleküle in die entstehende RNA eingebaut (Feinberg and Vogelstein, 1983).

Tab. 18: Reaktionsansatz zur Herstellung von RNA-Sonden für Northern-Blot.

Transkription und Markierung der Sonden	
10x Transcription Puffer	2µl
10x Labeling Mix (mit DIG-UTP)	2µl
DNA-Matrize	1µg
RNAse-Inhibitormix	1µl
T7-RNA-Polymerase	2µl
RNAse-freies Wasser	ad 20µl

Der Ansatz wurde 2h bei 37°C inkubiert, danach mit 180µl RNAse-freiem Wasser versetzt und als 10µl Aliquots bei -20°C gelagert.

3.2.13.2 Durchführung der Northern-Blot Analysen

Zum Zerstören der Sekundärstrukturen der RNA wurden die Proben (0,75µg bei RNA gewonnen aus HTM-N Zellen und 8µg bei RNA gewonnen aus Mausauge) mit Nuklease-freiem Wasser auf 7µl aufgefüllt, mit 8µl Northern-Proben-Puffer versetzt, für 10min bei 65°C inkubiert und schließlich auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Proben auf ein Formaldehyd/Agarose-Gel (1,1g Agarose in 11ml 10x MOPS pH 7,0 und 90ml H₂O aufkochen und vor Zugabe von 9ml 37% Formaldehyd auf 55°C abkühlen, dann in Gelapparatur gießen) geladen. Als Elektrodenpuffer diente 1x MOPS pH 7,0. Nach 3-minütigem Einlaufen der Proben in das Gel bei 80V erfolgte das Auftrennen der RNA bei 110V für 150 Minuten. Das Gel wurde daraufhin zweimal für 15min in 20x SSC geschwenkt, um das Formaldehyd aus dem Gel zu entfernen.

Zum Transfer der RNA auf eine Nylonmembran wurde ein sogenannter Kapillarblot durchgeführt, bei dem die RNA aus dem Gel durch 20x SSC herausgelöst wird und beim Passieren der positiv geladenen Nylonmembran an dieser hängen bleibt (Schema Abb. 5).

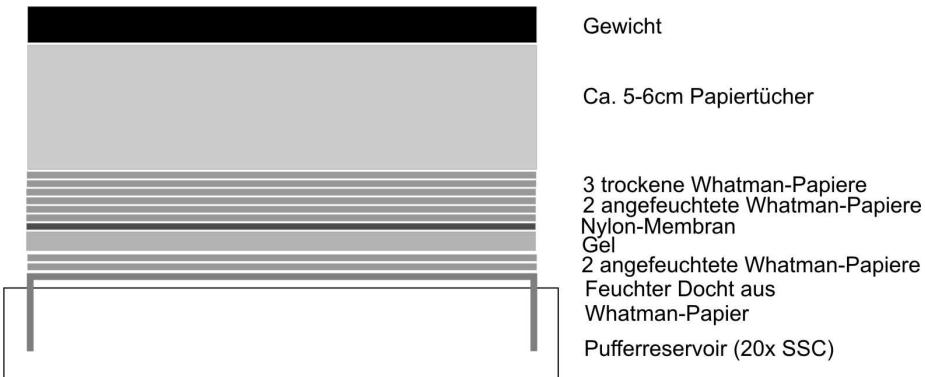


Abb. 5: Schematische Darstellung des Aufbaus für einen Kapillarblot.

Nach dem Blotten wurde die Membran kurz in destilliertem Wasser geschwenkt, getrocknet und die RNA in einem Stratagene Crosslinker C1-1 mittels UV-Bestrahlung (28s, 0,150 Joule) auf der Membran fixiert (Crosslinking). Um die Beladung des Gels bzw. des Blots zu überprüfen, wurde die Membran für 10min in einer Methylenblau-Lösung geschwenkt und daraufhin mit destilliertem Wasser solange gewaschen, bis man die 28S und 18S Bande deutlich erkennen konnte. Die Methylenblaufärbung wurde mit der LAS 3000 Intelligent Dark Box dokumentiert und diente als Ladungskontrolle. Die Membran wurde schließlich mit 10ml Dig Easy Hyb (Roche, Mannheim) für 45min bei 68°C im Hybridisierungsofen HB-1000 Hybridizer prähybridisiert. Danach wurde der Hybridisierungspuffer durch neues, vorgewärmtes DIG-Easy-Hyb ersetzt. Die Sonde wurde zunächst mit 50µl RNase-freiem Wasser verdünnt, für 10min auf 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und dann in die Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C für 16-18h. Anschließend wurde die Membran zweimal für 5min in 2x SSC + 0,1% (w/v) SDS bei Raumtemperatur, sowie zweimal für 15min in 0,2% SSC + 0,1% (w/v) SDS bei 70°C gewaschen. Nach einem weiteren Waschschritt in Maleinsäure-Washpuffer, wurde die Membran für 30min bei Raumtemperatur in 1x DIG-Blocking-Reagent (Roche, Mannheim) blockiert. Daraufhin wurden die DIG-gekoppelten Sonden mittels eines mit Alkalischer Phosphatase gekoppelten anti-Digoxygenin-Antikörpers (1:10.000 in 1x

DIG-Blocking-Reagent) für 30min bei Raumtemperatur markiert. Nach zwei weiteren Waschschritten (je 15min) mit Maleinsäurewaschpuffer wurde die Membran für 5min in Detektionspuffer äquilibriert und daraufhin 5min mit dem Chemilumineszenz-Substrat CDP-STAR (Roche, Mannheim; 5µl CDP-STAR in 500µl Detektionspuffer) inkubiert. Die entstandene Chemilumineszenz wurde an der LAS 3000 Intelligent Dark Box dokumentiert und mit Hilfe der Software ‘AIDA Image Analyzer’ densitometrisch ausgewertet.

3.2.14 Design und Synthese der verwendeten siRNAs

Die small interfering (si)RNA Technik wird zur Hemmung der Expression spezifischer Zielgene durch Abbau der entsprechenden mRNA benutzt. Dabei werden die transfizierten doppelsträngigen siRNAs durch die Zelle in Einzelstränge gespalten und in den sogenannten RNA Induced Silencing Komplex (RISC) aufgenommen, wo sie durch spezifische Basenpaarung mit einer mRNA deren Degradierung vermitteln.

Um einen effizienten Knock-down von WDR36 gewährleisten zu können, wurden geeignete Zielsequenzen entsprechend der Ambion siRNA Resource in der WDR36 mRNA gesucht. Voraussetzungen waren, dass der GC-Gehalt bei 30 - 50% liegt, die Sequenz 21 Nukleotide lang ist und für eine höhere Effizienz im 5'-Bereich auf AA enden sollte. Um die Transkription durch die T7-RNA-Polymerase *in vitro* zu ermöglichen, wurden die siRNA Primer am 5'-Ende mit einer im Kit enthaltenen Sequenz (5'-CCTGTCTC-3') verlängert.

Die Herstellung der siRNAs erfolgte mit Hilfe des Silencer® siRNA Construction Kit entsprechend der Angaben des Herstellers.

Zunächst erfolgte in zwei getrennten Reaktionen die Hybridisierung des T7 Promotor-Primers an die „sense“ wie auch an die „antisense“ Oligonukleotide. Dazu wurde der nachstehende Reaktionsansatz für 5min auf 70°C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt.

Tab. 19: Hybridisierungsansatz zur siRNA-Synthese.

Hybridisierung	
T7 Promotor Primer	2µl
DNA Hyb Buffer	6µl
Sense oder antisense Oligonukleotid (100 µM)	2µl

Im folgenden Schritt wurden die Primer mittels Klenow DNA-Polymerase zu doppelsträngiger DNA mit T7-Promotor aufgefüllt. Dazu wurden die Ansätze entsprechend nachfolgendem Protokoll für 30min bei 37°C inkubiert.

Tab. 20: Reaktionsansatz zur Doppelstrang-Synthese.

Doppelstrangsynthese	
Hybridisierungsansatz	10µl
10x Klenow Reaction Buffer	2µl
10x dNTP Mix	2µl
H ₂ O (Nukleasefrei)	4µl
Exo-Klenow	2µl

Im folgenden Schritt wurden die dsDNA-Fragmente durch die T7-RNA-Polymerase transkribiert.

Tab. 21: Reaktionsansatz zur siRNA-Synthese.

siRNA-Synthese	
doppelsträngige DNA	2µl
H ₂ O (Nukleasefrei)	4µl
2x dNTP Mix	10µl
10x T7 Buffer	2µl
T7-RNA-Polymerase	2µl

Die Reaktionen wurden für 2h bei 37°C inkubiert, vereinigt und für weitere 16h bei 37°C inkubiert, um die Bildung von RNA-Doppelsträngen zu ermöglichen. Um die DNA-Matrizen zu entfernen und zum Abbau der verbliebenen einzelsträngigen RNAs wurde anschließend noch ein Ribonukleaseverdau vorgenommen.

Tab. 22: Reaktionsansatz zum Verdau von ssRNA und dsDNA.

Verdau von ssRNA und dsDNA	
siRNA-Ansatz	40µl
H ₂ O (Nukleasefrei)	48,5µl
RNAse	3µl
DNAse	2,5µl

Der Verdau erfolgte für 2h bei 37°C. Nach dem Verdau wurde die siRNA mittels Siliciumoxid-Säule aufgereinigt. Dazu wurde der Ansatz mit 400µl siRNA Binding Buffer versetzt und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die Säule zweimal mit je 500µl siRNA Wash Buffer gewaschen und die siRNA mit 100µl Nukleasefreiem Wasser eluiert.

3.3 Generierung von gentechnisch modifizierten murinen embryonalen Stammzelllinien zu Etablierung einer konditionalen *Wdr36*-defizienten Maus

3.3.1 Recombineering

Zur Generierung eines Vektors für die gentechnische Modifizierung des *Wdr36* genetischen Locus in murinen embryonalen Stammzellen wurde das sogenannte Recombineering verwendet. Diese Methode erlaubt die Manipulation von DNA unabhängig von Restriktionsschnittstellen, wodurch Insertionen an allen beliebigen Stellen der DNA-Sequenz spezifisch vorgenommen werden können.

Im Einzelnen folgt die Insertion von DNA-Fragmenten folgendem Schema: Zuerst wird das gewünschte DNA-Insert mit verlängerten Primern (Primer + mind. 40bp lange Homologie-Arme) über PCR amplifiziert. Dann wird das Amplikon zusammen mit dem Zielvektor in Redα/β-exprimierende Bakterien elektroporiert. Auf Grund der Homologie-Arme wird das PCR-Produkt in den *E. coli* Zellen schließlich sequenzspezifisch in den Zielvektor integriert.

3.3.1.1 Verwendete PCR-Programme

Zur Amplifikation der verschiedenen Gen-Kassetten wurden nachfolgende PCR-Ansätze und Programme benutzt.

Tab. 23: Reaktionsansätze und Thermocycler-Programme zur Amplifikation verschiedener Genkassetten für das Recombineering.

Step1-PCR		PCR-Cyclerprogramm		
		Schritt	Temperatur	Dauer
5x HF Puffer	10µl	Initiation	98°C	30s
dNTP (10mM)	1µl	Denaturierung	98°C	10s
Step1 fwd (10µM)	2,5µl	Annealing	58°C	30s
Step1 rev (10µM)	2,5µl	Elongation	72°C	2min 30s
Phusion Taq	0,4µl	32x		
p15A-amp-pHSVtk-DTA-rpsL-BSD-Plasmid-DNA	2,0µl (~20ng)	Denaturierung	98°C	10s
H ₂ O	ad 50µl	Elongation	72°C	2min 30s
		End-Elongation	72°C	10min
			10°C	∞

Step2-PCR		PCR-Cyclerprogramm		
		Schritt	Temperatur	Dauer
5x HF Puffer	10µl	Initiation	98°C	30s
dNTP (10mM)	1µl	Denaturierung	98°C	10s
Step2 fwd (10µM)	2,5µl	Annealing	63°C	30s
Step2 rev (10µM)	2,5µl	Elongation	72°C	1min 30s
Phusion Taq	0,4µl	32x		
pR6K-PGK-EM7-neo-loxP-1-Plasmid-DNA	2,0µl (~20ng)	Denaturierung	98°C	10s
H ₂ O	ad 50µl	Elongation	72°C	1min 30s
		End-Elongation	72°C	10min
			10°C	∞

Step4A-PCR		PCR-Cyclerprogramm		
Schritt	Temperatur	Dauer		
Initiation	98°C	30s		
35x				
Denaturierung	98°C	15s		
Annealing	63°C	15s		
Elongation	72°C	2min 30s		
End-Elongation	72°C	5min		
	10°C	∞		

Nach der Amplifikation folgte ein Restriktionsverdau (37°C, üN) mit dem Enzym DpnI, welches nur methylierte und hemimethylierte DNA (Plasmid-DNA), jedoch keine unmethylierte DNA (wie die des PCR-Produkts) verdauen kann. Somit wurde verhindert, dass bei der Elektroporation das Template der PCR statt des Amplikons in die Zellen integriert wird. Nach dem Restriktionsverdau wurden die Ansätze mittels des NucleoSpin® Extract II Kits aufgereinigt.

3.3.1.2 Induktion der Expression

Entscheidend für die homologe Rekombination in Bakterien sind die aus dem Phagen λ isolierten Enzyme Redα und Redβ, welche homologe DNA-Sequenzen erkennen und rekombinieren können.

Im Plasmid pSC101-BAD-gbaA-tet sowie in den verwendeten GB05red-Bakterien steht die Transkription von Redα und Redβ unter der Kontrolle des L-Arabinose-induzierbaren Promoters BAD. Zur Expression der beiden Enzyme wurden zuerst 100µl einer sog. über-Nacht-Kultur in ein Reaktionsgefäß mit 1ml LB-Medium (bei Bakterien mit pSC101-BAD-gbaA-tet Vektor wurde zusätzlich Tetrazyklin zugesetzt) angeimpft und dieser Ansatz für 2 - 4h bei 30°C und 950 Upm in einem Thermomixer inkubiert. Dann wurden 20µl einer 10%-igen L-Arabinoselösung zugesetzt, die

Ansätze für 1h bei 37°C und 950 Upm im Thermomixer inkubiert und daraus elektrokompetente Bakterien hergestellt.

3.3.1.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien und Elektroporation

Bei der Herstellung elektrokompetenter Bakterien wurden die Ansätze möglichst auf Eis gehalten, das verwendete destillierte Wasser wurde vor Verwendung mindestens 2h auf Eis gekühlt. Die für 2 - 4h im Reaktionsgefäß kultivierten Bakterien wurden für 30s bei 9000Upm und 2°C zentrifugiert, das LB-Medium abgenommen und die Zellen in 1ml H₂O dest. resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 30s bei 10000Upm (2°C). Der Überstand wurde erneut abgenommen, die Zellen in H₂O dest. resuspendiert und für 30s bei 11000Upm (2°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde so abgenommen, dass neben den Bakterien noch ca. 30 - 50µl H₂O dest. im Reaktionsgefäß verblieben. Zu diesem Ansatz wurden 2µl des aufgereinigten PCR-Produkts gegeben, die Zellen resuspendiert und in eine auf Eis gekühlte 1mm Elektroporationsküvette (Biorad, München) überführt. Anschließend wurden die Bakterien elektroporiert (1350V, 10mF, 600Ohm), in ein Reaktionsgefäß mit 1ml LB₀-Medium pipettiert und für 1h in einem Thermomixer bei 30°C und 900Upm inkubiert.

3.3.1.4 Selektion und Verifizierung der Integration

Die Selektion erfolgte mit verschiedenen Antibiotika in unterschiedlichen Kombinationen. Um die LB₀-Agarplatten zu präparieren wurden die Antibiotika in der gewünschten Endkonzentration (Ampicillin 100µg/ml, Chloramphenicol 15µg/ml, Kanamycin 15µg/ml, Tetracyclin 5µg/ml) in einem Endvolumen von 100µl ausplattiert. Nachdem die Platte die Lösung aufgenommen hatte, wurden die Ansätze ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Von den angewachsenen Kolonien wurden Kulturen angeimpft, daraus die Plasmid-DNA gewonnen und die homologe Rekombination über Restriktionsverdau bzw. DNA-Sequenzanalyse überprüft.

3.3.2 Elektroporation des linearisierten Vektors in murine embryonale Stammzellen

Die Elektroporation des mit dem Restriktionsenzym AgeI linearisierten Vektors in murine embryonale Stammzellen, sowie die nachfolgende Selektion und Isolierung G418-resistenter Zellen wurde von Dr. Michael Bösl (Max Plank Institut für Neurobiologie, Martinsried) durchgeführt.

3.3.3 Nachweis genetisch modifizierter embryonaler Stammzellen

3.3.3.1 Long-Range-PCR

Zum Nachweis genetisch modifizierter embryonaler Stammzellen wurden Long-Range-PCR-Strategien entwickelt. Dabei bindet ein Primer außerhalb des Homologiebereichs des elektroporierten Vektors und ein Primer in einer integrierten Gen-Kassette. Die Ansätze wurden gemäß den nachstehenden Protokollen durchgeführt.

Tab. 24: Reaktionsansätze und Thermocycler-Programme für die verwendeten Long-Range-PCRs.

3'flank-Long-Range-PCR		PCR-Cyclerprogramm		
		Schritt	Temperatur	Dauer
5x HF Puffer	4,0µl	Initiation	98°C	30s
dNTP (10mM)	0,4µl	33x		
3'flank Long-Range fwd (10µM)	1,0µl	Denaturierung	98°C	15s
3'flank Long-Range rev (10µM)	1,0µl	Annealing	65,5°C	20s
Phusion Taq	0,2µl	Elongation	72°C	7min 30s
ES-DNA	2,0µl			
H ₂ O	ad 20µl	End-Elongation	72°C	10min
			10°C	∞

5'flank-Long-Range-PCR		PCR-Cyclerprogramm		
		Schritt	Temperatur	Dauer
5x GCPuffer	4,0µl	Initiation	92°C	2min
dNTP (10mM)	0,6µl	10x		
5'flank Long-Range fwd (10µM)	1,0µl	Denaturierung	92°C	20s
5'flank Long-Range rev (10µM)	1,0µl	Annealing	63,5°C	20s
Phusion Taq	0,2µl	Elongation	68°C	3min 30s
ES-DNA	2,0µl	21x		
H ₂ O	ad 20µl	Denaturierung	92°C	20s
		Annealing	63,5°C	20s
		Elongation	68°C	4min
		End-Elongation	72°C	10min
			10°C	∞

3.3.3.2 LacZ Färbung

Zum Nachweis der lacZ-Genexpression wurde eine lacZ-Färbung der murinen embryonalen Stammzellen vorgenommen. Hierzu wurden die ES-Zellen für 5min in 4% PFA fixiert und anschließend dreimal für je 10min mit lacZ Waschpuffer gewaschen. Daraufhin wurden sie für 24-48h in frisch angesetzter lacZ Färbelösung bei 37°C inkubiert, mit PBS gewaschen und am inversen Mikroskop fotografisch dokumentiert.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Die verwendeten HTM-N Zellen wurden bei 37°C und 7% CO₂ kultiviert. Als Nährmedium diente DMEM mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen zweimal mit PBS gespült und durch Behandlung mit 0,05%Trypsin-EDTA von der Plastikoberfläche der Kulturflaschen abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Kulturmedium abgestoppt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 300 x g wurde das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und im Verhältnis von 1:5 bis 1:20 in neue Zellkulturgefäße überführt.

3.4.2 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des CASY® Cell Counter and Analyser TT. Hierzu wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA von der Plastikoberfläche der Kulturflaschen abgelöst. Nach Abstoppen der Reaktion mit Kulturmedium wurden 50µl der Suspension in 10ml steriles CASY-Ton gegeben und daraus die Zellzahl bestimmt.

3.4.3 Transfektion von Zellen

Zur Transfektion von eukaryotischen Zellen wurde Lipofectamin™ 2000 verwendet. Bei der Lipofektion bilden sich Lipidvesikel aus kationischen Lipiden und Nukleinsäuren, die von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden können.

3.4.3.1 Transfektion von Vektoren

HTM-N Zellen wurden zunächst in 6-Well-Kulturplatten ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Vor der Transfektion wurde pro Well 1µg Plasmid-DNA zu 2µl

Lipofectamin™ 2000 und 500µl serumfreiem DMEM gegeben und der Ansatz für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Ansatz wurde schließlich auf HTM-N Zellen gegeben, die zuvor zweimal mit PBS gewaschen wurden. Nach 4h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium durch Kulturmedium ersetzt. 24h nach Transfektion wurde das Kulturmedium durch Selektionsmedium (Kulturmedium + 500µl G418/50ml Medium) ersetzt.

3.4.3.2 Transfektion von siRNA

24h vor der ersten Transfektion wurden 1x10⁵ HTM-N Zellen pro Well in einer 6-Well-Kulturplatte ausgesät.

Vor der Transfektion wurden 2µl Lipofectamin2000™ in 250µl DMEM gegeben und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die gewünschte siRNA in 250µl DMEM zum Lipofectaminansatz gegeben und für 20min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Lipofektionsansatz (siRNA in einer Endkonzentration von 50nM) wurde dann auf zuvor mit PBS gewaschene HTM-N Zellen gegeben. Nach 4h bei 37°C und 7% CO₂ wurde das Medium durch 2ml Kulturmedium ersetzt.

24h und 48h nach der ersten Transfektion wurde die Transfektion unter den selben Bedingungen erneut durchgeführt. Die Zellen wurden schließlich 48h nach der dritten Transfektion für weitere Experimente verwendet.

3.4.4 Zellkulturbasierende Versuche

3.4.4.1 Pulse-Chase Experiment

Pulse-Chase Experimente erlauben die Untersuchung zellulärer Prozessierungsvorgänge. Bei dieser Methode wird den Zellen eines Versuchsorganismus kurzzeitig eine radioaktiv markierte Substanz verabreicht, welche als Substrat für den betrachteten Biosyntheseweg dient („Pulse“). Während der Zeit, in der das radioaktive Substrat vorhanden ist, wird es in die Zellen inkorporiert und über den jeweiligen Biosyntheseweg in alle synthetisierten Zwischenstufen eingebaut. Nach definierter Zeit wird das radioaktive Substrat

schließlich durch nicht radioaktives Substrat ersetzt („Chase“). Indem man die Zellen anschließend zu verschiedenen Zeiten erntet, kann man die Reifung der markierten Zwischenprodukte zeitlich aufgelöst verfolgen.

In den durchgeführten Experimenten wurden die Zellen mit L-[Methyl-³H]-Methionin markiert. Wegen des hohen Methioninumsatzes in den Zellen wird die mit Tritium markierte Methylgruppe durch den S-Adenosyl-Methionin (SAM)-Zyklus auf die bereits kotranskriptionell methylierte pre-ribosomale RNA (47/45S pre-rRNA) übertragen (Tiollais et al., 1975). Der Vorteil von L-[Methyl-³H]-Methionin ist, dass bei der anschließenden RNA-Aufreinigung vornehmlich die pre-ribosomale RNA und deren Folgeprodukte markiert sind, wohingegen mRNA und tRNA nur eine geringe Aktivität aufweisen.

Für die Pulse-Chase Experimente wurde nach Knock-down von WDR36 zunächst das Kulturmedium abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 37°C und 7% CO₂ in 500µl methioninfreiem DMEM-Medium inkubiert. Dann wurden pro Well 25µCi L-[Methyl-³H]-Methionin zugesetzt und die Zellen für weitere 30min bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert („Pulse“). Schließlich wurde das Medium mit dem radioaktiven Substrat durch normales Kulturmedium ersetzt („Chase“). Anschließend wurden die Zellen für 15, 30 bzw. 60min bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit 500µl peqGold- TriFast™-Reagenz pro Well geerntet, die RNA isoliert und in 15µl H₂O dest. gelöst.

Für den Northern-Blot wurden jeweils 5µl der aufgereinigten RNA mit je 5µl Northern-Proben-Puffer versetzt und für 10min bei 65°C inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurden die Proben auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Proben auf ein Formaldehyd/Agarose-Gel geladen und entsprechend 3.2.13.2 ein Northern-Blot durchgeführt. Nach der Methylenblaufärbung wurde der Blot vollständig getrocknet, mit EN³HANCE Szintillationspray bis zur Sättigung besprüht, anschließend erneut getrocknet und auf einen BioMax MS Röntgenfilm (Fuji-Film) aufgelegt. In einer Röntgenkassette wurde der Blot anschließend für 7-28 Tage exponiert und der Film schließlich entwickelt.

3.4.4.2 Bestimmung apoptotischer Zellen mit dem 'Cell Death Detection ELISA'

Zur Bestimmung der Menge apoptotischer Zellen nach Transfektion von siRNAs wurde der 'Cell Death Detection ELISA' entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet. Während der Apoptose von Zellen kommt es zur Aktivität von Endonukleasen, die die DNA in den Regionen zwischen den Nukleosomen schneiden. Die so entstehenden Mono- und Oligonukleosomen gelangen ins Cytoplasma und können mit Hilfe des 'Cell Death Detection ELISA' detektiert werden.

48h nach der letzten Behandlung der Zellen wurden diese abtrypsiniert, für 5min bei 200 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 1ml Kulturmedium aufgenommen. Mit dem CASY® Cell Counter and Analyser TT wurde die Zellzahl bestimmt, jeweils 50.000 Zellen abgenommen und für 5min bei 200 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 500µl Inkubationspuffer aufgenommen und für 30min darin inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (10min, 20000 x g), um die unlöslichen Bestandteile der Zellen zu sedimentieren. 400µl des Überstandes bzw. der zytoplasmatischen Fraktion wurden abgenommen, 1:10 mit Inkubationspuffer verdünnt und im ELISA eingesetzt. Zur Vorbereitung der im ELISA enthaltenen Mikrotiterplatten wurden jeweils 100µl des anti-Histon Antikörpers (1:10 in Beschichtungslösung verdünnt) in die einzelnen Wells pipettiert und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurden die Wells anschließend für 30min mit 200µl Inkubationspuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit je 300µl Waschpuffer. Nun wurden in die präparierten Wells 100µl Probe pipettiert und für 90min inkubiert. Während dieser Zeit binden in der Probe enthaltene freie Nukleosomen an die immobilisierten anti-Histon Antikörper im Well. Nach drei Waschschritten wurden je Well 100µl anti-DNA Peroxidase (1:10 in Inkubationspuffer verdünnt) zugesetzt und die Ansätze für 90min inkubiert. In dieser Zeit bindet die Peroxidase die an die fixierten Nukleosomen gebundene freie DNA. Schließlich wurden die Ansätze erneut dreimal gewaschen und 100µl des Substrats ABTS (2,2'-Azino-di-[3-Ethylbenzthiazolin Sulfonat (6)]) zugegeben. 10-20min nach Zugabe von ABTS erfolgte die Extinktionsmessung bei 405nm gegen eine Referenzwellenlänge von 495nm. Zum Abgleich wurden 2 Wells ohne zytoplasmatische Fraktion entsprechend der anderen behandelt. Jeder Ansatz wurde als Duplikat analysiert.

3.4.4.3 Statistische Analyse des DNA Gehalts mittels Propidiumiodid-Färbung

Um die prozentuale Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zellzyklusphasen zu untersuchen, wurde eine Propidiumiodid-Färbung vorgenommen. Propidiumiodid interkaliert stöchiometrisch mit der DNA, so dass die Fluoreszenzintensität des Propidumiodids eine direkte Aussage über den DNA-Gehalt der Zelle zulässt. Über den DNA-Gehalt der Zellen kann schließlich eine Einteilung in die G1-Phase, die S-Phase und die G2/M Phase vorgenommen werden (Crissman and Steinkamp, 1973).

Vor der Färbung wurden die Zellen aus der 6-Well-Kulturplatte abtrypsinert und für 5min bei 4°C und 350 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 150µl HBS resuspendiert und mit 10ml 70% Ethanol (-20°C, üN) fixiert. Die Zellen wurden daraufhin für 10min bei 4°C und 350 x g zentrifugiert, in 500µl HBS mit 1mg RNaseA/ml aufgenommen und für 1h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation der Zellsuspension mit 50µg/ml Propidiumiodid für 30min bei 37°C. Danach wurden die Proben auf Eis abgekühlt und im Durchflusszytometer vermessen. Als Einstellung wurde dabei für den Fluoreszenz-Kanal 2 (FL-2) eine Detektion bei 605nm (PMT4) gewählt, sowie eine Verstärkung (GAIN) von 370 nm. Zur Auswertung wurde für die G1-Phase im Fluoreszenz-Kanal das Intervall 500-850, für die S-Phase 850-1300 und für die G2/M-Phase das Intervall 1300-1600 in den Primärdaten gewählt. Die Auswertung der Daten wurde mit der Software 'WinMDI 2.8' (J.Trotter, The Scripps Institute, Flow Cytometry Core Facility) vorgenommen. Zur Quantifizierung wurden die Daten in das Tabellenkalkulationsprogramm 'Excel' übertragen. Die Zellen im Bereich von 500-1600 wurden als 100% der Zellen angenommen. Signale im niedrigeren Bereich wurden als Zellfragmente, Zellen im höheren Bereich als Zellklumpen betrachtet.

3.4.4.4 Immunzytochemische Färbungen

Anhand von immunzytochemischen Färbungen ist es möglich, die subzelluläre Lokalisierung von Proteinen zu detektieren. Das zu untersuchende Protein wird dabei mit einem spezifischen primären Antikörper markiert, welcher wiederum von einem speziesspezifischen sekundären Antikörper erkannt wird. Dieser ist mit einem Fluorophor markiert, das am Fluoreszenzmikroskop angeregt werden kann.

Die Zellen (ca. 50% konfluent) wurden zunächst für 15min in 4% PFA fixiert, zweimal mit 0,1M Phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen und dann für 5min mit 0,5% Triton X-100 in 0,1M Phosphatpuffer permeabilisiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen für 45min mit 3% BSA und 0,1% Triton X-100 in 0,1M Phosphatpuffer blockiert. Dann wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen und für 2h mit dem ersten Primärantikörper (verdünnt in 0,3% BSA in 0,1M Phosphatpuffer) bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschritte und gegebenenfalls die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper (2h, Raumtemperatur). Die Zellen wurden gewaschen und die sekundären Antikörper für jeweils 1h zu den Zellen gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1M Phosphatpuffer (je 5min) wurden die Objekträger schließlich mit DAPI-haltigem Mounting-Medium (10% (v/v) Vectashield DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, USA) in Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation, Hamburg) beschichtet und mit einem Deckgläschen versehen.

Tab. 25 Liste der verwendeten Antikörper für immunzytochemische Färbungen mit den jeweiligen Verdünnungen und den zugehörigen Sekundärantikörpern.

Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
mouse anti-B23, polyklonal 1:500	donkey anti-mouse-IG, Cy3 konjugiert 1:1000
mouse anti-PWP2H, polyklonal 1:75	
rabbit anti-WDR36, polyklonal 1:50	goat anti-rabbit-IG, Alexa 488 konjugiert 1:1000
mouse anti-c-Myc, monoklonal 1:100	

3.5 Tiere und tierexperimentelles Arbeiten

3.5.1 Allgemeine Tierhaltungsbedingungen

Alle verwendeten Tiere wurden gemäß dem 'ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research' gehalten. Die Zucht und Haltung erfolgte im Tierlabor der Universität Regensburg unter standardisierten Bedingungen bei einer Temperatur von 23 ± 2 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5 % und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Tiere hatten Wasser und Futter *ad libitum* zur Verfügung. Die Tiere wurden durch atlantookzipitale Dislokation getötet und die Augen samt Sehnerv anschließend mit einer stumpfen Pinzette schonend enukleiert.

3.5.2 DNA Isolierung aus Mausschwänzen

Zur Isolierung von genomicscher DNA aus Mausschwänzen wurde ca. 0,5cm Mausschwanz in 250µl Mausschwanz-Lysepuffer gegeben und für mindestens 4h bei 1200Upm in einem Thermomixer bei 55°C inkubiert. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte durch 15-minütiges Erhitzen des Ansatzes auf 95°C. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min bei 13200 Upm zentrifugiert, der Überstand abgenommen, 1:25 verdünnt und in die PCR eingesetzt.

3.5.3 Verwendete Versuchstierlinien und deren Genotypisierung

Zur Untersuchung der funktionellen Rolle von *Wdr36* *in vivo* waren drei unterschiedliche Mauslinien in Gebrauch.

Zum einen wurde die von Dr. Markus Kröber generierte konventionelle *Wdr36* Knock-out Mauslinie, bei der die ersten 16 Exone des *Wdr36*-Gens durch ein *lacZ*-Gen ersetzt sind, verwendet. Die Genotypisierung dieser Mauslinie erfolgte gemäß dem nachstehenden Protokoll.

Material und Methoden

Tab. 26: Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm zur Genotypisierung von konventionellen *Wdr36* Knock-out Mäusen.

Wdr36-PCR		PCR-Cyclerprogramm		
		Schritt	Temperatur	Dauer
10x PCR Puffer	2,5µl	Initiation	96°C	2 min
5x PCR Puffer	5,0µl	35x		
MgCl ₂ (25mM)	1,5µl	Denaturierung	94°C	20s
dNTP (10mM)	0,5µl	Annealing	58°C	20s
M50 (10µM)	0,5µl	Elongation	72°C	45s
M51 (10µM)	0,5µl			
M52 (10µM)	0,5µl			
Taq-Polymerase	0,3µl	End-Elongation	72°C	2min
gDNA (1:25)	2,0µl		10°C	∞
H ₂ O	ad 25µl			

Im Verlauf der Experimente wurde die konventionelle *Wdr36* Knock-out Mauslinie mit einer in der Arbeitsgruppe von Takeshi Iwata generierten Überexpressionsmauslinie verpaart. Diese Mauslinie exprimiert unter der Aktivität des chicken- β -actin-Promoters eine mutierte Variante von *Wdr36*, der die Aminosäuren 605-607 fehlen (pCAGGS-*Wdr36* Del605-607). Die aus dieser Verpaarung stammenden Tiere wurden zusätzlich noch mit dem in Chi et al. (2010b) beschriebenen Protokoll genotypisiert.

Tab. 27 Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm für die Genotypisierung von pCAGGS-Wdr36 Del605-607 transgenen Mäusen.

pCAGGS-Del605-607-PCR		PCR-Cyclerprogramm		
Reagenz	Menge	Schritt	Temperatur	Dauer
10x PCR Puffer	2,0µl	Initiation	94°C	2 min
dNTP (10mM)	4,0µl	40x		
Myc geno fwd (10µM)	0,4µl	Denaturierung	94°C	30s
CAG rev No2 (10µM)	0,4µl	Annealing	63°C	30s
Taq-Polymerase	0,1µl	Elongation	72°C	25s
gDNA (1:25)	1,0µl			
H ₂ O	ad 20µl			
		End-Elongation	72°C	5min
			4°C	∞

Die konventionelle *Wdr36* Knock-out Mauslinie wurde zudem mit den in Junglas et al. (2012) beschriebenen β B1-CTGF-Mäusen verpaart. Bei diesen Mäusen kommt es zu einer linsenspezifischen Überexpression von CTGF unter der Aktivität des β B1-Crystallin-Promoters, welche bei transgenen Tieren zu einer Erhöhung des Augeninnendrucks führt. Die aus dieser Verpaarung stammenden *Wdr36+/-* β B1-CTGF-Tiere wurden zusätzlich mit der beschriebenen PCR genotypisiert.

Tab. 28: Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm für die Genotypisierung von β B1-CTGF transgenen Mäusen.

SV40-PCR		PCR-Cyclerprogramm		
		Schritt	Temperatur	Dauer
10x PCR Puffer	1,5 μ l	Initiation	96°C	2 min
5x PCR Puffer	3,0 μ l	35x		
MgCl ₂ (25mM)	0,6 μ l	Denaturierung	95°C	10s
dNTP (10mM)	0,3 μ l	Annealing	55°C	30s
SV40 fwd (10 μ M)	0,3 μ l	Elongation	72°C	60s
SV40 rev (10 μ M)	0,3 μ l			
Taq-Polymerase	0,3 μ l	End-Elongation	72°C	10min
gDNA (1:25)	2,0 μ l		10°C	∞
H ₂ O	ad 15 μ l			

Alle verwendeten Tiere hatten einen CD1-Hintergrund.

3.5.4 Intraokuläre Injektionen

3.5.4.1 Intravitreale Injektion von NMDA

Die intravitreale Injektion von NMDA ist ein anerkanntes Schadensmodell, das zu einer spezifischen exzitotoxischen Schädigung von retinalen Ganglienzellen führt. Das verwendete Glutamat analogon NMDA ist ein synthetischer Agonist für NMDA-Glutamatrezeptoren. Da die NMDA-Rezeptoren mit einem Ca²⁺-Kanal gekoppelt sind, wird durch Bindung von NMDA an den Rezeptor der Ionenkanal geöffnet, woraufhin es zu einem Ca²⁺-Influx kommt. Da NMDA kein natürlich vorkommender Ligand ist, fehlen dementsprechend Mechanismen, die die Inaktivierung des NMDA-

Rezeptorkomplexes bewirken. Durch die daraus resultierende lange Öffnung des Ca²⁺-Kanals und den exzessiven Einstrom des sekundären Messengers Ca²⁺ werden intrazelluläre Signalwege beeinflusst, die schließlich die Aktivierung der Apoptose-Signalkaskade einleiten. Der genaue Mechanismus über den NMDA seinen exzitotoxischen Schaden vermittelt, ist bislang noch nicht geklärt (Shen et al., 2006).

Für die intravitreale Injektion wurden die Mäuse durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran anästhesiert. Die Injektion erfolgte über eine 35G Kanüle, die über einen Schlauch an eine 25µl Hamiltonspritze gekoppelt war. Die Kanüle wurde am Augenäquator durch die Sklera in Richtung Sehnerv in den Glaskörper eingeführt und anschließend 3µl NMDA (10mM in sterilem PBS) injiziert. In das zweite Auge der Mäuse wurde 3µl steriles PBS injiziert, es diente somit als Kontrolle. Drei Wochen nach Injektion wurden die Tiere durch atlantookzipitale Dislokation getötet, ihre Augen schonend enukleiert, in Epon eingebettet, und Semidünnschnitte der Sehnerven angefertigt.

3.5.4.2 Induktion eines experimentellen Glaukoms durch intrakamerale Injektion von Polystyren-Microbeads

Zur Induktion eines experimentellen Glaukoms wurde die von Cone und Kollegen (Cone et al., 2010) beschriebene Methode der Injektion von Polystyren-Microbeads in die Augenvorderkammer von Mäusen verwendet. Es wird angenommen, dass durch die Injektion der Polystyren-Microbeads die Abflusskanäle des Kammerwassers blockiert werden und der daraus resultierende künstlich erhöhte Augeninnendruck zu einer Schädigung der retinalen Ganglienzellen führt.

Die Microbeads (Polybead Microspheres, Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA) mit einem Durchmesser von 6µm wurden vor der Injektion in 100%-igem Ethanol gewaschen, 5min bei 13200 x g zentrifugiert und erneut in Alkohol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Microbeads zweimal in sterilem PBS gewaschen und nach Zentrifugation mit sterilem PBS auf die Konzentration 3 x 10⁶ beads pro µl eingestellt. Die Mäuse wurden vor der intrakameralen Injektion mit 6 – 8 mg/kg Körpergewicht Xylazin und 90 – 120 mg/kg Körpergewicht Ketamin in tiefe

Narkose versetzt. Über eine mit einer Hamiltonspritze (Roth, Karlsruhe) verbundene Kanüle (32G, W.P.I., Berlin) wurden 2 μ l der Microbeadlösung aufgenommen und in die Augenvorderkammer injiziert. Als Injektionsstelle wurde die periphere Cornea gewählt. Nach Injektion der Microbeads verblieb die Kanüle für 2min in der Vorderkammer, um einen Ausfluss der Beads zu verhindern. Das Natriumhyaluronat (10 mg/ml, Healon, Advanced Medical Optics Inc., Santa Ana, CA, USA) wurde, anders als von Cone und Kollegen beschrieben, auf die Injektionsstelle gegeben, da es zu viskos für die 32G Kanüle war. Zur Kontrolle wurden in das zweite Auge der Tiere 2 μ l steriles PBS injiziert und ebenfalls 3 μ l Natriumhyaluronat auf die Injektionsstelle gegeben. Bei den Mäusen wurde zwei Tage nach Injektion, sowie danach wöchentlich der Augeninnendruck bestimmt. Sechs Wochen nach Injektion wurden die Tiere durch atlantookzipitale Dislokation getötet und ihre Augen schonend enukleiert. Die Augen und Sehnerven wurden in Epon eingebettet, um dann Semidünnschnitte anzufertigen und die Gesamtzahl der Axone im Sehnerv zu bestimmen.

3.5.5 Bestimmung des intraokulären Drucks

Der Augeninnendruck der Versuchstiere wurde mit Hilfe des TonoLab Tonometers (Tioloat Oy, Helsinki, Finnland) bestimmt. Bei dieser Applanationstonometrie genannten Methode wird die Kraft des Abpralls einer Messsonde von der Cornea des Auges ermittelt.

Da der Augeninnendruck einer tageszeitlichen Schwankung unterliegt (Sugimoto et al., 2006), wurden die Messungen stets zwischen 9:30 und 11:30 Uhr durchgeführt. Zur Messung des Augeninnendrucks wurden die Tiere mit 6 – 8 mg/kg Körpergewicht Xylazin und 90 – 120 mg/kg Körpergewicht Ketamin in tiefe Narkose versetzt. Es wurden pro Auge sechs Endwertmessungen durchgeführt, welche wiederum vom TonoLab Tonometer aus dem Mittelwert von sechs Einzelmessungen erstellt wurden.

3.5.6 Bestimmung der Gesamtzahl der retinalen Ganglienzellen

Zur Bestimmung der Gesamtzahl der retinalen Ganglienzellen wurde die Anzahl der Axone im *Nervus opticus* ermittelt. Dazu wurden Semidünnschnitte der Sehnerven mit Paraphenylendiamin gefärbt, mittels des Zeiss Lichtmikroskops und der 'Axiovision 4.7' Software Aufnahmen erstellt und anschließend mit der Zählfunktion des Programms 'Adobe Photoshop CS3' die Anzahl der Axone im Sehnerv bestimmt.

3.5.7 Isolierung und Kultivierung von Maus-Zygoten

Die hormonelle Zyklussynchronisation und Superovulation der weiblichen Mäuse erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von 5 IU 'Pregnant Mares Serum Gonadotropin' (PMSG, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und, 48h später, durch intraperitoneale Injektion von 5 IU 'Human Chorionic Gonadotropin' (HCG, Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Danach wurden je zwei superovulierte Weibchen mit einem Männchen verpaart. Die Gabe von PMSG und HCG erfolgte stets abends gegen 18:00 Uhr. Der nächste Morgen (ca. 9:00 Uhr) wurde als Tag 0,5 dpc (days post coitus) angenommen. Die Weibchen wurden auf das Vorhandensein eines Vaginal-Plugs überprüft, durch atlantookzipitale Dislokation getötet und die Uteri vorsichtig entnommen. Zur Isolierung der Zygoten wurde das Ovidukt mit M2 Medium (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gespült und die Zygoten mit Hilfe einer Embryo-Haltepipette unter dem Stereomikroskop gesammelt.

Zur Kultivierung der Präimplantationsstadien wurden sogenannte Microdrop-Kulturen verwendet. Dabei werden kleine Tropfen (ca. 30µl) KSOM Medium (Millipore, Billerica, USA) in eine Petrischale gegeben und mit Mineralöl (embryo-tested; Sigma-Aldrich, Taufkirchen) überschichtet. Die isolierten Zygoten wurden in diese Tropfen vereinzelt und bei 37°C und 5% CO₂ über mehrere Tage hinweg kultiviert. Der Entwicklungsverlauf der Embryonen wurde täglich unter einem inversen Mikroskop überprüft und fotografisch dokumentiert.

Um die genomische DNA aus Embryonen zu isolieren, wurden diese einzeln in 20µl Embryo-Lysepuffer überführt, für 4h bei 55°C inkubiert und anschließend für 10min auf 90°C erhitzt.

Zur Genotypisierung der Embryonen wurde eine Nested-PCR Strategie verwendet. Der erste Schritt entsprach der in Tab. 26 angegebenen PCR, jedoch wurde die gDNA unverdünnt eingesetzt. Aus diesem Reaktionsansatz wurde je 1 μ l entnommen und in nachfolgende Reaktion eingesetzt.

Tab. 29: Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm für die Genotypisierung von *Wdr36* Knock-out Blastozysten über eine Nested-PCR Strategie.

iNested-PCR		PCR-Cyclerprogramm		
		Schritt	Temperatur	Dauer
10x PCR Puffer	2,5 μ l	Initiation	96°C	2 min
5x PCR Puffer	5,0 μ l	30x		
MgCl ₂ (25mM)	1,5 μ l	Denaturierung	94°C	20s
dNTP (10mM)	0,5 μ l	Annealing	58°C	20s
iNested fwd (10 μ M)	0,5 μ l	Elongation	72°C	45s
iNested lacZ rev (10 μ M)/ iNested Intron rev (10 μ M)	0,5 μ l	End-Elongation	72°C	2min
Taq-Polymerase	0,3 μ l		10°C	∞
Nested1-DNA	1,0 μ l			
H ₂ O	ad 25 μ l			

Um auch frühe Embryonalstadien der *Wdr36+/-_Del605-607*-Mäuse auf das Vorhandensein des insertierten pCAGGS-Wdr36 Del605-607 Fragments überprüfen zu können, wurde hierfür ebenfalls eine spezifische Nested-PCR Strategie entwickelt. Dabei liegen die Primer in Exonbereichen, die in der genomischen Sequenz durch mehrere Exon-Intron-Grenzen getrennt sind.

Tab. 30: Reaktionsansätze und Thermocycler-Programme für die Genotypisierung pCAGGS-Wdr36 Del605-607 transgenen Blastozysten über eine Nested-PCR Strategie.

Japan-Nested1-PCR		PCR-Cyclerprogramm		
Schritt	Temperatur	Dauer		
Initiation	94°C	2 min		
30x				
Denaturierung	94°C	20s		
Annealing	59°C	20s		
Elongation	72°C	45s		
End-Elongation	72°C	2min		
	10°C	∞		

Japan-Nested2-PCR		PCR-Cyclerprogramm		
Schritt	Temperatur	Dauer		
Initiation	94°C	2 min		
35x				
Denaturierung	94°C	20s		
Annealing	59°C	20s		
Elongation	72°C	45s		
End-Elongation	72°C	2min		
	10°C	∞		

3.5.8 Injektion von siRNA in Maus-Zygoten

Die Injektion von siRNA in Zygoten wurde von Dr. Michael Bösl am Max Plank Institut für Neurobiologie, Martinsried vorgenommen. Dr. Bösl übernahm in diesen Experimenten die Isolierung der Zygoten, die Injektion und die Kultivierung.

Die Mikroinjektionen wurden an einem inversen Mikroskop (Olympus IX71) bei 320-facher Vergrößerung mit Hilfe eines elektromechanischen Mikromanipulators (Eppendorf TransferMan NK2) durchgeführt. Spezifische Wdr36 siRNA sowie die non-

target siRNA wurden mit einer Konzentration von 20 μ M ins Zytoplasma (10-20 μ l) oder einen der Pronuklei (2-4 μ l) von Mauszygoten injiziert. Die Embryonen wurden nach der Injektion unter den in 3.5.7 beschriebenen Bedingungen für mehrere Tage kultiviert.

Der Entwicklungsverlauf der Embryonen wurde täglich mikroskopisch überprüft und fotografisch dokumentiert.

3.6 Proteinbiochemische Methoden

3.6.1 Co-Immunopräzipitation

Bei der Co-Immunopräzipitation wurde versucht mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers WDR36 mitsamt seiner Interaktionspartner aus Zelllysaten zu isolieren und zu präzipitieren.

Zuerst wurden HTM-N Zellen bzw. HTM-N Zellen transfiziert mit dem pcDNA3.1-myc-his-Wdr36-Vektor abtrypsinisiert und zweimal in PBS gewaschen. Daraufhin wurden zu den Zellen 1ml Lysepuffer (1x PBS mit 1% Triton-X 100, 10% Glycerol und Proteaseinhibitoren) gegeben und der Ansatz für 20min bei 4°C auf einem Rollschüttler inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (20min, 14000 x g, 4°C) wurde der Überstand abgenommen. Zu diesem wurden 20 μ l einer 50%-igen Protein G Agarose Lösung gegeben und die Ansätze für 1h bei 4°C auf dem Rollschüttler inkubiert, um einer unspezifischen Bindung von Proteinen an die Agarose vorzubeugen. Anschließend wurden die Ansätze für 2min bei 1000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mit 1-5 μ g anti-WDR36-Antikörper versetzt und in einem neuen Reaktionsgefäß über Nacht bei 4°C auf einem Rollschüttler inkubiert. Zum Aufreinigen der Antikörper und der daran gebundenen Proteine wurden 50 μ l Protein G Agarose zum Ansatz gegeben und für 2h auf dem Rollschüttler inkubiert. Nach Bindung der Komplexe an die Protein G Agarose wurden die Ansätze für 2min bei 1000 x g zentrifugiert und die Agarose schließlich viermal mit je 1ml Lysepuffer gewaschen. Das Pellet wurde daraufhin in 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen, für 5min bei 90°C aufgekocht, kurz zentrifugiert und der Überstand mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteinbanden über Western Blot Analysen detektiert.

3.6.2 Bakterielle Expression von GST-Wdr36 und Vorbereitung für Pulldown-Assays

Zur bakteriellen Expression von GST-Wdr36 für sogenannte Pull-Down Assays wurden XL1-Blue Bakterien mit dem Vektor pGEX-4T-3-Wdr36 transformiert. Nach Isolierung definierter Klone wurden im ersten Schritt daraus Vorkulturen angeimpft. Nach Kultivierung (150 Upm, 37°C, über Nacht) wurden 500µl der Vorkultur entnommen und in 200ml vortemperierte LB_{Amp}-Medium überführt. Das Wachstum erfolgte bei 30 - 37°C und 150Upm. Dabei wurde regelmäßig die optische Dichte (oD) bei 600nm (Blank: LB₀-Medium) gemessen. Bei einer $\text{oD}_{600} = 0,5$ wurde die Expression von GST-Wdr36 durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,3 - 1mM) induziert. Anschließend folgte eine Inkubationsphase von 2 - 16h. Die Bakterien wurden schließlich durch Zentrifugation geerntet (10min, 4000Upm, 4°C), mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Dann wurden zum Pellet 20ml Bakterien-Lysepuffer gegeben. Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Druck von 137 MPa in einer French Press Zelle (American Instruments Company, Maryland, USA). Anschließend wurde das Lysat für 10min bei 10000Upm und 4°C zentrifugiert, zum Überstand 100µl Glutathion-Separose-Beads (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) gegeben und dieser Ansatz für mindestens 2h inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 10min bei 500Upm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Beads mit dem daran gebundenen Protein dreimal mit je 1ml 0,1% Triton-X-100 in 1xPBS gewaschen und in PBS gelagert.

3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bewerkstelligt. Die Gelelektrophorese und auch die Herstellung der Polyacrylamidgele wurden nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt.

Zum Gießen eines Gels wurde eine Apparatur der Firma Peqlab Biotechnology GmbH (Erlangen) entsprechend der Herstellerangaben aufgebaut. Dann wurde das Trenngel zwischen die beiden Glasplatten pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol abgekippt und das Sammelgel

auf das Trengel gegeben. Durch einen Plastikkamm im flüssigen Sammelgel entstanden nach der Polymerisation Taschen zum Auftragen der Proteinproben. Während im Sammelgel dieses Zwei-Phasen-Gels die Proteine aufkonzentriert werden, werden sie schließlich im Trengel nach Proteingröße aufgetrennt. Vor der Elektrophorese wurden die Proben mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt und im Wasserbad bei 100°C für 5min denaturiert. Das auspolymerisierte Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Puffertank mit Laufpuffer aufgefüllt. Dann wurden die Proben in die Geltaschen geladen. Als Größenstandard wurden 5µl Proteinmolekulargewichtsmarker aufgetragen. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von 20mA pro Gel für 1h aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und verworfen.

3.6.4 Semidry Blotting

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels „Elektroblotting“ aus dem Trengel auf eine Polyvinylfluorid (PVDF)-Membran (Roche, Mannheim) transferiert. Dazu diente eine „Semidry Blotting“ Apparatur (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen).

Vor dem Blotten wurde die Membran auf die Größe des Trengels gebracht, kurz mit Methanol behandelt und daraufhin für 1min in destilliertem Wasser geschüttelt. Schließlich wurde die Membran für 5min in Transferpuffer äquilibriert. Die zusätzlich benötigten Whatman-Papiere wurden ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtet. Der Blot wurde entsprechend dem nachfolgenden Schema zusammengebaut:

Kathode (-)
3 Lagen Whatman-Papier
Trengel mit Proteinen
PVDF-Membran
2 Lagen Whatman-Papier
Anode (+)

Beim Zusammenbau des Semidry Blots wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen Membran und Gel befanden. Geblottet wurde für 90min bei 25V.

3.6.5 Nachweis spezifischer Proteinbanden

Zum Nachweis spezifischer Proteinbanden wurde ein Primärantikörper gegen das gesuchte Protein hinzugefügt. Der Antikörper reagiert dabei mit dem entsprechenden Antigen. Der gebildete Antikörper-Antigen-Komplex wird schließlich von einem spezifischen Sekundärantikörper gebunden. Da der Sekundärantikörper an die Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt ist, wird durch Zugabe von Luminol ein Chemilumineszenz-Signal emittiert, welches detektiert werden kann.

Nach dem Semidry-Blot wurde die Membran 1h bei Raumtemperatur in 5% Magermilch (gelöst in TBS) blockiert. Dann wurde der Primärantikörper (mouse anti-PWP2H 1:1000 in 0,5%MM/TBST) zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschritten mit TBST (je 10min) wurde der HRP-konjugierte Sekundärantikörper (chicken anti-mouse 1:5000 in 0,5%MM/TBST) zugegeben und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde die Membran erneut dreimal mit TBST gewaschen. Bei allen Schritten wurde die Membran in den Lösungen geschüttelt. Zur Detektion wurde die Membran mit 1ml HRP Substrate Luminol Reagent und HRP-Peroxidase Solution (1:1 gemischt) (Millipore Corporation, Billerica, USA) benetzt, in eine Folie eingeschlagen und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Chemilumineszenz-Signal wurde mit dem LAS 3000 aufgenommen und in Graustufen umgesetzt. Die Analyse und Quantifizierung der Chemilumineszenz-Signale wurde mit der Software 'Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06' (Raytest, Straubenhardt) durchgeführt.

3.6.6 Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung (Sambrook et al., 1989) wurde verwendet, um Proteine auf PVDF-Membranen oder in Polyacrylamidgelen sichtbar zu machen. Die Färbung der PVDF-Membranen erfolgte nach dem Nachweis spezifischer Proteinbanden zur Ladungskontrolle. Zur Coomassie-Färbung wurden die PVDF-Membranen und Gele in die Coomassie-Färbelösung gegeben und für mindestens 60min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Färbelösung abgegossen und mit Entfärbelösung unter ständigem Schütteln für mindestens 1h gewaschen. Die Membranen wurden

anschließend getrocknet, die Gele in Folie eingeschweisst und mit Hilfe der LAS 3000 Intelligent Dark Box fotografiert.

3.7 Histologische Methoden

3.7.1 Eponeinbettung und Herstellung von Semidünnschnitten

Für die Einbettung in Epon wurden die enukleierten Augen für 12h in EM-Fixans immersionsfixiert. Anschließend wurden sie mehrfach für jeweils 20min in Cacodylatpuffer gespült. Dann wurden die Augen in 1% Osmiumtetroxid nachfixiert, das Osmium mit Cacodylatpuffer ausgewaschen und die Augen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70 %, 80 %, 90 %, 100 %) entwässert. Das Einbetten in Epon erfolgte mit Hilfe eines Einbettautomaten über Aceton nach Standardmethoden: Ethanol/Aceton 1:1; 100 % Aceton; Epon/Aceton 1:2; Epon/Aceton 2:1; 100 % Epon; Aushärten im Brutschrank 24 h bei 60 °C und 48 h bei 90 °C. Die Eponlösung bestand aus einer 1:1 Mischung zweier Stammlösungen und Zusatz von 2% Beschleuniger DMP-30. Stammlösung A war eine Mischung aus 62ml Glycidether 100 und 100ml DDSA; Stammlösung B wurde aus 100ml Glycidether 100 und 89ml MNA (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) angesetzt. Mit einem Reichert Ultramikrotom wurden von den Augen Semidünnschnitte in der Mittsagittalebene und von den Sehnerven Semidünnschnitte im Querschnitt (je 1µm) angefertigt und diese nach Färbung lichtmikroskopisch betrachtet.

3.7.2 Histologische Färbungen

3.7.2.1 Richardson-Färbung

Die sagittalen Semidünnschnitte der Augen wurden nach Richardson et al. (1960) gefärbt. Dazu wurden die Schnitte für 15 – 30 Sekunden bei 60°C mit der Gebrauchslösung, bestehend aus einer Mischung von Stammlösung 1 (1 Teil) und Stammlösung 2 (1 Teil) sowie H₂O dest. (2 Teile), überschichtet. Stammlösung 1 bestand aus 1% Azur II (5g in 500ml H₂O dest.), während die Stammlösung 2 eine 1% Methylenblau-Lösung war (5g Methylenblau in 500ml 1% Borax). Die Gebrauchslösung wurde nach der Färbung gut mit H₂O dest. abgespült.

3.7.2.2 Paraphenyldiamin-Färbung

Die Paraphenyldiamin-Färbung erfolgte gemäß Schultz (1972). Zur Herstellung einer Paraphenyldiamin-Lösung wurden 500mg Paraphenyldiamin in 50ml Ethanol absolut gelöst und für drei Tage bei Tageslicht inkubiert, bis sich die Lösung dunkel färbt. Mit dieser Lösung wurden die Semidünnschnitte der Sehnerven für 2-3min (Raumtemperatur) überschichtet, die Lösung abgekippt und die Schnitte mit Ethanol absolut gewaschen.

3.8 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der Färbungen erfolgte mit Hilfe des Mikroskops Axio Imager.Z1, (Zeiss, Göttingen). Bei Fluoreszenzfärbungen wurden Bilder der einzelnen Färbungen aufgenommen und mit dem Bildbearbeitungs- und Analyseprogramm `Axiovision 4.7` (Carl Zeiss, Göttingen) zu einem Bild mit verschiedenen Ebenen zusammengefügt.

3.9 Auswertung und Statistik

Zur Auswertung der numerischen Daten wurde das Programm `Microsoft® Excel` (Microsoft® Corporation, Redmond, USA) verwendet. Für die statistische Analyse der Versuche, die mindestens drei Mal durchgeführt wurden, wurde der studentische T-Test verwendet. Statistisch signifikante Unterschiede wurden für $p<0,05$ (*) und statistisch hochsignifikante Unterschiede für $p<0,01$ (**) angenommen. Für alle erstellten Abbildungen wurde das Programm `CorelDraw®` (Corel® Corporation, Ottawa, Canada) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse des Phänotyps von homozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen

Im Jahr 2005 wurde *WDR36* als ein weiteres Glaukom-verursachendes Gen identifiziert (Monemi et al., 2005). Um die Funktion dieses Gens sowie des daraus exprimierten Proteins und seinen möglichen Beitrag zur Pathogenese eines Glaukoms untersuchen zu können, wurde von Dr. Markus Kröber eine Knock-out Mauslinie generiert. Bei dieser Mauslinie sind die ersten 16 Exone von *Wdr36* durch eine *lacZ*-Kassette ersetzt, wobei das Startcodon dieses Gens direkt an die Stelle des Startcodons von *Wdr36* tritt (Abb. 6).

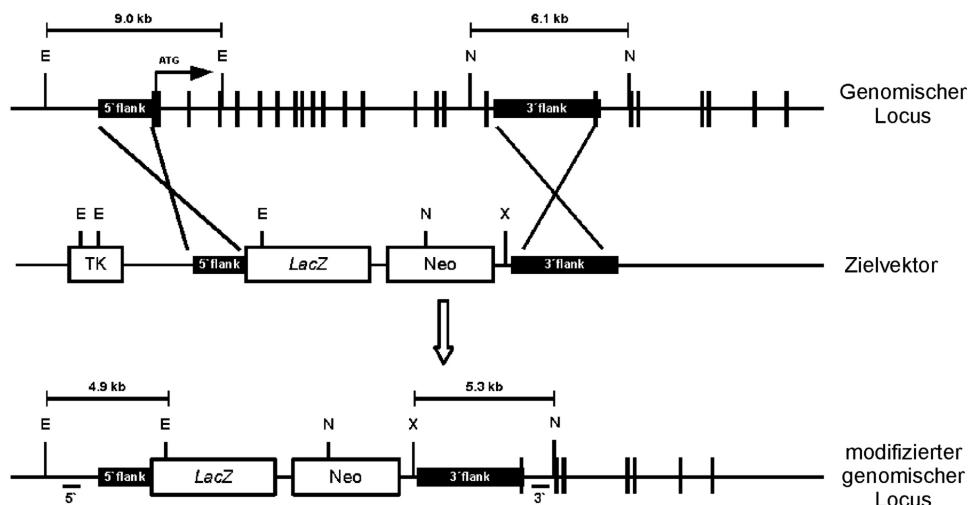


Abb. 6: Schematische Darstellung der Gene Targeting-Strategie zur Generierung der *Wdr36* Knock-out Mauslinie.

Bei der verwendeten Strategie wurden die ersten 16 Exone von *Wdr36* durch eine *lacZ*-Kassette ersetzt, wobei das Start-ATG des *lacZ*-Gens an die Stelle des Startcodons von *Wdr36* tritt. Adaptiert aus Gallenberger et al., 2011.

Nach Generierung dieser *Wdr36* Knock-out Mauslinie wurde festgestellt, dass nach Verpaarung heterozygoter Elterntiere keine homozygoten *Wdr36*-defizienten Nachkommen geboren wurden. Es konnten durch Southern-Blot Analyse und Genotypisierungs-PCR nur Wildtyp-Tiere und heterozygote *Wdr36*-defiziente

Nachkommen ermittelt werden (Gallenberger et al., 2011), was den Schluss zulässt, dass homozygote *Wdr36*-defiziente Tiere während der Embryonalentwicklung sterben. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden nach Verpaarung heterozygoter Elterntiere verschiedene Embryonalstadien präpariert und diese mittels PCR genotypisiert. Die Embryonalentwicklung dauert bei der Maus ca. 20 Tage, wobei in Prä- und Postimplantationsstadien unterschieden wird. Die Präimplantationsstadien umfassen die Entwicklungsritte von der Zygote hin zur Blastocyste (ca. 3,5dpc). Diese „schlüpft“ schließlich aus der *Zona pellucida* (ca. 4,5dpc) und implantiert dann in den Uterus, wo die weitere Entwicklung stattfindet (Postimplantationsstadien). Nachdem in den Postimplantationsstadien keine homozygoten *Wdr36*-defizienten Embryonen identifiziert werden konnten, wurde eine Nested-PCR Strategie entwickelt, um auch Präimplantationsstadien genotypisieren zu können. Basierend auf der eigentlichen Genotypisierungs-PCR wurden Primer entwickelt, die innerhalb des Amplikons dieser PCR binden und eine Unterscheidung des Wildtyp- und des modifizierten Gens zulassen. Während die Amplifikation des unveränderten *Wdr36*-Gens in der Nested-PCR ein Amplikon mit 577bp lieferte, ergab die Amplifikation des modifizierten Gens eine Bande bei 319bp (Abb. 7).

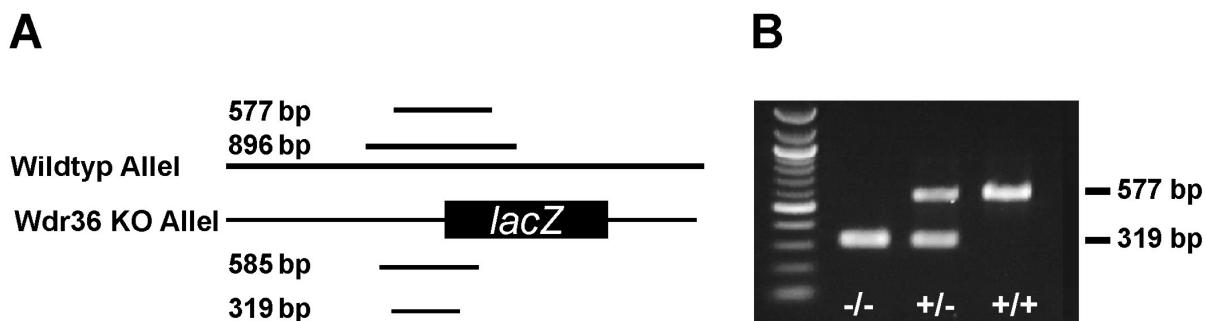


Abb. 7: Nested-PCR zur Genotypisierung von Präimplantationsstadien.

Wie in der schematischen Übersicht (A) zu sehen ist, wurden die Primer so generiert, dass sie eine eindeutige Unterscheidung des Wildtyp-Allels (577bp) vom modifizierten genomischen *Wdr36* Locus (Wdr36 KO Allel, 319bp) erlauben. Mittels Nested-PCR konnte so der Genotyp der Präimplantationsstadien ermittelt werden (B). Abbildung B aus Gallenberger et al., 2010.

Zur Untersuchung der frühen Embryonalentwicklung wurden Zygoten isoliert und in sogenannten Microdrop-Kulturen über mehrere Tage hinweg kultiviert. Um den Entwicklungsverlauf bis zum Blastozystenstadium (ca. 4 - 4,5dpc) zu dokumentieren, wurden die vereinzelten Embryonen täglich fotografiert, am Tag 4,5dpc schließlich lysiert und der Genotyp über Nested-PCR bestimmt. Von den 66 kultivierten Zygoten

erreichten 51 das Blastozysten-Stadium. Bei den restlichen 15 Zygoten konnte nur bis 3,5dpc eine normale Entwicklung beobachtet werden, anschließend degenerierten diese Embryonen. Anstatt ein Blastocoel auszubilden, lösten sich die Zellen dieser Embryonen von der *Zona pellucida* und verklumpten (Abb. 8). Mittels Nested-PCR wurde festgestellt, dass es sich bei diesen 15 Embryonen um homozygote *Wdr36*-defiziente Embryonen handelte. Die Genotypisierung der 51 Blastozysten zeigte, dass 17 Embryonen einen Wildtyp-Genotyp hatten und 34 Embryonen heterozygot *Wdr36*-defizient waren. Die statistische Verteilung der Genotypen entspricht der Mendelschen Vererbungslehre und lässt den Schluss zu, dass der Verlust des Proteins *Wdr36*, basierend auf der Modifizierung des genomischen *Wdr36*-Locus, zur Letalität während der frühen Embryonalentwicklung führt.

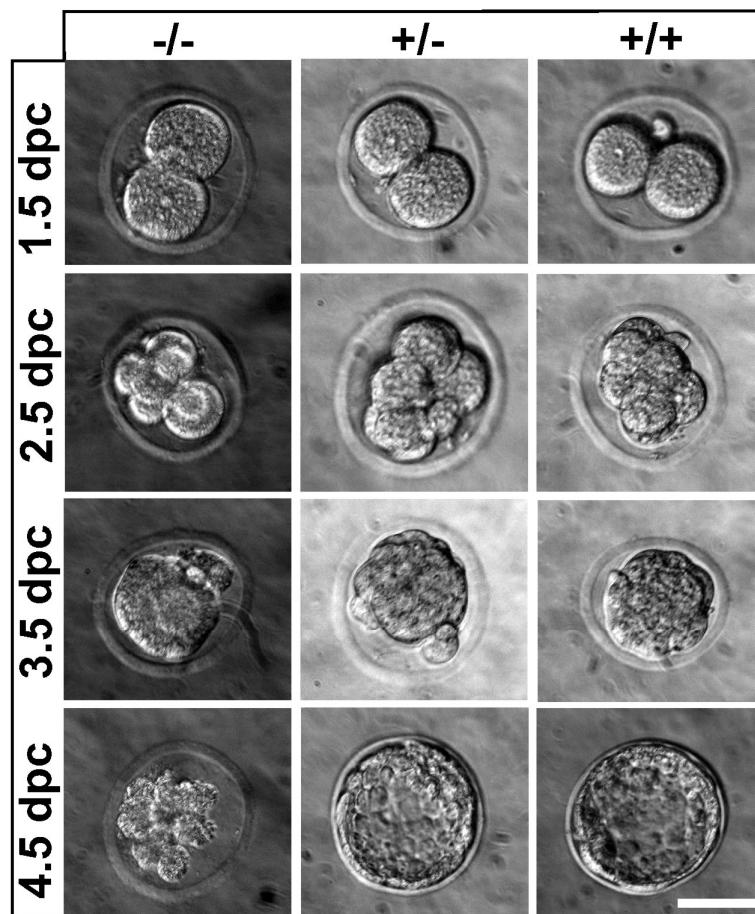


Abb. 8: Phänotyp der *Wdr36*-defizienten Embryonen.

Nach Verpaarung heterozygoter *Wdr36*-defizienter Elterntiere wurden die Zygoten gewonnen und in Microdrop-Kulturen kultiviert. Die Entwicklung der Embryonen wurde über mehrere Tage hin verfolgt und fotografisch dokumentiert. Wildtyp- (+/+) und heterozygot *Wdr36*-defiziente (+/-) Embryonen zeigten eine normale Entwicklung und erreichten das Blastozystenstadium am Tag 4,5dpc. Homozygot *Wdr36*-defiziente (-/-) Embryonen zeigten eine normale Entwicklung bis Tag 3,5dpc, degenerierten jedoch anschließend. Es bildete sich kein Blastocoel aus, stattdessen verklumpten die Zellen und die Embryonen degenerierten. Messbalken: 25µm. Adaptiert aus Gallenberger et al., 2010.

4.2 Phänotypische Analyse der Mikroinjektionsversuche

Um den beobachteten Phänotyp der homozygoten *Wdr36*-defizienten Embryonen in einem unabhängigen Experiment zu verifizieren, wurden sogenannte Mikroinjektionsversuche unternommen. Dabei wurde siRNA in den Pronukleus bzw. das Zytoplasma von Wildtyp-Zygoten injiziert und diese anschließend über mehrere Tage hinweg kultiviert. Während dieser Zeit wurden die Embryonen täglich fotografiert und ihre Entwicklung dokumentiert (Tab. 31).

Von den siRNA injizierten Zygoten entwickelte sich der Großteil hin zum Morula-Stadium, nur wenige Embryonen degenerierten innerhalb der ersten beiden Tage nach Injektion vermutlich auf Grund von Injektionsschäden. In den Versuchsgruppen, denen spezifische *Wdr36* siRNA injiziert wurde, entwickelte sich jedoch nur ein geringer Prozentsatz weiter zum Blastozystenstadium (4 von 36 nach zytoplasmatischer Injektion bzw. 2 von 16 nach Pronukleusinjektion am Tag 4,5dpc). Alle anderen Embryonen zeigten einen Phänotyp vergleichbar mit dem der homozygoten *Wdr36*-defizienten Embryonen. So bildete sich auch bei diesen Embryonen kein Blastocoel aus, die Zellen lösten sich von der *Zona pellucida* ab und bildeten einen unregelmäßigen Zellklumpen (Abb. 9).

Bei den Versuchsgruppen, denen eine non-target siRNA (siRNA, deren Sequenz mit keiner bekannten mRNA identisch ist) injiziert wurde, entwickelte sich der Großteil bis zum Blastozysten-Stadium, nur ein geringer Prozentsatz der injizierten Embryonen war zum Zeitpunkt 4,5dpc degeneriert (3 von 34 nach zytoplasmatischer Injektion bzw. 2 von 18 nach Pronukleusinjektion).

Eine weitere Gruppe von Zygoten erhielt keine Injektionen und diente dazu, den normalen Verlauf der frühen Embryonalentwicklung in den Microdrop-Kulturen verfolgen zu können.

Ergebnisse

Tab. 31: Übersicht über die *in vitro* Embryonalentwicklung nach Injektion von siRNA.
Adaptiert aus Gallenberger et. al., 2010.

0,5dpc									
Behandlung	Zygote	2-Zell-Stadium	4-Zell-Stadium	8-Zell-Stadium	16-32 Zellen	Morula	Blastozyste	„geschlüpfte“ Blastozyste	
A	17								
B	39								
C	40								
D	16								
E	18								
1,5dpc									
Behandlung	Dege-neriert/tot	2-Zell-Stadium	4-Zell-Stadium	8-Zell-Stadium	16-32 Zellen	Morula	Blastozyste	„geschlüpfte“ Blastozyste	
A		14	3						
B	3 ^a	32	4						
C	6 ^a	34							
D		15	1						
E		17	1						
3,5dpc									
Behandlung	Dege-neriert/tot	2-Zell-Stadium	4-Zell-Stadium	8-Zell-Stadium	16-32 Zellen	Morula	Blastozyste	„geschlüpfte“ Blastozyste	
A						10	7		
B						30 + 6 ^b			
C					4	21	9		
D						16			
E						13	5		
4,5dpc									
Behandlung	Dege-neriert/tot	2-Zell-Stadium	4-Zell-Stadium	8-Zell-Stadium	16-32 Zellen	Morula	Blastozyste	„geschlüpfte“ Blastozyste	
A							2	14	
B	32						4		
C	3						5	26	
D	14						2		
E	2							16	

A, Kontrollgruppe ohne Injektion; B, Injektion spezifischer Wdr36 siRNA ins Zytoplasma; C, Injektion von non-target siRNA ins Zytoplasma; D, Injektion spezifischer Wdr36 siRNA in den Pronukleus; E, Injektion von non-target siRNA in den Pronukleus

a, bei der Injektion beschädigt.

b, teilweise zerstört.

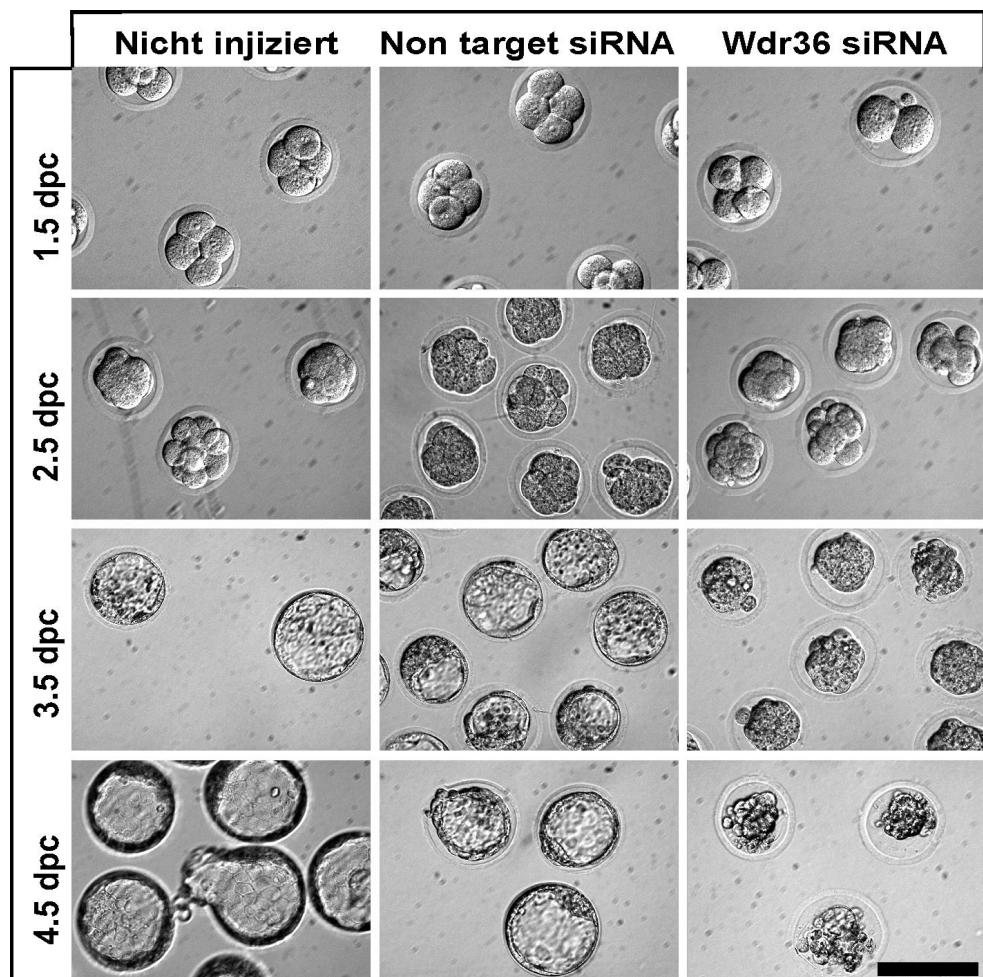


Abb. 9: Phänotyp und Übersicht über die Entwicklung der Embryonen nach Injektion von siRNA.
 Nach Injektion von siRNA ins Zytoplasma oder den Pronukleus von Wildtyp-Zygoten wurden die Embryonen in Microdrop-Kulturen kultiviert. Die Entwicklung der Embryonen wurde über mehrere Tage hin verfolgt und fotografisch dokumentiert. Nicht injizierte und mit non-target siRNA injizierte Zygoten zeigten größtenteils eine normale Entwicklung und hatten am Tag 4,5dpc das Blastozystenstadium erreicht. Nach Injektion von spezifischer Wdr36 siRNA zeigten die Zygoten eine normale Entwicklung bis Tag 3,5dpc, anschließend degenerierten sie jedoch. Vergleichbar mit den homozygoten Wdr36-defizienten Embryonen bildete sich kein Blastocoel aus, stattdessen lösten sich die Zellen von der Zona pellucida und verklumpten. Messbalken: 50µm. Aus Gallenberger et al., 2010.

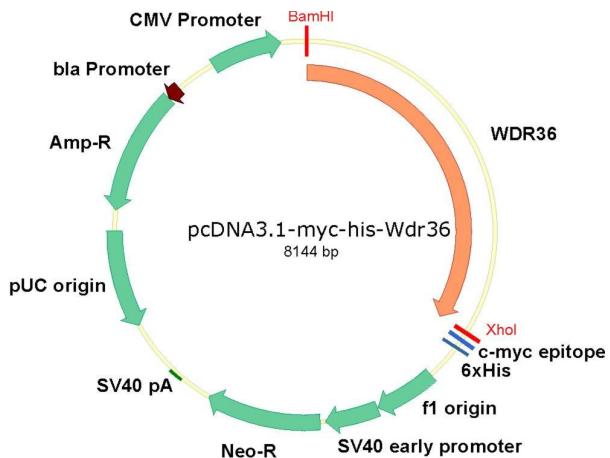
Der beobachtete Phänotyp sowohl der homozygoten *Wdr36*-defizienten Embryonen als auch der Phänotyp von Embryonen nach Injektion *Wdr36*-spezifischer siRNA lässt den Schluss zu, dass es sich bei *WDR36* um ein essentielles Protein handelt, das bereits früh in der Embryonalentwicklung exprimiert wird.

4.3 Subzelluläre Lokalisierung von WDR36

Bereits Skarie und Link (Skarie and Link, 2008) berichteten von einer Sequenzhomologie von WDR36 zu dem in der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) exprimierten Protein Utp21. Die Gruppe von Michael Walter konnte zudem eine strukturelle Homologie von WDR36 und Utp21 feststellen (Footz et al., 2009). In der Hefe ist Utp21 an der Ribosomenbiogenese beteiligt und im Nucleolus der Zelle lokalisiert. Basierend auf diesen Ergebnissen entstand die Hypothese, dass WDR36 auch funktionell ein zu Utp21 homologes Protein sein könnte. In diesem Falle würde man folglich eine Lokalisierung im Nukleolus der Zelle vermuten.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zum einen die cDNA des murinen Wdr36 in das Überexpressionsplasmid pcDNA™3.1/myc-His A kloniert (Abb. 10A) und schließlich in eine aus humanen Trabekelwerkszellen generierte immortalisierte Zelllinie (HTM-N) transfiziert. Nach Etablierung einer Überexpressionszelllinie wurde mit Hilfe eines anti-Myc Antikörpers die Lokalisierung des rekombinanten, Epitopgetagten Proteins ermittelt. Die immunzytochemischen Färbungen zeigten ein intensives Signal im Bereich der Nukleoli der Zellen (Abb. 10B). Zudem wurde eine leichte Färbung im Zytoplasma der HTM-N Zellen beobachtet.

A



B

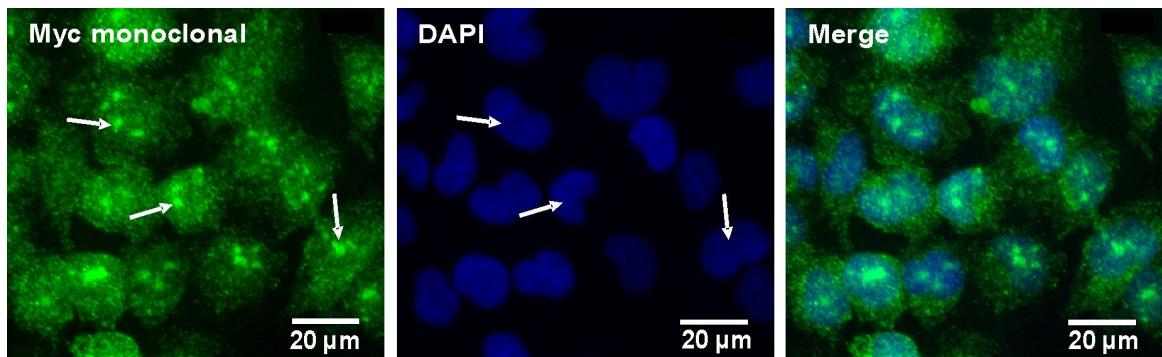
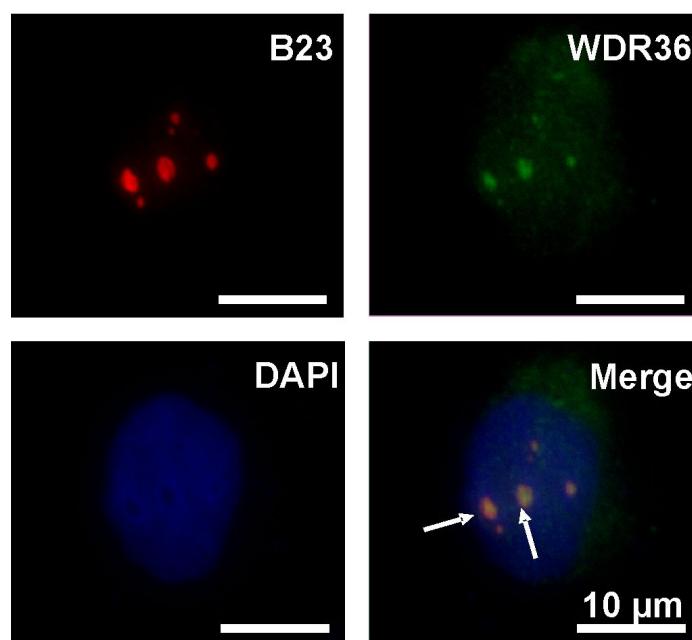


Abb. 10: Subzelluläre Lokalisierung von Epitop-getagtem Wdr36.

Die Wdr36 cDNA wurde in das pcDNA3.1-myc-his Plasmid subkloniert (A), in HTM-N Zellen transfiziert und durch Selektion mit G418 Überexpressionszelllinien generiert. Das rekombinante Protein (grün) ist hauptsächlich im Bereich des Nukleolus der Zellen lokalisiert (weiße Pfeile), jedoch kann auch eine zytoplasmatische Lokalisierung beobachtet werden. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Abbildung B aus Gallenberger et al., 2010

In einem weiteren Ansatz wurde die subzelluläre Lokalisierung von WDR36 in HTM-N Zellen mit Hilfe eines anti-WDR36 Antikörpers ermittelt. Dabei wurden Doppelfärbungen zusammen mit B23/Nucleophosmin unternommen. B23 ist ein nukleoläres Phosphoprotein, das an der Ribosomenanlagerung sowie deren Transport beteiligt ist und als Nukleolusmarker dient. In den Doppelfärbungen zeigte sich eine eindeutige Kolokalisierung der beiden Signale im Nukleolus der Zellen (Abb. 11A). In parallelen Ansätzen wurden auch Doppelfärbungen mit PWP2 (Periodic Tryptophan Protein Homolog) unternommen. Das nukleolare Protein PWP2 ist Teil des Small Subunit Prozessoms und an der Ribosomenbiogenese beteiligt. Die Färbung ergab erneut eine eindeutige Kolokalisierung der beiden Proteine in den Nukleoli der Zellen. Am Konfokalmikroskop wurde für WDR36 zudem eine leichte Färbung in der direkten Umgebung des Nukleus der Zellen detektiert (Abb. 11B).

A



B

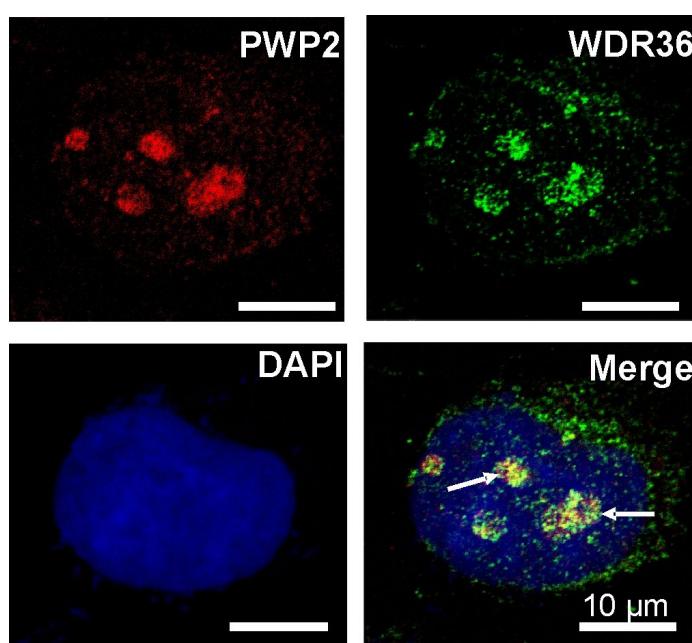


Abb. 11: Subzelluläre Lokalisierung von WDR36 in HTM-N Zellen.

WDR36 (grün) ist hauptsächlich im Nukleolus der Zellen lokalisiert (A und B). Es ist zudem eine deutliche Kolokalisierung (weiße Pfeile) mit B23 (A, rot, fluoreszenzmikroskopische Aufnahme) und PWP2 (B, rot, konfokalmikroskopische Aufnahme) erkennbar. B23 gilt als gängiger Nukleolusmarker, während PWP2 ein nukleoläres Protein und Bestandteil des SSU-Prozessoms ist. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Abbildungen aus Gallenberger et al., 2010

Zusammengefasst deuten diese Daten auf eine hauptsächlich nukleolare Lokalisierung von WDR36 hin.

4.4 Funktion von WDR36 auf zellulärer Ebene

Um die biologische Funktion von WDR36 auf zellulärer Ebene zu klären, wurden weiterhin Untersuchungen auf Zellkulturebene vorgenommen. Die nachfolgenden Versuche wurden teilweise von bzw. in Zusammenarbeit mit dem Diplomanden Dominik Meinel vorgenommen.

4.4.1 Expressionsanalyse

Zur Etablierung eines geeigneten Zellkulturmodells wurde zuerst mittels qPCR die Expression von WDR36 in verschiedenen humanen Zelllinien untersucht. Als Referenzgen wurde GNB2L verwendet. Das Expressionsniveau wurde mit der $\Delta\Delta C_T$ Methode relativ zum Referenzgen bestimmt.

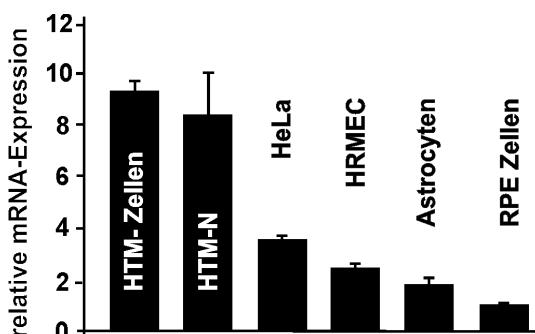


Abb. 12: WDR36 mRNA Expression in humanen Zellen *in vitro*.

Es wurden mittels qPCR-Analyse die relativen WDR36 mRNA-Expressionsraten von primären HTM Zellen, SV40-transformierten HTM Zellen (HTM-N), HeLa Zellen (humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms), humanen retinalen microvaskulären Endothelzellen (HRMEC), primären humanen Astrocyten und primären humanen retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) bestimmt. GNB2L wurde als Referenzgen verwendet, die Daten wurden auf den Mittelwert der RPE WDR36 mRNA Expression normiert. Aus Gallenberger et al., 2010.

In allen untersuchten Zelllinien wurde eine endogene Expression von WDR36 mRNA detektiert, jedoch war sie unterschiedlich stark (Abb. 12). Die höchsten Expressionsraten wurden in primären Trabekelwerkszellen (HTM-Zellen) und in einer aus humanen Trabekelwerkszellen generierten immortalisierten Zelllinie (HTM-N) gefunden. In HeLa-Zellen (humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms), humanen retinalen microvaskulären Endothelzellen (HRMEC) sowie in primären humanen Astrocyten war die relative mRNA-Expression bedeutend niedriger. Die geringste

Expression wurde in primären humanen retinalen Pigmentepithelzellen (RPE) festgestellt.

Basierend auf den erhaltenen Daten wurde entschieden für die weiteren Untersuchungen HTM-N Zellen zu verwenden, da sie eine starke WDR36 mRNA Expression besitzen und zudem gut zu kultivieren und zu transfizieren sind.

4.4.2 Etablierung eines Knock-down der WDR36 Expression in HTM-N Zellen

Um die Funktion von WDR36 zu untersuchen, wurde von Dominik Meinel ein Knock-down mittels WDR36 spezifischer siRNA etabliert. Um eine effiziente Depletion von WDR36 zu erreichen, mussten die Zellen mehrmals mit spezifischer siRNA (50nM) transfiziert werden. Die erste Transfektion erfolgte 24h nach Aussäen der Zellen, zwei weitere Transfektionen folgten im Abstand von jeweils 24h. Die Zellen wurden schließlich 48h nach der letzten Transfektion geerntet. Als Kontrollen dienten Lipofectamin behandelte Zellen sowie Zellen, die mit einer non-target siRNA transfiziert wurden. Nach dreimaliger Transfektion der spezifischen siRNA konnte eine signifikante Abnahme ($p<0,05$) der WDR36 Expression auf $23,5 \pm 0,6\%$ (siRNA1) bzw. $45,5 \pm 9,9\%$ (siRNA2) verglichen mit den Lipofectamin behandelten Zellen erreicht werden (Abb. 13). Die Transfektion von non-target siRNA hatte keinen statistisch relevanten Einfluss auf die Expressionsrate der WDR36 mRNA. Der Nachweis der verringerten WDR36 Expression konnte nur durch qPCR nachgewiesen werden, da für Western-Blot Analyse kein geeigneter Antikörper zur Verfügung stand.

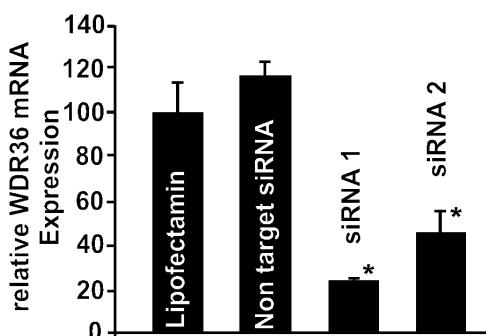


Abb. 13: WDR36 mRNA Expression in HTM-N Zellen nach Depletion mittels RNA Interferenz.

Nach wiederholter Transfektion von WDR36 spezifischer siRNA ist mittels qPCR eine Abnahme der relativen WDR36 mRNA Expression im Vergleich zu den Lipofectamin und non-target Kontrollen detektierbar. Die Daten wurden auf den Mittelwert der Lipofectamin-Kontrolle normiert (100%). GNB2L diente als Referenzgen. * markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Lipofectamin-Kontrolle ($*p<0,05$). Aus Gallenberger et al., 2010.

4.4.3 Wachstumsverhalten der HTM-N Zellen nach WDR36 Depletion

Nach Transfektion der HTM-N Zellen mit spezifischer WDR36 siRNA wurde eine verringerte Zellzahl beobachtet. Eine Quantifizierung der Zellzahl ergab, dass nach Knock-down von WDR36 sowohl mit siRNA1 als auch mit siRNA2 signifikant weniger Zellen ($p<0,05$) als in den Kontrollen vorhanden waren (Abb. 14). Während nach Transfektion von siRNA1 nur mehr $54 \pm 12\%$ der Zellen ermittelt werden konnten, die in den Zellkulturschalen mit den Lipofectamin behandelten Zellen gezählt wurden, waren es nach Transfektion von siRNA2 $77 \pm 13\%$. Nach Transfektion von non-target siRNA waren nur geringe Veränderungen in der Zellzahl zu finden ($89 \pm 13\%$). Da am Anfang der Experimente immer eine identische Zellzahl (10^5 Zellen pro Schale in der 6-Well Platte) ausgesät wurde, kann durch die Normierung auf die allein mit Lipofectamin behandelten Zellen eine Abnahme der Zellzahl auf Grund von toxischen Effekten der Transfektionen ausgeschlossen werden.

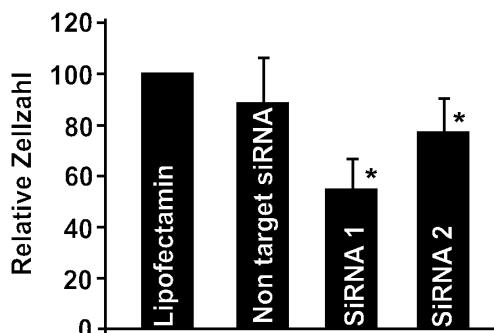


Abb. 14: Bestimmung der relativen Zellzahl nach Depletion von WDR36 mittels RNA Interferenz.

Nach dreifacher Transfektion von WDR36 spezifischer siRNA ist eine eindeutige Abnahme der relativen Zellzahl im Vergleich zu den Lipofectamin und non-target Kontrollen erkennbar. Die Daten wurden auf den Mittelwert der Lipofectamin-Kontrolle (100%) normiert. * markieren statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Lipofectamin-Kontrolle ($*p<0,05$). Aus Gallenberger et al., 2010.

Um den Grund für die verringerte Zellzahl nach Transfektion mit spezifischen siRNAs zu untersuchen, wurde in einem weiteren Schritt die prozentuale Verteilung der Zellen auf die einzelnen Zellzyklusphasen ermittelt. Bernstein und Kollegen (Bernstein and Baserga, 2004) berichteten, dass ribosomale Defekte bei *S. cerevisiae* und *S. pombe* zu einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus führen können. Falls nun WDR36 wirklich ein funktionell homologes Protein zu Utp21 und somit in die Ribosomenbiogenese involviert ist, könnte die verringerte Zellzahl durch einen Zellzyklusarrest erklärt werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde der statistische DNA Gehalt pro Zelle mittels Durchflusszytometrie mit Propidiumiodid-

Färbung bestimmt. Nach Depletion von WDR36 durch Transfektion spezifischer siRNA konnte keine merkliche Veränderung zu den Lipofectamin und den non-target siRNA behandelten Zellen festgestellt werden. Weder der Verlauf der Intensitätsverteilung der Propidiumiodid Fluoreszenz noch deren Quantifizierung zeigten auffällige Veränderungen im Zellzyklus (Abb. 15).

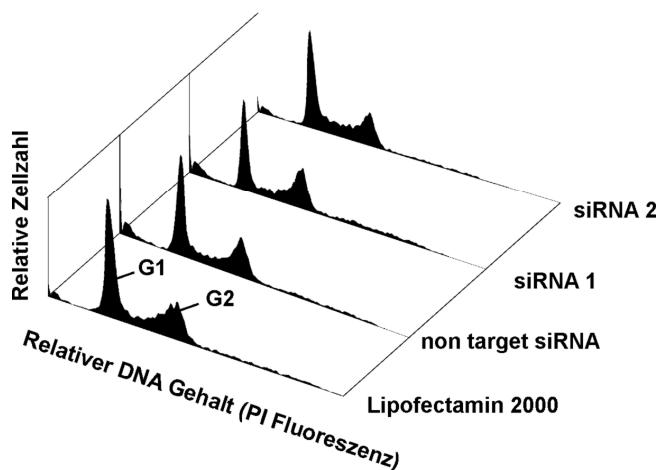


Abb. 15: Effekte der WDR36 Depletion auf den Zellzyklus von HTM-N Zellen.

Die Zellen wurden mit Lipofectamin, non target bzw. mit spezifischer WDR36 siRNA (siRNA 1 bzw. siRNA2) behandelt und durchflusszytometrisch analysiert. Depletion von WDR36 durch Transfektion spezifischer siRNA resultierte in keiner merklichen Veränderung im Vergleich zu den Lipofectamin und den non-target siRNA behandelten Zellen. G1: Zellen in der G1-Phase, G2: Zellen in der G2-Phase. Aus Gallenberger et al., 2010.

4.4.4 Untersuchung der Apoptoserate nach WDR36 Depletion

Nachdem ein Zellzyklusarrest als Grund für die verringerte Zellzahl nach WDR36 Depletion ausgeschlossen werden konnte, wurde in weiteren Ansätzen getestet, ob eine erhöhte Apoptoserate Ursache für die geringere Anzahl an Zellen ist. Bereits der Phänotyp der homozygoten *Wdr36*-defizienten Embryonen und die Ergebnisse der Mikroinjektionsversuche deuteten darauf hin, dass WDR36 ein essentielles Protein ist. Um auf Zellkulturebene eine mögliche erhöhte Apoptoserate zu untersuchen, wurde ein 'Cell Death Detection ELISA' benutzt. Dieser ELISA ermöglicht die relative Quantifizierung von Mono- und Oligonukleosomen (fragmentierte DNA-Histon Komplexe) im Zytoplasma von Zellen und erlaubt so einen direkten Rückschluss auf die Apoptoserate der untersuchten Zellen. Nach Depletion von WDR36 mit spezifischer siRNA konnte eine signifikante (siRNA1; $p<0,05$) bzw. hoch signifikante (siRNA2;

$p<0,01$) Zunahme der apoptotischen Zellen beobachtet werden. Während die Transfektion von siRNA1 zu einer $1,6 \pm 0,05$ -fachen Erhöhung an zytoplasmatischen Nukleosomen führte, konnte für siRNA2 eine $2,1 \pm 0,04$ -fache Zunahme der freien Nukleosomen im Vergleich zu der Lipofectamin-Kontrolle beobachtet werden. Transfektion von non-target siRNA resultierte in keiner merklichen Veränderung ($1,1 \pm 0,05$ -fache Erhöhung) der Apoptoserate (Abb. 16).

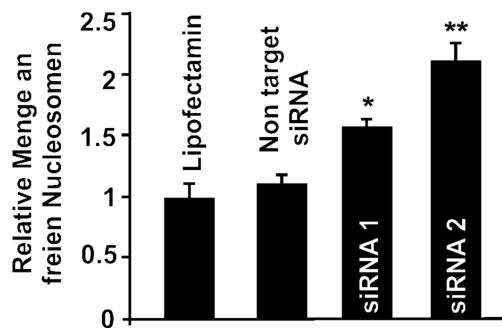


Abb. 16: Relative Menge freier Nukleosomen nach Depletion von WDR36 in HTM-N Zellen.

Die Zellen wurden mit Lipofectamin, non-target bzw. mit spezifischer WDR36 siRNA (siRNA 1 bzw. siRNA2) behandelt und anschließend die Menge freier Nukleosomen untersucht, die einen direkten Rückschluss auf die Apoptoserate der Zellen erlaubt. Behandlung mit spezifischer WDR36 siRNA (siRNA1 und siRNA2) führt zu einer signifikanten Zunahme apoptotischer Zellen. Die Daten wurden auf den Mittelwert der Lipofectamin-Kontrolle (auf den Wert 1 gesetzt) normiert. */** markieren statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Lipofectamin-Kontrolle (* $p<0,05$, ** $p<0,01$). Aus Gallenberger et al., 2010.

Basierend auf diesem Ergebnis wurden mittels qPCR die relativen Expressionsraten verschiedener Gene untersucht, die auch beim apoptotischen Zelltod reguliert sind. Die Untersuchung der Expressionsraten von BAX (BCL2-associated X protein), einem pro-apoptotischen Protein und Mitglied der BCL Proteinfamilie, zeigte nach Depletion von WDR36 mit siRNA1 eine $4,0 \pm 0,9$ -fache und somit hoch signifikante ($p<0,01$) Erhöhung der Expression verglichen mit den Lipofectamin-Kontrollen. Wiederholte Transfektion von siRNA2 resultierte ebenfalls in einer hoch signifikanten ($p<0,01$) Expressionssteigerung von BAX ($3,8 \pm 0,5$ -fach erhöht). Bei Transfektion von non-target siRNA konnte keine merkliche Veränderung der BAX mRNA Expression beobachtet werden (Abb. 17A).

Da die Expression von BAX durch den Tumorsuppressor TP53 (Tumor Protein 53, p53) reguliert ist und dieses Protein ein zentrales Molekül in der TP53 vermittelten Apoptose ist, wurde auch die relative Expression dieses Gens mittels qPCR untersucht. Der Knock-down von WDR36 mittels spezifischer siRNA resultierte in einem signifikanten

($p<0,05$) Anstieg der TP53 mRNA Expression auf das $1,7 \pm 0,3$ -fache (siRNA1) bzw. $2,3 \pm 0,5$ -fache (siRNA2) verglichen mit der Lipofectamin Kontrolle. Im Gegensatz dazu führte die Transfektion von non-target siRNA zu einer verringerten TP53 Expression ($0,7 \pm 0,07$, $p<0,05$) verglichen mit den Lipofectamin transfizierten Zellen (Abb. 17B). Zudem wurde die Expression des Gens CDKN1A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A, p21, Cip1) untersucht, welches bekannterweise von TP53 reguliert wird und als Zellzyklus-arretierendes Protein während der Caspase-3 vermittelten Apoptose gespalten wird. Mittels qPCR konnte nach Knock-down von WDR36 mit siRNA1 eine signifikante Erhöhung ($2,9 \pm 0,8$ -fach; $p<0,05$) der CDKN1A mRNA Expression im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden. Auch die Transfektion von siRNA2 resultierte in einer $3,5 \pm 1,4$ -fachen Erhöhung der CDKN1A Expression. Bei Transfektion von non-target siRNA konnte keine merkliche Veränderung der CDKN1A -Expression beobachtet werden (Abb. 17C).

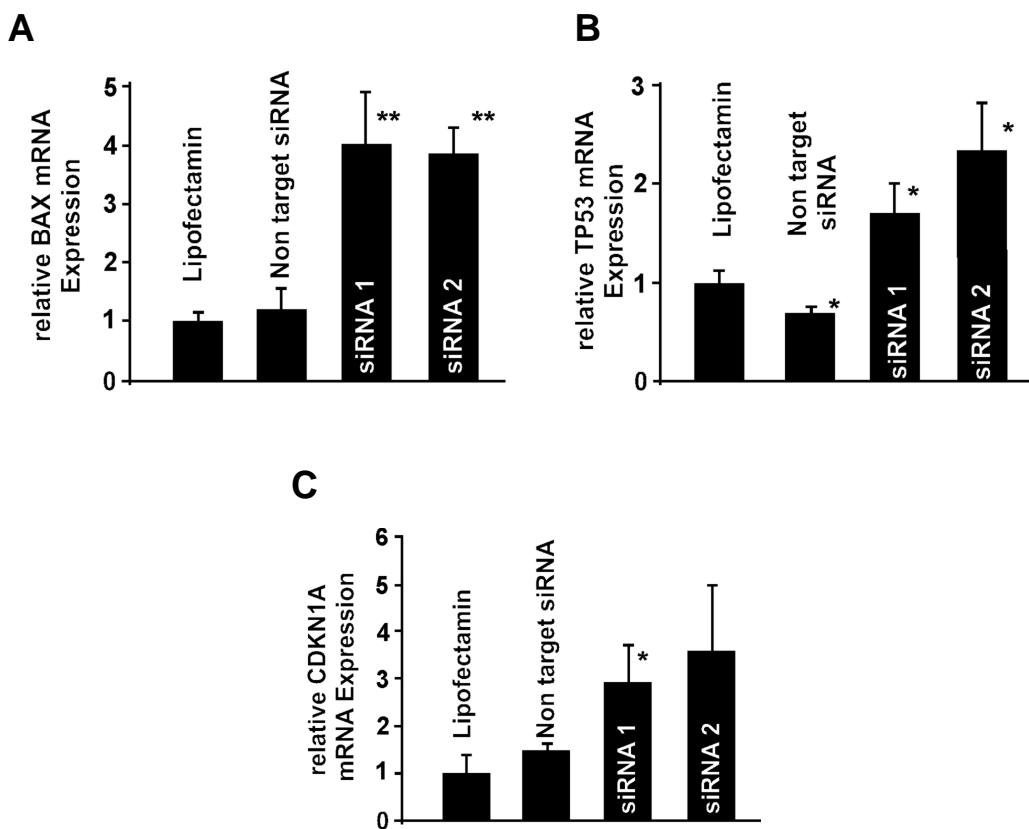


Abb. 17: Real-time RT-PCR Analyse der mRNA Expression von BAX (A), TP53 (B) und CDKN1A (C) in HTM-N Zellen nach Depletion von WDR36.

Nach Behandlung mit Lipofectamin, non-target siRNA und spezifischer WDR36 siRNA wurde die RNA isoliert und die mRNA Expression der Gene untersucht. Depletion von WDR36 führt zu einem hoch signifikanten Anstieg der BAX Expression (A, siRNA1 und 2), einer signifikanten Steigerung der TP53 Expression (B, siRNA1 und 2) sowie der Expression von CDKN1A (C, siRNA1). Die Daten wurden auf den Mittelwert der Lipofectamin-Kontrollen normiert. GNB2L diente als Referenzgen. */** markieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen und der Lipofectamin-Kontrolle ($*p<0,05$, $**p<0,01$). Aus Gallenberger et al., 2010.

Somit kann festgehalten werden, dass die Depletion von WDR36 im Zellkulturmodell zu einer Abnahme der Zellzahl auf Grund von einer Zunahme der Apoptoserate führt.

4.4.5 Northern-Blot Analysen zur Beteiligung von WDR36 an der 18S rRNA Prozessierung

Bereits von Skarie und Link (Skarie and Link, 2008) wurde gezeigt, dass WDR36 anscheinend ein funktionell zu Utp21 homologes Protein ist. Utp21 ist in *S. cerevisiae* Teil des Small Subunit Prozessoms, einem großen Ribonukleoproteinkomplex, der in die Reifung der 18S rRNA involviert ist.

Um nun die funktionelle Rolle des Proteins WDR36 bei der Reifung der ribosomalen RNA in Säugerzellen zu untersuchen, wurde der Einfluss einer Depletion von WDR36 mittels Northern-Blot analysiert.

Die Reifung der ribosomalen RNA erfolgt in Säugerzellen ausgehend vom primären Transkript (47S/45S pre-rRNA) über zwei alternative Wege in mehreren Schritten (Abb. 18). Die pre-rRNA enthält neben der 18S rRNA auch die Nukleotidsequenzen der 5.8S und der 28S rRNA. Diese rRNA-Sequenzen sind im primären Transkript flankiert von sog. External Transcribed Spacers (5'ETS und 3'ETS) und im Inneren des Transkripts durch sog. Internal Transcribed Spacers (ITS-1 und ITS-2) getrennt. Während der Prozessierung hin zu den reifen 18S, 5.8S und 28S rRNAs werden die ETS- und ITS-Regionen in mehreren Schritten abgespalten. Die ITS-1 Region verbleibt während der Reifung bis zur letzten Spaltung am 18S rRNA Transkript und erlaubt in Form einer zu diesem Bereich komplementären Sonde die Prozessierung der 18S rRNA zu verfolgen. Die 18S rRNA kann durch die ITS-1 Sonde nicht detektiert werden, wodurch auch eine Überstrahlung der Signale der reifenden 18S rRNA Vorläufer durch die hohe Kopienzahl der reifen 18S rRNA verhindert wird. Es wurde eine ITS-1 Sonde verwendet, die komplementär zum zentralen Bereich der ITS-1 Region war, so dass die 47/45S, die 41S, die 36S und 30S sowie die 21S rRNA-Vorläufer detektiert werden konnten. Die detektierten Banden wurden mit Hilfe des „ssRNA ladder“ Größenstandards identifiziert.

Ergebnisse

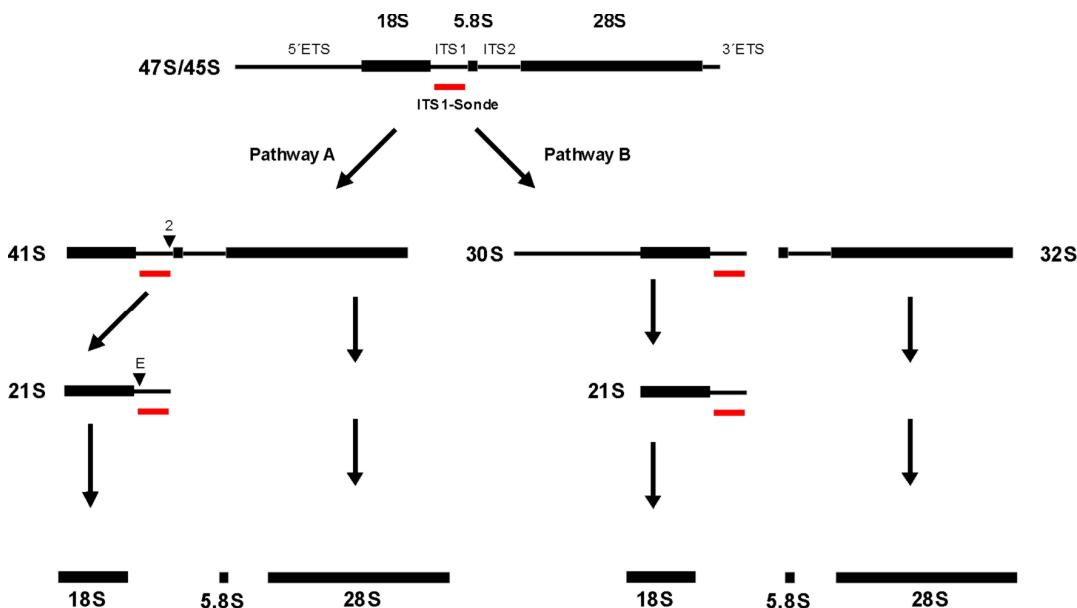


Abb. 18: Vereinfachte schematische Darstellung der rRNA Prozessierung in humanen Zellen.

Bei allen rRNA Vorläufern, an die die verwendete ITS-1 Sonde binden kann, wurde diese ins Schema integriert (rot). Adaptiert aus Hadjilová et al., 1993, Rouquette et al., 2005 und Mullineux und Lafontaine, 2012.

Wie erwartet, hybridisierte die ITS-1 Sonde mit allen oben genannten rRNA-Vorläufern. Es wurde zudem eine weitere Bande auf Laufhöhe der 28S rRNA detektiert. Vergleiche der Nukleotidsequenzen der ITS-1 Sonde und der 28S rRNA ergaben, dass gewisse Bereiche eine hohe Sequenzhomologie aufweisen, so dass es sich bei der zusätzlichen Bande wohl um 28S rRNA handelt, welche auf Grund der hohen Kopienzahl und der Sequenzhomologie markiert wurde.

Nach dreifacher Transfektion von WDR36-spezifischer siRNA konnte eine relative Abnahme der Intensität des 21S rRNA Vorläufers im Vergleich zur Lipofectamin-Kontrolle beobachtet werden. Die Bande scheint im Gel zudem etwas niedriger zu laufen. Das kann dadurch erklärt werden, dass die Schnittstellen im 3'Bereich der aus 18S und ITS-1 bestehenden 21S rRNA nicht eindeutig definiert ist und somit eine heterogene Spezies von 21S rRNA entstehen kann, die eine breite Lauffront aufweist. Außerdem konnte eine Zunahme der Signalintensität im Bereich der 30S rRNA detektiert werden. Die 30S rRNA ist in Pathway B direkter Vorläufer der 21S rRNA. Es konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich bei dieser Zunahme der Signalintensität um Akkumulierung von 30S rRNA handelt oder ob knapp oberhalb der 30S rRNA Bande eine zusätzliche Bande entstand.

Wiederholte Transfektion von non-target siRNA resultierte in keiner auffälligen Veränderung der Prozessierung der 47S/45S pre-rRNA hin zur 21S rRNA im Vergleich zur Lipofectamin-Kontrolle (Abb. 19).

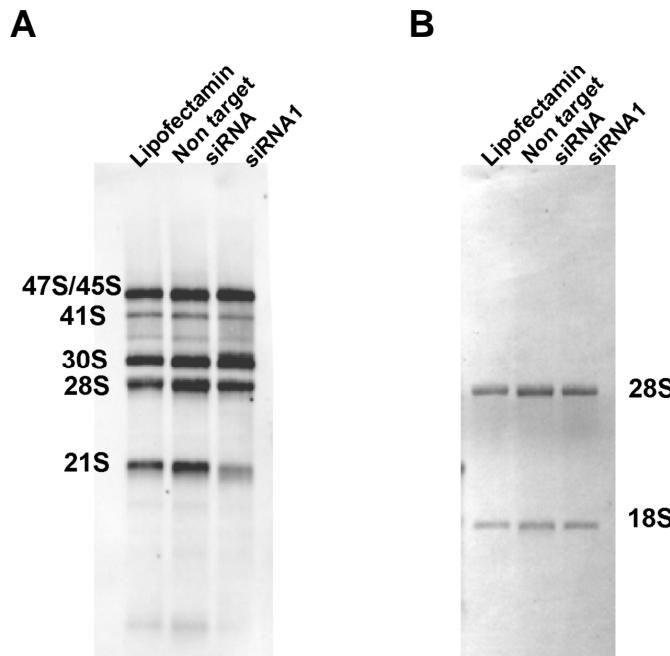


Abb. 19: Northern-Blot Analyse der rRNA Prozessierung nach Depletion von WDR36 in HTM-N Zellen.

HTM-N Zellen wurden mit Lipofectamin, non-target siRNA und spezifischer WDR36 siRNA behandelt, die RNA isoliert und mittels Northern-Blot analysiert. Nach Depletion von WDR36 mit siRNA1 zeigt sich eine deutliche schwächere Bande beim 21S rRNA Vorläufer im Vergleich zu den Kontrollen (A). Die Methylenblau-Färbung des Blots dient als Kontrolle für gleichmäßige Beladung (B). Aus Gallenberger et al., 2010.

Die Ergebnisse der Northern-Blot Analysen deuten somit auf eine Beteiligung von WDR36 bei der Prozessierung von ribosomaler RNA hin.

4.4.6 Pulse-Chase Analysen zur Beteiligung von WDR36 an der 18S rRNA Prozessierung

Da die Northern-Blot Analysen auf einen Einfluss von WDR36 bei der Prozessierung von ribosomaler RNA hinwiesen, wurden diese Effekte mittels Pulse-Chase Experimenten genauer betrachtet. Während die Northern-Blot Analysen nur eine stationäre Betrachtung der Effekte einer Depletion von WDR36 auf die Ribosomenbiogenese erlauben, ermöglichen Pulse-Chase Experimente auch eine

zeitliche Auflösung zellulärer Prozesse. Somit können mittels Pulse-Chase auch zeitliche Änderungen in der Prozessierung der rRNA sichtbar gemacht werden.

In den durchgeführten Experimenten wurden die HTM-N Zellen nach Depletion von WDR36 mit radioaktivem Methyl-[³H]-L-Methionin inkubiert. Wegen des hohen Methioninumsatzes in Zellen wird dieses zu S-Adenosyl-Methionin (SAM) adenyliert und kann dann im SAM-Zyklus zur Methylierung verschiedener Substrate dienen. Da ribosomale RNA kotranskriptionell stark methyliert wird, erfolgt ein massiver Einbau des markierten Methionins in die ribosomale pre-RNA und ermöglicht somit deren Prozessierung zeitlich zu verfolgen.

Nach einem 30-minütigen Puls mit radioaktivem Methyl-[³H]-L-Methionin wurde das Medium mit radioaktivem Substrat durch Medium mit unmarkiertem Substrat ersetzt und die Reaktion nach 15, 30 bzw. 60min abgestoppt.

Wie exemplarisch in Abb. 20 (A: Übersicht, B: Detail) zu sehen ist, war nach 15-minütigem Chase bei siRNA2 (siRNA1 fehlt) deutlich geringere Mengen an markierter 18S rRNA im Vergleich zu der Lipofectamin und der non-target Kontrolle detektierbar. Auch nach 30min Chase-Zeit war sowohl bei siRNA1 als auch bei siRNA2 eine deutlich geringere Menge markierter 18S rRNA feststellbar, was eine Verzögerung der rRNA Prozessierung begründet durch die Depletion von WDR36 vermuten lässt. Wiederholte Transfektion von non-target siRNA resultierte in keiner auffälligen Veränderung der rRNA-Prozessierung im Vergleich zur Lipofectamin-Kontrolle (Abb. 20A: Übersicht bzw. B: Detail).

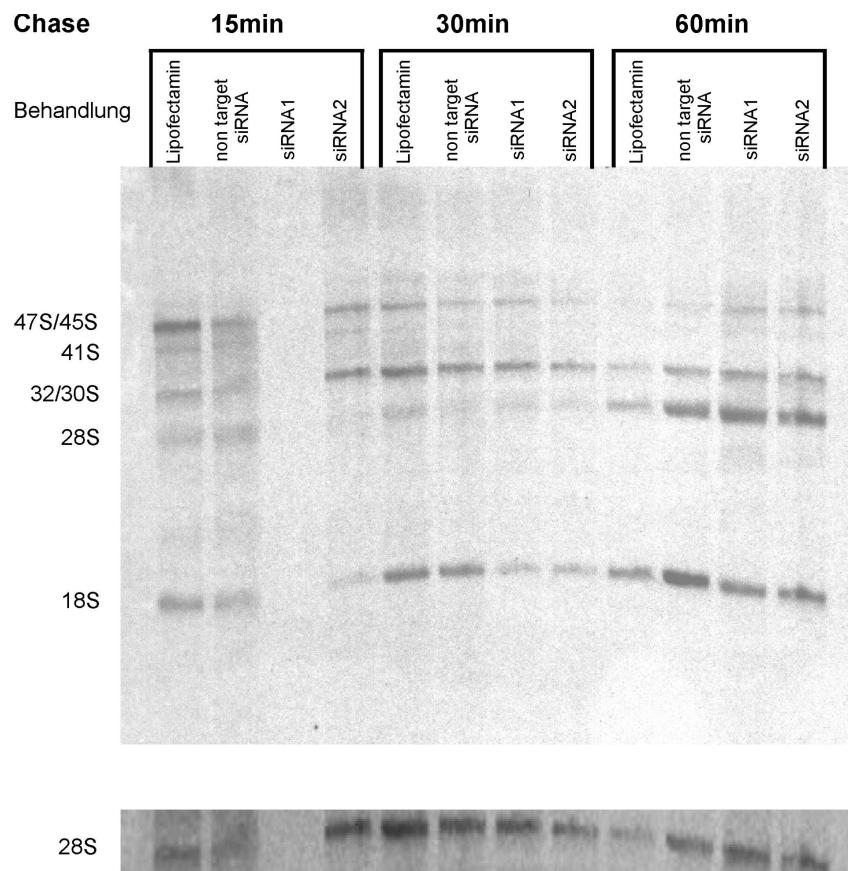
Bei einer Chase Zeit von 60min war bei allen Zellen nur noch ein geringer Unterschied in der Intensität der markierten 18S rRNA detektierbar. In den mit spezifischer siRNA transfizierten Zellen war jedoch im Vergleich zu der Lipofectamin und der non-target Kontrolle noch ein deutlich stärkeres Signal auf Höhe der 47S/45S rRNA Bande zu ermitteln, was den verzögerten Abbau der markierten pre-rRNA anzeigt (Abb. 20 A: Übersicht bzw. B: Detail). Zudem konnte nach 60min eine Veränderung des Verhältnisses der produzierten 28S zur 18S rRNA festgestellt werden.

In den Pulse-Chase Experimenten wurden teilweise bei den Lipofectamin und den non-target Kontrollen geringe Unterschiede bei Mengen an vorhandener pre-rRNA beobachtet. Diese Unterschiede wurden als nicht relevant und als Folge der RNA Aufarbeitung bzw. als Folge geringer Ladungsfehler betrachtet.

Ergebnisse

Insgesamt wurden drei Pulse-Chase Analysen durchgeführt, die alle eine verzögerte Reifung der 18SrRNA nach Depletion von WDR36 zeigten. Der Effekt von siRNA1 war dabei stets stärker ausgeprägt.

A



B

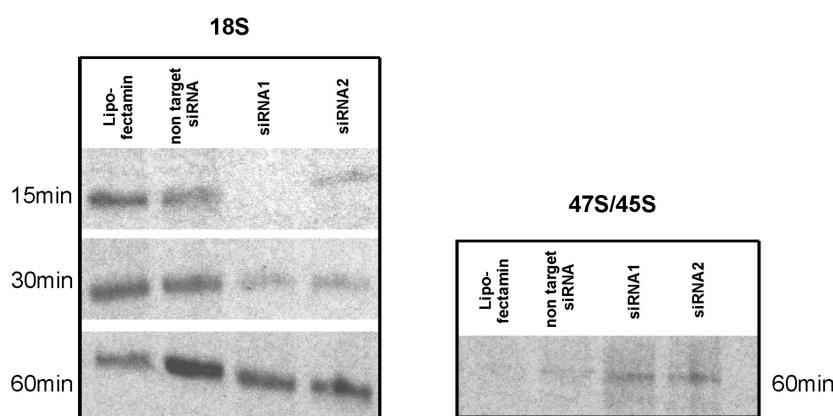


Abb. 20: Repräsentative Pulse-Chase Analyse der rRNA Prozessierung nach Depletion von WDR36 in HTM-N Zellen in Übersicht (A) und Detail (B).

HTM-N Zellen wurden mit Lipofectamin, non-target siRNA und spezifischer WDR36 siRNA behandelt und mit Methyl-[³H]-L-Methionin gelabelt. Dann wurde die RNA isoliert und mittels Northern-Blot analysiert. Nach Depletion von WDR36 mit siRNA1 und siRNA2 zeigt sich eine deutliche Verzögerung der rRNA-Prozessierung im Vergleich zu den Kontrollen. Die Methylenblau-Färbung der 28S rRNA diente als Ladekontrolle. Aus Gallenberger et al., 2010.

Die Ergebnisse der Pulse-Chase Experimente zeigten einheitlich eine Verzögerung der rRNA Prozessierung nach Depletion von WDR36 und lassen daher den Schluss zu, dass WDR36 in die Reifung der ribosomalen RNA involviert ist.

4.4.7 Untersuchung von PWP2 als möglichem Interaktionspartner von WDR36

WDR36 besitzt starke Sequenzhomologien zu Utp21 (Skaric and Link, 2008), ähnelt diesem strukturell (Footz et al., 2009) und ist gemäß der Ergebnisse dieser Arbeit als nukleoläres, in die 18S rRNA Prozessierung involviertes Protein scheinbar auch funktionell homolog zu Utp21. Somit wäre es ein Bestandteil des Utp- β Subkomplexes im Nukleolus der Zelle und würde mit anderen Komponenten dieses Subkomplexes interagieren. Ein weiteres Protein dieses Subkomplexes, das eine direkte Interaktion mit Utp21 eingeht, ist Pwp2/Utp1 (Lim et al., 2011). Pwp2 ist in allen Eukaryoten konserviert und an der Ribosomenbiogenese beteiligt (Dosil and Bustelo, 2004). Ferner ist es nachweislich im Nukleolus humaner Zellen lokalisiert (<http://www.lamondlab.com/NOPdb3.0/>; vergleiche auch Abb. 11B).

Daher sollte mittels Co-Immunopräzipitation untersucht werden, ob PWP2 ein Interaktionspartner von WDR36 ist. Zur Überprüfung der Bindungsaffinität von WDR36 zu PWP2 wurden HTM-N Zellen und die generierte Überexpressionszelllinie (siehe hierzu 4.3) verwendet. Die Immunopräzipitationen wurden an Zelllysaten durchgeführt und nachfolgend mittels Western-Blot Analyse untersucht.

In den vorgenommenen Untersuchungen konnte jedoch keine Bindungsaffinität von PWP2 zu WDR36 gezeigt werden. Da der WDR36 Antikörper, obwohl er in immunzytochemischen Färbungen ein definiertes Signal lieferte, in Western-Blot Analysen nicht funktioniert, kann jedoch auch ein methodisches Problem nicht ausgeschlossen werden.

4.4.8 Untersuchung von möglichen Interaktionspartnern mittels GST-Pulldown

Nachdem mittels Co-Immunopräzipitation keine eindeutige Aussage über PWP2 als möglichen Interaktionspartner getroffen werden kann, sollten GST-Pulldown Untersuchungen vorgenommen werden. Hierbei fungiert das bakteriell exprimierte Wdr36 selbst als potentieller Interaktionspartner und man umgeht die Verwendung des WDR36-Antikörpers. So wurde wie unter 3.2.7.2 beschrieben ein Expressionsplasmid generiert und in XL1-Blue-Bakterien elektroporiert. Nach Etablierung definierter Klone wurden verschiedene Expressionsansätze unternommen, da das exprimierte Protein in sog. „inclusion bodies“ abgelagert wurde. Es wurden Variationen der Kultivierungstemperatur (30-37°C), der IPTG-Konzentration (0,3-1mM) und der Inkubationsphase von 2-16h vorgenommen, jedoch wurde das rekombinante Protein stets in „inclusion bodies“ abgelagert. Die in Tao et al. (2010) beschriebene Verwendung von 10% Sarkosyl resultierte zwar in der Solubilisierung der Proteine aus den „inclusion bodies“, jedoch präzipitierten die Proteine bei geringeren Sarkosyl-Konzentrationen stets wieder, woran die Durchführung des GST-Pulldown-Assays scheiterte.

4.5 Heterozygot *Wdr36*-defiziente Mäuse

4.5.1 Phänotyp der heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäuse

Wie die Analyse des Phänotyps der *Wdr36* Knock-out Maus ergab, führt die Defizienz von *Wdr36* in homozygoten Mäusen zur Letalität während der frühen Embryonalentwicklung.

Heterozygote *Wdr36*-defiziente Mäuse sind dagegen lebensfähig und fertil. Eine Analyse des Phänotyps dieser heterozygoten *Wdr36*-defizienten Tiere wurde von Dr. Markus Kröber und Loreen März durchgeführt. Hierbei konnte mittels Northern-Blot Analysen geringere Mengen von *Wdr36* mRNA Transkripten in Gehirn, Herz, Leber und Niere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren ermittelt werden. Auch die qPCR-Analyse verschiedener okulärer Gewebe ergab eine eindeutige Reduktion der *Wdr36* Transkriptionsraten in heterozygoten Tieren. Ob die verringerte Transkription des Gens *Wdr36* bei heterozygoten Mäusen auch in verringerten Proteinmengen resultiert, ist bislang unklar, da für Mausgewebe kein spezifischer Antikörper zur Western-Blot Analyse oder für immunhistochemische Färbungen verfügbar ist. Morphologische Untersuchungen der heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäuse ergaben jedoch keinen auffälligen okulären Phänotypen. So sind keine strukturellen Veränderungen des Kammerwinkels, der Retina oder auch des Sehnervs festzustellen. Ebenso konnte in Tieren im Alter von einem Jahr kein eindeutiger Unterschied in der Anzahl der Axone im Sehnerv ermittelt werden. Weiterhin war in heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen kein Unterschied beim Augeninnendruck feststellbar (Dr. Markus Kröber und Loreen März, unveröffentlichte Daten). Da zum einen ein erhöhter Augeninnendruck als eindeutigster Risikofaktor gilt und zum anderen eine Exkavation des Sehnervs und der progrediente Verlust von Axonen der retinalen Ganglienzellen charakteristisch für ein Glaukom sind, kann somit davon ausgegangen werden, dass heterozygote *Wdr36*-defiziente Mäuse kein Glaukom ausbilden.

Die persönliche Untersuchung der *Wdr36* Expressionsraten im Auge adulter Mäuse bestätigte eine verringerte Menge an *Wdr36* Transkripten. Hierzu wurde die RNA aus dem Auge inklusive der Linse isoliert, in cDNA transkribiert und die Expression von *Wdr36* im Vergleich zur LaminA Expression ermittelt. Die Ergebnisse der qPCR

ergaben eine ca. 50% geringere Transkriptionsrate ($0,51 \pm 0,12$ -fache relative Wdr36 mRNA Expression; $p<0,05$) verglichen zu Wildtyp-Kontrollaugen (Abb. 21).

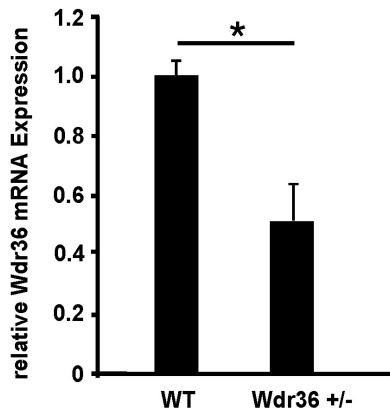


Abb. 21: Relative Wdr36 mRNA Expression im Auge von Wildtypen (WT) und heterozygoten Wdr36-defizienten (Wdr36 $^{+/-}$) Mäusen.

Heterozygot Wdr36-defiziente Mäuse zeigen eine ca. 50% geringere Transkriptionsrate von Wdr36 mRNA. Die Daten wurden auf den Mittelwert der Wildtyp-Kontrolle normiert. LaminA diente als Referenzgen. * markieren statistisch signifikante Unterschiede ($*p<0,05$). n=6.

Somit kann festgehalten werden, dass heterozygote Wdr36-defiziente Mäuse auf mRNA Level zwar eine verringerte Expression haben, jedoch sonst kein auffälliger okulärer Phänotyp festzustellen war.

4.5.2 Analyse der rRNA Prozessierung im Auge von heterozygoten-Wdr36 defizienten Mäusen

Im Zellkulturmodell hat die Depletion von WDR36 eine Verzögerung der Prozessierung der ribosomalen RNA zur Folge. Um nun zu überprüfen, ob auch die mittels qPCR ermittelte verringerte Wdr36 mRNA Expression bei den heterozygoten Wdr36-defizienten Mäusen einen Effekt auf die Ribosomenbiogenese im Mausauge hat, wurden Northern-Blot Analysen vorgenommen. Hierfür wurde vergleichbar zum Zellkulturmodell eine mausspezifische ITS-1 Sonde (mmITS-1) generiert, welche die Prozessierung der rRNA vom 47S/45S Vorläufer hin zur 20S rRNA verfolgen lässt (Abb. 22). Die mmITS-1 Sonde hybridisierte sowohl bei Wildtyp- als auch in heterozygoten Wdr36-defizienten Tieren mit den erwarteten rRNA-Vorläufern 47S/45S,

41S, 34S und 20S (Abb. 23). Ein schwaches Signal deutet auch auf eine mögliche Hybridisierung mit dem 29S rRNA Vorläufer hin.

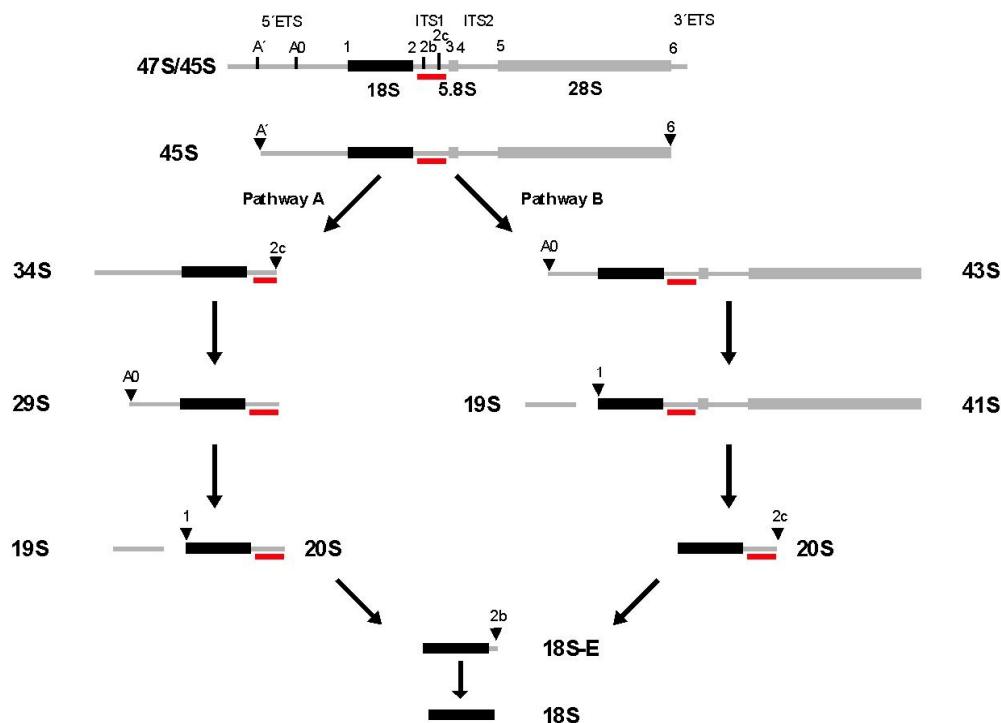


Abb. 22: Schematische Darstellung der rRNA Prozessierung zur 18S rRNA in murinen Zellen.
Bei allen rRNA Vorläufern, an die die verwendete mmITS1 Sonde binden kann, wurde diese ins Schema integriert (rot). Abbildung nach Kent et al., 2009.

Im direkten Vergleich von Wildtyp und heterozygoter *Wdr36*-defizienter Maus konnte jedoch keine auffällige Veränderung in der Prozessierung der rRNA ermittelt werden. So ergab sich statistisch weder eine verringerte Menge des 20S rRNA Vorläufers, noch konnte die Akkumulierung eines anderen rRNA Vorläufers detektiert werden.

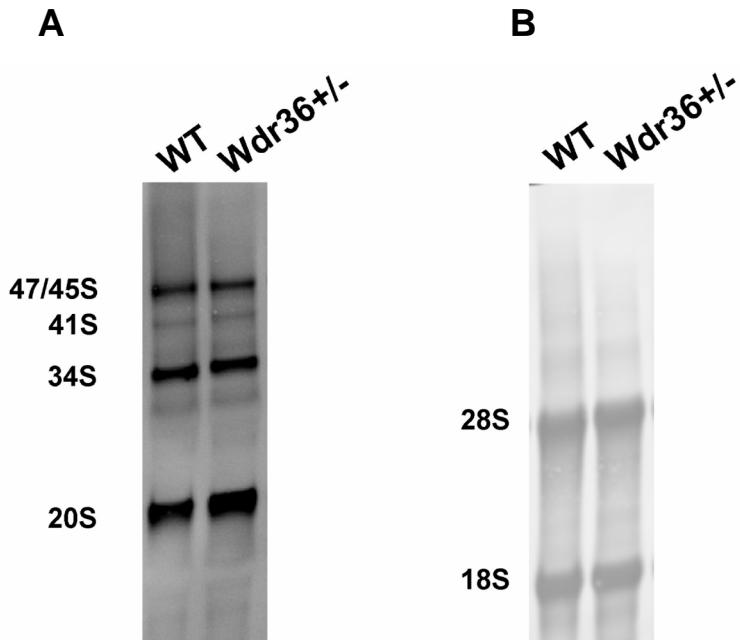


Abb. 23: Northern-Blot Analyse der rRNA Prozessierung im Mausauge von heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen (*Wdr36+/-*).

Die RNA wurde aus den Augen von Wildtyp- und heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen isoliert und mittels Northern-Blot analysiert. Im direkten Vergleich zu den Wildtyp-Tieren ist bei den heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen keine auffällige Veränderung in der rRNA-Prozessierung erkennbar. Die Methylenblau-Färbung des Blots dient als Ladekontrolle.

Eine ca. 50%ige Reduktion der *Wdr36* mRNA Expression hat im Mausauge offensichtlich keinen Einfluss auf die Prozessierung der ribosomalen RNA.

4.5.3 Untersuchung der Vulnerabilität retinaler Ganglienzellen in heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen

Während im Mausmodell homozygote *Wdr36*-defiziente Embryonen noch vor dem Blastozystenstadium absterben, ist bei heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen kein offensichtlicher Phänotyp erkennbar. Jedoch wird WDR36 auch als „genetic modifier“ gehandelt (Hauser et al., 2006), woraus sich die Hypothese ergab, dass eine verringerte WDR36 Expression im Auge unter gewissen Umständen einen Einfluss auf die Vulnerabilität der retinalen Ganglienzellen haben könnte. Um nun die Effekte einer verringerten *Wdr36* mRNA Expression im Auge *in vivo* genauer untersuchen zu können, wurden nachfolgende Schadensmodelle verwendet.

4.5.3.1 NMDA induzierte exzitotoxische Schädigung von retinalen Ganglienzellen

Zur Untersuchung einer möglichen veränderten Vulnerabilität der retinalen Ganglienzellen in heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen wurde in Zusammenarbeit mit Loreen März das Modell der exzitotoxischen Schädigung dieser Zellen durch NMDA verwendet.

Dabei wird das synthetische Glutamat analogon NMDA intravitreal ins Mausauge injiziert. Dort bindet es an Ionenkanal-gekoppelte NMDA-Glutamat-Rezeptoren, woraufhin sich diese öffnen und dauerhaft geöffnet bleiben. Dadurch kommt es zu einem exzessiven Ca^{2+} -Influx in die Zellen, und schließlich zur Induktion der Apoptose (Shen et al., 2006). Der induzierte Schaden ist relativ spezifisch, da die Expression von NMDA-Rezeptoren im Auge neben den retinalen Ganglienzellen nur in einer Subpopulation amakriner Zellen auftritt (Jakobs et al., 2007).

Zur akuten Schädigung der retinalen Ganglienzellen erhielten die Mäuse im Alter von 3-6 Monaten eine intravitreale Injektion von 3 μl NMDA (10mM) in ein Auge. In das zweite Auge der Tiere erfolgte eine intravitreale Injektion von 3 μl PBS. Drei Wochen nach Injektion wurden die Tiere getötet, die Augen enukleiert und die Sehnerven in Epon eingebettet. Anschließend wurden Semidünnschnitte der Sehnerven angefertigt und die Gesamtzahl der Axone im *N. opticus* bestimmt. Als Kontrollen zu den heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen dienten Wildtyp-Tiere, die entsprechende Injektionen erhielten.

Nach intravitrealer Injektion von PBS konnte keine offensichtliche Veränderung im Erscheinungsbild der Sehnerven verglichen mit den Sehnerven nicht injizierter Augen festgestellt werden. Die Axone im *N. opticus* waren gleichmäßig verteilt, sie lagen dicht beieinander und der Anteil an glialem Gewebe war gering. Nach intravitrealer Injektion von NMDA war die Verteilung der Axone im Sehnerv deutlich unregelmäßiger, ihre Anzahl reduziert und auch der Anteil glialen Gewebes deutlich größer. Zudem war eine deutlich intensivere Färbung der Myelinscheide der Axone feststellbar (Abb. 24).

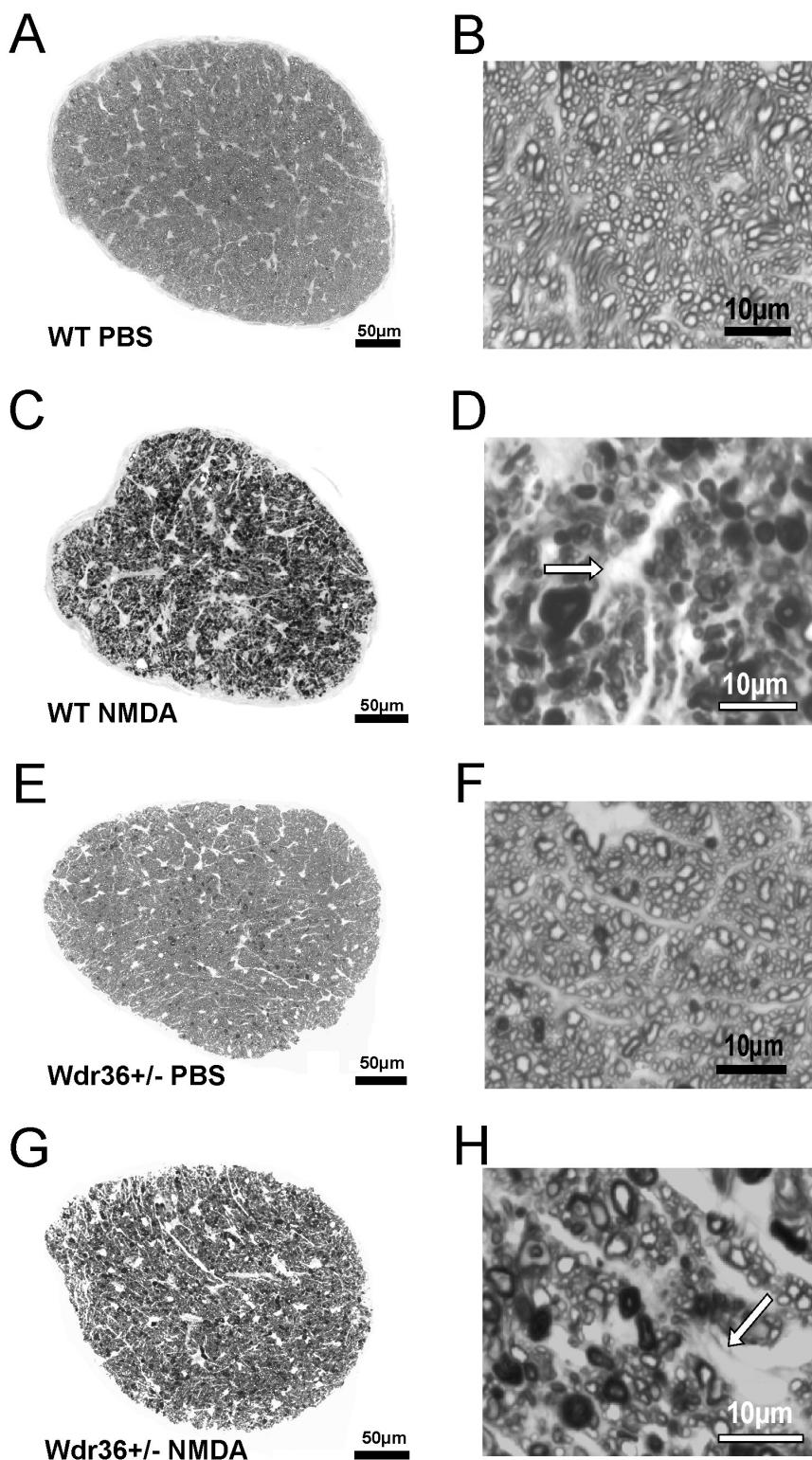


Abb. 24: Exzitotoxische Schädigung von retinalen Ganglionzellen in Wildtyp- (WT; C-D) und heterozygoten *Wdr36* defizienten (*Wdr36*+/-) Mäusen (G-H) mittels NMDA.

A-H: Exemplarische Darstellung sagittaler Semidünnschnitte durch den *Nervus opticus*. Drei Wochen nach intravitrealer Injektion von 3µl PBS zeigen sich bei lichtmikroskopischer Betrachtung keine auffälligen Veränderungen in der Morphologie des Sehnervs (WT: A bzw. im Detail B; heterozygot *Wdr36*-defizient: E bzw. im Detail F). Im Gegensatz dazu sind drei Wochen nach intravitrealer Injektion von NMDA (10mM) größere Bereiche glialen Gewebes (Pfeile) und ein Verlust an Axonen erkennbar (WT: C bzw. im Detail D; heterozygot *Wdr36*-defizient: G bzw. im Detail H).

Die Bestimmung der Anzahl der Axone im *N. opticus* nach intravitrealer Injektion von PBS ergab bei Wildtyp-Mäusen (42853 ± 1963 , n=6) und heterozygoten *Wdr36*-defizienten Tieren (43525 ± 1691 , n=5) vergleichbare Werte. Im Vergleich zu den PBS injizierten Augen waren 3 Wochen nach Injektion von NMDA sowohl bei Wildtyp- als auch bei heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen signifikant weniger Axone ($p < 0,01$) im Sehnerv vorhanden. Ein direkter Vergleich von Wildtyp-Mäusen (15320 ± 1134 , n=6) und heterozygoten *Wdr36*-defizienten Tieren (15544 ± 915 , n=5) nach Schädigung mit NMDA zeigte jedoch keine Unterschiede in der Gesamtzahl der ermittelten Axone (Abb. 25).

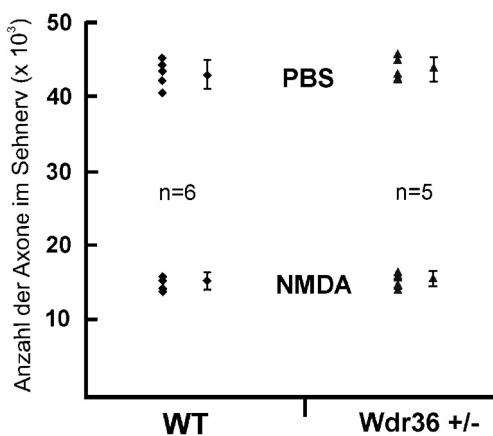


Abb. 25: Quantifizierung der Axone im *N. opticus* nach exzitotoxische Schädigung von retinalen Ganglienzellen mittels NMDA.

Drei Wochen nach Injektion von NMDA (10mM) ist ein starker Verlust von Axonen von Wildtyp (WT) und heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen (*Wdr36* +/-) im Vergleich zur PBS-Kontrolle sichtbar. Im direkten Vergleich von Wildtyp und heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen nach Injektion von NMDA ist jedoch keine auffällige Veränderung erkennbar.

4.5.3.2 Induktion eines experimentellen Glaukoms durch Vorderkammerinjektion von Polystyren-Microbeads

Als weiteres Schadensmodell wurde die Induktion eines experimentellen Glaukoms durch Vorderkammerinjektion von Polystyren-Microbeads gewählt. Wie von Cone und Kollegen (Cone et al., 2010) beschrieben wurde, können die injizierten Microbeads zur Obstruktion des uveoskleralen wie auch des trabekulären Kammerwasserabflusses führen, wodurch sich der Augeninnendruck erhöht und es zu einem Verlust von Zellen der retinalen Ganglienzellschicht kommt.

Um nun in heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen eine mögliche Veränderung der Vulnerabilität der retinalen Ganglienzellen bei erhöhtem Augeninnendruck untersuchen zu können, wurde in die Vorderkammer eines Auges Polystyren-Microbeads injiziert, während das zweite Auge der Versuchstiere als Kontrolle diente. Zwei Tage nach Injektion und anschließend wöchentlich wurde der Augeninnendruck der Tiere bestimmt (Abb. 27). Sechs Wochen nach Induktion des experimentellen Glaukoms wurden die Tiere getötet, die Augen enukleiert und die Sehnerven in Epon eingebettet. An Semidünnschnitten der Sehnerven wurde schließlich die Gesamtzahl der Axone bestimmt.

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung von Semidünnschnitten der Augen konnte festgestellt werden, dass sich die Microbeads im Kammerwinkel ablagerten. Da sich die Polystyren-Microbeads während der Epon-Einbettung auflösen, kann die Lage der einzelnen Microbeads im Auge nur mehr als helle Sphäre wahrgenommen werden (Abb. 26).

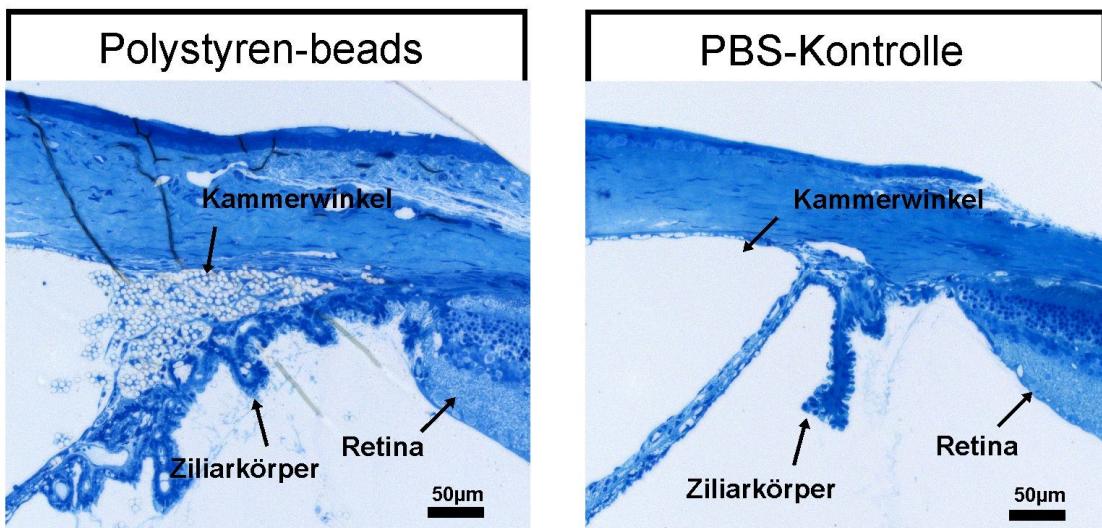


Abb. 26: Exemplarische Darstellung sagittaler Semidünnschnitte von Segmenten des vorderen Auges nach Injektion von Polystyren-Microbeads bzw. von PBS.

Nach Injektion von Polystyren-Microbeads lagern sich diese vornehmlich im Kammerwinkel des Auges ab. Sie können in der Abbildung nur mehr als helle Sphäre gesehen werden, da sie sich während der Epon-Einbettung auflösen.

Bei der Ermittlung des Augeninnendrucks zeigte sich zwei Tage nach Injektion der Polystyren-Microbeads sowohl bei Wildtyp- ($24,1 \pm 5,9$ mmHg, n=5) als auch bei heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen ($20,9 \pm 6,1$ mmHg, n=5) ein signifikant

($p<0,05$) erhöhter Augeninnendruck im Vergleich zu den Kontrollaugen (Wildtyp: $17,5 \pm 2,1$ mmHg, n=5; heterozygot *Wdr36*-defizient: $17,1 \pm 1,9$ mmHg, n=6) (Abb. 27B).

Bereits eine Woche nach Injektion der Microbeads hatte sich der Augeninnendruck jedoch wieder dem Druck der Kontrollaugen angeglichen (Abb. 27C).

Die Bestimmung der Axonzahl im Sehnerv der Tiere sechs Wochen nach Induktion des experimentellen Glaukoms zeigte jedoch keine auffällige Veränderung in ihrer Gesamtzahl. So war die Anzahl der Axone in Microbead-injizierten Augen sowohl bei Wildtyp- (41467 ± 5668 , n=5) als auch bei heterozygoten *Wdr36*-defizienten Tieren (41357 ± 3064 , n=5) jeweils vergleichbar mit den Kontrollaugen (Wildtyp: 41355 ± 962 , n=5; heterozygot *Wdr36*-defizient: 38507 ± 2213 , n=6) (Abb. 27G).

Es kann festgehalten werden, dass eine kurzzeitige Erhöhung des Augeninnendrucks keinen Effekt auf die Gesamtzahl der Axone im Sehnerv der Mäuse hatte.

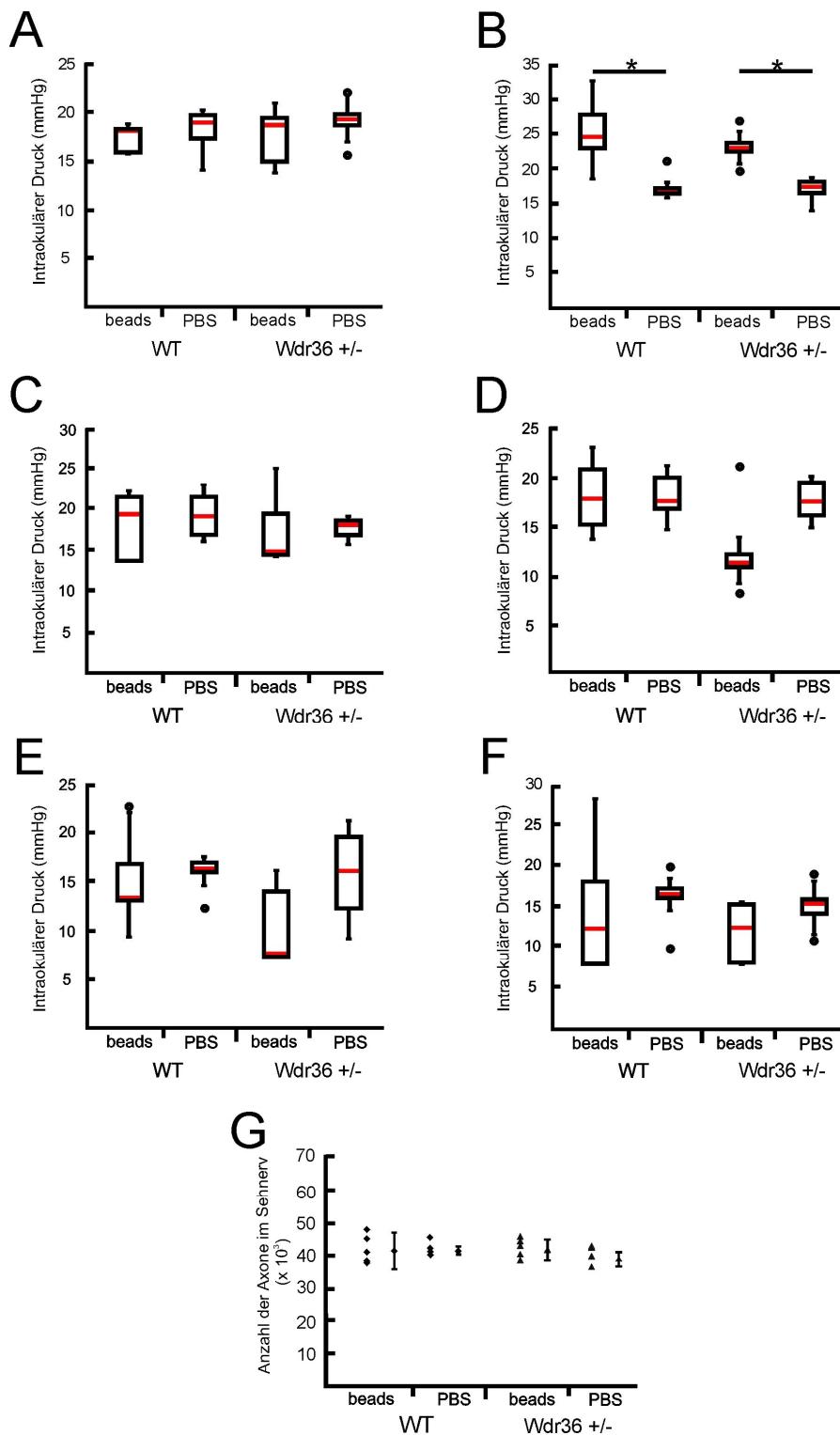


Abb. 27: Darstellung des Verlaufs des Augeninnendrucks (A-F) und Quantifizierung der Axone im Sehnerv sechs Wochen nach Injektion von Polystyren-Microbeads.

Die Abbildung zeigt den Augeninnendruck vor der Vorderkammerinjektion (A), zwei Tage nach (B), eine Woche nach (C), zwei Wochen nach (D), vier Wochen (E) sowie sechs Wochen (F) nach Injektion von Polystyren-Microbeads bzw. PBS in die Augenvorderkammer von Wildtyp (WT) und heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen (*Wdr36*+/-). Einzig zwei Tage nach Injektion der Microbeads zeigt sich ein signifikant erhöhter Augeninnendruck im Vergleich zu den Kontrollaugen. Der kurzzeitig erhöhte Augeninnendruck resultierte jedoch in keiner auffälligen Veränderung der Gesamtzahl der Axone (G). A-F: Es werden die Mediane (rot) mit Maximum und Minimum (Linien) und dem oberen sowie unteren Quartil (Balken) der Messwerte gezeigt. Abweichende Werte sind als Kugeln dargestellt. * markiert statistisch signifikante Unterschiede der Wildtyp- und *Wdr36*+/- Mäuse im Vergleich zur PBS-Kontrolle (*p<0,05). n=5 bzw. n=6 bei *Wdr36*+/-_PBS.

4.5.3.3 Induktion eines Glaukoms durch Verpaarung mit β B1-CTGF-Mäusen

Da durch intrakamerale Injektion von Polystyren-Microbeads nur eine kurzzeitige Erhöhung des Augeninnendrucks erzielt werden konnte, welcher in keiner merklichen Schädigung der retinalen Ganglienzellen resultierte, wurden in einem weiteren Ansatz Verpaarungen mit β B1-CTGF Überexpressionsmäusen vorgenommen.

In dieser von der Arbeitsgruppe von Dr. Rudolf Fuchshofer generierten Mauslinie wird CTGF (Connective Tissue Growth Factor) unter der Aktivität des linsenspezifischen chicken β B1-Promotors exprimiert. Durch Sekretion von CTGF ins Kammerwasser der Augen kommt es zu einer Modifizierung des Aktin-Zytoskeletts im Trabekelwerk und schließlich zu einer anhaltenden signifikanten Erhöhung des Augeninnendrucks. Dies wiederum führt bei den transgenen Tieren zu einer kontinuierlichen Abnahme der Gesamtzahl der Axone im Sehnerv. Ansonsten lassen sich keine morphologischen Veränderungen im Auge feststellen. Somit zeigt dieses Tiermodell essentielle Charakteristiken des primären Offenwinkelglaukoms beim Menschen (Junglas et al., 2012).

Durch Verpaarung der heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäuse mit β B1-CTGF Überexpressionsmäusen sollten nun die Effekte einer verringerten *Wdr36* mRNA Expression bei anhaltender Erhöhung des Augeninnendrucks untersucht werden.

Hierzu wurden diese *Wdr36+/-* β B1-CTGF-Mäuse im Alter von 3 Monaten getötet und die Gesamtzahl der Axone im *N. opticus* bestimmt. Als Kontrollen zu den *Wdr36+/-* β B1-CTGF-Mäusen dienten β B1-CTGF Überexpressionsmäuse, sowie Wildtyp-Tiere. Die Überprüfung des Augeninnendrucks der Mäuse im Alter von 3 Monaten ergab sowohl bei den β B1-CTGF Mäusen ($18,1 \pm 2,2$ mmHg, n=6) als auch bei *Wdr36+/-* β B1-CTGF ($18,1 \pm 1,7$ mmHg, n=6) jeweils einen signifikant ($p<0,01$) höheren Augeninnendruck verglichen mit Wildtyp-Tieren ($15,6 \pm 1,8$ mmHg, n=6) (Abb. 28B).

Die Betrachtung der Semidünnschnitte der Sehnerven zeigte sowohl bei den Kontrollen als auch bei den *Wdr36+/-* β B1-CTGF-Mäusen eine gleichmäßige Verteilung der Axone im *N. opticus* (Abb. 28A). Die Auswertung der Gesamtzahl der Axone in den Sehnerven ergab eine signifikant ($p<0,01$) geringere Menge an Axonen bei den β B1-CTGF- (38469 ± 2319 , n=6) und den *Wdr36+/-* β B1-CTGF-Mäusen (37840 ± 3365 , n=6) verglichen mit den Wildtyp-Mäusen (44017 ± 2280 , n=6). Ein direkter Vergleich der beiden transgenen Mausgruppen ergab jedoch keinen statistisch relevanten Unterschied in der Anzahl der Axone (Abb. 28C).

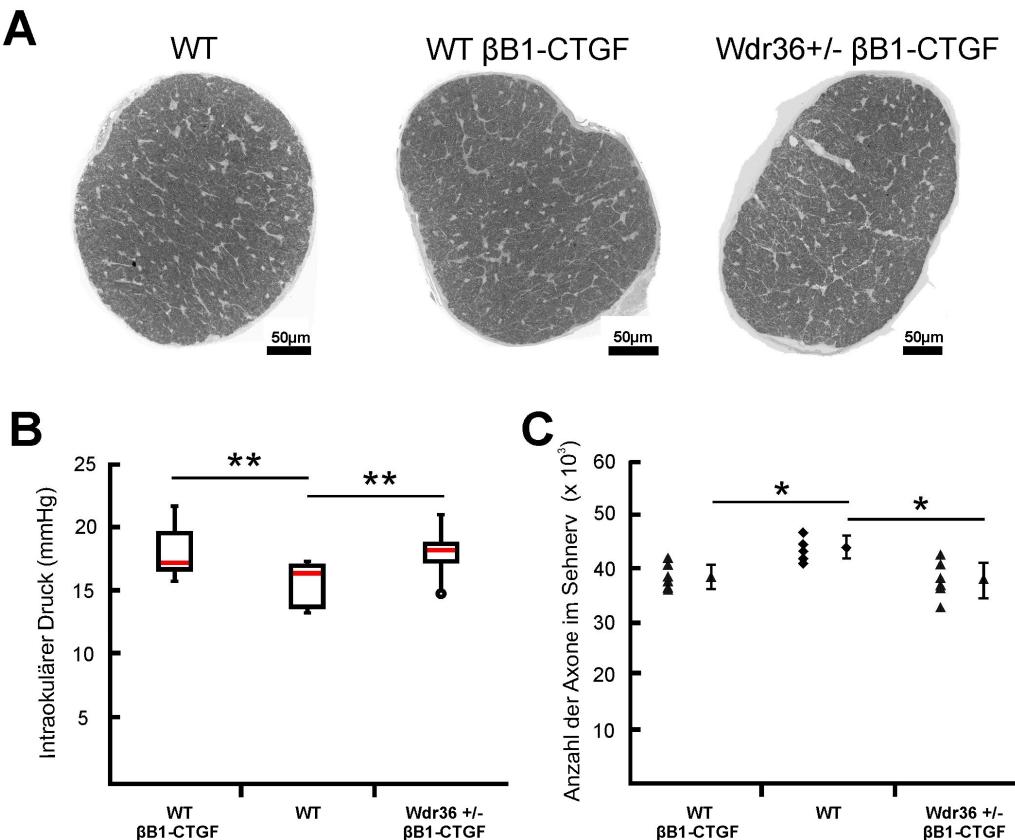


Abb. 28: Kreuzung der heterozygoten Wdr36-defizienten Mäuse mit βB1-CTGF Überexpressionsmäusen.

Exemplarische Darstellung von Semidünnsschnitten durch Sehnerven von 3 Monate alten Mäusen (A). Eine gleichmäßige Verteilung der Axone ist zu sehen. Die Bestimmung des Augeninnendrucks von 3 Monate alten Tieren (B) zeigt eine signifikante Erhöhung bei den CTGF-transgenen Tieren (WT_{βB1-CTGF} bzw. Wdr36^{+/−}_{βB1-CTGF}) im Vergleich zu den Wildtypen (WT). Die Quantifizierung der Axone im Sehnerv (C) der Tiere ergibt signifikant weniger Axone bei den CTGF-transgenen Tieren (WT_{βB1-CTGF} bzw. Wdr36^{+/−}_{βB1-CTGF}) im Vergleich zu den Wildtypen (WT), jedoch keine statistisch relevanten Unterschiede im direkten Vergleich der beiden CTGF-transgenen Gruppen. */** zeigen statistisch signifikante Unterschiede an (*p<0,05, **p<0,01). n=6.

Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, dass die linsenspezifische Überexpression von CTGF zwar zu einer Abnahme der Axone im *N. opticus* basierend auf der Schädigung der Axone durch einen erhöhten Augeninnendruck führt. Jedoch führt eine verringerte Wdr36 mRNA Expression zu keiner weiteren Veränderung der Vulnerabilität der retinalen Ganglienzellen.

4.6 Untersuchungen zur pCAGGS-Wdr36 Del605-607-Mauslinie

Die pCAGGS-Wdr36 Del605-607-Mauslinie wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Takeshi Iwata (Division of Molecular and Cellular Biology, National Institute of Sensory Organs, National Hospital Organization, Tokyo, Japan) generiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Diese Überexpressions-Mauslinie exprimiert eine mutierte Variante von Wdr36, der die Aminosäuren 605-607 fehlen, unter der Aktivität des CMV Enhancer/chicken- β -actin-Promoters (pCAGGS). Die Mutation ist der D658G Mutation nachempfunden, welche in mehreren Studien in POWG Patienten gefunden wurde. Untersuchungen an dieser Mauslinie zeigten, dass in 16 Monate alten Tieren die periphere Retina signifikant (25%) dünner ist als in den zugehörigen Kontrollen. Auch wird von einem Verlust an retinalen Ganglienzellen in diesem Bereich der Retina, sowie von kürzeren axonalen Ausläufern der retinalen Ganglienzellen berichtet (Chi et al., 2010b).

Daher wurde diese Mauslinie ausgewählt, um weitere Untersuchungen zur Funktion von Wdr36 im Mausauge vorzunehmen.

4.6.1 Genetic rescue

In einem ersten Ansatz sollte ermittelt werden, ob die Überexpression von mutiertem Wdr36 die homozygoten *Wdr36*-defizienten Embryonen vor der frühen Degeneration bewahren kann. Hierzu wurden heterozygote *Wdr36*-defiziente Mäuse mit pCAGGS-Wdr36 Del605-607 transgenen heterozygoten *Wdr36*-defizienten Tieren verpaart und der Genotyp der Nachkommen mittels PCR bestimmt. Die Expression von Wdr36 Del605-607 wird in den transgenen Tieren vom pCAGGS-Promoter reguliert, welcher entwicklungsbiologisch bereits nach dem 2-Zellstadium und ubiquitär aktiv ist (Okabe et al., 1997). Jedoch konnten aus diesen Verpaarungen keine homozygoten *Wdr36*-defizienten *Wdr36*-Del605-607 exprimierenden Mäuse erhalten werden.

Um eine mögliche Veränderung des Phänotyps basierend auf der Überexpression der mutierten Wdr36 Variante zu untersuchen, wurden im nächsten Schritt die Zygoten isoliert und in Microdrop-Kulturen über mehrere Tage hinweg kultiviert. Um den Entwicklungsverlauf zu dokumentieren, wurden die Embryonen täglich fotografiert, am Tag 4,5dpc schließlich vereinzelt und lysiert. Der Genotyp wurde anhand zweier Nested-PCR Strategien bestimmt. Neben der Nested-PCR Strategie, die schon zur

Analyse des Phänotyps der homozygoten *Wdr36*-defizienten Embryonen verwendet wurde, wurde eine weitere Nested-PCR Strategie entwickelt, die die Unterscheidung transgener Del605-607 Embryonen von Wildtypen zulässt. Basierend auf der *Wdr36* mRNA Sequenz wurden Primer generiert, die im Exonbereich binden und zwischen denen mehrere Exon-Intron Grenzen liegen, um unspezifische Signale von der genomischen *Wdr36*-Sequenz ausschließen zu können. Während bei den Wildtyp-Embryonen kein Signal detektierbar ist, resultiert die Nested-PCR in transgenen Tieren in der Amplifikation eines 359bp langen Fragments. Von den 135 kultivierten Zygoten konnte 117 ein Genotyp zugewiesen werden. So wurden 11 Wildtypen, 17 Wildtyp_Del605-607, sowie 33 heterozygote *Wdr36*-defiziente und 38 heterozygote *Wdr36*-defiziente_Del605-607 Embryonen erhalten. Zudem konnten 15 Embryonen als homozygot *Wdr36*-defizient und 8 als homozygot *Wdr36*-defizient_Del605-607 identifiziert werden. Während die transgenen und nicht transgenen Wildtyp- und heterozygoten Embryonen zum Zeitpunkt 4,5dpc das Blastozystenstadium erreicht hatten, zeigten die homozygoten *Wdr36*-defizienten Del605-607 Embryonen einen Phänotyp vergleichbar mit dem der homozygoten *Wdr36*-defizienten Embryonen. Es bildete sich kein Blastocoel aus, stattdessen lösten sich die Zellen von der *Zona pellucida* und verklumpten (Abb. 29).

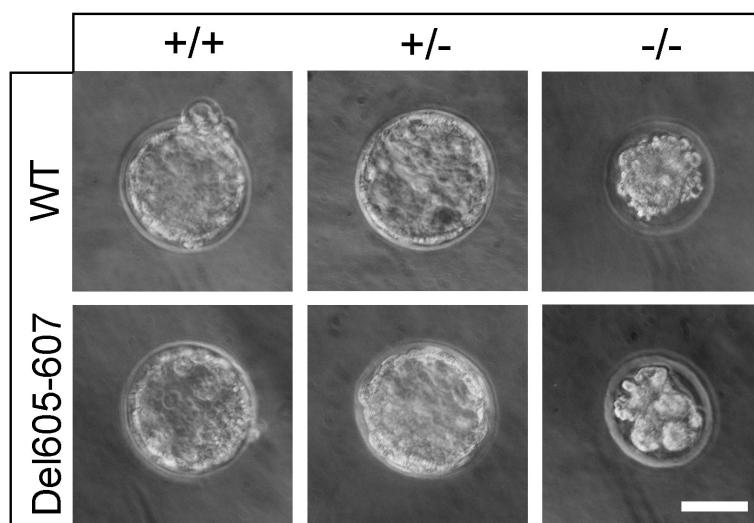


Abb. 29: Analyse des Phänotyps der Kreuzung von heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen mit heterozygoten *Wdr36*-defizienten_Del605-607 Mäusen.

Nach Verpaarung heterozygoter *Wdr36*-defizienter Mäuse mit heterozygoten *Wdr36*-defizienten_Del605-607 Mäusen wurden die Zygoten gewonnen und in Microdrop-Kulturen kultiviert. Die Entwicklung der Embryonen wurde über mehrere Tage hin verfolgt und fotografisch dokumentiert. Die Wildtyp- (+/+), die Wildtyp_Del605-607, die heterozygoten *Wdr36*-defizienten (+/-) und die heterozygoten *Wdr36*-defizienten_Del605-607 Embryonen wiesen eine normale Entwicklung auf. Die homozygot *Wdr36*-defizienten_Del605-607 Embryonen dagegen hatten einen mit den homozygot *Wdr36*-defizienten (-/-) Embryonen vergleichbaren Phänotyp. Auch bei diesen Embryonen bildete sich kein Blastocoel aus, stattdessen verklumpten die Zellen und die Embryonen degenerierten. Messbalken: 50µm

4.6.2 Phänotyp der heterozygoten *Wdr36*-defizienten Del605-607 Maus

Da die Expression der mutierten *Wdr36* Variante die homozygoten *Wdr36*-defizienten Embryonen nicht vor der Degeneration bewahren konnte, wurde im nächsten Ansatz eine erste Charakterisierung der transgenen heterozygoten *Wdr36*-defizienten Tiere (von nun an *Wdr36+/-_Del605-607* genannt) begonnen.

Eine Auffälligkeit war, dass nach Verpaarung heterozygoter *Wdr36*-defizienter Del605-607 Männchen mit heterozygoten *Wdr36*-defizienten Weibchen stets alle weiblichen Nachkommen das Transgen aufwiesen, was den Schluss zulässt, dass das Transgen im X-Chromosom der Tiere lokalisiert ist.

Erste morphologische Untersuchungen von *Wdr36+/-_Del605-607* Mäusen im Alter von 6 Wochen ergaben keinen auffälligen okulären Phänotypen. So sind im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen keine offensichtlichen strukturellen Veränderungen des Kammerwinkels, der Retina oder auch des Sehnervs festzustellen. Auch die Bestimmung der Axonzahlen im Sehnerv der Tiere ergab keine Unterschiede in ihrer Gesamtzahl. So lag die Anzahl der Axone in den Sehnerven der *Wdr36+/-_Del605-607* Mäuse bei 35185 ± 5517 ($n=4$), während sie bei Wildtyp-Tieren bei 34062 ± 3569 ($n=4$) lag (Abb. 30A).

Um die Expressionsraten des Transgens zu ermitteln, wurde die RNA aus dem Mausauge inklusive der Linse isoliert, in cDNA transkribiert und die Expression von *Wdr36* mit der Expression von LaminA abgeglichen. Die Untersuchung der *Wdr36* Expressionsraten im Auge adulter Mäuse bestätigte eine signifikant höhere Menge an *Wdr36* Transkripten in *Wdr36+/-_Del605-607* Mäusen ($p<0,05$) verglichen mit Wildtyp-Kontrollaugen (Abb. 30B). Ob die gesteigerte Transkription des Transgens bei den *Wdr36+/-_Del605-607* Mäusen auch in gesteigerten Proteinmengen resultiert, ist bislang noch unklar.

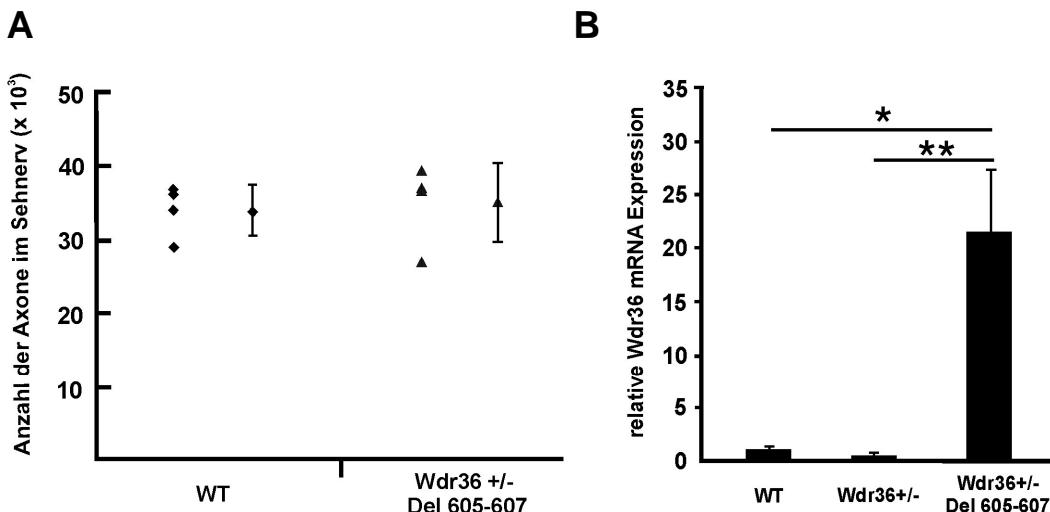


Abb. 30: Analyse der Anzahl der Axone im Sehnerv (A) bzw. der relativen okulären Wdr36 mRNA Expression von *Wdr36^{+/−}_Del605-607* Mäusen (B).

A, Die Quantifizierung der Gesamtzahl der Axone im Sehnerv von *Wdr36^{+/−}_Del605-607* Mäusen zeigte keinen Unterschied im Vergleich zu Wildtypen. n=4

B, Die qPCR-Analyse der Wdr36 mRNA Expression zeigte eine signifikante (verglichen mit WT-Augen) bzw. hoch signifikante (verglichen mit den heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mausaugen) Steigerung der Wdr36 Expressionsraten bei den transgenen Tieren. Die Daten wurden auf den Mittelwert der Wildtyp-Kontrolle normiert. LaminA diente als Referenzgen. Mittelwert \pm SEM. n=6 */** markieren statistisch signifikante Unterschiede (*p<0,05, **p<0,01).

Um nun zu überprüfen, ob die Überexpression der mutierten Wdr36 Variante einen Einfluss auf die auf die Ribosomenbiogenese im Mausauge nimmt, wurden Northern-Blot Analysen vorgenommen (vergleiche hierzu auch 4.5.2). Die Verwendung der mausspezifischen ITS-1 Sonde (mmITS-1) zeigt im direkten Vergleich von Wildtyp, und *Wdr36^{+/−}_Del605-607* Maus jedoch keine auffällige Veränderung in der Prozessierung der rRNA (Abb. 31).

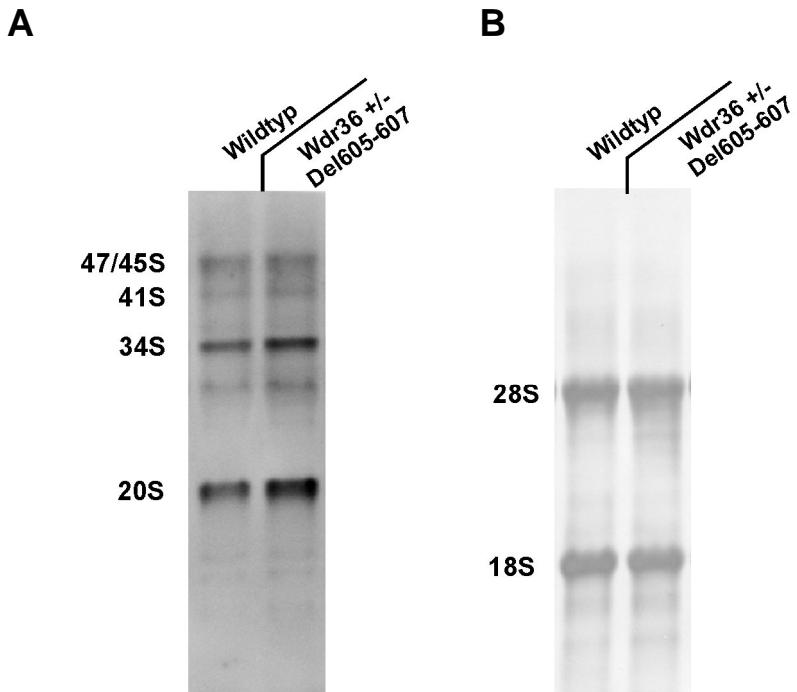


Abb. 31: Northern-Blot Analyse der rRNA Prozessierung im Mausauge von *Wdr36+/-_Del605-607* Mäusen.

Die Gesamt-RNA wurde aus den Augen von Wildtyp- und *Wdr36+/-_Del605-607* Mäusen isoliert und die rRNA Prozessierung mittels Northern-Blot analysiert. Im direkten Vergleich zu den Wildtyp-Tieren ist bei den *Wdr36+/-_Del605-607* Mäusen keine auffällige Veränderung in der rRNA-Prozessierung erkennbar (A). Die Methylenblau-Färbung des Blots (B) dient als Ladekontrolle.

4.6.2.1 NMDA induzierte exzitotoxische Schädigung von retinalen Ganglienzellen der heterozygoten *Wdr36* defizienten *Del605-607* Maus

Die mutierte *Wdr36* Variante in den transgenen Tieren ist von der D658G Mutation abgeleitet, die in mehreren Studien in POWG Patienten gefunden wurde. Um nun zu untersuchen, ob diese Sequenzvariante möglicherweise eine Veränderung der Vulnerabilität der retinalen Ganglienzellen in *Wdr36+/-_Del605-607* Mäusen bewirkt, wurde das Modell der exzitotoxischen Schädigung dieser Zellen durch NMDA verwendet.

Zur Schädigung der retinalen Ganglienzellen erhielten die Mäuse im Alter von 6 Wochen eine intravitreale Injektion von 3 μ l NMDA (10mM, gelöst in PBS) in ein Auge. In das zweite Auge der Tiere erfolgte eine intravitreale Injektion von 3 μ l PBS. Drei Wochen nach Injektion wurden die Tiere getötet, die Augen enukleiert und die Sehnerven in Epon eingebettet. Anschließend wurden Semidünnschnitte der

Ergebnisse

Sehnerven angefertigt und die Gesamtzahl der Axone im *N. opticus* bestimmt. Als Kontrollen dienten Wildtyp-Tiere, die entsprechende Injektionen erhielten.

Im Vergleich zu den PBS-Kontrollen war nach intravitrealer Injektion von NMDA die Verteilung der Axone im Sehnerv unregelmäßiger und auch der Anteil glialen Gewebes war größer.

Die Quantifizierung der Axone im Sehnerv nach intravitrealer Injektion von PBS ergab bei Wildtyp-Mäusen (35561 ± 2045) und *Wdr36+/-_Del605-607* Mäusen (34555 ± 3922) ähnliche Werte. Im Vergleich dazu waren 3 Wochen nach Injektion von NMDA sowohl bei den Wildtyp- (15256 ± 1810) als auch bei den *Wdr36+/-_Del605-607* Tieren (13898 ± 2090) signifikant ($p < 0,01$) weniger Axone im Sehnerv vorhanden. Im direkten Vergleich ergab sich jedoch kein statistisch relevanter Unterschied in der Gesamtzahl der ermittelten Axone (Abb. 32).

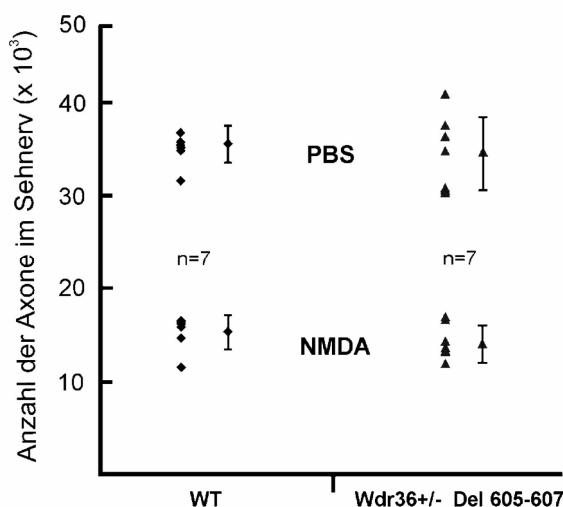


Abb. 32: Quantifizierung der Axone im *N. opticus* von *Wdr36+/-_Del605-607* Mäusen nach exzitotoxischer Schädigung von retinalen Ganglienzellen mittels NMDA.

Die Injektion von NMDA (10mM) resultiert in einem starken Verlust von Axonen bei Wildtyp (WT) und heterozygoten *Wdr36*-defizienten_Del605-607 Mäusen (*Wdr36+/-_Del605-607*) im Vergleich zu den PBS injizierten Kontrollen. Im direkten Vergleich von Wildtyp und *Wdr36+/-_Del605-607* Mäusen nach Injektion von NMDA ist jedoch keine auffällige Veränderung feststellbar. n=7.

4.7 Generierung einer konditionellen *Wdr36*-defizienten embryonalen Stammzelllinie

Wie die phänotypische Charakterisierung der konventionellen *Wdr36* Knock-out Mauslinie ergab, entwickeln sich homozygote *Wdr36*-defiziente Embryonen nur bis hin zum Morulastadium und degenerieren anschließend. Daher wurde die Generierung einer konditionellen *Wdr36*-defizienten Mauslinie beschlossen. Diese soll die Untersuchung einer (induzierbaren) zell- bzw. gewebsspezifischen Deletion von *Wdr36* ermöglichen und somit dazu beitragen den Einfluss bzw. die Effekte von *Wdr36* im Auge adulter Mäuse zu ermitteln.

4.7.1 Theoretische Überlegungen

Zur Generierung konditioneller Knock-out Mauslinien wird häufig das Cre/loxP-Rekombinasesystem benutzt. Dieses nutzt zum einen das Enzym Cre- (causes recombination) Rekombinase, das im Bakteriophagen P1 entdeckt wurde, sowie als zweite Komponente die sogenannten loxP-sites. Lox-P-sites sind 34bp lange DNA-Sequenzen, deren Rekombination durch die Cre-Rekombinase katalysiert wird. Bei gleicher Orientierung der beiden loxP-sites resultiert diese Rekombination in einer Deletion des zwischen diesen sites liegenden DNA-Bereiches (Simon et al., 2009).

Das Gen *Wdr36* besteht bei der Maus (*Mus musculus*) aus 23 Exons. Je nach Quelle werden daraus zwei (Monemi et al., 2005; www.ensembl.org) bzw. drei mRNA Isoformen (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) transkribiert. Daher sollte als erste Voraussetzung der von den loxP-sites flankierte Bereich so liegen, dass nach Rekombination der loxP-sites durch die Cre-Rekombinase alle potentiellen Isoformen betroffen sind. Weiterhin sollte der deletierbare Bereich tendenziell im Anfangsbereich (5'-Bereich) des Gens liegen. Schließlich sollte die Deletion des Genbereichs zu einem sogenannten „frame-shift“ führen, was bedeutet, dass das Leseraster des Gens verändert wird, wodurch verfrüht ein STOP-Codon entsteht und die Translation verfrüht beendet wird. Auf diese Weise soll verhindert werden, dass trotz Deletion des Genabschnitts ein trunkiertes Protein entsteht.

Da Exon5 des Gens *Wdr36* die eben genannten Bedingungen erfüllt und zudem für eines der WD-repeats des Proteins codiert, wurde die Generierung einer konditionellen

Wdr36 Knock-out Mauslinie beschlossen, bei der Exon5 von zwei loxP-sites flankiert wird. Die beiden loxP-sites werden in den angrenzenden Intronbereichen in Regionen integriert, die evolutionär wenig konserviert sind. Somit soll eine unspezifische Einflussnahme der integrierten DNA-Fragmente auf das Gen möglichst verhindert bzw. minimiert werden. Die Verpaarung dieser *Wdr36*^{Exon5 flox/flox} Mauslinie mit einer Cre-Rekombinase exprimierenden Mauslinie soll schließlich in der Rekombination der beiden loxP sites resultieren, wodurch Exon5 aus der genomischen DNA deletiert wird. Dadurch kommt es theoretisch zu einer Veränderung des Leserasters und der Entstehung eines STOP-Codons in Exon6.

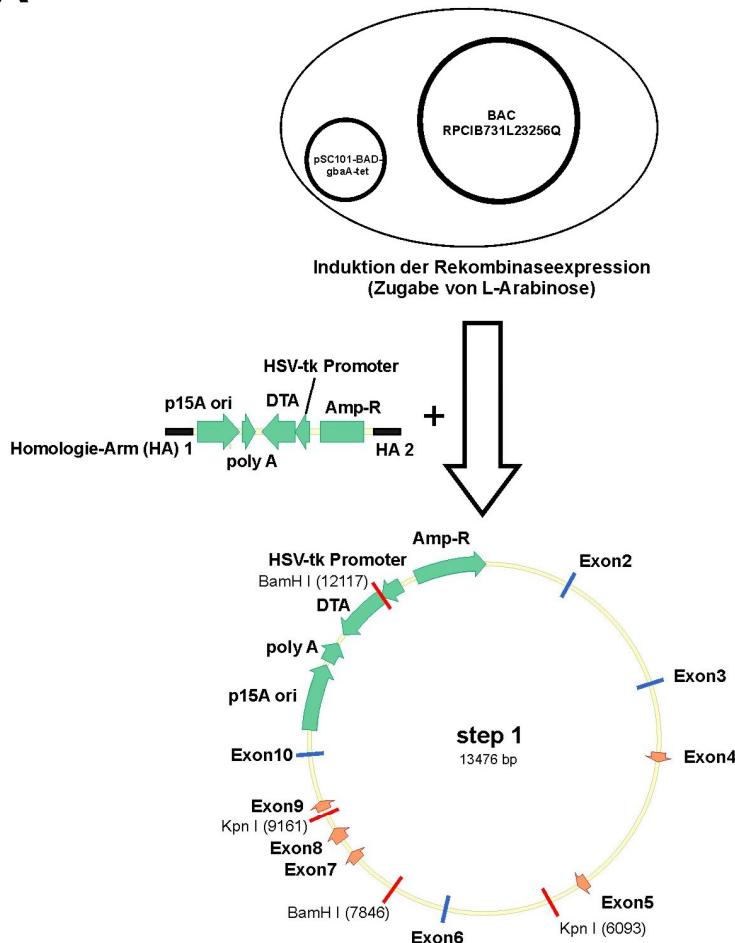
4.7.2 Generierung des Zielvektors

Zur Generierung eines Zielvektors wurde die Methode des „Recombineering“ (Recombinogenic engineering) verwendet. Recombineering bietet die Möglichkeit in *E. coli* (*in vivo*) durch homologe Rekombination gentechnische Manipulationen an DNA-Molekülen durchzuführen. Zu den Vorteilen dieser Methode zählen, dass die DNA-Manipulationen unabhängig von vorhandenen Restriktionsschnittstellen durchgeführt werden können, die Rekombinationseffizienz sehr hoch (>80%) ist sowie die Tatsache, dass auch das direkte Subklonieren und Klonieren von DNA-Fragmenten aus großen Molekülen wie z.B. BAC-Klonen möglich ist. Die homologe Rekombination in den Zellen wird hier durch die vom Phagen λ abgeleiteten Proteine Redα und Redβ katalysiert, wobei schon 35bp lange Homologiebereiche zur spezifischen Rekombination ausreichen (Muyrers et al., 2001; Muyrers et al., 2004).

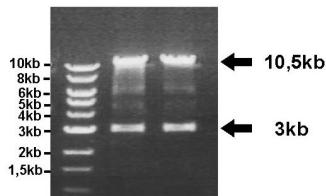
4.7.2.1 Subklonieren des zu modifizierenden genomischen Bereichs von *Wdr36*

Im ersten Schritt sollte ein definierter Bereich der genomischen *Wdr36* Sequenz aus einem BAC-Klon subkloniert werden. Hierzu wurde mittels PCR aus dem Plasmid p15A-amp-pHSVtk-DTA-rpsL-BSD der Bereich mit den Kassetten p15A-amp—pHSVtk-DTA amplifiziert und der Ansatz anschließend mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. Parallel dazu wurden Bakterien, die das BAC RPCIB731L23256Q enthalten, mit dem Plasmid pSC101-BAD-gbaA-tet elektroporiert. Durch Doppelselektion mit Chloramphenicol/Tetrazyclin wurden Klone kultiviert, die beide Vektoren enthalten und bei denen eine Arabinose-induzierbare Expression von Red α und Red β möglich ist. Nach Induktion der Red α / β -Expression wurde das aufgereinigte PCR-Amplikon elektroporiert, worauf die Kultivierung in ampicillinhaltigem Medium folgte. Durch homologe Rekombination in den Bakterien sollten Klone mit Vektoren der Größe 13476bp erhalten werden. Diese Vektoren sollten zum einen ein 10213bp großes Fragment der genomischen *Wdr36* Sequenz enthalten, in dem zentral der zu modifizierende DNA-Bereich des Gens liegt. Des Weiteren enthalten die Vektoren ein sog. „Plasmid-Backbone“ mit einem Ampicillin-Resistenzgen (Amp-R) und einem p15A origin of replication. Im „Backbone“ ist zudem eine DyphtherietoxinA (DTA) Kassette unter der Aktivität des HSV-tk-Promotors (Herpes Simplex Virus-Thymidin Kinase) enthalten, welche nach Elektroporation des finalen Vektors in embryonale Stammzellen als negativer Selektionsmarker dienen soll (Abb. 33A).

A



B



C

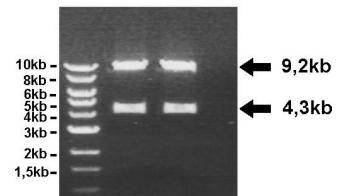


Abb. 33: Strategie zur Generierung des Vektors step1.

In Bakterien mit BAC RPCIB731L23256Q und Plasmid pSC101-BAD-gbaA-tet wurde die Expression von Reda/β durch Zugabe von L-Arabinose induziert. Die Elektroporation des Amplikons aus Plasmid p15A-amp-pHSVtk-DTA-rpsL-BSD und anschließende Selektion auf Ampicillin-haltigem Medium resultierte im Erhalt des 13476bp großen, step1 genannten Plasmids (A). Der Erhalt des geplanten Vektors wurde unter anderem durch Restriktionsverdau mit KpnI (B) und BamHI (C) überprüft.

Per Restriktionsverdau wurde schließlich der Erhalt des geplanten Vektors überprüft und bestätigt (Abb. 33B, C).

Die step1 genannten Vektoren wurden anschließend in GB05red Bakterien elektroporiert. GB05red sind genetisch modifizierte Bakterien, die eine genomische Insertion der Gene für Reda/β enthalten, deren Expression zudem unter der Kontrolle

eines Arabinose-induzierbaren Promoters steht, wodurch die Rekombinationsvorgänge in diesen Bakterien zu einem definierten Zeitpunkt aktiviert werden können.

4.7.2.2 Insertion eines Kanamycin-Resistenzgens in Vektor step1

Im zweiten Schritt wurde ein DNA-Fragment in den Intronbereich zwischen Exon4 und Exon5 des step1-Vektors insertiert. Mit den step2 Primern wurde dazu aus dem Plasmid pR6K-PGK-EM7-neo-loxP-1 ein Bereich amplifiziert, der ein Kanamycin-Resistenzgen unter der Aktivität des prokaryotischen EM7 Promoters enthält. Dieses Gen ist flankiert von zwei loxP-sites, wobei vor die erste loxP site (5' der Kanamycin-Kassette) über den Primer eine zusätzliche SmaI-Restriktionsschnittstelle eingefügt wurde. Nach Induktion der Redα/β-Expression in den GB05red Bakterien mit Vektor step1 wurde das aufgereinigte Amplikon elektroporiert und die Bakterien anschließend auf LB-Platten mit Kanamycin als Selektionsmarker ausplattiert. Durch homologe Rekombination in den Bakterien sollte nun ein 15160bp großer Vektor entstehen, welcher im Gegensatz zum step1-Vektor zwischen Exon4 und Exon5 ein von loxP-sites flankiertes Kanamycin-Resistenzgen enthält. Die korrekte Insertion des DNA-Fragments in den erhaltenen Klonen wurde mittels Restriktionsverdau überprüft (Abb. 34).

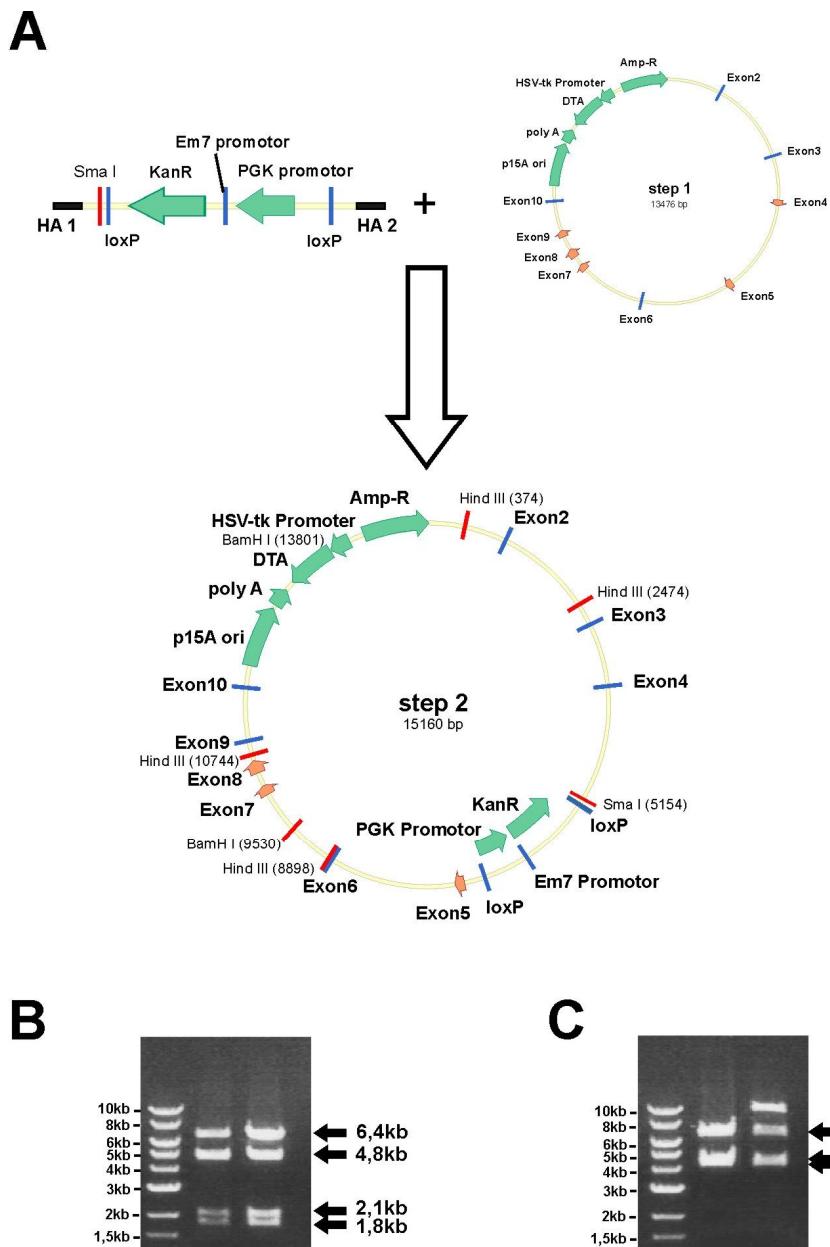


Abb. 34: Schematische Übersichtszeichnung zur Generierung von Vektor step2 (A) und zugehöriger Kontrollverdau repräsentativer Klone (B,C).

In GB05red Bakterien mit Plasmid step1 wurde die Expression von Reda/β durch Zugabe von L-Arabinose induziert. Anschließend wurde das Amplikon aus Plasmid pr6K-PGK-EM7-neo-loxP-1 elektroporiert. Durch homologe Rekombination in den Bakterien und auf Grund der Selektion auf Kanamycin-haltigem Medium wurde das 15160bp große, step2 genannte Plasmid erhalten (A). Der Erhalt von Vektor step2 wurde unter anderem durch Restriktionsverdau mit HindIII (B) und SmaI/BamHI (C) überprüft.

4.7.2.3 Rekombination der loxP-sites in Vektor step2

Im folgenden Schritt sollte der zwischen den loxP-sites liegende DNA-Bereich sowie eine der beiden loxP-sites wieder aus dem Vektor entfernt werden. Hierzu wurden die positiv getesteten Vektoren, step2 genannt, zusammen mit dem Plasmid pSC101-BAD-Cre-tet in GB05 Bakterien elektroporiert. Das Plasmid pSC101-BAD-Cre-tet enthält unter anderem eine Genkassette, die für die Cre-Rekombinase codiert. Da diese Kassette unter der Aktivität eines Arabinose-induzierbaren Promoters steht, kann die bakterielle Expression der Cre-Rekombinase zu einem definierten Zeitpunkt aktiviert werden. Durch Doppelselektion mit Ampicillin und Tetrazyclin wurden Klone gewonnen, die beide Vektoren enthielten. Nach Kultivierung einzelner Klone und der Induktion der Cre-Expression für 1h 10min bei 30°C wurden die einzelnen Kulturen zentrifugiert und eine Plasmidisolierung vorgenommen. Die gewonnenen Plasmide wurden in GB05pir Bakterien elektroporiert und auf LB_{Amp}-Platten ausplattiert. Die Expression der Cre-Rekombinase sollte in der Rekombination der beiden loxP-sites und der Excision der dazwischen liegenden Kassetten resultieren, wodurch ein 13547bp großer Vektor entsteht. Von dem im zweiten Schritt insertierten DNA-Fragment sollten nur eine loxP-site und die über PCR eingefügte SmaI-Schnittstelle verbleiben (Abb. 35A). Der Verlust des Kanamycin-Resistenzgens wurde mittels Restriktionsverdau überprüft (Abb. 35B). Zudem wurden von den erhaltenen Klonen auch Ausstriche auf LB_{Kan}-Platten vorgenommen. Bei Klonen, die auf diesen Platten nicht anwachsen konnten, konnte von einer erfolgreichen Rekombination der loxP-sites und dem Verlust der dazwischen liegenden Genkassetten ausgegangen werden.

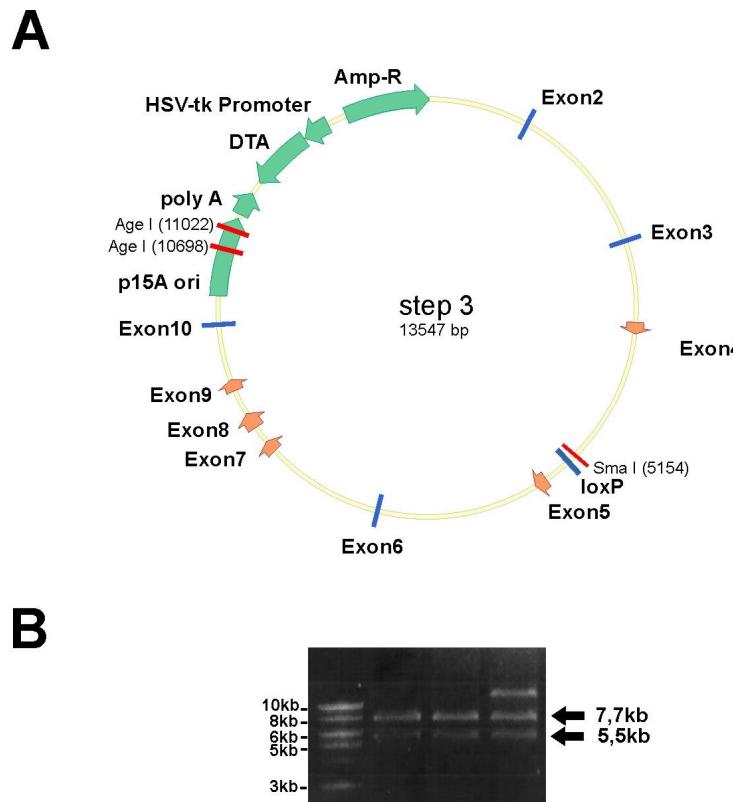


Abb. 35: Schematische Darstellung von Vektor step3 (A) und Restriktionsverdau repräsentativer Klone (B).

In GB05 Bakterien mit den Plasmiden step2 und pSC101-BAD-Cre-tet wurde die Expression der Cre-Recombinase durch Zugabe von L-Arabinose induziert. Cre-Recombinase vermittelt in diesem Ansatz die Excision des DNA-Bereichs zwischen den loxP-sites. Das resultiert im Verlust des Kanamycin-Resistenzgens und dem Verbleib einer loxP-site und der SmaI-Schnittstelle, wodurch der 13547bp große, step3 genannte Vektor entsteht (A). Der Restriktionsverdau von Vektor step3 mit SmaI/AgeI bestätigte den Erhalt des geplanten Vektors (B).

4.7.2.4 Insertion eines Chloramphenicol-Resistenzgens in Vektor step3

Im nächsten Schritt sollte in den Intronbereich zwischen Exon5 und Exon6 ein Chloramphenicol-Resistenzgen insertiert werden. Die Genkassette wurde über PCR aus dem Plasmid pR6K-cm amplifiziert. Die für die PCR verwendeten Primer waren verlängert und beinhalteten neben den Homologiearmen (HA), die zur locusspezifischen Insertion der Chloramphenicol-Kassette in den step3-Vektor nötig sind (HA1 bzw. 2), auch weitere Homologiebereiche als Vorbereitung für die Insertion eines weiteren DNA-Fragments (HA3 bzw. 4). Parallel dazu wurde in die Bakterien GB05pir mit Vektor step3 mittels Elektroporation das Plasmid pSC101-BAD-gbaA-tet gebracht. Durch anschließende Doppelselektion mit Ampicillin/Tetrazyclin konnten Klone erhalten werden, die beide Vektoren enthalten und bei denen eine Arabinose-

induzierbare Expression von Red α und Red β möglich ist. Zur Insertion des Chloramphenicol-Resistenzgens wurde in diesen Zellen die Red α/β -Expression induziert und schließlich das aufgereinigte PCR-Produkt elektroporiert. Nach Selektion auf einer LB_{Chloramph}-Platte wurden schließlich einzelne Klone gepickt und über Restriktionsverdau die spezifische Insertion des Chloramphenicol-Resistenzgens überprüft. Durch Insertion der Chloramphenicol-Kassette sollte sich der Vektor auf 15215bp vergrößern (Abb. 36).

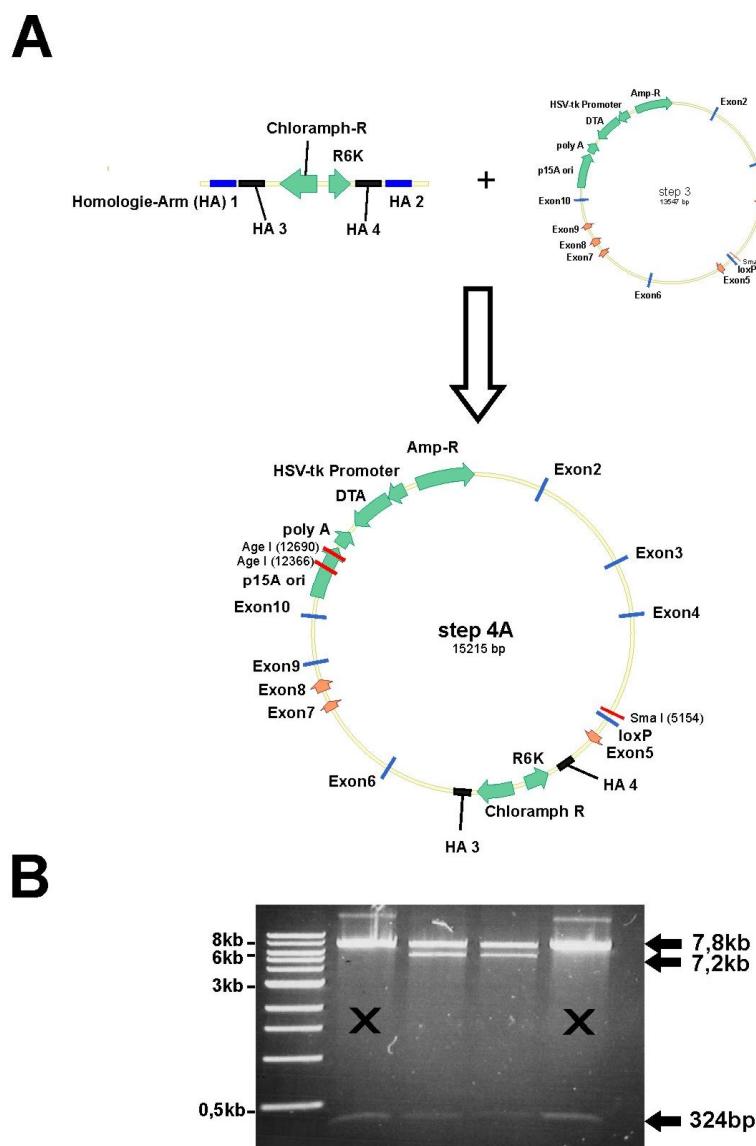


Abb. 36: Schematische Übersichtszeichnung zur Generierung von Vektor step4A (A) und zugehöriger Kontrollverdau einzelner Klone (B).

In GB05pir Bakterien mit Plasmid step3 und Plasmid pSC101-BAD-gbaA-tet wurde die Expression von Red α/β durch Zugabe von L-Arabinose induziert. Dann wurde das Amplikon aus Plasmid pR6K-cm elektroporiert. Auf Grund der durch Red α/β vermittelten homologen Rekombination in den Bakterien und durch Selektion auf Chloramphenicol-haltigem Medium wurde das 15215bp große, step4A genannte Plasmid erhalten (A). Durch Kontrollverdau unter anderem mit den Restriktionsenzymen SmaI/AgeI konnten positive Klone nachgewiesen werden (B, Spur3 und 4).

4.7.2.5 Insertion einer β -geo-Kassette in Vektor step4A

Im finalen Schritt sollte schließlich das Chloramphenicol-Resistenzgen durch ein weiteres DNA-Fragment ersetzt werden, welches durch Restriktionsverdau des Plasmids pR6K-cm-sA-IRES-lacZneo-loxP-FRT mit dem Enzym Swal gewonnen wurde. Dieses Fragment ist aufgebaut aus einer zu Homologie-Arm4 identischen Sequenz auf die eine FRT-site und weiterhin eine sog. splice-acceptor-Kassette (EN2 SA) folgt. Darauf folgt eine internal ribosomal entry site (IRES) und schließlich eine β -geo-Kassette (aufgebaut aus einer lacZ-Kassette und einem Neomycin-Resistenzgen mit einem bakteriellen Promotor) sowie eine SV40polyA-Sequenz. Schließlich folgen noch eine weitere FRT-site, eine loxP-site und eine zu Homologie-Arm3 identische Sequenz. Dieses Plasmid-Fragment wurde in GB05red Bakterien elektroporiert, welche den Vektor step4A enthielten. Da die im vorangegangenen Schritt zusätzlich insertierten Homologie-Arme HA3 und HA4 eine Sequenzhomologie zu den die β -geo-Kassette flankierenden Bereichen haben, konnte durch Induktion der Reda/ β -Expression der Austausch des Chloramphenicol-Resistenzgens durch die β -geo-Kassette bewerkstelligt werden. Nach Selektion der elektroporierten Bakterien auf Kanamycin-haltigen LB-Platten wurden einzelne Klone isoliert und daraus die Vektoren isoliert. Die korrekte Insertion des DNA-Fragments wurde über Restriktionsverdau überprüft (Abb. 37). Schließlich wurde der step4 genannte Vektor sequenziert und auf diese Weise der Erhalt des vorgesehenen Zielvektors bestätigt.

A

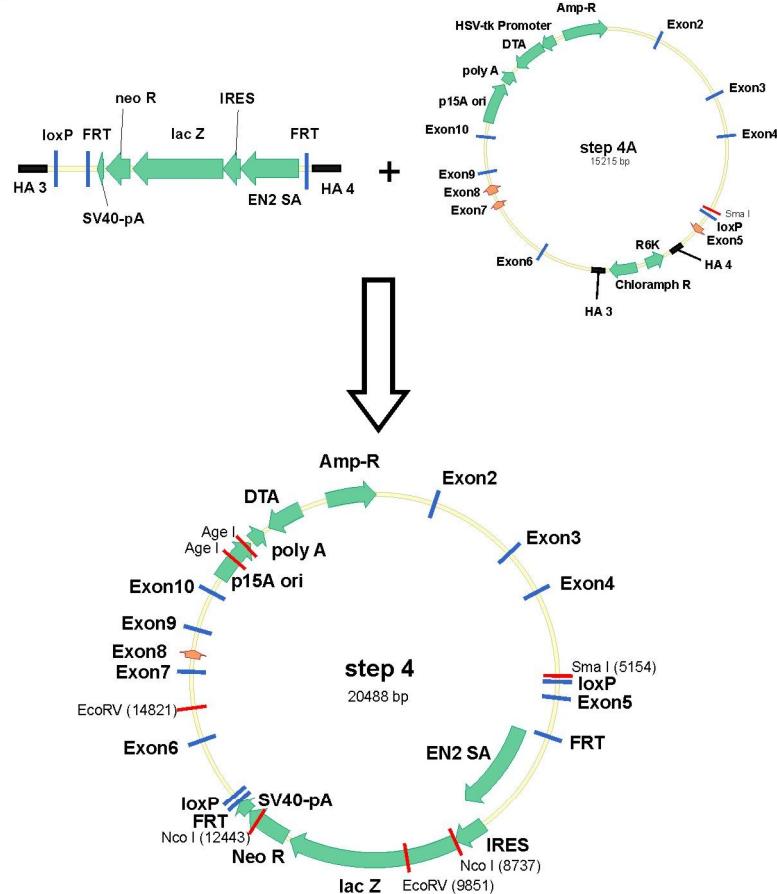


Abb. 37: Schematische Übersichtszeichnung zur Generierung des Zielvektors step4 (A) und Kontrollverdau repräsentativer Klone (B).

In GB05pir Bakterien mit Plasmid **step4A** und Plasmid **pSC101-BAD-gbaA-tet** wurde die Expression von β -Galactosidase durch Zugabe von L-Arabinose induziert. Die Elektroporation des mit **Swal**-verdauten Plasmids **pR6K-cm-sA-IRES-lacZneo-loxP-FRT** und anschließende Selektion auf Kanamycin-haltigem Medium resultierte im Erhalt des 20488bp großen, **step4** genannten Zielvektors (A). Der Restriktionsverdau von Vektor **step4** mit **EcoRV** (Spur 2-6) bzw. **Smal/Ncol** (Spur 7-11) bestätigte den Erhalt des Zielvektors in mehreren Klonen (B).

Der Zielvektor mit einer Größe von 20488bp ist aufgebaut aus einem ca. 5000bp langem Fragment der genomischen *Wdr36* Sequenz mit Exon2 bis Exon4, welche bei der homologen Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen als sog. 5'flank dienen soll, gefolgt von einer loxP-site im Intronbereich zwischen Exon4 und Exon5. Vor dieser loxP-site (upstream bzw. im 5'Bereich) ist eine Small-Restriktionsschnittstelle insertiert, die den Nachweis der sequenzspezifischen Insertion der loxP-site in die DNA der murinen Zellen erleichtern soll. Es folgt ein ca. 1000bp langes Fragment der genomischen DNA von *Wdr36* mit Exon5 und anschließend im Intronbereich zwischen Exon5 und Exon6 die von FRT-sites flankierte β-geo-Kassette. Die FRT-sites sollen bei der Generierung der genetisch modifizierten Mauslinie die spezifische Deletion der Sequenz ermöglichen, die innerhalb dieser sites liegen (En2SA-IRES-lacZneo). Die innerhalb der FRT-sites ebenfalls enthaltene EN2 splice acceptor und die IRES-Sequenz sollen die Transkription und Translation des Neomycin-Resistenzgens gewährleisten, welches keinen zusätzlichen eukaryotischen Promotor besitzt, sondern allein unter der Aktivität des *Wdr36* Promoters steht. Das Neomycin-Resistenzgen wird somit in den murinen ES-Zellen als positiver Selektionsmarker dienen. Darauf folgt eine weitere loxP-site und ein ca. 4200bp langes Fragment der genomischen *Wdr36* Sequenz mit Exon6 bis Exon10, welches bei der homologen Rekombination in murinen embryonalen Stammzellen als sog. 3'flank dienen soll. Im Plasmid-backbone ist neben dem p15A origin of replication und dem Ampicillin-Resistenzgen eine DiphtherietoxinA-Genkassette unter der Aktivität eines HSV-tk Promoters zu finden, welche in den murinen ES-Zellen als negativer Selektionsmarker fungieren soll.

Der Zielvektor wurde mit dem Restriktionsenzym AgeI linearisiert und von Dr. Michael Bösl in murine embryonale Stammzellen elektroporiert. Nach Selektion mit G418 wurden schließlich einzelne Stammzellkolonien isoliert.

4.7.3 Nachweis der homologen Rekombination in ES-Zellen mittels Long-Range-PCR

Um die homologe Rekombination des linearisierten Zielvektors in die genomische DNA der murinen embryonalen Stammzellen überprüfen zu können, wurden Long-Range-PCR Strategien entwickelt. Dabei bindet einer der beiden Primer im *Wdr36* Gen ausserhalb der Homologiebereiche des Zielvektors, während der andere Primer in einer im Zielvektor insertierten Kassette bindet. So kann mittels PCR nur ein Amplikon entstehen, wenn es in den ES-Zellen zur homologen Rekombination und somit zur genetischen Modifizierung der genomischen *Wdr36* Sequenz gekommen ist (Abb. 38A).

Im ersten Ansatz wurde ein 'forward'-Primer gewählt, der in der Neomycin-Kassette des modifizierten *Wdr36* Gens bindet, während der zweite Primer ausserhalb des Homologiebereichs vom Zielvektor (downstream bzw. im 3'-Bereich) bindet. In ES-Klonen mit einem modifizierten *Wdr36* Gen sollte so durch PCR ein 5747bp langes Amplikon entstehen. Von den 96 untersuchten ES-Zellklonen konnte bei 62 ein PCR-Produkt mit der erwarteten Größe ermittelt werden. Per Restriktionsverdau konnte zudem die Richtigkeit des Amplikons bestätigt werden (Abb. 38B).

Im zweiten Ansatz wurde ein 'forward'-Primer gewählt, der ausserhalb des Homologiebereichs vom Zielvektor (upstream bzw. im 5'-Bereich) bindet. Der zweite Primer dagegen bindet in der insertierten EN2 splice acceptor site des modifizierten *Wdr36* Gens. Bei korrekter Integration dieses DNA-Bereichs über homologe Rekombination sollte mittels PCR ein 6526bp langes Amplikon entstehen (Abb. 38C). Von den 62 untersuchten Zellklonen konnte bei 35 ein PCR-Produkt mit der entsprechenden Größe ermittelt werden. Jedoch wurde bei den verwendeten Bedingungen auch ein zusätzliches Produkt von ca. 3kb Größe amplifiziert. Dieses konnte zwar durch Erhöhung der Annealingtemperatur eliminiert werden, dadurch verringerte sich jedoch auch die Produktmenge des gewünschten Amplikons. Um die Integration der loxP-site in den Intronbereich zwischen Exon4 und Exon5 zu verifizieren, wurde zusätzlich ein Smal-Verdau des PCR-Produkts unternommen. Bei Integration der loxP-site und der Smal-Restriktionsschnittstelle sollte sich das Amplikon nach Verdau um ca. 1100bp verkürzen. Dies konnte für 17 der untersuchten 35 Klone bestätigt werden (Abb. 38D).

Von diesen Klonen wurden 12 ausgewählt und nach mehrmaligem Passagieren der Nachweis der homologen Rekombination mittels Long-Range-PCR wiederholt. So

konnte eine mögliche Kontaminierung ausgeschlossen und der Genotyp verifiziert werden.

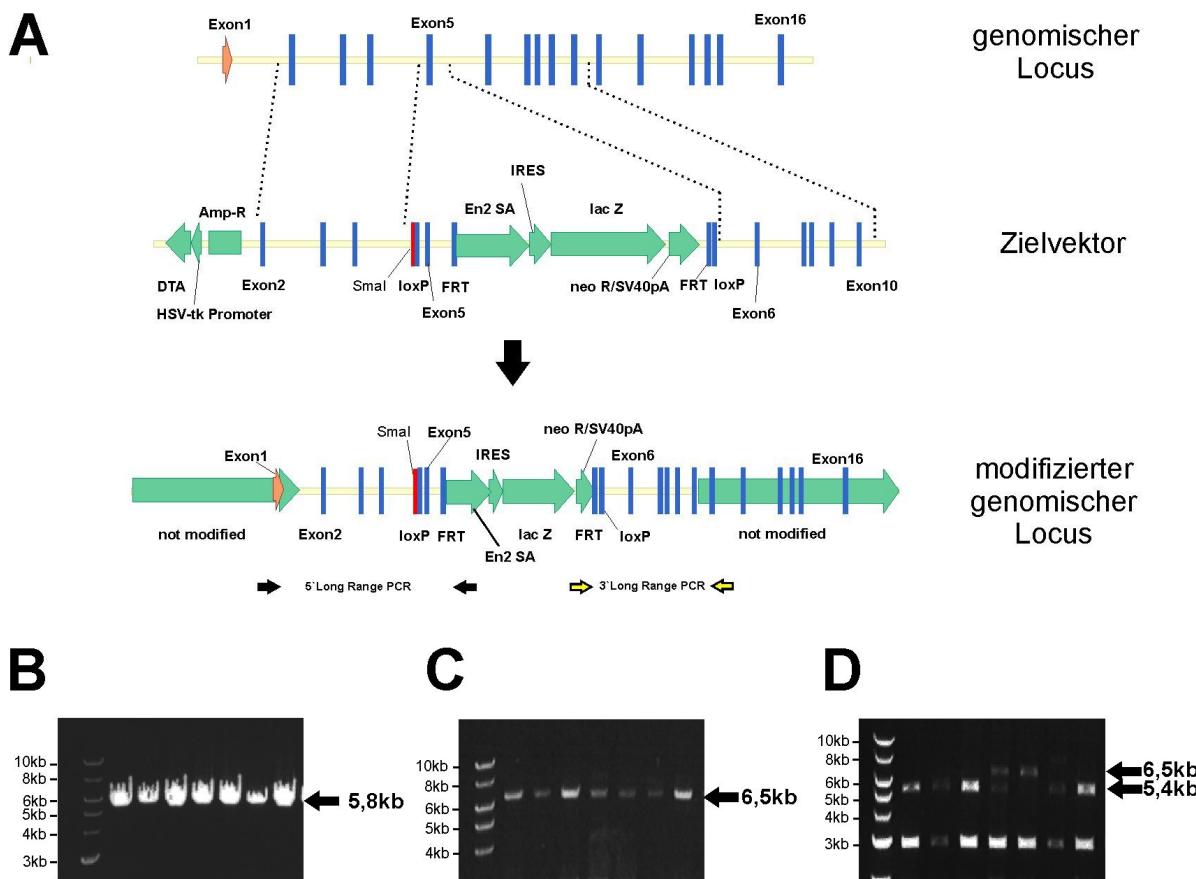


Abb. 38: Nachweis der homologen Rekombination des Zielektors in murinen embryonalen Stammzellen mittels Long-Range-PCR (B-D).

Die schematische Darstellung zeigt die Gene Targeting-Strategie zur Generierung der konditionellen *Wdr36* Knock-out Mauslinie (A). Zudem sind die relativen Bindungsbereiche der Primer für die Long-Range-PCR angegeben. Der Nachweis der homologen Rekombination im 3'-Bereich des Gens resultierte bei positiven Klonen in der Amplifizierung eines 5,8kb großen Produkts (B). Der Nachweis der homologen Rekombination im 5'-Bereich des Gens resultierte bei positiven Klonen in der Amplifizierung eines 6,5kb großen Produkts (C). Bei Integration des SmaI/loxP Bereichs führte der SmaI-Verdau des 5'Long-Range PCR Produkts zu einer Verkürzung des Amplikons auf 5,4kb, wie exemplarisch in D dargestellt ist.

4.7.4 Nachweis der β -Galaktosidase Aktivität in den gentechnisch modifizierten murinen ES-Zellen

Um die Aktivität der β -Galaktosidase in den positiv getesteten murinen embryonalen Stammzellen zu überprüfen, wurden lacZ-Färbungen unternommen. Nach Färbung der in den Zellkulturschalen als kompakte mehrschichtige Kolonien wachsenden murinen embryonalen Stammzellen konnte eine eindeutige Blaufärbung bei allen 12 ausgewählten Zellklonen beobachtet werden (Abb. 39).

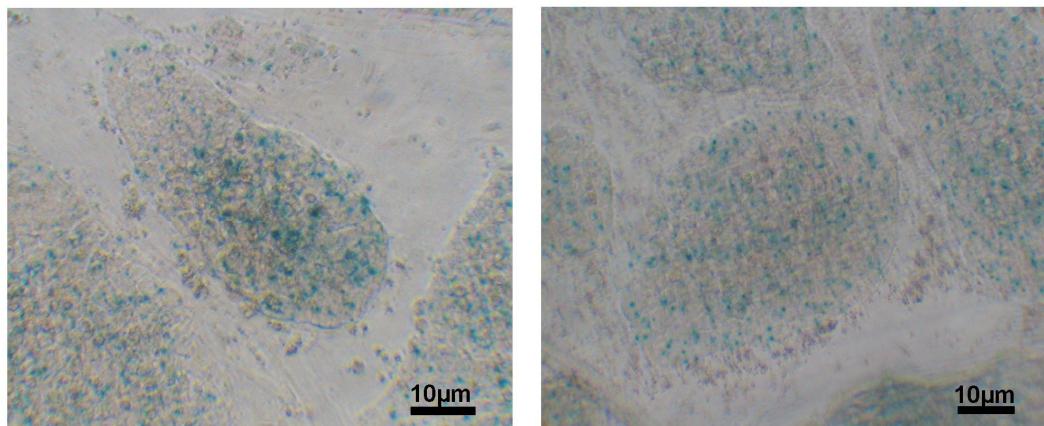


Abb. 39: LacZ Färbung an positiv getesteten gentechnisch modifizierten murinen ES-Zellen.

Nach dem Nachweis der korrekten homologen Rekombination des Zielvektors wurden bei 12 ausgewählten Zellklonen lacZ Färbungen unternommen. Bei allen 12 ausgewählten Klonen konnte in den murinen embryonalen Stammzellen, die als kompakte mehrschichtige Kolonien wachsen, eine eindeutige Blaufärbung beobachtet werden.

5 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass es sich bei WDR36 um ein in Säugerzellen essentielles nukleoläres Protein handelt, welches funktionell homolog zu dem aus *S. cerevisiae* bekannten Protein Utp21 ist. WDR36 ist vermutlich ein Bestandteil des SSU-Prozessoms und offensichtlich an der Prozessierung der 18S rRNA beteiligt. Diese Annahmen basieren auf der Beobachtung, dass zum einen homozygote *Wdr36*-defiziente Embryonen frühzeitig degenerieren wie auch die Depletion von *Wdr36* mittels RNA Interferenz in Wildtyp-Embryonen zur frühen embryonalen Letalität führt. Ferner resultiert die Depletion von WDR36 in HTM-N Zellen in einer Abnahme der Zellzahl und einer erhöhten Apoptoserate. Weiterhin ergaben immunzytochemische Färbungen eine nukleoläre Lokalisierung von WDR36 und die Depletion von WDR36 mRNA führte zu einer Verzögerung der 18S rRNA Prozessierung.

Ausserdem bekräftigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Ausbildung eines Glaukoms bei Patienten mit Mutationen in *WDR36* offenbar nicht auf Grund einer Haploinsuffizienz auftritt. Denn sowohl in heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen als auch in heterozygoten *Wdr36*-defizienten_Del605-607 Mäusen konnte kein Glaukom-ähnlicher Phänotyp beobachtet werden. Auch konnte gezeigt werden, dass weder eine reduzierte Expression von *Wdr36* mRNA noch eine Mutation in *Wdr36* einen direkten Einfluss auf die Viabilität oder die Vulnerabilität der retinalen Ganglienzellen hat.

5.1 WDR36 ist ein essentielles Protein

WDR36 kann als essentielles Protein betrachtet werden, da homozygote *Wdr36*-defiziente Embryonen während der frühen Embryonalentwicklung degenerieren. Auch der Phänotyp der Embryonen nach Injektion von spezifischer siRNA bekräftigt die wichtige funktionelle Rolle von *Wdr36* in der Zelle. Während der Embryonalentwicklung von Säugetieren sind die aus der Eizelle stammenden mRNAs nur in die ersten Zellteilungen involviert. In einem 'maternal to zygotic transition' (MZT)

genannten Vorgang werden die mütterlichen mRNAs und Proteine degradiert und die Transkription/Translation des zygotischen Genoms initiiert (Schier, 2007; Tadros and Lipshitz, 2009). Dabei zerfallen während der Fusion der Pronuklei auch die von der Eizelle stammenden Nukleoli (Ogushi et al., 2008). Die Initiation der rRNA Transkription beginnt in der Zygote im 2-Zellstadium und findet in sog. 'Nukleolar precursor bodies' und im Nukleoplasma statt (Romanova et al., 2006a; Svarcova et al., 2009; Zatsepina et al., 2003). Die 'Nucleolar precursor bodies' sind bis zur Entwicklung ins Morulastadium vorhanden und entwickeln sich schließlich zu den Nukleoli (Grondahl and Hyttel, 1996; Hyttel et al., 2001; Tesarik et al., 1987; Viuff et al., 2002). Vergleichbar mit den homozygoten *Wdr36*-defizienten Embryonen und den mit spezifischer siRNA injizierten Embryonen zeigen auch Mauseembryonen mit einer Nullmutation in Genen, die für rRNA Synthese und Prozessierung verantwortlich sind, einen letalen Phänotyp während der frühen Embryonalentwicklung. So konnte auch für Nullmutanten von RBM19 (Zhang et al., 2008), Pescadillo-1 (Lerch-Gaggl et al., 2002), Fibrillarin (Newton et al., 2003), RPO1-2 (Chen et al., 2008), RPS19 (Matsson et al., 2004) und SURF6 (Romanova et al., 2006b) nur eine Entwicklung bis zum Morulastadium und anschließende Degeneration der Embryonen beobachtet werden. Depletion von *Wdr36* im Zebrafisch führt ebenfalls zur Degeneration der Tiere, allerdings erst zu einem entwicklungsbiologisch späteren Zeitpunkt (Skarie and Link, 2008). Dies mag zum einen daran liegen, dass es sich bei dem Mausmodell um eine Nullmutation handelt, während die virale Insertion in *Wdr36* und auch Depletion mittels Morpholinos im Zebrafisch nur in einem Knock-down resultierten. Zum anderen steht Zebrafischembryonen ein großer Vorrat materneller Transkripte und Proteine für die frühe Embryonalentwicklung zur Verfügung (Pelegri, 2003). Die Transkription der eigenen genomischen DNA beginnt beim Zebrafisch erst im Mitt-Blastula-Stadium und wird auch 'mid-blastula transition' genannt (Kimmel et al., 1995). Allerdings nach wird das Absterben der Zebrafischembryonen durch diese Voraussetzungen verzögert. Vergleichbare Unterschiede im Hinblick auf den Phänotyp von Maus- und Zebrafischembryonen, die defizient für jeweils homologe Gene der rRNA Prozessierung sind, wurden so auch bei den Zebrafischproteinen Pescadillo-1 (Allende et al., 1996) und Rps19 (Danilova et al., 2008; Uechi et al., 2008) gefunden.

5.2 Depletion von WDR36 führt in Zellen zur Apoptose

Im Zellkulturmodell resultierte eine Depletion von WDR36 in einer eindeutigen Abnahme der Zellzahl, was einen Zellzyklusarrest oder gesteigerte Apoptoseraten vermuten lässt. Gegen einen Zellzyklusarrest sprechen die FACS-Analysen in dieser Arbeit, die keine Anzeichen für eine ungewöhnliche Verteilung der Zellen auf einzelne Zellzyklusphasen liefern. In der Hefe konnte durch Deletion verschiedener Proteine des SSU-Prozessoms eine starke Verzögerung des Zellzyklus bzw. ein Zellzyklusarrest nachgewiesen werden (Bernstein and Baserga, 2004). Auch im Zebrafisch konnte nach Knock-down von *Wdr36* eine gesteigerte Menge an Zellen in der S-Phase nachgewiesen werden. Die *Wdr36* Deletionsmutante zeigt beim Zebrafisch eine anfängliche Hochregulierung Zellzyklus-arretierender Marker, während keine Veränderung bei pro-apoptotischen Markern gefunden wurde. In der weiteren Entwicklung der Mutanten kommt es allerdings zu einer gesteigerten p53-Expression und einer Caspase-3 vermittelten Apoptose (Skarie and Link, 2008). Vergleichbar damit konnte in den Zellkulturexperimenten nach Depletion von WDR36 eine erhöhte Menge an freien Nukleosomen gefunden werden, die für eine gesteigerte Apoptoserate spricht. Gestützt wird dieses Ergebnis durch den Nachweis der verstärkten Expression von *BAX*, einem pro-apoptotischen Gen, dessen Proteinprodukt die Aktivierung verschiedener Caspasen (unter anderem Caspase-3) vermittelt und somit die Apoptose von Zellen einleitet (Kuribayashi and El-Deiry, 2008). Die Transkription von *BAX* wird durch TP53/p53 vermittelt, welches nachweislich ebenfalls hochreguliert wird und im Nukleus der Zelle die Transkription verschiedener pro-apoptotischer Gene steuert. TP53/p53 reguliert zudem die Transkription von CDKN1/p21, einem Zellzyklus-arretierenden Protein, dessen erhöhte Expression ebenfalls nachgewiesen werden konnte (Gartel and Tyner, 2002). Da allerdings Caspase-3 wiederum CDKN1/p21 spaltet und so Apoptose induziert, sprechen die Daten geschlossen für eine gesteigerte Apoptoserate induziert durch Depletion von WDR36. Dies ist konsistent mit dem Phänotyp im Mausmodell und wird außerdem durch Publikationen bestätigt, die zeigen, dass es durch Deletion von Genen für rRNA Synthese und Prozessierung zu einer Erhöhung der Apoptoserate von Zellen kommt (Chen et al., 2008; Newton et al., 2003; Zhang et al., 2008).

5.3 WDR36 als *bona fide* Komponente des Small-Subunit Prozessoms

Die Reifung der 18S rRNA aus der 47S pre-rRNA erfordert mehrere Prozessierungsschritte, während die externen und internen Spacer sukzessive abgespalten werden (Henras et al., 2008) (vergleiche hierzu Abb. 4). Dieser Vorgang wird durch das Small-Subunit Prozessom im Nukleolus der Zelle vermittelt. Es handelt sich dabei um einen Ribonukleoproteinkomplex mit ca. 72 beteiligten Proteinen (Lim et al., 2011). Sein Aufbau wie auch die Funktion ist haupsächlich durch Untersuchungen an der Hefe analysiert worden. Die Funktion und die Beteiligung des SSU-Prozessoms an der Ribosomenbiogenese wird jedoch zunehmend auch in humanen Zellen untersucht (Hu et al., 2011; Prieto and McStay, 2007; Turner et al., 2009).

Zu den identifizierten SSU-Prozessom Proteinen der Hefe zählt unter anderem Utp21 (Bernstein et al., 2004), welches einen Bestandteil des Utp- β Subkomplexes darstellt (Champion et al., 2008; Lim et al., 2011). Bereits die starke Sequenzhomologie von WDR36 zu Utp21 (Skarie and Link, 2008), wie auch die strukturelle Homologie (Footz et al., 2009) der beiden Proteine initiieren die Annahme, dass WDR36 als ein funktionell zu Utp21 homologes Protein ein Bestandteil des SSU-Prozessoms ist. Um die Funktion von WDR36 als Komponente des SSU-Prozessoms zu untersuchen, wurden die von Bernstein und Kollegen definierten Kriterien überprüft (Bernstein et al., 2004).

Demnach sollen Proteine des SSU-Prozessoms im Nukleolus der Zelle zu finden sein. Dies konnte für WDR36 zum einen durch massenspekrometrische Analysen bestätigt werden (<http://www.lamondlab.com/NOPdb3.0/>) (Ahmad et al., 2009; Andersen et al., 2002). Des Weiteren unterstützen die in dieser Arbeit vorgenommenen immunozytochemischen Färbungen diese Analysen. So zeigt die Expression von rekombinantem Epitop-getagtem Wdr36 eine starke nukleoläre Lokalisierung, jedoch konnte auch eine gleichmäßige Verteilung im Zytoplasma der Zellen beobachtet werden. Die zytoplasmatische Färbung ist aller Wahrscheinlichkeit nach eine Folge der vom CMV-Promotor vermittelten Überexpression von Wdr36. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit dem von Skarie und Link (2008) beschriebenen Lokalisierungsmuster, wonach Überexpression von YFP-gekoppeltem Wdr36

vornehmlich im Zytosoma und Nukleolus der Zellen von Zebrafischembryonen zu finden ist. Immunzytochemische Färbungen von WDR36 in humanen Zellen zeigen ebenfalls eine sehr spezifische Färbung im Nukleolus der Zellen. Ebenso konnte eine Kolokalisierung mit dem Nukleolusmarker B23 wie auch zu PWP2, einem weiteren Protein des SSU-Prozessoms, nachgewiesen werden.

Als weiteres Kriterium für Proteine des SSU-Prozessoms gilt, dass sie für die 18S rRNA Biogenese erforderlich sind. Die Northern-Blot Analysen nach Depletion von WDR36 in HTM-N Zellen zeigen eine verringerte Menge an 21S rRNA und weisen auf eine Beteiligung von WDR36 an der Ribosomenbiogenese hin. Anhand der Pulse-Chase Analysen konnte zudem gezeigt werden, dass die verringerte WDR36 mRNA Expression in einer Verzögerung der rRNA Prozessierung resultiert. Die Tatsache, dass die 18S rRNA Prozessierung nur verzögert, jedoch nicht komplett ausgeschaltet wurde, liegt wahrscheinlich am Versuchsansatz selbst. Selbst durch mehrfache Transfektion kann keine komplette Depletion eines Proteins bewerkstelligt werden (Elbashir et al., 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass WDR36 ein essentielles Protein ist, was bedeutet, dass Zellen mit der stärksten Depletion von WDR36 wohl im Laufe des Knock-downs durch Apoptose verloren gehen. Somit entspricht der gefundene Phänotyp aller Wahrscheinlichkeit nach einer abgeschwächten Variante der eigentlichen Situation. Die Generierung eines induzierbaren Vektorsystems, bei dem die Expression von sog. 'small hairpin RNAs' (shRNA) zu einem definierten Zeitpunkt initiiert werden kann, könnte hierbei Abhilfe verschaffen und die Effekte einer WDR36 Depletion genauer beleuchten.

Auffällig bei den Northern-Blot Analysen war, dass nach WDR36 Depletion anscheinend der Prozessierungsschritt von der 30S zur 21S rRNA langsamer wird. Somit ist WDR36 wohl an der Prozessierung der 30S zur 21S rRNA beteiligt. In der Hefe konnte gezeigt werden, dass mit Utp21 die 23S pre-rRNA präzipitiert (Bernstein et al., 2004). Da die 23S rRNA von *S. cerevisiae* analog zur humanen 30S rRNA ist, kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Proteine im selben Prozessierungsschritt involviert sind, was die Annahme der funktionellen Homologie von Utp21 und Wdr36 weiter stärkt.

Mittels einer 18S rRNA Sonde wurde auch im Zebrafischmodell bei Tieren mit viralem Insert in *Wdr36* eine verringerte Menge an reifer 18S rRNA gefunden, was die Zellkulturdaten zudem bestätigen (Skarie and Link, 2008).

Weiterhin wurde eine Coimmunopräzipitation mit einem anderen SSU-Prozessom spezifischen Protein als weiteres Kriterium definiert. Utp21 ist Bestandteil des Utp- β Subkomplexes (Champion et al., 2008; Lim et al., 2011), weshalb man WDR36 als funktionell zu Utp21 homologes Protein ebenso in diesem Subkomplex vermuten würde. In dieser Arbeit konnte jedoch keine gemeinsame Präzipitation von WDR36 mit PWP2/Utp1, einem weiteren Bestandteil des Utp- β Subkomplexes und direkten Interaktionspartner von WDR36 als funktionellem Homolog, nachgewiesen werden. Dies mag jedoch auch im verwendeten Antikörper begründet liegen. Der käuflich erhältliche Antikörper ist zwar für immunzytochemische Färbungen geeignet, funktioniert jedoch nicht bei Western-Blot Analysen, weshalb seine Eignung in Bezug auf Coimmunopräzipitationen trotz positiver Herstellerangaben unbekannt ist. Ebenso ist unbekannt, wie stark die Interaktion der einzelnen Proteine im Utp- β Subkomplex bei Säugerzellen ist. Somit kann eine Dissoziation der Proteine während der Aufreinigung nicht ausgeschlossen werden. Schließlich besteht auch die Möglichkeit, dass der Antikörper am nativen Protein auf Grund seiner Faltung oder Lage im Komplex nicht binden kann.

Um mögliche Probleme mit dem WDR36 Antikörper zu umgehen, wurde ein GST-Pulldown angestrebt. Es konnte allerdings kein Protein aufgereinigt werden, da es in sog. 'inclusion bodies' abgelagert wurde und auch nach Solubilisierung stets wieder präzipitierte. Möglichweise könnte dieses Problem durch die Expression von Teilbereichen des Proteins umgangen werden, da dadurch die Gesamtgröße des Proteins vermindert wird, was das Ausfällen des rekombinanten Proteins verhindern könnte.

Auch wenn bislang keine positive Coimmunopräzipitation gelungen ist, sprechen die Untersuchungen für eine funktionelle Homologie von WDR36 zu Utp21, weshalb es als *bona fide* Komponente des SSU-Prozessoms betrachtet werden kann.

5.4 Heterozygote *Wdr36*-defiziente Mäuse haben keine höhere Anfälligkeit für glaukomatóse Schäden

Heterozygote *Wdr36*-defiziente Mäuse zeigen weder einen auffälligen okulären Phänotyp noch entwickeln sie im Laufe ihres Lebens ein Glaukom (Markus Kröber und Loreen März; unveröffentlichte Daten). Somit kann anhand des Mausmodells die Ausbildung glaukomatóser Schäden auf Grund einer Haploinsuffizienz von *Wdr36* ausgeschlossen werden.

Auch die Untersuchung der Ribosomenbiogenese bei heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen stützt diese Aussage. Denn im Gegensatz zum Zellkulturmodell konnte bei diesen Tieren keine offensichtliche Auswirkung der verringerten *Wdr36* mRNA Expression auf die rRNA Prozessierung gefunden werden. Allerdings waren für die effektive Depletion von WDR36 im Zellkulturmodell auch mehrere Transfektionen von siRNA nötig. Eine einfache bzw. auch zweifache Transfektion hatte ebenfalls keine Auswirkung auf die rRNA Prozessierung bei Northern-Blot Analysen (Dominik Meinel, persönliche Mitteilung). Offensichtlich reicht selbst eine um ca. 50% reduzierte *Wdr36* mRNA-Expression noch aus, die Funktionalität des SSU-Prozessoms aufrecht zu erhalten. Dies würde auch die Ergebnisse der morphologischen Charakterisierung von heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen erklären, die keinen auffälligen Phänotyp aufweisen. Auch für andere Proteine der rRNA Prozessierung konnten vergleichbare Ergebnisse gefunden werden. So zeigen heterozygot Fibrillarin-defiziente Mäuse (Newton et al., 2003) wie auch heterozygote RBM19-defiziente Mäuse (Zhang et al., 2008) keinen offensichtlichen Phänotyp oder Veränderungen in der rRNA Prozessierung. Da für Western Blot Analysen bislang kein geeigneter Antikörper verfügbar war, ist noch nicht klar, inwiefern die verringerte mRNA Expression auch in Veränderungen in der *Wdr36* Proteinmenge resultiert.

Im Mausauge sind die höchsten 47S rRNA Level in den basalen Schichten des Corneaepithels, dem Linsenübergangsbereich, der inneren Körnerschicht und der Ganglienzellschicht zu finden (Qian et al., 2006). Das bedeutet, dass in diesen Zellen wahrscheinlich eine hohe Umsatzrate der rRNA Vorläufer zu finden ist, weshalb vermutet werden kann, dass auch Proteine des SSU-Prozessoms dort stärker exprimiert sind. Anhand von Primärkulturen der retinalen Ganglienzellen könnte daher noch überprüft werden, ob es in diesen Zellen zu einer Verzögerung der rRNA Prozessierung kommt, die durch Verwendung der RNA des gesamten Auges nicht

auffiel. Allerdings würde man dann auch Effekte der veränderten Ribosomenbiogenese auf die Viabilität der retinalen Ganglienzellen erwarten, was anhand der Quantifizierung der retinalen Ganglienzellen bei 1 Jahr alten heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen ausgeschlossen werden kann (Markus Kröber und Loreen März; unveröffentlichte Daten).

WDR36 wird aber auch als 'genetic modifier' gehandelt, wirkt also möglicherweise nur unter Beteiligung eines weiteren mutanten Gens. Um dies zu simulieren und eine mögliche Veränderung der Viabilität der retinalen Ganglienzellen zu untersuchen, wurden verschiedene Schadensmodelle verwendet.

Um eine somatische Schädigung der retinalen Ganglienzellen nachzustellen, wurde zum einen das NMDA-Schadensmodell verwendet. Dabei werden durch intravitreale Injektion des synthetischen Glutamat Analogons NMDA die NMDA-Glutamat-Rezeptoren in den retinalen Ganglienzellen und Amakrinzellen nachhaltig aktiviert. NMDA führt zu einem exzessiven Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen, aktiviert somit die Apoptose-Signalkaskade und leitet schließlich den Zelltod ein (Li et al., 1999; Shen et al., 2006). Die Injektion von NMDA resultierte zwar in einer massiven Schädigung der retinalen Ganglienzellen, wie durch Quantifizierung der Axone im Sehnerv der Tiere festgestellt wurde. Jedoch zeigte sich kein Unterschied zwischen Wildtyp- und heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen, was implizierte, dass eine verringerte *Wdr36* Expression in keiner Veränderung der Zellviabilität resultiert. Die durch NMDA vermittelte Schädigung der retinalen Ganglienzellen ist jedoch sehr massiv, so dass geringe Unterschiede in der Zellviabilität möglicherweise nicht auffallen.

Deshalb wurde als weiteres Schadensmodell die Induktion eines experimentellen Glaukoms durch Vorderkammerinjektion von Polystyren-Microbeads gewählt. Dieses sollte zu einer Erhöhung des intraokulären Drucks führen, dem maßgeblichsten belegbaren pathogenen Risikofaktor für die Ausbildung eines Glaukoms (Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group, 1998; The AGIS Investigators, 2000; Gordon et al., 2002; Leske et al., 2003), und dadurch vermittelt in der Apoptose retinaler Ganglienzellen resultieren. Die retinalen Ganglienzellen von CD1 Mäusen, wie sie in diesen Studien verwendet wurden, zeigen laut Cone et al. (2010) eine starke Anfälligkeit auf einen erhöhten Augeninnendruck und damit einhergehend einen signifikanten Verlust dieser Zellen. Zwar konnte auch im Rahmen dieser Arbeit durch Injektion der Polystyren-Microbeads eine kurzzeitige Erhöhung des

Augeninnendrucks erreicht werden, jedoch zeigte sich im Gegensatz zu den Daten von Cone et al. (2010) keine Auswirkung auf die Anzahl der retinalen Ganglienzellen. Experimentell bestand zwischen den hier vorgenommenen Ansätzen und dem beschriebenen Protokoll nur der Unterschied, dass das Healon nicht in die Vorderkammer injiziert, sondern außen auf die Injektionsstelle gegeben wurde, da es für die Injektionsnadel zu viskos war. Im Ansatz sollte Healon als viskoelastische Lösung den Rückfluss der Polystyren-Microbeads aus der Vorderkammer verhindern, im Beipackzettel wird aber auch berichtet, dass eine intrakamerale Injektion zu einer vorübergehenden Augeninnendruckerhöhung führen kann. Daher könnte vermutet werden, dass die intrakamerale Injektion von Healon zusammen mit den Microbeads zu einer kurzzeitig höheren Zunahme des Augeninnendrucks führte und dadurch die von Cone und Kollegen beschriebene Schädigung der retinalen Ganglienzellen zustande kam.

Um die Effekte eines anhaltend erhöhten Augeninnendrucks auf die Viabilität der retinalen Ganglienzellen heterozygoter *Wdr36*-defizienter Mäuse untersuchen zu können, wurden schließlich Verpaarungen mit β B1-CTGF Überexpressionsmäusen unternommen. Die Überexpression von CTGF in der Linse führte zu einem erhöhten Augeninnendruck und resultierte auch in einer Abnahme der vorhandenen retinalen Ganglienzellen. Allerdings war die Gesamtzahl der gezählten Axone bei den transgenen heterozygot *Wdr36*-defizienten Mäusen und den transgenen Wildtypen vergleichbar.

Somit sprechen die Ergebnisse der somatischen (NMDA) wie auch der axonalen (erhöhter Augeninnendruck) Schädigungen der retinalen Ganglienzellen heterozygoter *Wdr36*-defizienter Mäuse gegen eine verminderte Zellviabilität bzw. eine erhöhte Zellvulnerabilität basierend auf einer verminderten *Wdr36* mRNA Expression. Eine Wirkung von *Wdr36* als 'genetic modifier' konnte allerdings anhand der verwendeten Schadensmodelle nicht eindeutig geklärt werden.

5.5 Überexpression von mutiertem Wdr36 führt zu keiner Änderung des Phänotyps Wdr36-defizienter Mäuse

Die D658G Mutation wurde in verschiedenen Studien bei Glaukompatienten gefunden, allerdings war sie auch in Kontrollgruppen auffindbar (Hauser et al., 2006; Hewitt et al., 2006; Pasutto et al., 2008; Weisschuh et al., 2007). Somit ist die Beteiligung dieser Mutation bei der Ausbildung eines Glaukoms bislang unbekannt. Bioinformatische Analysen ergaben aber, dass diese Mutation in einem konservierten Bereich des Proteins liegt und in einer Veränderung der Proteinstruktur und -funktion resultieren kann (Chi et al., 2010b; Weisschuh et al., 2007).

Im Mausmodell führt die Überexpression einer zur D658G Variante vergleichbaren Mutation (Del605-607) zu einer progressiven Degeneration der peripheren Retina. Zudem ist das Auswachsen der Axone bei den retinalen Ganglienzellen der transgenen Tiere vermindert (Chi et al., 2010b). Um die Effekte der Del605-607 Mutation besser untersuchen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit Verpaarungen der transgenen Tiere mit der Knock-out Mauslinie vorgenommen. So sollte ermittelt werden, ob das mutierte Transgen die Funktion des natürlichen Wdr36 übernehmen kann. Es zeigte sich jedoch keine Veränderung des letalen Phänotyps bei den transgenen Tieren. Der pCAGGS-Promotor ist früheren Untersuchungen zufolge bereits nach dem 2-Zellstadium aktiv (Okabe et al., 1997) und ein sehr starker Promotor, wie die Analysen an adulten Mäusen zeigten. Der letale Phänotyp mag daher eher in einer zu geringen Translation bzw. einem verstärkten Abbau der mutanten Wdr36 mRNA liegen. Ebenso kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Mutation die Funktion des Proteins im Utp-β Subkomplex verloren geht.

Erste Analysen transgener heterozygot *Wdr36*-defizienter Mäuse im Alter von sechs Wochen ergaben keinen auffälligen okulären Phänotyp. Es scheint sich aber bei den transgenen Tieren um eine progressive Degeneration der peripheren Retina zu handeln, weshalb vergleichbar mit der ursprünglichen Veröffentlichung (Chi et al., 2010b) auch ältere Tiere (12-16 Monate) untersucht werden sollten. Im Laufe der Verpaarungen wurde in den CD1 Hintergrund gewechselt. Ob diese Veränderung oder auch die verringerte *Wdr36* mRNA Expression einen Einfluss auf den Phänotyp nimmt ist bislang unklar und sollte in weiteren Analysen geklärt werden.

Die Überexpression der *Wdr36* Sequenzvariante zeigte keine auffällige Veränderung der rRNA Prozessierung. Dies stimmt überein mit den in Footz et al. (2009, 2011)

beschriebenen Ergebnissen, wonach im Hefemodell die Expression Glaukom-assozierter Utp21-Mutanten zu keiner Änderung in der Prozessierung der rRNA führte. In der Hefe scheinen somit alle untersuchten Sequenzvarianten funktionell aktiv zu sein, da ansonsten die Letalität der Hefestämme oder ein Einfluss auf die Ribosomenbiogenese zu erwarten wäre. Bei der Maus würde man anhand der gefundenen Daten vermuten, dass die mutierte Variante nicht funktionell aktiv ist, die Assemblierung des SSU-Prozessoms durch dessen Expression aber auch nicht gestört ist. Da für Western-Blot Analysen kein Antikörper zur Verfügung steht, konnte bislang auch nicht bestätigt werden, dass die starke Wdr36_Del605-607 mRNA Expression auch zu einem vermehrten Vorhandensein mutanten Proteins führt. Studien an der Hefe zeigten aber bei gleichzeitiger Mutation von Sti1 und einer zur D658G vergleichbaren Mutation von Utp21 Veränderungen in der Zellproliferation (Footz et al., 2011). Deshalb wurde das NMDA Schadensmodell verwendet, um eine mögliche Veränderung der Zellviabilität der retinalen Ganglienzellen in heterozygoten Wdr36-defizienten Del605-607 Mäusen zu untersuchen. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Gesamtzahl der retinalen Ganglienzellen nach NMDA-Schaden. Das legt die Vermutung nahe, dass die mutierte Wdr36 Variante keinen Einfluss auf die Zellviabilität nimmt. Es ist jedoch denkbar, dass die Schädigung durch NMDA zu stark war und auf diese Weise geringe Effekte nicht nachweisbar waren. Eine Verpaarung mit den β B1-CTGF Überexpressionsmäusen wäre demnach eine denkbare Alternative zum NMDA-Schadensmodell.

5.6 WDR36 und das Glaukom

Die Ergebnisse der zellbiologischen Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass WDR36 in die Ribosomenbiogenese involviert ist.

In den letzten Dekaden wurden zunehmend vererbbare Krankheiten entdeckt, die ihren Ursprung in einer defekten Ribosomenbiogenese haben. Dabei treten die Mutationen entweder in den Genen für Proteine der Ribosomenbiogenese, in Genen die für nukleoläre Ribonukleoproteine (snoRNP) codieren oder in Genen ribosomaler Proteine auf. Fast alle dieser Proteine sind für das Überleben der Zelle essentiell. Trotzdem führen verschiedene Mutationen nicht zur embryonalen Letalität, sondern resultieren in Krankheiten. Diese sind zudem meist sehr organ- oder gewebsspezifisch, wenn auch der Grund hierfür unbekannt ist (Freed et al., 2010).

Mutationen in WDR36 werden mit einer Eosinophilie (Buysschaert et al., 2009; Gudbjartsson et al., 2009; Rothenberg et al., 2010) oder auch mit Ausbildung eines Glaukoms (Monemi et al., 2005) in Zusammenhang gebracht.

Beim Glaukom kommt es zu einem progressiven Verlust an retinalen Ganglienzellen. In diesen Zellen wurden im Mausauge hohe 47S rRNA Level ermittelt (Qian et al., 2006), weshalb ein kausaler Zusammenhang zwischen Mutationen in WDR36 und der Apoptose von retinalen Ganglienzellen durchaus bestehen kann. Beim Menschen sind diese Mutationen im heterozygoten Zustand zu finden, was zur Annahme einer Haploinsuffizienz oder eines dominant-negativen Effekts der Mutationen führt. Im Mausmodell zeigt sich allerdings bei heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen kein offensichtlicher Phänotyp, wodurch eine Haploinsuffizienz wohl auszuschließen ist. In den verwendeten Schadensmodellen konnten auch keine Auffälligkeiten beobachtet werden, die auf Effekte einer Haploinsuffizienz hindeuten. Die Überexpression von mutantem Wdr36 (Del605-607) jedoch führt zu einem progressiven retinalen Schaden (Chi et al., 2010b), was einen dominant-negativen Effekt dieser Sequenzvariante im Auge nahe legen kann. Im verwendeten Schadensmodell allerdings zeigen heterozygote *Wdr36*-defiziente Mäuse mit einer Überexpression von mutantem Wdr36 (Del605-607) keine offensichtliche Veränderung in der Anzahl der retinalen Ganglienzellen, was gegen einen dominant-negativen Effekt dieser Sequenzvariante spricht. In der Hefe wiederum führt die Kombination gewisser Mutationen zu einer verringerten Zellproliferation (Footz et al., 2011), was die Funktion von WDR36 als 'genetic modifier' unterstützt.

Anhand der allgemeinen Daten kann somit eine Haploinsuffizienz weitgehend ausgeschlossen werden, ein dominant-negativer Effekt mancher WDR36 Mutationen ebenso wie die Funktion als 'genetic modifier' sind jedoch durchaus möglich. Somit kann eine Beteiligung von WDR36 sowie seine Funktion bei der Ausbildung eines Glaukoms nicht abschließend geklärt werden. Die Generierung der konditionellen Knock-out Mauslinie kann allerdings dazu beitragen, mehr zur Funktion von WDR36 im Auge zu erfahren.

6 Zusammenfassung

Mutationen in *WDR36* wurden als ursächlich für seltene Formen des primären Offenwinkelglaukoms beschrieben. Da wenig zur Funktion von *WDR36* bekannt war, sollte im Rahmen dieser Arbeit die funktionelle Rolle von *WDR36* in Säugerzellen entschlüsselt und seine Beteiligung bei der Pathogenese des Glaukoms erforscht werden.

Es konnte festgestellt werden, dass es sich bei *Wdr36* um ein in der Zelle essentielles Protein handelt. So degenerieren homozygote *Wdr36*-defiziente Mausembryonen bereits vor Erreichen des Blastozystenstadiums. Auch die Depletion von *Wdr36* mittels RNA Interferenz führt zum Absterben von Wildtyp-Embryonen bevor sie sich zur Blastozyste entwickelt haben. Ferner führt der Knock-down von *WDR36* in der Zellkultur zu einer Abnahme der Zellzahl. Diese verringerte Zellzahl ist offensichtlich die Folge einer erhöhten Apoptoserate, wie eine erhöhte Menge an freien Nukleosomen im Cytoplasma der Zelle und die Hochregulierung pro-apoptotischer Gene zeigte. Ein Einfluss der Depletion von *WDR36* auf den Zellzyklus konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass *WDR36* offenbar ein zu dem Hefeprotein *Utp21* funktionell homologes Protein und somit ein Bestandteil des Small-Subunit Prozessoms ist. Neben seiner subzellulären Lokalisierung im Nukleolus der Zelle konnte festgestellt werden, dass die Depletion von *WDR36* zu einer Verzögerung der rRNA Prozessierung führt. Untersuchungen an heterozygot *Wdr36*-defizienten Mäusen ergaben, dass eine Glaukomerkankung auf Grund einer Haploinsuffizienz von *WDR36* ausgeschlossen werden kann, da die Tiere weder einen auffälligen Phänotyp zeigen noch im Schadensmodell eine erhöhte Vulnerabilität der retinalen Ganglienzellen beobachtet werden konnte. Ferner hat die verstärkte Expression von mutiertem *Wdr36* keinen offensichtlichen Einfluss auf den Phänotyp der homo- und heterozygoten Tiere.

Auch wenn die Daten dieser Arbeit gegen eine direkte Beteiligung von *WDR36* an der Pathogenese eines Glaukoms sprechen, kann eine Funktion von *WDR36* als 'genetic modifier', wie auch ein dominant-negativer Effekt mancher Mutationen nicht ausgeschlossen werden. Um die weitere Betrachtung der Rolle von *Wdr36* beim Glaukom zu ermöglichen, wurden deshalb mutierte Stammzellen entwickelt, um die

Voraussetzung zur Generierung einer konditionellen Wdr36 Knock-out Mauslinie zu schaffen.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- 1998, The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group, *Am J Ophthalmol* **126**(4):498-505.
- 2000, The Advanced Glaucoma Intervention Study (AGIS):7. The relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. The AGIS Investigators, *Am J Ophthalmol* **130**(4):429-40.
- Adam, M. F., Belmouden, A., Binisti, P., Brezin, A. P., Valtot, F., Bechettoille, A., Dascotte, J. C., Copin, B., Gomez, L., Chaventre, A., Bach, J. F., and Garchon, H. J., 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):2091-7.
- Ahmad, Y., Boisvert, F. M., Gregor, P., Cobley, A., and Lamond, A. I., 2009, NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update, *Nucleic Acids Res* **37**(Database issue):D181-4.
- Allende, M. L., Amsterdam, A., Becker, T., Kawakami, K., Gaiano, N., and Hopkins, N., 1996, Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development, *Genes Dev* **10**(24):3141-55.
- Allingham, R. R., Liu, Y., and Rhee, D. J., 2009, The genetics of primary open-angle glaucoma: a review, *Exp Eye Res* **88**(4):837-44.
- Alward, W. L., Fingert, J. H., Coote, M. A., Johnson, A. T., Lerner, S. F., Junqua, D., Durcan, F. J., McCartney, P. J., Mackey, D. A., Sheffield, V. C., and Stone, E. M., 1998, Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (GLC1A), *N Engl J Med* **338**(15):1022-7.
- Andersen, J. S., Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K., Lam, Y. W., Steen, H., Mann, M., and Lamond, A. I., 2002, Directed proteomic analysis of the human nucleolus, *Curr Biol* **12**(1):1-11.
- Bernstein, K. A., and Baserga, S. J., 2004, The small subunit processome is required for cell cycle progression at G1, *Mol Biol Cell* **15**(11):5038-46.
- Bernstein, K. A., Gallagher, J. E., Mitchell, B. M., Granneman, S., and Baserga, S. J., 2004, The small-subunit processome is a ribosome assembly intermediate, *Eukaryot Cell* **3**(6):1619-26.
- Boisvert, F. M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J., and Lamond, A. I., 2007, The multifunctional nucleolus, *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7):574-85.

Bonovas, S., Filoussi, K., Tsantes, A., and Peponis, V., 2004a, Epidemiological association between cigarette smoking and primary open-angle glaucoma: a meta-analysis, *Public Health* **118**(4):256-61.

Bonovas, S., Peponis, V., and Filoussi, K., 2004b, Diabetes mellitus as a risk factor for primary open-angle glaucoma: a meta-analysis, *Diabet Med* **21**(6):609-14.

Burgoyne, C. F., and Downs, J. C., 2008, Premise and prediction-how optic nerve head biomechanics underlies the susceptibility and clinical behavior of the aged optic nerve head, *J Glaucoma* **17**(4):318-28.

Buss, F., Luzio, J. P., and Kendrick-Jones, J., 2001, Myosin VI, a new force in clathrin mediated endocytosis, *FEBS Lett* **508**(3):295-9.

Buysschaert, I. D., Grulio, V., Eloy, P., Jorissen, M., Rombaux, P., Bertrand, B., Collet, S., Bobic, S., Vlaminck, S., Hellings, P. W., and Lambrechts, D., 2009, Genetic evidence for a role of IL33 in nasal polyposis, *Allergy* **65**(5):616-22.

Challa, P., 2008, Glaucoma genetics, *Int Ophthalmol Clin* **48**(4):73-94.

Challa, P., Herndon, L. W., Hauser, M. A., Broomer, B. W., Pericak-Vance, M. A., Ababio-Danso, B., and Allingham, R. R., 2002, Prevalence of myocilin mutations in adults with primary open-angle glaucoma in Ghana, West Africa, *J Glaucoma* **11**(5):416-20.

Champion, E. A., Lane, B. H., Jackrel, M. E., Regan, L., and Baserga, S. J., 2008, A direct interaction between the Utp6 half-a-tetratricopeptide repeat domain and a specific peptide in Utp21 is essential for efficient pre-rRNA processing, *Mol Cell Biol* **28**(21):6547-56.

Chen, H., Li, Z., Haruna, K., Li, Z., Li, Z., Semba, K., Araki, M., Yamamura, K., and Araki, K., 2008, Early pre-implantation lethality in mice carrying truncated mutation in the RNA polymerase 1-2 gene, *Biochem Biophys Res Commun* **365**(4):636-42.

Chi, Z. L., Akahori, M., Obazawa, M., Minami, M., Noda, T., Nakaya, N., Tomarev, S., Kawase, K., Yamamoto, T., Noda, S., Sasaoka, M., Shimazaki, A., Takada, Y., and Iwata, T., 2010a, Overexpression of optineurin E50K disrupts Rab8 interaction and leads to a progressive retinal degeneration in mice, *Hum Mol Genet* **19**(13):2606-15.

Chi, Z. L., Yasumoto, F., Sergeev, Y., Minami, M., Obazawa, M., Kimura, I., Takada, Y., and Iwata, T., 2010b, Mutant WDR36 directly affects axon growth of retinal ganglion cells leading to progressive retinal degeneration in mice, *Hum Mol Genet* **19**(19):3806-15.

Chomczynski, P., and Sacchi, N., 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Anal Biochem* **162**(1):156-9.

- Cone, F. E., Gelman, S. E., Son, J. L., Pease, M. E., and Quigley, H. A., 2010, Differential susceptibility to experimental glaucoma among 3 mouse strains using bead and viscoelastic injection, *Exp Eye Res* **91**(3):415-24.
- Crissman, H. A., and Steinkamp, J. A., 1973, Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations, *J Cell Biol* **59**(3):766-71.
- Danilova, N., Sakamoto, K. M., and Lin, S., 2008, Ribosomal protein S19 deficiency in zebrafish leads to developmental abnormalities and defective erythropoiesis through activation of p53 protein family, *Blood* **112**(13):5228-37.
- Dosil, M., and Bustelo, X. R., 2004, Functional characterization of Pwp2, a WD family protein essential for the assembly of the 90 S pre-ribosomal particle, *J Biol Chem* **279**(36):37385-97.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T., 2001, Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature* **411**(6836):494-8.
- Faber, P. W., Barnes, G. T., Srinidhi, J., Chen, J., Gusella, J. F., and MacDonald, M. E., 1998, Huntingtin interacts with a family of WW domain proteins, *Hum Mol Genet* **7**(9):1463-74.
- Fan, B. J., Wang, D. Y., Cheng, C. Y., Ko, W. C., Lam, S. C., and Pang, C. P., 2009, Different WDR36 mutation pattern in Chinese patients with primary open-angle glaucoma, *Mol Vis* **15**:646-53.
- Fan, B. J., and Wiggs, J. L., 2010, Glaucoma: genes, phenotypes, and new directions for therapy, *J Clin Invest* **120**(9):3064-72.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B., 1983, A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, *Anal Biochem* **132**(1):6-13.
- Fingert, J. H., 2002, Primary open-angle glaucoma genes, *Eye (Lond)* **25**(5):587-95.
- Fingert, J. H., Alward, W. L., Kwon, Y. H., Shankar, S. P., Andorf, J. L., Mackey, D. A., Sheffield, V. C., and Stone, E. M., 2007, No association between variations in the WDR36 gene and primary open-angle glaucoma, *Arch Ophthalmol* **125**(3):434-6.
- Fingert, J. H., Heon, E., Liebmann, J. M., Yamamoto, T., Craig, J. E., Rait, J., Kawase, K., Hoh, S. T., Buys, Y. M., Dickinson, J., Hockey, R. R., Williams-Lyn, D., Trope, G., Kitazawa, Y., Ritch, R., Mackey, D. A., Alward, W. L., Sheffield, V. C., and Stone, E. M., 1999, Analysis of myocilin mutations in 1703 glaucoma patients from five different populations, *Hum Mol Genet* **8**(5):899-905.
- Footz, T., Dubois, S., Sarfarazi, M., Raymond, V., and Walter, M. A., 2011, Co-variation of STI1 and WDR36/UTP21 alters cell proliferation in a glaucoma model, *Mol Vis* **17**:1957-69.

Footz, T. K., Johnson, J. L., Dubois, S., Boivin, N., Raymond, V., and Walter, M. A., 2009, Glaucoma-associated WDR36 variants encode functional defects in a yeast model system, *Hum Mol Genet* **18**(7):1276-87.

Foster, P. J., Buhrmann, R., Quigley, H. A., and Johnson, G. J., 2002, The definition and classification of glaucoma in prevalence surveys, *Br J Ophthalmol* **86**(2):238-42.

Freed, E. F., Bleichert, F., Dutca, L. M., and Baserga, S. J., 2010, When ribosomes go bad: diseases of ribosome biogenesis, *Mol Biosyst* **6**(3):481-93.

Frezzotti, P., Pescucci, C., Papa, F. T., Lester, M., Mittica, V., Motolese, I., Peruzzi, S., Artuso, R., Longo, I., Mencarelli, M. A., Mittica, P., Motolese, E., and Renieri, A., 2010, Association between primary open-angle glaucoma (POAG) and WDR36 sequence variance in Italian families affected by POAG, *Br J Ophthalmol* **95**(5):624-6.

Gallenberger, M., Meinel, D. M., Kroeber, M., Wegner, M., Milkereit, P., Bosl, M. R., and Tamm, E. R., 2011, Lack of WDR36 leads to preimplantation embryonic lethality in mice and delays the formation of small subunit ribosomal RNA in human cells in vitro, *Hum Mol Genet* **20**(3):422-35.

Gartel, A. L., and Tyner, A. L., 2002, The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis, *Mol Cancer Ther* **1**(8):639-49.

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., and Kass, M. A., 2002, The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma, *Arch Ophthalmol* **120**(6):714-20; discussion 829-30.

Grondahl, C., and Hyttel, P., 1996, Nucleologenesis and ribonucleic acid synthesis in preimplantation equine embryos, *Biol Reprod* **55**(4):769-74.

Gudbjartsson, D. F., Bjornsdottir, U. S., Halapi, E., Helgadottir, A., Sulem, P., Jonsdottir, G. M., Thorleifsson, G., Helgadottir, H., Steinhorsdottir, V., Stefansson, H., Williams, C., Hui, J., Beilby, J., Warrington, N. M., James, A., Palmer, L. J., Koppelman, G. H., Heinzmann, A., Krueger, M., Boezen, H. M., Wheatley, A., Altmuller, J., Shin, H. D., Uh, S. T., Cheong, H. S., Jonsdottir, B., Gislason, D., Park, C. S., Rasmussen, L. M., Porsbjerg, C., Hansen, J. W., Backer, V., Werge, T., Janson, C., Jonsson, U. B., Ng, M. C., Chan, J., So, W. Y., Ma, R., Shah, S. H., Granger, C. B., Quyyumi, A. A., Levey, A. I., Vaccarino, V., Reilly, M. P., Rader, D. J., Williams, M. J., van Rij, A. M., Jones, G. T., Trabetti, E., Malerba, G., Pignatti, P. F., Boner, A., Pescollderungg, L., Girelli, D., Olivieri, O., Martinelli, N., Ludviksson, B. R., Ludviksdottir, D., Eyjolfsson, G. I., Arnar, D., Thorgeirsson, G., Deichmann, K., Thompson, P. J., Wjst, M., Hall, I. P., Postma, D. S., Gislason, T., Gulcher, J., Kong, A., Jonsdottir, I., Thorsteinsdottir, U., and Stefansson, K., 2009, Sequence variants affecting eosinophil numbers associate with asthma and myocardial infarction, *Nat Genet* **41**(3):342-7.

- Hadjiolova, K. V., Nicoloso, M., Mazan, S., Hadjiolov, A. A., and Bachellerie, J. P., 1993, Alternative pre-rRNA processing pathways in human cells and their alteration by cycloheximide inhibition of protein synthesis, *Eur J Biochem* **212**(1):211-5.
- Hattula, K., and Peranen, J., 2000, FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis, *Curr Biol* **10**(24):1603-6.
- Hauser, M. A., Allingham, R. R., Linkroum, K., Wang, J., LaRocque-Abramson, K., Figueiredo, D., Santiago-Turla, C., del Bono, E. A., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., and Wiggs, J. L., 2006, Distribution of WDR36 DNA sequence variants in patients with primary open-angle glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(6):2542-6.
- Henras, A. K., Soudet, J., Gerus, M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Mougin, A., and Henry, Y., 2008, The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis, *Cell Mol Life Sci* **65**(15):2334-59.
- Hewitt, A. W., Dimasi, D. P., Mackey, D. A., and Craig, J. E., 2006, A Glaucoma Case-control Study of the WDR36 Gene D658G sequence variant, *Am J Ophthalmol* **142**(2):324-5.
- Hu, L., Wang, J., Liu, Y., Zhang, Y., Zhang, L., Kong, R., Zheng, Z., Du, X., and Ke, Y., 2011, A small ribosomal subunit (SSU) processome component, the human U3 protein 14A (hUTP14A) binds p53 and promotes p53 degradation, *J Biol Chem* **286**(4):3119-28.
- Hyttel, P., Viuff, D., Fair, T., Laurincik, J., Thomsen, P. D., Callesen, H., Vos, P. L., Hendriksen, P. J., Dieleman, S. J., Schellander, K., Besenfelder, U., and Greve, T., 2001, Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos, *Reproduction* **122**(1):21-30.
- Jacobson, N., Andrews, M., Shepard, A. R., Nishimura, D., Searby, C., Fingert, J. H., Hageman, G., Mullins, R., Davidson, B. L., Kwon, Y. H., Alward, W. L., Stone, E. M., Clark, A. F., and Sheffield, V. C., 2001, Non-secretion of mutant proteins of the glaucoma gene myocilin in cultured trabecular meshwork cells and in aqueous humor, *Hum Mol Genet* **10**(2):117-25.
- Jakobs, T. C., Ben, Y., and Masland, R. H., 2007, Expression of mRNA for glutamate receptor subunits distinguishes the major classes of retinal neurons, but is less specific for individual cell types, *Mol Vis* **13**:933-48.
- Junglas, B., Kespert, S., Seleem, A. A., Struller, T., Ullmann, S., Bosl, M., Bosserhoff, A., Kostler, J., Wagner, R., Tamm, E. R., and Fuchshofer, R., 2012, Connective Tissue Growth Factor Causes Glaucoma by Modifying the Actin Cytoskeleton of the Trabecular Meshwork, *Am J Pathol*.

- Kamphuis, W., and Schneemann, A., 2003, Optineurin gene expression level in human trabecular meshwork does not change in response to pressure elevation, *Ophthalmic Res* **35**(2):93-6.
- Kent, T., Lapik, Y. R., and Pestov, D. G., 2009, The 5' external transcribed spacer in mouse ribosomal RNA contains two cleavage sites, *Rna* **15**(1):14-20.
- Kim, B. S., Savinova, O. V., Reedy, M. V., Martin, J., Lun, Y., Gan, L., Smith, R. S., Tomarev, S. I., John, S. W., and Johnson, R. L., 2001, Targeted Disruption of the Myocilin Gene (Myoc) Suggests that Human Glaucoma-Causing Mutations Are Gain of Function, *Mol Cell Biol* **21**(22):7707-13.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., and Schilling, T. F., 1995, Stages of embryonic development of the zebrafish, *Dev Dyn* **203**(3):253-310.
- Kroeber, M., Ohlmann, A., Russell, P., and Tamm, E. R., 2006, Transgenic studies on the role of optineurin in the mouse eye, *Exp Eye Res* **82**(6):1075-85.
- Kuribayashi, K., and El-Deiry, W. S., 2008, Regulation of programmed cell death by the p53 pathway, *Adv Exp Med Biol* **615**:201-21.
- Laemmli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**(5259):680-5.
- Lang, G. K., 2008, Augenheilkunde, Thieme.
- Lerch-Gaggl, A., Haque, J., Li, J., Ning, G., Traktman, P., and Duncan, S. A., 2002, Pescadillo is essential for nucleolar assembly, ribosome biogenesis, and mammalian cell proliferation, *J Biol Chem* **277**(47):45347-55.
- 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**(1):48-56.
- Li, D., and Roberts, R., 2001, WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases, *Cell Mol Life Sci* **58**(14):2085-97.
- Li, Y., Kang, J., and Horwitz, M. S., 1998, Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains, *Mol Cell Biol* **18**(3):1601-10.
- Li, Y., Schlamp, C. L., and Nickells, R. W., 1999, Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice, *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**(5):1004-8.
- Lim, Y. H., Charette, J. M., and Baserga, S. J., 2011, Assembling a protein-protein interaction map of the SSU processome from existing datasets, *PLoS One* **6**(3):e17701.
- Liu, Y., Liu, W., Crooks, K., Schmidt, S., Allingham, R. R., and Hauser, M. A., 2010, No evidence of association of heterozygous NTF4 mutations in patients with

primary open-angle glaucoma, *Am J Hum Genet* **86**(3):498-9; author reply 500.

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

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods* **25**(4):402-8.

Mackey, D. A., Healey, D. L., Fingert, J. H., Coote, M. A., Wong, T. L., Wilkinson, C. H., McCartney, P. J., Rait, J. L., de Graaf, A. P., Stone, E. M., and Craig, J. E., 2003, Glaucoma phenotype in pedigrees with the myocilin Thr377Met mutation, *Arch Ophthalmol* **121**(8):1172-80.

Matsson, H., Davey, E. J., Draptchinskaia, N., Hamaguchi, I., Ooka, A., Leveen, P., Forsberg, E., Karlsson, S., and Dahl, N., 2004, Targeted disruption of the ribosomal protein S19 gene is lethal prior to implantation, *Mol Cell Biol* **24**(9):4032-7.

Miyazawa, A., Fuse, N., Mengkegale, M., Ryu, M., Seimiya, M., Wada, Y., and Nishida, K., 2007, Association between primary open-angle glaucoma and WDR36 DNA sequence variants in Japanese, *Mol Vis* **13**:1912-9.

Monemi, S., Spaeth, G., DaSilva, A., Popinchalk, S., Ilitchev, E., Liebmann, J., Ritch, R., Heon, E., Crick, R. P., Child, A., and Sarfarazi, M., 2005, Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1, *Hum Mol Genet* **14**(6):725-33.

Mullineux, S. T., and Lafontaine, D. L., 2012, Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: Where do we stand? *Biochimie*.

Muyrers, J. P., Zhang, Y., and Stewart, A. F., 2001, Techniques: Recombinogenic engineering--new options for cloning and manipulating DNA, *Trends Biochem Sci* **26**(5):325-31.

Muyrers, J. P. P., Zhang, Y., Benes, V., Testa, G., Rientjes, J. M. J., and Stewart, A. F., 2004, ET Recombination DNA Engineering Using Homologous Recombination in *E. coli*, *Bacterial Artificial Chromosomes, Methods in Molecular Medicine™* **256**:107-121.

Newton, K., Petfalski, E., Tollervey, D., and Caceres, J. F., 2003, Fibrillarin is essential for early development and required for accumulation of an intron-encoded small nucleolar RNA in the mouse, *Mol Cell Biol* **23**(23):8519-27.

Ogushi, S., Palmieri, C., Fulka, H., Saitou, M., Miyano, T., and Fulka, J., Jr., 2008, The maternal nucleolus is essential for early embryonic development in mammals, *Science* **319**(5863):613-6.

Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., and Nishimune, Y., 1997, 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells, *FEBS Lett* **407**(3):313-9.

- Ortego, J., Escribano, J., and Coca-Prados, M., 1997, Cloning and characterization of subtracted cDNAs from a human ciliary body library encoding TIGR, a protein involved in juvenile open angle glaucoma with homology to myosin and olfactomedin, *FEBS Lett* **413**(2):349-53.
- Park, B. C., Shen, X., Samaraweera, M., and Yue, B. Y., 2006, Studies of optineurin, a glaucoma gene: Golgi fragmentation and cell death from overexpression of wild-type and mutant optineurin in two ocular cell types, *Am J Pathol* **169**(6):1976-89.
- Pasutto, F., Mardin, C. Y., Michels-Rautenstrauss, K., Weber, B. H., Sticht, H., Chavarria-Soley, G., Rautenstrauss, B., Kruse, F., and Reis, A., 2008, Profiling of WDR36 missense variants in German patients with glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**(1):270-4.
- Pasutto, F., Matsumoto, T., Mardin, C. Y., Sticht, H., Brandstatter, J. H., Michels-Rautenstrauss, K., Weisschuh, N., Gramer, E., Ramdas, W. D., van Koolwijk, L. M., Klaver, C. C., Vingerling, J. R., Weber, B. H., Kruse, F. E., Rautenstrauss, B., Barde, Y. A., and Reis, A., 2009, Heterozygous NTF4 mutations impairing neurotrophin-4 signaling in patients with primary open-angle glaucoma, *Am J Hum Genet* **85**(4):447-56.
- Pelegrí, F., 2003, Maternal factors in zebrafish development, *Dev Dyn* **228**(3):535-54.
- Prieto, J. L., and McStay, B., 2007, Recruitment of factors linking transcription and processing of pre-rRNA to NOR chromatin is UBF-dependent and occurs independent of transcription in human cells, *Genes Dev* **21**(16):2041-54.
- Qian, J., Lavker, R. M., and Tseng, H., 2006, Mapping ribosomal RNA transcription activity in the mouse eye, *Dev Dyn* **235**(7):1984-93.
- Quigley, H. A., 1996, Number of people with glaucoma worldwide, *Br J Ophthalmol* **80**(5):389-93.
- Quigley, H. A., 1999, Neuronal death in glaucoma, *Prog Retin Eye Res* **18**(1):39-57.
- Quigley, H. A., and Broman, A. T., 2006, The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020, *Br J Ophthalmol* **90**(3):262-7.
- Rao, P. V., Allingham, R. R., and Epstein, D. L., 2000, TIGR/myocilin in human aqueous humor, *Exp Eye Res* **71**(6):637-41.
- Ray, K., and Mookherjee, S., 2009, Molecular complexity of primary open angle glaucoma: current concepts, *J Genet* **88**(4):451-67.
- Resch, Z. T., and Fautsch, M. P., 2009, Glaucoma-associated myocilin: a better understanding but much more to learn, *Exp Eye Res* **88**(4):704-12.
- Rezaie, T., Child, A., Hitchings, R., Brice, G., Miller, L., Coca-Prados, M., Heon, E., Krupin, T., Ritch, R., Kreutzer, D., Crick, R. P., and Sarfarazi, M., 2002, Adult-

onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin, *Science* **295**(5557):1077-9.

Rezaie, T., and Sarfarazi, M., 2005, Molecular cloning, genomic structure, and protein characterization of mouse optineurin, *Genomics* **85**(1):131-8.

Rezaie, T., Waitzman, D. M., Seeman, J. L., Kaufman, P. L., and Sarfarazi, M., 2005, Molecular cloning and expression profiling of optineurin in the rhesus monkey, *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(7):2404-10.

Richardson, K. C., Jarett, L., and Finke, E. H., 1960, Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy, *Stain Technol* **35**:313-23.

Roberts, M. D., Grau, V., Grimm, J., Reynaud, J., Bellezza, A. J., Burgoyne, C. F., and Downs, J. C., 2009, Remodeling of the connective tissue microarchitecture of the lamina cribrosa in early experimental glaucoma, *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**(2):681-90.

Romanova, L., Korobova, F., Noniashvilli, E., Dyban, A., and Zatsepina, O., 2006a, High resolution mapping of ribosomal DNA in early mouse embryos by fluorescence in situ hybridization, *Biol Reprod* **74**(5):807-15.

Romanova, L. G., Anger, M., Zatsepina, O. V., and Schultz, R. M., 2006b, Implication of nucleolar protein SURF6 in ribosome biogenesis and preimplantation mouse development, *Biol Reprod* **75**(5):690-6.

Rothenberg, M. E., Spergel, J. M., Sherrill, J. D., Annaiah, K., Martin, L. J., Cianferoni, A., Gober, L., Kim, C., Glessner, J., Frackelton, E., Thomas, K., Blanchard, C., Liacouras, C., Verma, R., Aceves, S., Collins, M. H., Brown-Whitehorn, T., Putnam, P. E., Franciosi, J. P., Chiavacci, R. M., Grant, S. F., Abonia, J. P., Sleiman, P. M., and Hakonarson, H., 2010, Common variants at 5q22 associate with pediatric eosinophilic esophagitis, *Nat Genet* **42**(4):289-91.

Rouquette, J., Choesmel, V., and Gleizes, P. E., 2005, Nuclear export and cytoplasmic processing of precursors to the 40S ribosomal subunits in mammalian cells, *Embo J* **24**(16):2862-72.

Sachsenweger, M., 2003, Augenheilkunde, Thieme.

Sahlender, D. A., Roberts, R. C., Arden, S. D., Spudich, G., Taylor, M. J., Luzio, J. P., Kendrick-Jones, J., and Buss, F., 2005, Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis, *J Cell Biol* **169**(2):285-95.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual.

Sarfarazi, M., 1997, Recent advances in molecular genetics of glaucomas, *Hum Mol Genet* **6**(10):1667-77.

- Sarfarazi, M., Child, A., Stoilova, D., Brice, G., Desai, T., Trifan, O. C., Poinoosawmy, D., and Crick, R. P., 1998, Localization of the fourth locus (GLC1E) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 10p15-p14 region, *Am J Hum Genet* **62**(3):641-52.
- Schier, A. F., 2007, The maternal-zygotic transition: death and birth of RNAs, *Science* **316**(5823):406-7.
- Schultz, W., 1972, Über das Paraphenylendiamin in der histologischen Färbetechnik und über eine neue Schnellfärbemethode der Nervenmarkscheide am Gefrierschnitt., *Zentralbl. Pathol.* **36**:639-640.
- Sheffield, V. C., Stone, E. M., Alward, W. L., Drack, A. V., Johnson, A. T., Streb, L. M., and Nichols, B. E., 1993, Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31, *Nat Genet* **4**(1):47-50.
- Shen, Y., Liu, X. L., and Yang, X. L., 2006, N-methyl-D-aspartate receptors in the retina, *Mol Neurobiol* **34**(3):163-79.
- Shimizu, S., Lichter, P. R., Johnson, A. T., Zhou, Z., Higashi, M., Gottfredsdottir, M., Othman, M., Moroi, S. E., Rozsa, F. W., Schertzer, R. M., Clarke, M. S., Schwartz, A. L., Downs, C. A., Vollrath, D., and Richards, J. E., 2000, Age-dependent prevalence of mutations at the GLC1A locus in primary open-angle glaucoma, *Am J Ophthalmol* **130**(2):165-77.
- Simon, J., Arthur, C., and McGuire, V. A., 2009, Transgenesis Techniques, Chapter 9: Gene-Targeting Vectors, in: *Methods in Molecular Medicine*™, pp. 127-144.
- Sippl, C., Bosserhoff, A. K., Fischer, D., and Tamm, E. R., 2011, Depletion of optineurin in RGC-5 cells derived from retinal neurons causes apoptosis and reduces the secretion of neurotrophins, *Exp Eye Res* **93**(5):669-80.
- Skaper, S. D., 2008, The biology of neurotrophins, signalling pathways, and functional peptide mimetics of neurotrophins and their receptors, *CNS Neurol Disord Drug Targets* **7**(1):46-62.
- Skarie, J. M., and Link, B. A., 2008, The primary open-angle glaucoma gene WDR36 functions in ribosomal RNA processing and interacts with the p53 stress-response pathway, *Hum Mol Genet* **17**(16):2474-85.
- Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E. J., 1999, The WD repeat: a common architecture for diverse functions, *Trends Biochem Sci* **24**(5):181-5.
- Sobotta, 2010, *Atlas der Anatomie des Menschen*, Elsevier.
- Sugimoto, E., Aihara, M., Ota, T., and Araie, M., 2006, Effect of light cycle on 24-hour pattern of mouse intraocular pressure, *J Glaucoma* **15**(6):505-11.
- Svarcova, O., Dinnyes, A., Polgar, Z., Bodo, S., Adorjan, M., Meng, Q., and Maddox-Hytel, P., 2009, Nucleolar re-activation is delayed in mouse embryos cloned from two different cell lines, *Mol Reprod Dev* **76**(2):132-41.

- Tadros, W., and Lipshitz, H. D., 2009, The maternal-to-zygotic transition: a play in two acts, *Development* **136**(18):3033-42.
- Tao, H., Liu, W., Simmons, B. N., Harris, H. K., Cox, T. C., and Massiah, M. A., 2010, Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS, *Biotechniques* **48**(1):61-4.
- Tesarik, J., Kopecny, V., Plachot, M., and Mandelbaum, J., 1987, High-resolution autoradiographic localization of DNA-containing sites and RNA synthesis in developing nucleoli of human preimplantation embryos: a new concept of embryonic nucleologenesis, *Development* **101**(4):777-91.
- Tielsch, J. M., Katz, J., Singh, K., Quigley, H. A., Gottsch, J. D., Javitt, J., and Sommer, A., 1991, A population-based evaluation of glaucoma screening: the Baltimore Eye Survey, *Am J Epidemiol* **134**(10):1102-10.
- Tielsch, J. M., Katz, J., Sommer, A., Quigley, H. A., and Javitt, J. C., 1994, Family history and risk of primary open angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey, *Arch Ophthalmol* **112**(1):69-73.
- Tiollais, P., Auger, M. A., and Galibert, F., 1975, Methylation process of mammalian ribosomal precursor RNA, *Biochimie* **57**(11-12):1315-21.
- Tuck, M. W., and Crick, R. P., 1998, The age distribution of primary open angle glaucoma, *Ophthalmic Epidemiol* **5**(4):173-83.
- Turner, A. J., Knox, A. A., Prieto, J. L., McStay, B., and Watkins, N. J., 2009, A novel small-subunit processome assembly intermediate that contains the U3 snoRNP, nucleolin, RRP5, and DBP4, *Mol Cell Biol* **29**(11):3007-17.
- Uechi, T., Nakajima, Y., Chakraborty, A., Torihara, H., Higa, S., and Kenmochi, N., 2008, Deficiency of ribosomal protein S19 during early embryogenesis leads to reduction of erythrocytes in a zebrafish model of Diamond-Blackfan anemia, *Hum Mol Genet* **17**(20):3204-11.
- Valeyev, N. V., Downing, A. K., Sondek, J., and Deane, C., 2008, Electrostatic and functional analysis of the seven-bladed WD beta-propellers, *Evol Bioinform Online* **4**:203-16.
- Vittitow, J., and Borras, T., 2002, Expression of optineurin, a glaucoma-linked gene, is influenced by elevated intraocular pressure, *Biochem Biophys Res Commun* **298**(1):67-74.
- Viuff, D., Greve, T., Holm, P., Callesen, H., Hyttel, P., and Thomsen, P. D., 2002, Activation of the ribosomal RNA genes late in the third cell cycle of porcine embryos, *Biol Reprod* **66**(3):629-34.
- Warner, C. L., Stewart, A., Luzio, J. P., Steel, K. P., Libby, R. T., Kendrick-Jones, J., and Buss, F., 2003, Loss of myosin VI reduces secretion and the size of the Golgi in fibroblasts from Snell's waltzer mice, *Embo J* **22**(3):569-79.

- Weih, L. M., Nanjan, M., McCarty, C. A., and Taylor, H. R., 2001, Prevalence and predictors of open-angle glaucoma: results from the visual impairment project, *Ophthalmology* **108**(11):1966-72.
- Weisschuh, N., Wolf, C., Wissinger, B., and Gramer, E., 2007, Variations in the WDR36 gene in German patients with normal tension glaucoma, *Mol Vis* **13**:724-9.
- Wensor, M. D., McCarty, C. A., Stanislavsky, Y. L., Livingston, P. M., and Taylor, H. R., 1998, The prevalence of glaucoma in the Melbourne Visual Impairment Project, *Ophthalmology* **105**(4):733-9.
- Wiggs, J. L., Allingham, R. R., Vollrath, D., Jones, K. H., De La Paz, M., Kern, J., Patterson, K., Babb, V. L., Del Bono, E. A., Broomer, B. W., Pericak-Vance, M. A., and Haines, J. L., 1998, Prevalence of mutations in TIGR/Myocilin in patients with adult and juvenile primary open-angle glaucoma, *Am J Hum Genet* **63**(5):1549-52.
- Wolfs, R. C., Klaver, C. C., Ramrattan, R. S., van Duijn, C. M., Hofman, A., and de Jong, P. T., 1998, Genetic risk of primary open-angle glaucoma. Population-based familial aggregation study, *Arch Ophthalmol* **116**(12):1640-5.
- Wu, J., Hewitt, A. W., Green, C. M., Ring, M. A., McCartney, P. J., Craig, J. E., and Mackey, D. A., 2006, Disease severity of familial glaucoma compared with sporadic glaucoma, *Arch Ophthalmol* **124**(7):950-4.
- Zatsepina, O., Baly, C., Chebrout, M., and Debey, P., 2003, The step-wise assembly of a functional nucleolus in preimplantation mouse embryos involves the cajal (coiled) body, *Dev Biol* **253**(1):66-83.
- Zhang, J., Tomasini, A. J., and Mayer, A. N., 2008, RBM19 is essential for preimplantation development in the mouse, *BMC Dev Biol* **8**:115.
- 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**(1):223-34.
- Zode, G. S., Kuehn, M. H., Nishimura, D. Y., Searby, C. C., Mohan, K., Grozdanic, S. D., Bugge, K., Anderson, M. G., Clark, A. F., Stone, E. M., and Sheffield, V. C., 2011, Reduction of ER stress via a chemical chaperone prevents disease phenotypes in a mouse model of primary open angle glaucoma, *J Clin Invest* **121**(9):3542-53.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin, Ampere
Abb.	Abbildung
ad	zu
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
CMV	Cytomegalievirus
Cy	Carbocyanin
DAPI	4` ,6-Diamidino-2-phenylindol
dest.	destilliert
DIG	Dioxygenin
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
dpc	Tage nach der Befruchtung (days post coitus)
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethyldiamintereessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ES	embryonale Stammzellen
et al.	und andere
ETS	external transcribed spacer
FBS	fetal bovine serum
fwd	forward
g	Gramm, Erdbeschleunigung

G	Guanin, Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GNB2L	Guanin Nukleotide Binding Protein 2L
h	Stunde
HBS	Hepes gepufferte Salzlösung (Hepes buffered saline)
Hefe bzw. Bäckerhefe	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
HTM-N	SV40-transformierte humane Trabekelwerkszellen
<i>in vitro</i>	außerhalb des lebenden Organismus
<i>in vivo</i>	im lebenden Organismus
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITS	internal transcribed spacer
k	Kilo (10^3)
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
m	Milli- (10^{-3}), Meter
M	Molar (mol/l)
mm	Mus musculus
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
n	Nano (10^{-9})
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
p	Piko (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidium-Iodid

POWG	Primäres Offenwinkelglaukom
pre-rRNA	Vorläufer-RNA der ribosomalen RNAs
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
S	Svedberg
s	Sekunde
siRNA	small interfering RNA
sog.	sogenannt
ss	single strand (einzelsträngig)
SSU	Small Subunit (40S Untereinheit des Ribosoms)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TG	Transgen
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
üN	über Nacht
V	Volt
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit
WT	Wildtyp
x	-fach, mal
z.B.	zum Beispiel
β	beta
µ	Mikro- (10^{-6})

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung zum Aufbau des Auges (A) und des Kammerwasserabflusses (B).....	2
Abb. 2: Schematische Darstellung der Proteinstruktur von WDR36.	8
Abb. 3: Modell der Ribosomenbiogenese.	10
Abb. 4: Vereinfachte schematische Darstellung der pre-rRNA Prozessierung in humanen Zellen.	11
Abb. 5: Schematische Darstellung des Aufbaus für einen Kapillarblot.....	37
Abb. 6: Schematische Darstellung der Gene Targeting-Strategie zur Generierung der <i>Wdr36</i> Knock-out Mauslinie.	66
Abb. 7: Nested-PCR zur Genotypisierung von Präimplantationsstadien.....	67
Abb. 8: Phänotyp der <i>Wdr36</i> -defizienten Embryonen.	68
Abb. 9: Phänotyp und Übersicht über die Entwicklung der Embryonen nach Injektion von siRNA.	71
Abb. 10: Subzelluläre Lokalisierung von Epitop-getagtem <i>Wdr36</i>	73
Abb. 11: Subzelluläre Lokalisierung von WDR36 in HTM-N Zellen.....	74
Abb. 12: WDR36 mRNA Expression in humanen Zellen <i>in vitro</i>	75
Abb. 13: WDR36 mRNA Expression in HTM-N Zellen nach Depletion mittels RNA Interferenz.....	76
Abb. 14: Bestimmung der relativen Zellzahl nach Depletion von WDR36 mittels RNA Interferenz.....	77
Abb. 15: Effekte der WDR36 Depletion auf den Zellzyklus von HTM-N Zellen.....	78
Abb. 16: Relative Menge freier Nukleosomen nach Depletion von WDR36 in HTM-N Zellen.	79
Abb. 17: Real-time RT-PCR Analyse der mRNA Expression von BAX (A), TP53 (B) und CDKN1A (C) in HTM-N Zellen nach Depletion von WDR36.	80
Abb. 18: Vereinfachte schematische Darstellung der rRNA Prozessierung in humanen Zellen.	82
Abb. 19: Northern-Blot Analyse der rRNA Prozessierung nach Depletion von WDR36 in HTM-N Zellen.....	83

Abb. 20: Repräsentative Pulse-Chase Analyse der rRNA Prozessierung nach Depletion von WDR36 in HTM-N Zellen in Übersicht (A) und Detail (B).....	85
Abb. 21: Relative <i>Wdr36</i> mRNA Expression im Auge von Wildtypen (WT) und heterozygoten <i>Wdr36</i> -defizienten (<i>Wdr36+/-</i>) Mäusen.	89
Abb. 22: Schematische Darstellung der rRNA Prozessierung zur 18S rRNA in murinen Zellen.	90
Abb. 23: Northern-Blot Analyse der rRNA Prozessierung im Mausauge von heterozygoten <i>Wdr36</i> - defizienten Mäusen (<i>Wdr36+/-</i>).	91
Abb. 24: Exzitotoxische Schädigung von retinalen Ganglienzellen in Wildtyp- (WT; C-D) und heterozygoten <i>Wdr36</i> defizienten (<i>Wdr36+/-</i>) Mäusen (G-H) mittels NMDA.	93
Abb. 25: Quantifizierung der Axone im <i>N. opticus</i> nach exzitotoxische Schädigung von retinalen Ganglienzellen mittels NMDA.	94
Abb. 26: Exemplarische Darstellung sagittaler Semidünnschnitte von Segmenten des vorderen Auges nach Injektion von Polystyren-Microbeads bzw. von PBS.	95
Abb. 27: Darstellung des Verlaufs des Augeninnendrucks (A-F) und Quantifizierung der Axone im Sehnerv sechs Wochen nach Injektion von Polystyren-Microbeads... .	97
Abb. 28: Kreuzung der heterozygoten <i>Wdr36</i> -defizienten Mäuse mit βB1-CTGF Über-expressionsmäusen.	99
Abb. 29: Analyse des Phänotyps der Kreuzung von heterozygoten <i>Wdr36</i> -defizienten Mäusen mit heterozygoten <i>Wdr36</i> -defizienten_Del605-607 Mäusen.....	101
Abb. 30: Analyse der Anzahl der Axone im Sehnerv (A) bzw. der relativen okulären <i>Wdr36</i> mRNA Expression von <i>Wdr36+/-_Del605-607</i> Mäusen (B).....	103
Abb. 31: Northern-Blot Analyse der rRNA Prozessierung im Mausauge von <i>Wdr36+/-_Del605-607</i> Mäusen.....	104
Abb. 32: Quantifizierung der Axone im <i>N. opticus</i> von <i>Wdr36+/-_Del605-607</i> Mäusen nach exzitotoxischer Schädigung von retinalen Ganglienzellen mittels NMDA.....	105
Abb. 33: Strategie zur Generierung des Vektors step1.....	109
Abb. 34: Schematische Übersichtszeichnung zur Generierung von Vektor step2 (A) und zugehöriger Kontrollverdau repräsentativer Klone (B,C).....	111
Abb. 35: Schematische Darstellung von Vektor step3 (A) und Restriktionsverdau repräsentativer Klone (B).	113
Abb. 36: Schematische Übersichtszeichnung zur Generierung von Vektor step4A (A) und zugehöriger Kontrollverdau einzelner Klone (B).....	114

Abb. 37: Schematische Übersichtszeichnung zur Generierung des Zielvektors step4 (A) und Kontrollverdau repräsentativer Klone (B).	116
Abb. 38: Nachweis der homologen Rekombination des Zielvektors in murinen embryonalen Stammzellen mittels Long-Range-PCR (B-D).	119
Abb. 39: LacZ Färbung an positiv getesteten gentechnisch modifizierten murinen ES-Zellen.	120

7.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Reagenzienliste.....	13
Tab. 2: Verwendete Enzyme.....	15
Tab. 3: Verwendete Reaktions-Kits.....	16
Tab. 4: Auflistung der verwendeten Nukleotidprimer.....	16
Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Plasmide.....	19
Tab. 6: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme.....	20
Tab. 7: Übersicht über die verwendeten Größenstandards.....	20
Tab. 8: Liste der verwendeten Geräte.....	20
Tab. 9: Auflistung der Verbrauchsmaterialien.....	22
Tab. 10: Liste der verwendeten Antikörper.....	23
Tab. 11: Auflistung von Puffern und Lösungen.....	23
Tab. 12: Gelrezepte für Acrylamid-Gele.....	27
Tab. 13: Reaktionsansatz zur Herstellung von cDNA aus RNA.....	32
Tab. 14: Thermocycler-Programm zur Herstellung von cDNA aus RNA.....	32
Tab. 15: Reaktionsansatz für einen qPCR-Ansatz mit dem HotStarTaq-Kit	34
Tab. 16: PCR-Programm zur Durchführung der qPCR.....	34
Tab. 17: Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm für die ITS1-Sonden-PCR.	35
Tab. 18: Reaktionsansatz zur Herstellung von RNA-Sonden für Northern-Blot.....	36
Tab. 19: Hybridisierungsansatz zur siRNA-Synthese.....	39
Tab. 20: Reaktionsansatz zur Doppelstrang-Synthese.....	39
Tab. 21: Reaktionsansatz zur siRNA-Synthese.....	39
Tab. 22: Reaktionsansatz zum Verdau von ssRNA und dsDNA.....	40
Tab. 23: Reaktionsansätze und Thermocycler-Programme zur Amplifikation verschiedener Genkassetten für das Recombineering.....	41
Tab. 24: Reaktionsansätze und Thermocycler-Programme für die verwendeten Long- Range-PCRs.....	44
Tab. 25 Liste der verwendeten Antikörper für immunzytochemische Färbungen mit den jeweiligen Verdünnungen und den zugehörigen Sekundärantikörpern.....	51
Tab. 26: Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm zur Genotypisierung von konventionellen <i>Wdr36</i> Knock-out Mäusen.....	53

Tab. 27 Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm für die Genotypisierung von pCAGGS-Wdr36 Del605-607 transgenen Mäusen.....	53
Tab. 28: Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm für die Genotypisierung von β B1-CTGF transgenen Mäusen.....	54
Tab. 29: Reaktionsansatz und Thermocycler-Programm für die Genotypisierung von <i>Wdr36</i> Knock-out Blastozysten über eine Nested-PCR Strategie.....	58
Tab. 30: Reaktionsansätze und Thermocycler-Programme für die Genotypisierung pCAGGS-Wdr36 Del605-607 transgenen Blastozysten über eine Nested-PCR Strategie.....	59
Tab. 31: Übersicht über die <i>in vitro</i> Embryonalentwicklung nach Injektion von siRNA.	
.....	70

7.5 Danksagung

Es ist an der Zeit „Danke“ zu sagen. Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die tatkräftige Unterstützung einer ganzen Reihe von Leuten. Darum ein „Danke“ an

Herrn Prof. Dr. Ernst R. Tamm für die Vergabe dieses Themas, seine Begeisterung für WDR36, seine ständige Diskussionsbereitschaft und die Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Herbert Tschochner für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Dr. Philip Milkereit für seine Hilfe bei all den Dingen rund um die Ribosomenbiogenese.

Herrn Dr. Michael Bösl für die gute Zusammenarbeit und viele hilfreiche Telefonate zum Thema Mausgenetik.

Herrn Dominik Meinel für eine großartige Zusammenarbeit, sein anhaltendes Interesse an WDR36 auch lange nach seiner Diplomarbeit, zahlreiche Diskussionen über dies und das und einer Menge Spass im Labor („English rose...“).

Herrn Dr. Markus Kröber und **Frau Loreen März** für ihre Vorarbeiten und die gute Zusammenarbeit.

Alle Mitarbeiter des Lehrstuhls für Humananatomie und Embryologie (hier fühle sich jede/r angesprochen) für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor und auch darüber hinaus. Vor allem möchte ich **Herrn Ludwig Zeilbeck** (Tierstall?) und **Sabrina Ullmann** (☺) erwähnen, die mich nun schon seit längst vergangenen Studentagen begleiten. Dank gebührt auch den „Mädels“ **Silvia Babl, Angelika Pach, Elke Stauber, Corinna Unger** und **Margit Schimmel** für ihre Hilfe bei Färbungen, dem Schneiden unzähliger Sehnerven, ihre Hilfe am Mikroskop und den einen oder anderen kleinen Ratsch zwischendrin...

Meine ganze Familie für ihre Unterstützung und so vieles mehr.

7.6 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Martin Gallenberger, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Regensburg, Juni 2012

Martin Gallenberger