

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

**EXPERIMENTELLE ANALYSE DES PHÄNOTYPUS  
VON WDR36- DEFIZIENTEN MÄUSEN**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg



vorgelegt von  
**Loreen März**  
2014



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

**EXPERIMENTELLE ANALYSE DES PHÄNOTYPUS  
VON WDR36- DEFIZIENTEN MÄUSEN**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg



vorgelegt von

**Loreen März**

2014

Dekan: Prof. Dr. Ernst R. Tamm

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 05.11.2014

**Meiner Familie**



## Inhaltsverzeichnis

### **Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Pathogenese und Ätiologie des Glaukoms.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Genetische Hintergründe des Glaukoms.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Aufgabenstellung der Arbeit.....</b>	<b>9</b>
<b>2 Materialien und Methoden.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Materialien.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1.1 Grundausstattung.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1.2 Geräte für die Histologie.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1.4 Verwendete kommerziell erwerbliche Kits.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1.5 Oligonucleotid.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 <i>In vitro</i> Experimente.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.1 Agarose- Gelelektrophorese.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2.2 Prinzip der Expressionsanalyse mittels konservativer RT-PCR und quantitativer real-time RT-PCR.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.3 Herstellung von cDNA.....</b>	<b>16</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>2.3 In vivo Experimente.....</b>	18
<b>2.3.1 Haltung der Versuchstiere.....</b>	18
<b>2.3.2 Gewebepräparation aus Maus.....</b>	18
2.3.2.1 Augen- und Opticuspräparation.....	18
2.3.2.2 Präparation der Abdominalorgane.....	19
2.3.3 Intravitreale Injektion von NMDA.....	19
2.3.3.1 Narkotisierung der Versuchstiere.....	19
2.3.2.2 Intravitreale Injektion von NMDA und PBS.....	19
<b>2.3.4 DNA- Isolierung aus Mäuseschwänzen.....</b>	21
<b>2.3.5 Histologische Aufarbeitung der Gewebeproben.....</b>	21
2.3.5.1 Epon- Einbettung.....	21
2.3.5.1.1 Herstellung der Reagenzien.....	21
2.3.5.1.2 Durchführung der Epon- Einbettung der Augen.....	22
2.3.5.1.3 Epon- Einbettung der Sehnerven.....	23
2.3.5.1.4 Durchführung der Epon- Einbettung der Abdominalorgane.....	25
2.3.5.2 Herstellung von Semidünnschnitten.....	26

## Inhaltsverzeichnis

2.3.5.2.1 Herstellung von Semidünnschnitten der Augen.....	26
2.3.5.2.2 Herstellung von Semidünnschnitten der Sehnerven.....	27
2.3.5.2.3 Herstellung von Semidünnschnitten der Abdominalorgane.....	28
<b>2.3.6 Auswertung.....</b>	<b>29</b>
2.3.6.1 Mikroskopie.....	29
2.3.6.2 Auswertung der Semidünnschnitte.....	29
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Mikroskopische Untersuchung der Augen von WDR-36-defizienten Tieren.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Lichtmikroskopische Untersuchung extraokulärer Gewebe von heterozygoten WDR-36-defizienten Mäusen.....</b>	<b>33</b>
<b>3.3 Quantitative Analyse der Anzahl von Axonen im Sehnerv von heterozygoten WDR36-defizienten Mäusen.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4. Exzitotoxischer Schaden nach Injektion von NMDA.....</b>	<b>39</b>
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>42</b>
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>45</b>
<b>6 Anhang.....</b>	<b>46</b>
<b>6.1 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>46</b>
<b>6.2 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>53</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>6.3 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>58</b>
<b>6.4 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>60</b>
<b>6.5 Danksagung.....</b>	<b>62</b>
<b>6.6 Erklärungen.....</b>	<b>63</b>
<b>6.7 Curriculum vitae.....</b>	<b>64</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Pathogenese und Ätiologie des Glaukoms

Eine der häufigsten Erkrankungen des Sehapparats ist das Glaukom, im Volksmund auch Grüner Star genannt. Eine Degeneration der Fasern des Nervus opticus und in der Folge der retinalen Nervenfasern führt zum Gesichtsfeldverlust und im schlimmsten Fall zur beidseitigen Erblindung. Das Verständnis der Pathogenese des Glaukoms hat sich in den letzten Jahren grundlegend geändert. Während man früher zur Diagnose eines Glaukoms einen erhöhten Augeninnendruck voraussetzte, orientiert man sich heute einzig an den strukturellen Schäden des Nervus opticus. So bezeichnet der Terminus „Glaukom“ nach neuer Definition kein einheitliches Krankheitsbild mehr; vielmehr werden unter dem Sammelbegriff „Glaukom“ alle Schäden des Sehnerven mit Axonverlust zusammengefasst. Eine weitere Voraussetzung für die Diagnose eines Glaukoms ist das Fehlen einer optischen Polyneuropathie als Ursache der Seheinschränkungen. Die doch sehr unterschiedlichen Ursachen (s.u.) haben alle den Verlust von Nervenfasern und nachfolgend den von Nervenzellen zur Folge.

Aus der Optikusschädigung, die zu einer Degeneration der retinalen Nervenfasern führt, resultieren die für das Glaukom typischen Gesichtsfeldausfälle. Vom Blinden Fleck ausgehend bildet sich ein bogenförmiges Skotom (Bjerrum- Skotom) aus, das bei unverändert weiterbestehendem pathologischen Augeninnendruck zum völligen Sehverlust des betroffenen Auges fortschreitet. Unverzichtbar für die Diagnosestellung eines Glaukoms ohne Gesichtsfeldausfälle ist die Untersuchung des Augenhintergrunds zur Beurteilung der Papilla nervi optici zur Klassifizierung des bereits eingetretenen Optikusschadens. Zur Objektivierung des Verlusts von Optikus- und Retinazellen verwendet man die Cup- Disc- Ratio (CDR) des Sehnervenkopfes, ein Maß für die druckbedingte Exkavation der Sehnervenpapille. Auch die gesunde Papille zeigt eine physiologische Eindellung bis zu einem CDR- Wert von 0,3; ein CDR- Wert von 1 würde eine Exkavation der gesamten Papille bedeuten. Bei Glaukompatienten können Werte bis 0,7 oder höher auftreten, die sich als deutliche Eindellung der Papille in Richtung des Sehnerven in der Fundoskopie darstellen lassen.

Entsprechend ihrer Ätiologie werden Glaukome in primäre und sekundäre Glaukome unterteilt. Während bei sekundären Glaukomen andere, teilweise nicht- okuläre Erkrankungen zu einer Pathologie des Sehnerven führen, kann beim primären Glaukom keine extraokuläre Ursache gefunden werden.

Primäre Glaukome werden nach der Struktur des Kammerwinkels in primäre Offenwinkelglaukome (primary open angle glaucoma, POAG) und primäre Engwinkelglaukome (primary angle closure glaucoma, PACG) eingeteilt.

Engwinkelglaukome entstehen durch eine Einengung des Kammerwinkels und daraus folgend eine Abflussbehinderung des Kammerwassers in den Plexus venosus. Man unterscheidet sinnvollerweise Patienten mit einer gonoskopisch gesicherten Enge des Kammerwinkels ohne Sehnervenschädigung, also einem primären Kammerwinkelverschluss (primary angle closure, PAC), von denjenigen mit einer bereits eingetretenen Schädigung des Sehnervs (primary angle closure glaucoma, PACG). Der größte Teil der Betroffenen leidet an einer chronischen, asymptotischen Form des PACG mit schmerzlos fortlaufendem Gesichtsfeldverlust; nur ein kleiner Prozentsatz wird bei ersten Mal durch einen akuten Verschluss des Kammerwinkels mit nachfolgendem Glaukomanfall auffällig. Vor Diagnosestellung eines PAC oder PACG sollten Erkrankte mit einer ophthalmologischen Zweitdiagnose, die Ursache eines Visusverlust sein kann, identifiziert werden. Beispiele für glaukomassoziierte Sekundärerkrankungen sind Schäden der Iris, nicht- glaukomatöse Optikusatrophien, Trübungen der Augenlinse und Defekte des Korneaendothels.

Im Gegensatz zum Engwinkelglaukom werden beim Offenwinkelglaukom (primary open angle glaucoma, POAG) in der gonoskopischen Untersuchung keine Auffälligkeiten des Kammerwinkels nachgewiesen. Auch dürfen zur Diagnose eines POAG keine Hinweise darauf vorliegen, dass andere Erkrankungen ursächlich für die vorliegenden Optikusschäden sind. Offenwinkelglaukome entstehen durch einen relativen Überdruck des Kammerwassers im Verhältnis zum Druck im Schlemm-Kanal und in den Venen des Kammerwinkels. Folglich genügt bei arterieller Hypotonie, also einem niedrigen systemischen Blutdruck, ein normaler intraokularer Druck, um einen im Vergleich erhöhten Augeninnendruck hervorzurufen.

Unter normotensiven Bedingungen führt wiederum erst ein erhöhter IOP zu Schädigungen des Sehapparats. Als normal werden Druckwerte zwischen 10 und 21mmHg angesehen, wobei bereits ab Werten von 18mmHg der Druck regelmäßig kontrolliert oder ein Tagesdruckprofil angefertigt werden sollte, da der Augeninnendruck einer zirkadianen Rhythmik folgt.

Primäre Glaukome können sich in unterschiedlichen Lebensstadien manifestieren. Betroffene, die bereits in jungen Jahren erkranken (sog. juvenile-onset primary open angle glaucoma, JOAG), zeigen oftmals schwerere Verläufe als Patienten mit höherem Lebensalter. Gerade bei diesen Erkrankten wird das Glaukom spät oder zu spät entdeckt, da nur wenige die charakteristischen Beschwerden mit einem Glaukom in Verbindung bringen.

Sekundäre Glaukome beruhen im Gegensatz zu den primären Glaukomen auf anderen Pathologien des Auges, Traumen oder systemischen Erkrankungen. 20% aller Glaukome können auf sekundäre Ursachen zurückgeführt werden. Durch eine Pathologie des Auges entsteht ein erhöhter Augeninnendruck, der dem bekannten Mechanismus folgend zu einer Schädigung des Nervus opticus führt. Unter anderem können Traumen des Bulbus, Neovaskularisation, Pathologien der Linse (z. B. hypermature Katarakt) oder der Uvea ein sekundäres Glaukom entstehen lassen. Unklarheit besteht bei der Einordnung des Pigmentdispersionssyndrom und des Pseudoexfoliationsglaukoms hinsichtlich ihrer Zuordnung zu den sekundären Glaukomen (Foster et al., 2002).

Für das internationale öffentliche Gesundheitswesen spielt das Glaukom eine nicht unerhebliche Rolle. Nach der Katarakt stellt das Glaukom den zweithäufigsten Grund für Erblindung weltweit dar. 12% aller beidseitig Erblindeten leiden oder litten aktuell an einem Glaukom; geht man im Moment von 8,4 Millionen Betroffenen aus, rechnet man bis 2020 mit bis zu 11,1 Million Erblindeten. Aber auch die weniger dramatisch Erkrankten sollten nicht übersehen werden. Wurden bis zum Jahr 2010 geschätzt 60 465 796 Personen weltweit mit einem Glaukom diagnostiziert, wird im Laufe der nächsten zehn Jahre die Anzahl der an einem Glaukom erkrankten Personen um fast 20 Millionen Patienten auf 79 640 184 Erkrankte zunehmen, was bei den über 40-Jährigen einen Anteil von 2,86% entspricht (Quigley et al., 1996, 2006).

Auch bei isolierter Betrachtung der USA, Europas (Dänemark, Finnland, Island, Irland, Italien, Niederlande und Vereintes Königreich) und Australiens liegt das Glaukom an zweiter Stelle in der Rangliste der Gründe für Erblindung; nur die altersspezifische Makuladegeneration (AMD) kostet mehr Menschen in diesen Ländern das Augenlicht. Im Jahr 2002 erblindeten hier Schätzungen zufolge zwischen 0,4 (USA) und 0,6 (Australien) Prozent der Bevölkerung über 50 Jahre. Dieser Prozentsatz mag gering erscheinen, auf die Gesamtbevölkerung umgerechnet waren jedoch zwischen 0,315 Millionen (Australien) und 0,713 Millionen (Europa) Patienten nicht mehr sehfähig. In 18% der Fälle konnte die Erblindung auch in diesen Ländern auf die Spätschäden eines Glaukoms zurückgeführt werden (Resnikoff et al., 2004).

## 1.2 Genetische Hintergründe des Glaukoms

Bis heute wurden - basierend auf Kopplungsanalysen - 27 Gene beschrieben, die mit der Entstehung eines primären Offenwinkelglaukoms (POAG) in Verbindung gebracht werden können (Sarfarazi et al., 1998, Stoilova et al., 1996, Wirtz et al., 1999, Wiggs et al., 2000, Wiggs et al., 2004, Trifan et al., 1998). Nur drei der Kandidatengene konnten bisher mithilfe der Positionsklonierung bisher nur drei Gene identifiziert werden: Myocilin (*MYOC*), Optineurin (*OPTN*) und WD40-repeat36 (*WDR36*).

Myocilin (*MYOC*), ein Olfactomedinprotein, wird mit der Entstehung des jugendlichen Offenwinkelglaukoms (JOAG) in Verbindung gebracht. Es ist auf Chromosom 1, Genort q24.3-q25.2 lokalisiert. Weltweit wurden bei 3-4% der adulten und bei 10% der juvenilien Offenwinkelglaukome verschiedene Mutationen bei Myocilin nachgewiesen. Myocilin wird in vielen Geweben des vorderen Augenabschnittes, wie in Iris, Ziliarkörper oder Kornea exprimiert, am stärksten jedoch im Trabekelwerk. Deswegen und wegen der *in vitro* nachgewiesenen Funktion von Myocilin bei der

trabekulären Zelladhäsion geht man davon aus, dass hohe Konzentrationen an Myocilin den Abflusswiderstand für das Kammerwasser erhöhen. *In vivo* weisen Myocilin- knock-out- Mäuse keinen offenkundig veränderten Phänotyp auf. Eine konkrete biologische Funktion von Myocilin, sei es am Auge oder an anderen Organsystemen, ist bislang nicht bekannt (Stone et al., 1997, Michels- Rautenstrauss et al., 2002).

Optineurin (*OPTN*) ist auf Chromosom 10 am Genort p15-p14 lokalisiert. Die betroffenen Familien zeigen einen autosomal-dominanten Erbgang. Hier beeinflusst Optineurin die Ausbildung eines Offenwinkelglaukoms, das jedoch in den seltensten Fällen mit einem signifikant erhöhten Augeninnendruck einhergeht, was man im Allgemeinen als Normaldruckglaukom (normal tension glaucoma, NTG) bezeichnet. Nur ein geringer Anteil von 18,4% zeigte moderat erhöhte Druckwerte, eine manifeste intraokuläre Hypertonie konnte nur bei sehr wenigen Testpersonen nachgewiesen werden. Da nicht immer ein Zusammenhang zwischen Optineurin-Mutationen und der Ausbildung eines Glaukoms bewiesen werden konnte, wird Optineurin heute eher als Modifikator in der Glaukomentstehung verstanden (Rezaie et al., 2002, Sarfarazi et al., 2003).

*WDR36* ist am Genort GLC1G auf dem Chromosom 5q22.1 lokalisiert. Das *WDR36* wird so genannt, weil es mehrere WD- Repeats enthält, von denen jedes aus ca. 40 Aminosäuren besteht und meist mit Tryptophan (W) und Aspartat (D) endet. Diese Domäne ist häufig und in verschiedenen Proteinen zu finden; meist folgen sieben bis acht Repeats aufeinander, die eine Beta- Propeller- Struktur ausbilden. Die *WDR36*-exprimierenden Proteine spielen unter anderem wichtige Rollen bei der Zellteilung, der Zelldifferenzierung, der mRNA- Modifizierung sowie weitere Prozesse, bei denen es gilt, mehrere Proteineinheiten zu koordinieren. Durch Mutationsanalysen konnten 24 Allelvarianten des *WDR36* identifiziert werden, von denen jeweils die Hälfte auf Änderungen der Aminosäuresequenz oder der Introns zurückgehen.

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien über den Zusammenhang zwischen diesen Mutationen im *WDR36*-Gen und der Ausbildung eines Glaukoms veröffentlicht. Pasutto et al. konnten bei 399 deutschen Glaukompatienten insgesamt 44 verschiedene Mutationen nachweisen. Die gefundenen Mutationen lagen jedoch

zum größten Teil in Introns oder bewirkten eine stille Mutation. 14 Mutationen resultieren allerdings in einem Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz. Die Mutationen L25P, A163V, H212P, A449T und D658G konnten von Pasutto als krankheitsauslösend ausgeschlossen werden. Acht weitere Mutationen scheinen im Gegensatz dazu in Zusammenhang zur Ausbildung eines Glaukoms zu stehen: Während bei 3,7% der Erkrankten eine dieser Mutationen nachgewiesen werden konnte, wiesen sie nur 0,2% der nicht-erkrankten Kontrollgruppe auf. (Pasutto et al., 2008) Bei amerikanischen Patienten konnten keine so eindeutigen Zusammenhänge gefunden werden. Hauser et al. bewiesen eine Verknüpfung zwischen Erkrankungsschwere und Mutationen, jedoch keinen definitiven Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Mutationen und einer Erkrankung.

Wird der Genort GLC1G vererbt, kann mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit mit dem Auftreten eines Glaukoms gerechnet werden. Die Vererbung von *WDR36*-Mutationen muss im Gegenzug dazu nicht unbedingt mit einem Glaukom assoziiert sein.

Über die Funktion von *WDR36* ist bisher wenig bekannt. Mao et al. postulierten basierend auf Mikroarraystudien einen Einfluss von *WDR36* auf die IL-2-abhängige T-Zell-Aktivierung.

Das in *Saccharomyces cerevisiae* vorkommende Gen UTP21 ist sehr gut erforscht. Es besteht eine große Ähnlichkeit zu *WDR36*, weswegen davon ausgegangen wird, dass *WDR36* ein homologes Gen zu UTP21 sein könnte. Analog zu Utp21 ist auch *WDR36* in Wirbeltierzellen am Nucleolus lokalisiert. Zwischen menschlichem *Wdr36* und dem Utp21 der Hefe besteht eine 24%-ige Übereinstimmung, während die Übereinstimmung von Utp21 und dem *WDR36* des Zebrafisches 25 Prozent beträgt. Da die Ähnlichkeit zwischen menschlichem und Zebrafisch- *WDR36* 65% beträgt, stellt das Zebrafisch-Modell eine probate Möglichkeit zur Erforschung der Funktion von *WDR36* in Wirbeltieren dar.

Skarie et al. konnten bei der Untersuchung von embryonalen und adulten Zebrafisch-Gewebe eine ubiquitäre Präsenz von *WDR36* nachweisen, mit überdurchschnittlicher Anreicherung in stark proliferierenden Geweben. Zu den Geweben mit dem höchsten Gehalt an *WDR36* gehörten unter anderem das Augenbläschen, vor allem in Linse und peripherer Retina, und Bereiche von Darm und ZNS. Durch viralen Gentransfer

konnten heterozygote und homozygote *WDR36*- Mutanten erzeugt werden. Während die heterozygoten Embryonen keine phänotypischen Auffälligkeiten zeigten, fielen die homozygoten Tiere durch einen signifikant verringerten Gehalt von *WDR36* in allen Geweben auf. Phänotypisch zeigte sich eine sich ungefähr ab dem 3. Tag manifestierende Wachstumsretardierung besonders der Köpfe und Augen; im weiteren Verlauf traten eine Trübung der Augenlinse und Fehlbildungen der Eingeweide wie Lebernekrosen und das Fehlen der Schwimmblase hinzu. Eine sukzessive Verschlechterung der Fehlbildungen führte zu einem frühzeitigen Tod der Homozygoten um den 11. Tag post conceptionem.

Am Auge konnte neben der offensichtlichen Retardierung eine Ausdünnung der Retina durch Tod der Zellen beobachtet werden.

Doch auch bei den Heterozygoten war die Proliferationsfähigkeit der Retina vermindert. Um die subtilen Veränderungen sicher quantifizieren zu können, wurden die Präparate mittels RT-PCR auf die Expression von *gap34* und *c1q* untersucht. Erhöhte Werte von *gap34* als Marker für retinalen Zellschaden werden bei Axotomien oder Abrissverletzungen des Nervus opticus gefunden, während *c1q* für Neuropathien des Nerven inklusive glaukomatösen Schädigungen spricht. Sowohl bei Heterozygoten als auch bei Wildtypieren konnten niedrige Werte beider Gene gefunden werden, ohne dass ein Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen zu erkennen war.

Da sich *WDR36* jedoch auch im Laufe der Säugetierevolution stark in seiner ursprünglichen Form erhalten geblieben ist, teilen auch Schimpansen, Hunden, Ratten und Mäuse 11 der Aminosäuremutationen des Menschen. Eine Expression von *WDR36* konnte mittels Real time quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) neben dem okularen Gewebe von Linse, Iris, Sklera, Ziliarmuskel, Ziliarkörper, Trabekelwerk, Retina und Nervus opticus auch in Gewebe von Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas nachgewiesen werden. Bei erwachsenen Mäusen findet man eine Genexpression in ähnlichen Geweben wie beim Menschen; ein hoher Gehalt an *WDR36* ließ sich im Gewebe von Herz, Skelettmuskel, Gehirn, Leber, Niere und Hoden darstellen, ein etwas geringerer in Milz und Lunge. Bereits bei sieben Tage alten Embryos konnte eine Aktivität von

*WDR36* nachgewiesen werden (Chi et al., 2010, Footz et al., 2009, Monemi et al., 2005).

Wie genau sich *WDR36* auf die RNA- Reifung und andere Zellprozesse auswirkt, ist noch unbekannt. Sicher ist jedoch, dass ein Verlust von *WDR36* in der Phase der Embryogenese zu einer Aktivierung des p53-Stress-Response- Pathways führt. Dies führt zu einer Verlangsamung des Zellzyklus, die im transienten Stressfall eine positive Wirkung auf die Zelle ausübt. Im Falle eines Verlusts von *WDR36* entsteht im Gegensatz dazu aber eine kontinuierliche Stresssituation, die über den p53- Pathway zu Apoptose der betroffenen Zellen führt.

Die genauen Auswirkungen von *WDR36* im Rahmen der Embryo- und Fetogenese sind noch weitgehend ungeklärt. Gallenberger et al. konnten kürzlich nachweisen, dass homozygote Deletionsmutanten schon in der Embryonalphase letal sind und sich in Kultivierungsexperimenten nicht über das Blastozystenstadium hinaus anzüchten lassen, was auf eine existentiell wichtige Bedeutung von *WDR36* hinweist.

### 1.3 Aufgabenstellung der Arbeit

Analog zur Untersuchung der homozygoten Tiere in oben genannter Arbeit widmet sich diese Arbeit der Betrachtung der durch knock- out entstandenen Heterozygoten.

Im Laufe der letzten Jahre wurden immer mehr Erbkrankheiten einer ribosomalen Genese zugeordnet. Auch die Entstehung des POAG scheint auf einen Fehler in der ribosomalen Biosynthese zurückzugehen; hier führt wohl eine Haploinsuffizienz über den p53 Pathway zur Apoptoseaktivierung. Dieser programmierte Zelltod ist die Ursache des Sehverlusts beim POAG, wenn er die retinalen Ganglienzellen betrifft. Veränderungen von *WDR36* könnten so zu einer erhöhten Anfälligkeit dieser Zellen für die Apoptose, zum Nervenzellverlust und zu einer Erhöhung des Augeninnendrucks führen.

Aufgrund der oben beschriebenen Gemeinsamkeiten zwischen Mensch und Mäusen werden zur Erforschung von *WDR36* oft Mausmodelle verwendet. Um sicherzustellen, dass das zu untersuchende Gen exprimiert wird, werden in der molekularen Forschung häufig gentechnisch veränderte Tiermodelle entwickelt, um die Regulation und Funktion bestimmter Gene zu untersuchen. Dabei können entweder verschiedene Gene entfernt (*Knock-out*) oder zusätzlich eingeschleust (*Transgen*) werden. Im vorliegenden Fall wurden Tiere mit einer gezielten Inaktivierung des *WDR36* erschaffen (entsprechend Won et al., 2011), um die Auswirkungen des Heterozygotenstatus zu erforschen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Grundausstattung

Materialien/ Geräte	Hersteller
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Glaswaren	Schott, Roth, VWR
Handschuhe Latex	Roth, Karlsruhe
Handschuhe Nitrile	VWR, Darmstadt
Inolab pH- Meter	WTW GmbH, Schwabach
Memmert Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Giessen
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA
Multi- Reaktionsgefäße 0,5 1,5 und 2,0 ml	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Pipetman Pipetten	Gilson, Den Haag, Niederlande
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Pipettierhilfe Macroman™	Gilson, Den Haag, Niederlande
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Kelheim
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Sunrise-Basic ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH, Grodig, Österreich
Systec V75 Autoklav	Systec GmbH, Wettenburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf, Hamburg

Tab. 1: Grundausstattung

## 2.1.2 Geräte für die Histologie

Geräte	Hersteller
Einbettautomat EM TP (Epon)	Leica, Wetzlar
Slotgrids/ Kupfergrids	Plano, Marburg
Ultracut E- Ultramikrotom (Epon)	Reichert- Jung, Kirchseeon

Tab. 2: Geräte für die Histologie

## 2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien und Reagenzien in der Reinheitsstufe pro analysis bezogen.

Reagenzien	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt
Bleicitrat	Merck, Darmstadt
Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat	Merck, Darmstadt
2- Dodecenylsuccinic- acid- anhydride (DDSA)	Merck, Darmstadt
2,4,6- Tri(dimethylaminomethyl)Phenol (DPM-30)	Serva, Heidelberg
Epon	Serva, Heidelberg
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycidether	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
MNA	Roth, Karlsruhe
Osmiumtetroxid	Merck, Darmstadt
Paraffin	Engelbrecht, München
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
1,4p-phenyldiamin	Sigma, Taufkirchen
Pioloform	Plano, Marburg
Uranylacetat	Merck, Darmstadt

Tab. 3: Chemikalien und Reagenzien

## 2.1.4 Verwendete kommerziell erwerbliche Kits

Bezeichnung	Hersteller
DIG Northern Starter Kit	Roche, Mannheim
DNA Isolation Kit for genomic DNA	AppliChem, Darmstadt
Iscript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad, München
Nucleo Spin® Extract Kit	Macherey Nagel, Düren
Nucleo Spin® Plasmid Kit	Macherey Nagel, Düren
QIAGEN Plasmid Maxi, Endotoxinfree	Qiagen, Hilden
Qproteome Cell compartment Kit	Qiagen, Hilden
Silencer® siRNA Construction Kit	Ambion, Darmstadt

Tab. 4: Verwendete kommerziell erwerbliche Kits

## 2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotidprimer wurden bei der Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Die in der quantitativen real-time RT-PCR eingesetzten Primer wurden mittels Roche Applied Science *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* ermittelt.

### qPCR Primer

Primer	Spezies	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
LAMIN A	Mus musculus	fwd	AGCAAAGTGCCTGAGGAGTT
LAMIN A	Mus musculus	rev	ACAAGTCCCCCTCCTTCTTG
WDR36	Homo sapiens	fwd	AGTTTGGCAAGGATCAAGC
WDR36	Homo sapiens	rev	TCCAGAATTGAGTAATCCTCACT
WDR36	Rattus norvegicus	fwd	CCATGTGGATCACCTTGGA
WDR36	Rattus norvegicus	rev	CGCAGGGAGACAACCTGAATAG
WDR36	Mus musculus	fwd	TGTCAGTAAGGCTCCCACCT
WDR36	Mus musculus	rev	CATCCCAGTCACTTGACGA

Tab. 5: qPCR Primer

## siRNA Primer

Primer	Orientierung	Sequenz 5' nach 3'
siWDR36 1	fwd	AAGGCCGGTCTATGTAACACCTGTCTC
siWDR36 1	rev	AATGTTACATAGAACCGGCGCCGTCTC
siWDR36 2	fwd	AATTGCCGGACTGACATTCTCCTGTCTC
siWDR36 2	rev	AAAGAAATGTCAGTCCGGAACCTGTCTC
siWDR36 3	fwd	AAATAACAAATTGTCATCCCCCTGTCTC
siWDR36 3	rev	AAGGGATGACAAATTGTTATCCTGTCTC
siWDR36mm	fwd	AAGGCCGCTTCTACGTGACGCCTGTCTC
siWDR36mm	rev	AACGTCACGTAGAAGCGGCGCCGTCTC

Tab. 6: siRNA Primer

## 2.2 In vitro Experimente

### 2.2.1 Agarose- Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde verwendet, um die Qualität der isolierten RNA und die Produkte der PCR zu überprüfen.

Zur Zubereitung des Agarosegels wurde 1g Agarosegel in 100ml 1x TBE- Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und anschließend auf ca. 60°C abgekühlt. 5µl 0,01% -ige Ethidiumbromid-Lösung wurden zugegeben, um die Wanderstrecke der Proben abschätzen zu können. Danach wurde das Gel in Form gegossen. Nach Aushärten wurde die horizontale Elektrophoresekammer mit 1x TBE- Puffer gefüllt, bis das Gel bedeckt war.

Die Proben wurden mit 4x Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels gegeben.

Die Gelelektrophorese wurde für 30-60 Minuten mit einer Spannung von 130V durchgeführt. Nach Auftrennung der Proben wurde das Ergebnis in einem Transilluminator unter UV- Bestrahlung fotodokumentiert.

## 2.2.2 Prinzip der Expressionsanalyse mittels konservativer RT-PCR und quantitativer real-time RT-PCR

Für die Expressionsanalysen wurden die konservative RT- PCR und die quantitative real- time RT- PCR verwendet. Für beide Methoden wurde cDNA (complementary DNA) als Ausgangsmaterial durch das Enzym reverse Transkriptase aus mRNA synthetisiert.

Mittels konservativer RT- PCR kann die Transkription bestimmter Gene in Geweben oder Zellen nachgewiesen werden. Hierzu wird mit spezifischen Primern ein zu untersuchendes Transkript mittels eines einfachen PCR-Programms amplifiziert. Die dabei entstehenden Produkte, die etwa 300 - 1000 bp groß sind, werden zur Analyse mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

Für die quantitative Analyse der relativen Expression der untersuchten Gene wurde die quantitative Real-Time RT-PCR verwendet. Hier dient cDNA (copy-DNA), die durch reverse Transkription von RNA gewonnen wird, als Ausgangsmaterial für die Polymerasekettenreaktion. Zur relativen Quantifizierung wird das untersuchte Gen in seiner Expression zu einem Referenzgen ins Verhältnis gesetzt. Dieses Referenzgen darf durch die Untersuchungsbedingungen nicht in seinem Expressionslevel beeinträchtigt werden. Als Referenzgen eignen sich „Housekeeping“- Gene, die aufgrund ihrer Beteiligung an grundlegenden Prozessen so genannt werden. Geeignete „Housekeeping“- Gene wurden mittels des Programms Genex- light (Multid, Göteborg, Schweden) identifiziert.

Um die gewünschten cDNA-Sequenzen zu amplifizieren und eine Kontamination durch DNA zu vermeiden, wurden Primer über Exon-Intron-Grenzen des Zielgens gelegt. Hierfür wurde das Primerdesign-Programm von Roche (Roche Probe finder, Roche Diagnostics – Applied Science, Mannheim, [www.roche-applied-science.com](http://www.roche-applied-science.com))

Die exponentielle Vervielfältigung des PCR- Produkts wird durch „Färbung“ der DNA mit einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff quantifiziert. Der interkalierende Farbstoff SYBR- Green I lagert sich nur in doppelsträngige DNA ein und wird durch einen Laser angeregt. Da ungebundenes SYBR- Green I nur sehr schwach

fluoresziert, kann der Grad der Fluoreszenz als proportional zur vorhandenen DNA-Menge betrachtet werden (Gibson et al, 1996, Heid et al, 1996, Higuchi et al, 1993). Ab dem „cycle- threshold“- Wert (ct- Wert) überschreitet die Fluoreszenz des PCR- Produkts die des Hintergrundwerts. Ab diesem Zyklus wird eine exponentielle Zunahme des Produkts beobachtet. Da der Ct- Wert abhängig von der eingesetzten cDNA- Konzentration des untersuchten Gens ist, kann mithilfe des Ct- Werts eine quantitative Aussage über die eingesetzte mRNA- Menge gemacht werden (Roche 2001, 2003). Da sich SYBR- Green I in dsDNA einlagert, muss nach der Amplifikation eine Schmelzkurve erstellt werden, um entstandene Primerdimere von dem gesuchten Produkt unterscheiden zu können.

Von jeder zu analysierenden cDNA- Probe („+RT“) wurde ein Duplikat untersucht. Um Kontaminationen ausschließen zu können, wurde jeweils ein „-RT“- Ansatz und eine Probe mit dem verwendeten RNase- freien Wasser untersucht. Für die Durchführung wurde für jedes zu untersuchende Gen ein Mastermix erstellt, der alle Komponenten bis auf die cDNA enthielt. 13,5 µl des Mastermix wurden mit jeweils 1,5µl der cDNA- Probe versetzt.

10x PCR- Puffer	1,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,6µl
dNTPs	0,12µl
Taq DNA Polymerase(5U/micl)	0,06µl
SYBR- Green I (7,4% (v/v) in DMSO)	0,1875µl
Fluorescein	0,015µl
Forward Primer (1micM)	0,1275µl
Reverse Primer (1micM)	0,1275µl
RNase- freies Wasser	19,7625µl

Tab. 7: Mastermix für einen Ansatz

1,5 µl der Probe (1:10 Verdünnung in RNase- freiem Wasser von „+RT“, „-RT“ bzw. RNase- freiem Wasser als Kontrolle.

Die 96- Loch- Mikrotiterplatte wurde mit einer speziellen Klebefolie (Microseal „B“ Film, BioRad, München) abgedichtet. Die Proben wurden kurz zentrifugiert. Nach Eingabe des Pipetierschemas in das Gerät wurde das PCR- Programm gestartet.

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

Tab. 8: Real time PCR- Programm

### 2.2.3 Herstellung von cDNA

Für Expressionsanalysen wird cDNA benötigt. Die Umschreibung von mRNA in cDNA erfolgt mittels dem Enzym Reverse Transkriptase. Gemeinhin wird hierfür eine virale Transkriptase verwendet. Die reverse Transkriptase dient dabei als DNA-Polymerase, die die RNA als Matrize nutzt. Da die reverse Transkriptase Primer benötigt, die von 5' nach 3' verlängert werden, werden entweder Poly- T- Primer, die an den Poly- A- Schwanz der mRNA binden, oder random- Primer mit verschiedenen zufälligen Sequenzen zugegeben. Für die DNA- Synthese wurde das „iScripti cDNA Synthese Kit“ (BioRad, München) verwendet.

Um eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA erkennen zu können, wurden pro RNA- Probe zwei Ansätze angesetzt, wobei einmal reverse Transkriptase („+RT“) und einmal keine reverse Transkriptase („-RT“) zugegeben wird.

	„+ RT“	„- RT“
RNA	0,5µg	0,5µg
5x iScript TM Reaction Mix	2 µl	0 µl
iScript TM reverse Transcriptase	0,5µl	0 µl
H2O	Ad 10µl	Ad 10µl

Tab. 9: Ansatz für reverse Transkriptase- Reaktion

Die reverse Transkription wurde im Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

	Temperatur	Dauer	
Schritt 1	25°C	5 min	
Schritt 2	42°C	30 min	Reverse Transkription
Schritt 3	85°C	5 min	Inaktivierung der reversen Transkriptase
Schritt 4	4°C	unendlich	
Nach Schritt 4	20°C		Aufbewahrung

Tab. 10: PCR- Programm für cDNA- Synthese

## 2.3 *In vivo* Experimente

### 2.3.1 Haltung der Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden im Einklang mit dem „ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research“ behandelt. Es wurde stets auf für Nager optimale Haltungsparameter geachtet (Temperatur  $23\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ , relative Luftfeuchtigkeit  $55\% \pm 5\%$ , Hell-Dunkelintervall 12 Stunden, Futter und Wasser ad libitum). Die Tiere wurden im Tierstall der Universität Regensburg gehalten.

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Experimente wurden an Black6-Mäusen beider Geschlechter aus eigener Zucht durchgeführt.

### 2.3.2 Gewebepräparation aus Maus

#### 2.3.2.1 Augen- und Opticuspräparation für die Histologie

Die Tötung der Versuchstiere erfolgte durch zervikale Dislokation. Anschließend wurden die Augen samt Sehnerv mit einer stumpfen Pinzette entnommen. Dabei wurde das um das Auge liegende Bindegewebe mittels Mikro-Schere durchtrennt. Das Auge wurde im Bereich des Durchtritts des N. opticus durch die Sklera zwischen die Pinzette genommen und mit leichtem Zug aus der knöchernen Augenhöhle luxiert, ohne das Auge oder den Sehnerven zu verletzen. Der Sehnerv wurde daraufhin sowohl 1cm proximal des Auges als auch kurz nach der Absetzstelle durchtrennt.

Danach wurden die Präparate zur Vorbereitung für die Epon-Einbettung in das entsprechende Fixans überführt. Für eine vollständige Fixierung der Augen wurde mittels Skalpell ein kleiner Skleraschnitt in einer Seite des Augapfels durchgeführt.

### 2.3.2.2 Präparation der Abdominalorgane

Zur histologischen Auswertung wurden den Versuchstieren im Anschluss Herz, Leber, Nieren und Milz durch Laparotomie entnommen und in das vorbereitete Fixans überführt.

### 2.3.3 Intravitreale Injektion von NMDA

#### 2.3.2.1 Narkotisierung der Versuchstiere

Für die Injektion von NMDA (Sigma, Taufkirchen) und PBS (Invitrogen, Karlsruhe) wurden die Versuchstiere mit Ketamin und Xylazin narkotisiert. Aufgrund der Tatsache, dass Mäuse unter Narkose sehr schnell auskühlen, bestrahlten wir die Tiere vor und nach der Narkose mit einer Wärmelampe.

Nach etwa 10-minütiger Einwirkzeit trat bei den Mäusen gute Analgesie, Muskelrelaxation und leichte Atemdepression für durchschnittlich 30 Minuten ein. Nach weiteren 120 Minuten waren die Mäuse wieder vollständig erwacht.

#### 2.3.2.2 Intravitreale Injektion von NMDA und PBS

Zur besseren Übersicht bei der Injektion wurden die Augen der narkotisierten Mäuse für 2 min mit 2% Phenylephrin behandelt, was zur Mydriasis der Mausaugen führte. Anschließend wurde für 3 min mit 10%- jodhaltiger Braunol®-Lösung (Braun, Melsungen) in sterilem PBS desinfiziert. Die Injektion erfolgte mit einer 34- Gauge-Nadel (World Precision Instruments, Berlin) limbusnah am Augenäquator durch die Sklera in Richtung des Sehnerven in den Glaskörper. Aus der mit der Nadel verbundenen 25 $\mu$ l Hamiltonspritze (Roth, Karlsruhe) wurden 3 $\mu$ l NMDA in das eine und zur Kontrolle 3 $\mu$ l PBS in das andere Auge injiziert. Die Nadel wurde nach ungefähr 1 Minute aus dem Auge entfernt. Die kurze Latenzzeit sollte dazu dienen, den durch die Injektion erhöhten Augeninnendruck auszugleichen, und der injizierten Flüssigkeit im Glaskörper die Möglichkeit zur Verteilung im Glaskörper geben, um so einen Reflux über den Stichkanal zu verhindern.

Nach Entfernen der Nadel wurde das Auge antiseptisch mit Isopto Max (Dexamethason, Neomycinsulfat, Polymyxin-B-Sulfat) (Alcon® Pharma GmbH, Freiburg) behandelt.

Nach 3 Wochen wurden die Versuchstiere getötet, die Augen entnommen und histologisch aufgearbeitet (s.u.).

Materialien	Hersteller
Anästhetikum	
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Antiseptika	
Sepso R J (Polyvidon- Jod)	Braun, Melsungen
Isopto Max	Alcon Pharma, Freiburg
Injektabilia	
N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) 10mM	Sigma, Taufkirchen
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Invitrogen, Karlsruhe
Nadel (beveled needle 35G)	World Precision Instruments, Berlin
Hamiltonsspritze	Roth, Karlsruhe

Tab. 11: Materialien für die NMDA- Injektion

### 2.3.4 DNA- Isolierung aus Mäuseschwänzen

Im Alter von drei Wochen wurde die erste Genotypisierung der Versuchstiere durchgeführt. Bei jeder Tierpräparation wurden erneut 5mm Mausschwanz für die Genotypisierung entnommen. Die DNA- Isolierung erfolgte nach der „quick and dirty“- Methode. Die Gewebeproben wurden in 200µl Lysepuffer mit 2,5mg Proteinase K über Nacht im Thermomixer bei 55°C lysiert. Am folgenden Tag wurde die Proteinase K bei 95°C für 10 min inaktiviert. Danach wurde nach zehnminütiger Zentrifugation der Überstand verworfen, die Probe verdünnt und in die PCR eingesetzt.

### 2.3.5 Histologische Aufarbeitung der Gewebeproben

#### 2.3.5.1 Epon- Einbettung

##### 2.3.5.1.1 Herstellung der Reagenzien

Reagenz	Dosierung	Hersteller
Glycid Ether	45,0g	Serva, Heidelberg
DDSA Härter	30,0g	Serva, Heidelberg
MNA Härter	20,0g	Serva, Heidelberg

Tab. 12: Ansatz für die Eponherstellung

Nach 30-minütiger Durchmischung mit dem Magnetrührer unter Verschluss durch Parafilm und Vermeidung von Luftblasen erfolgte die Zugabe von 1,5g DMP-30 Beschleuniger (Serva, Heidelberg). Vor Verwendung des Epons wurde der Ansatz nochmals 1 h gut durchmischt und mit der Vakuumpumpe entlüftet.

Reagenz	Dosierung	
Cacodylatsäure	20,14g	
a.d.	0,5l	

Tab. 13: Ansatz für Cacodylat- Puffer (Caco- Puffer)

Reagenz	Dosierung	Hersteller
Paraformaldehyd 25%	10,0ml	Merck, Darmstadt
0,2M Caco- Puffer (pH 7,2)	50,0ml	Merck, Darmstadt
a. d.	30,0ml	

Tab. 14: Ansatz für EM- Fixans (modifizierte Fixierung nach Ito und Karnovsky)

Kurz vor Verwendung der EM-Fixans wurde bei einem pH-Wert von 7,4 noch Glutaraldehyd 25% in einer Verdünnung 1:10 zum Ansatz des EM-Fixans zugegeben.

### 2.3.5.1.2 Durchführung der Epon- Einbettung der Augen

Die enukleierten Augen wurden in EM- Fixans für mindestens 12 Stunden immersionsfixiert und danach mehrfach in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,2) für mehrere Stunden gespült. Die Nachfixierung erfolgte mit 1% Osmiumferrocyanid. Das Osmium wurde mit Cacodylatpuffer ausgewaschen. Die Entwässerung der Augen erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%, 80%, 90%, 100% Ethanol. Danach wurden die Augen im Einbettautomaten (EM-TP, Leica, Nussloch, Deutschland) in Epon eingebettet.

Einbettschritte:

1. Propylenoxid/ Epon 2:1 für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20°C);
2. Propylenoxid/ Epon 1:1 für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20°C);
3. Propylenoxid/ Epon 1:2 für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20°C);
4. 100 % Epon für 1 h bei Raumtemperatur (20°C);
5. 100 % Epon für mindestens 12 h bei Raumtemperatur (20°C);

Schritt	Reagenz	Dauer	Temperatur
1	EM- Fixans	mindestens 12 h	4°C
2	0,1M CaCo- Puffer (pH 7,2)	4x15 Minuten	Raumtemperatur
3	0,1M CaCo- Puffer (pH 7,2)	4h	4°C
4	1% Osmiumtetroxid	2h	4°C
5	Aqua bidest.	mehrmals	Raumtemperatur
6	Ethanol 50%	2x10 Minuten	4°C
7	Ethanol 70%	2x10 Minuten	4°C
8	Ethanol 80%	2x10 Minuten	4°C
9	Ethanol 90%	2x10 Minuten	Raumtemperatur
10	Ethanol 100%	2x10 Minuten	Raumtemperatur
11	Propylenoxid	2x10 Minuten	Raumtemperatur
12	Propylenoxid/ Epon (2:1)	30 Minuten	Raumtemperatur
13	Propylenoxid/ Epon (1:1)	30 Minuten	Raumtemperatur
14	Propylenoxid/ Epon (1:2)	30 Minuten	Raumtemperatur
15	100% Epon	1h	Raumtemperatur
16	100% Epon	Mindestens 12h	Raumtemperatur

Tab. 15: Epon- Einbettung der Augen

Das Aushärten erfolgte im Brutschrank für 24 h bei 60°C, danach für 48 Stunden bei 90°C.

### 2.3.5.1.3 Epon- Einbettung der Sehnerven

Die 1 cm langen Abschnitte der Nn. optici wurden in EM- Fixans für mindestens 12 Stunden immersionsfixiert und danach mehrfach in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) für mehrere Stunden gespült. Die Nachfixierung erfolgte mit 1% Osmiumferrocyanid. Das Osmium wurde mit Cacodylatpuffer ausgewaschen. Die Entwässerung der Augen erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%, 80%, 90%, 100% Ethanol. Danach wurden die Augen im Einbettautomaten (EM-TP, Leica, Nussloch, Deutschland) in Epon eingebettet.

### Einbettsschritte:

1. Propylenoxid/ Epon 2:1 für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20°C)
2. Propylenoxid/ Epon 1:1 für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20°C)
3. Propylenoxid/ Epon 1:2 für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20°C)
4. 100 % Epon für 1 h bei Raumtemperatur (20°C)
5. 100 % Epon für mindestens 12 h bei Raumtemperatur (20°C);

Schritt	Reagenz	Dauer	Temperatur
1	EM- Fixans	mindestens 12 h	4°C
2	0,1M CaCo- Puffer (pH 7,4)	4x15 Minuten	Raumtemperatur
3	0,1M CaCo- Puffer (pH 7,4)	4h	4°C
4	1% Osmiumtetroxid	2h	4°C
5	Aqua bidest.	mehrmals	Raumtemperatur
6	Ethanol 50%	2x10 Minuten	4°C
7	Ethanol 70%	2x10 Minuten	4°C
8	Ethanol 80%	2x10 Minuten	4°C
9	Ethanol 90%	2x10 Minuten	Raumtemperatur
10	Ethanol 100%	2x10 Minuten	Raumtemperatur
11	Propylenoxid	2x10 Minuten	Raumtemperatur
12	Propylenoxid/ Epon (2:1)	30 Minuten	Raumtemperatur
13	Propylenoxid/ Epon (1:1)	30 Minuten	Raumtemperatur
14	Propylenoxid/ Epon (1:2)	6	Ethanol 50%
15	100% Epon	1h	Raumtemperatur
16	100% Epon	Mindestens 12h	Raumtemperatur

Tab. 16: Epon- Einbettung der Sehnerven

Das Aushärten erfolgte im Brutschrank für 24 h bei 60°C, danach für 48 Stunden bei 90°C.

### 2.3.5.1.4 Epon- Einbettung der Abdominalorgane

Die Abdominalorgane wurden in EM-Fixans für mindestens 12 Stunden immersionsfixiert und danach mehrfach in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,2) für mehrere Stunden gespült. Die Nachfixierung erfolgte mit 1% Osmiumferrocyanid. Das Osmium wurde mit Cacodylatpuffer ausgewaschen. Die Entwässerung der Organe erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%, 80%, 90%, 100% Ethanol. Danach wurden die Organpräparate im Einbettautomaten (EM-TP, Leica, Nussloch, Deutschland) in Epon eingebettet.

Einbetschritte:

1. Propylenoxid/ Epon 2:1 für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20°C);
2. Propylenoxid/ Epon 1:1 für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20°C);
3. Propylenoxid/ Epon 1:2 für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20°C);
4. 100 % Epon für 1 h bei Raumtemperatur (20°C);
5. 100 % Epon für mindestens 12 h bei Raumtemperatur (20°C);

Schritt	Reagenz	Dauer	Temperatur
1	EM- Fixans	mindestens 12 h	4°C
2	0,1M CaCo- Puffer (pH 7,2)	4x15 Minuten	Raumtemperatur
3	0,1M CaCo- Puffer (pH 7,2)	4h	4°C
4	1% Osmiumtetroxid	2h	4°C
5	Aqua bidest.	mehrmals	Raumtemperatur
6	Ethanol 50%	2x10 Minuten	4°C
7	Ethanol 70%	2x10 Minuten	4°C
8	Ethanol 80%	2x10 Minuten	4°C
9	Ethanol 90%	2x10 Minuten	Raumtemperatur
10	Ethanol 100%	2x10 Minuten	Raumtemperatur
11	Propylenoxid	2x10 Minuten	Raumtemperatur
12	Propylenoxid/ Epon (2:1)	30 Minuten	Raumtemperatur
13	Propylenoxid/ Epon (1:1)	30 Minuten	Raumtemperatur
14	Propylenoxid/ Epon (1:2)	30 Minuten	Raumtemperatur
15	100% Epon	1h	Raumtemperatur
16	100% Epon	Mindestens 12h	Raumtemperatur

Tab. 17: Epon- Einbettung der Abdominalorgane

Das Aushärten erfolgte im Brutschrank für 24 h bei 60°C, danach für 48 Stunden bei 90°C.

### 2.3.5.2 Herstellung von Semidünnschnitten

#### 2.3.5.2.1 Herstellung von Semidünnschnitten der Augen

Mit einem Reichert Ultramikrotom wurden 1µm dicke Semidünnschnitte der Augen angefertigt. Die Schnittführung erfolgte beim Auge sagittal. Die Augenschnitte wurden auf Objektträger aufgebracht und bei 90°C getrocknet. Die Schnitte wurden nach Richardson bei 60°C für 15-30 Sekunden gefärbt; danach wurde mit H2O dest. gespült. (nach Romeis, 1989 und Stain Technology 35, 313-323, 1960).

Färbelösung nach Richardson:

Reagenz	Dosierung
Azur II	5,0g
a. d.	500,0 ml

Tab. 18: Stammlösung I: 1% Azur II

Reagenz	Dosierung
Methylenblau	5,0g
1% Natriumtetraboratlösung	500,0 ml

Tab. 19: Stammlösung II: 1% Methylenblau

Gebrauchslösung	1 Teil Stammlösung I + 1 Teil Stammlösung II + 2 Teile H <sub>2</sub> O dest.
-----------------	---

Nach Trocknung wurden die Schnitte mit Vitro-Clud® (Langenbrinck, Emmendingen) eingedeckelt. Danach ruhten die Objektträger für 12 h bei Raumtemperatur, um eine ausreichend feste Adhäsion der Deckgläser zu erreichen.

### 2.3.5.2.2 Herstellung von Semidünnschnitten der Sehnerven

Nach dem Aushärten wurden die hergestellten Eponblöcke mit den Nn. optici mit Hilfe einer Blattsäge bis zu 1 mm von den augennahen Enden der Sehnerven getrimmt. Anschließend wurden mit dem Reichert Ultramikrotom 1µm dicke Semidünnschnitte senkrecht zur Längsachse des Sehnervenverlaufs angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht und bei 90°C getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte mit Paraphenyldiamin bei Raumtemperatur für 30 Minuten kontrastiert. Danach wurden die Objektträger mit 100% Ethanol (vergällt) gespült, bis keine Rückstände der Färbung mehr sichtbar waren.

Reagenz	Dosierung	Hersteller
1,4-p-Phenyldiamin (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> ; M = 108,14)	1,0mg	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
100% Ethanol (vergällt)	100,0 ml	

Tab. 20: Ansatz für 1% Paraphenyldiamin (modifiziert nach Tanck J.J, 2004 und Schultze W.H. et al., 1972)

Der Ansatz wird 3 d bei Tageslicht und Raumtemperatur inkubiert, bis sich das 1,4-p-Phenyldiamin vollständig gelöst hat und die Lösung eine dunkelbraune Farbe annimmt.

Nach Trocknung wurden die Schnitte mit Vitro-Clud® (Langenbrinck, Emmendingen) eingedeckelt. Danach ruhten die Objektträger für 12 h bei Raumtemperatur, um eine ausreichend feste Adhäsion der Deckgläser zu erreichen.

### 2.3.5.2.3 Herstellung von Semidünnschnitten der Abdominalorgane

Analog zu den Semidünnschnitten der Augen wurden von den Abdominalorganen 1µm dicke Semidünnschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht und bei 90°C getrocknet. Die Schnitte wurden nach Richardson (s.o.) bei 60°C für 15-30 Sekunden gefärbt; danach wurde mit H<sub>2</sub>O dest. gespült. (nach Romeis, 1989 und Stain Technology 35, 313-323, 1960). Im Anschluss erfolgte die Eidecklung der Schnitte mit Vitro-Clud® (Langenbrinck, Emmendingen) (s.o.).

## 2.3.6 Auswertung

### 2.3.6.1 Mikroskopie

Die lichtmikroskopische Analyse wurde mit Hilfe des *Axio Imager Z1-Mikroskops* (Carl Zeiss, Göttingen) durchgeführt. Die Aufnahme der konfokalen Bilder erfolgte mittels LSM170-Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen).

### 2.3.6.2 Auswertung der Semidünnnschnitte

Nach Färbung der 1µm dicken Semidünnnschnitte nach Richardson beziehungsweise mit Paraphenyldiamin erfolgte die Auswertung mittels Mikroskop. Mit Hilfe des Zeiss Lichtmikroskops und der Axiovision 3.0 Software wurden Panoramaaufnahmen der Semidünnnschnitte angefertigt.

Die Sehnerven wurden zur Quantifizierung des Sehnervenverlusts mit Paraphenyldiamin kontrastiert, um die Anzahl der Axone bestimmen zu können. Zur manuellen Auszählung der Axone wurde die Zählfunktion „Count-and-tag“ des Programms IT Image Tool verwendet. Es wurden alle Axone ungeachtet der Intensität der Myelinscheidenfärbung mitgezählt.

Die Schnitte der Abdominalorgane wurden jeweils vergleichend mikroskopiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Mikroskopische Untersuchung der Augen von *Wdr36*-defizienten Tieren

Heterozygote *Wdr36*-defiziente Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistertieren keine strukturellen Unterschiede im Aufbau von Trabekelwerk und Schlemmkanal. So war der Kammerwinkel bei beiden Tiergruppen regelrecht differenziert, weit offen und gut durchgängig. Ebenso zeigten Ziliarkörper, Iris und Linse keine nachweisbaren strukturellen Veränderungen.

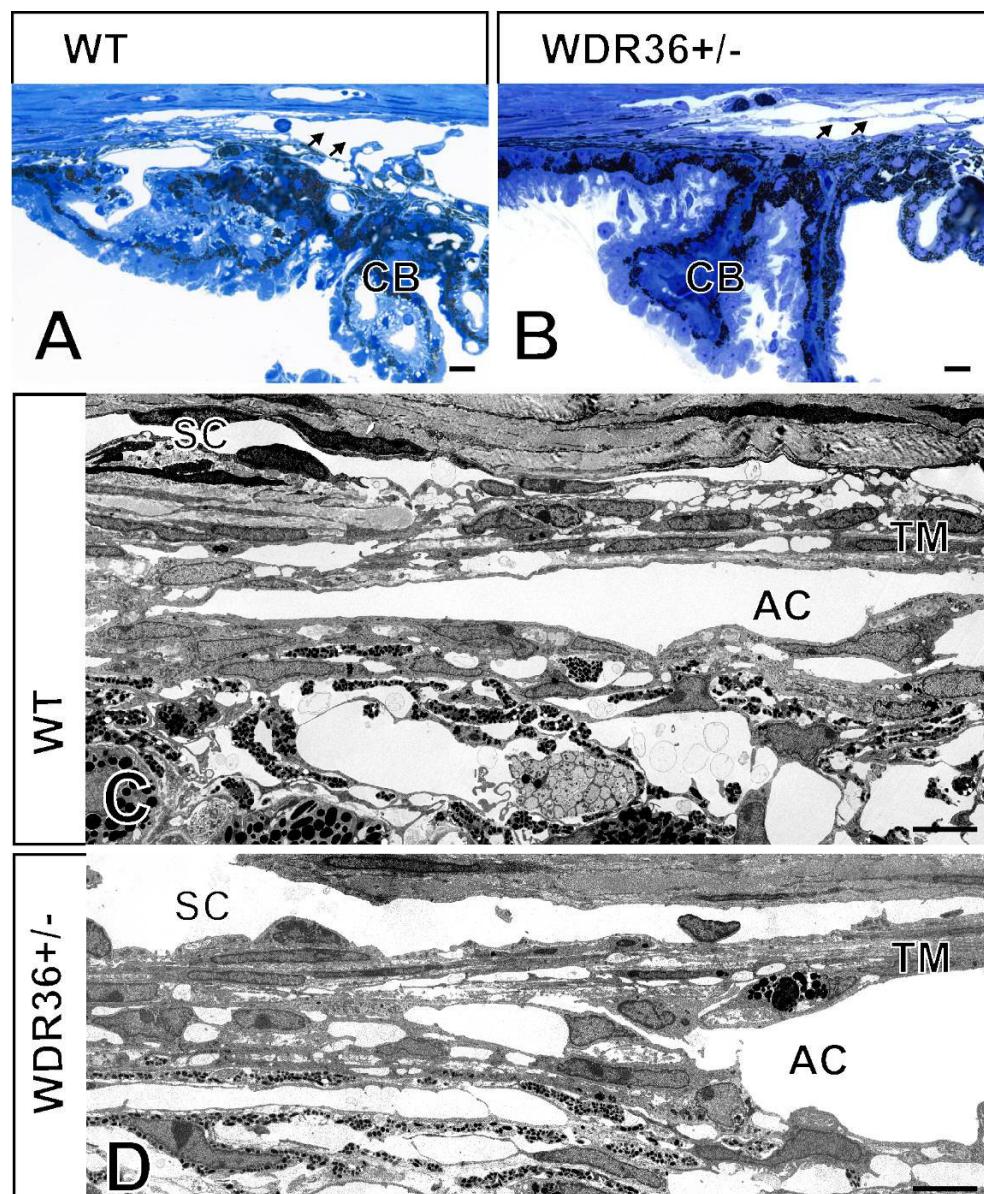
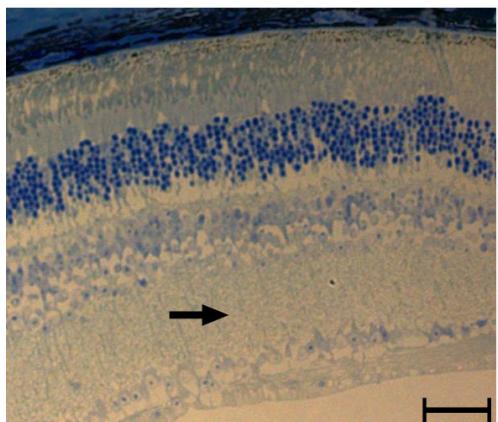


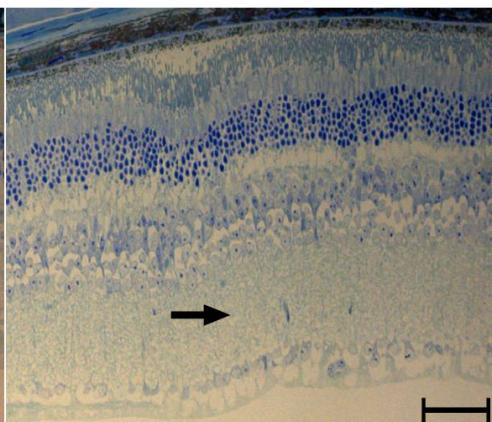
Abbildung 1: Histologische Darstellung des Kammerwinkels einer Wildtyp-Maus (A/ C) und einer heterozygoten *Wdr36*-defizienten Maus (B/ D). Bei beiden Tieren sind die Strukturen des Kammerwinkels regelrecht ausgebildet (Pfeile). (CB: Ziliarkörper, SC: Schlemm-Kanal, AC: Vorderkammer, TM: Trabekelwerk). A/ B: Lichtmikroskopie, Färbung nach Richardson, Messbalken: 10 µm, C/ D: Rasterelektronenmikroskop, Messbalken: 50 µm

Auch im hinteren Augenabschnitt zeigten heterozygote *Wdr-36*-defiziente Tiere keine offensichtlichen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp. Bei beiden Tiergruppen waren die einzelnen Schichten der Netzhaut völlig regelrecht ausgebildet.

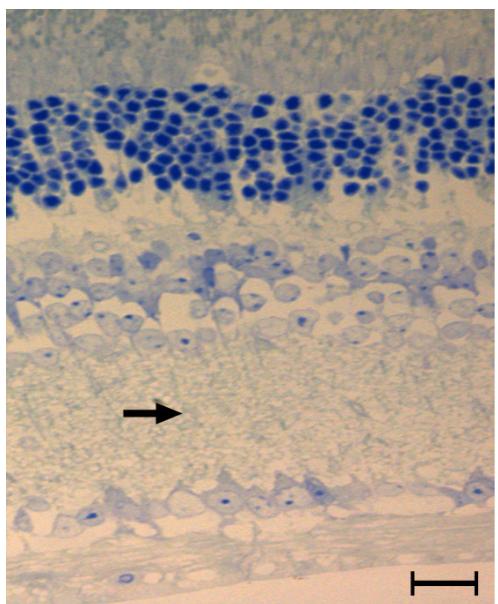
A



B



C



D

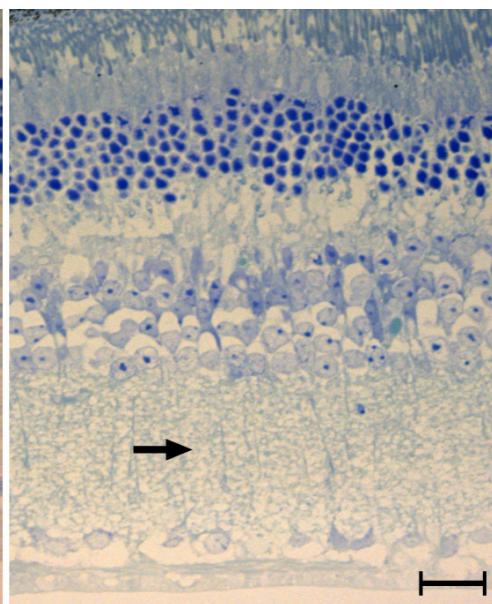
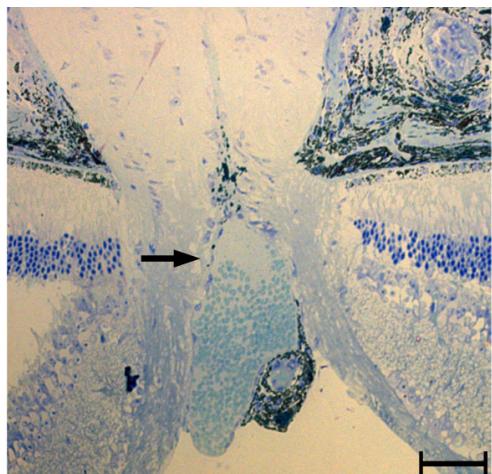


Abbildung 2: Lichtmikroskopische Aufnahmen der Retina eines Wildtypieres (B/D) und eines heterozygoten *Wdr36*-defizienten Tieres. C und D sind Vergrößerungen von A und B. Beide Tiere unterschieden sich nicht im strukturellen Aufbau der Retina. Insbesondere ist die innere plexiforme Schicht (Pfeil) und die daran anliegende Ganglionzellschicht bei der *Wdr36*-defizienten Maus im Vergleich zum Wildtyp-Tier nicht verändert. Färbung nach Richardson, Messbalken: A/B: 50 µm; C/D 20µm

Auch die Analyse des Sehnervenkopfes zeigte bei heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen keine Unterschiede zu Wildtyp-Geschwistern. Beide Tiergruppen zeigten eine physiologische Exkavation, die mit Gefäßanschnitten der *Arteria centralis retinae* ausgefüllt war.

A



B

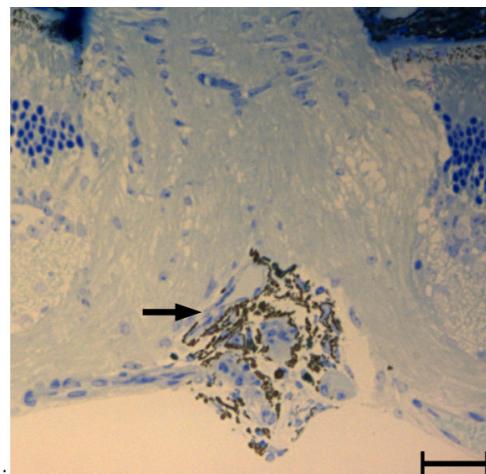
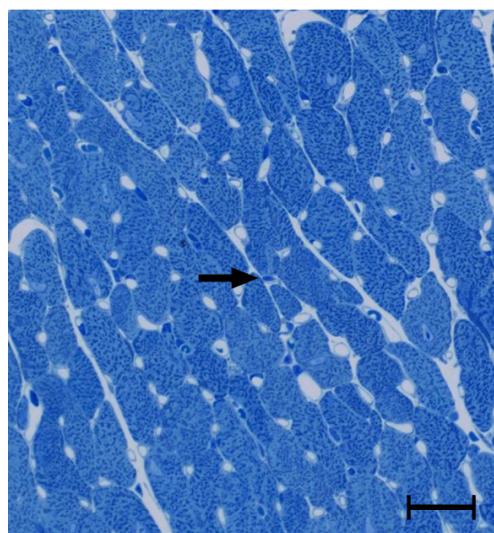


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Aufnahme des Sehnervenkopfes (*Discus nervi optici*) eines Wildtyp-Tieres (A) und einer heterozygoten *Wdr36*-defizienten Maus (B). Beide Tiergruppen zeigen keine Unterschiede in der Struktur des Sehnervenkopfes. Färbung nach Richardson, Messbalken: A: 20 µm; B: 10µm

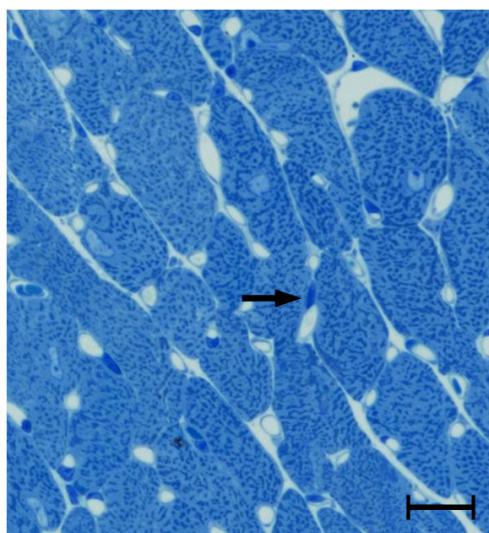
### 3.2 Lichtmikroskopische Untersuchung extraokulärer Gewebe von heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen

Die Herzen von *Wdr36*-defizienten Tieren zeigten makroskopisch einen völlig normalen Aufbau. Auch histologisch wurde bei heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen kein Unterschied hinsichtlich der Anzahl und Morphologie der Myozyten gefunden.

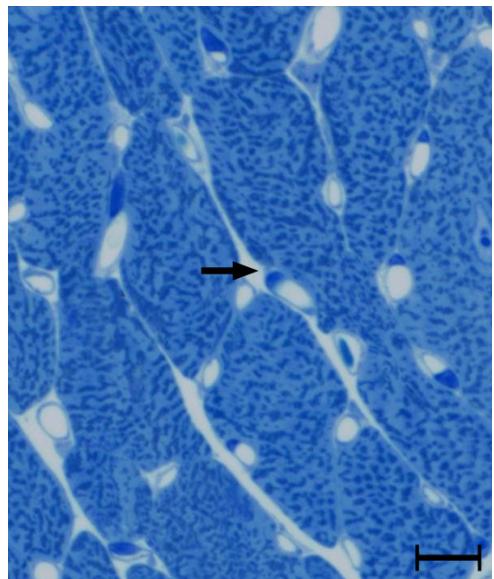
A



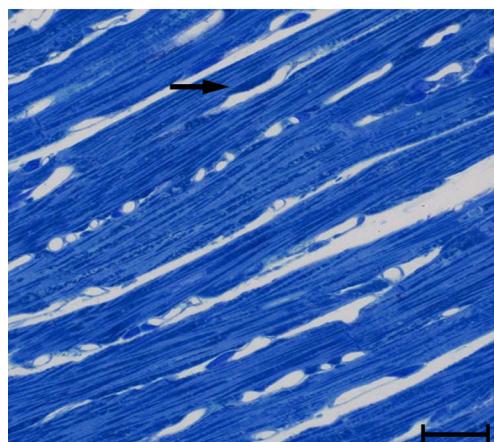
B



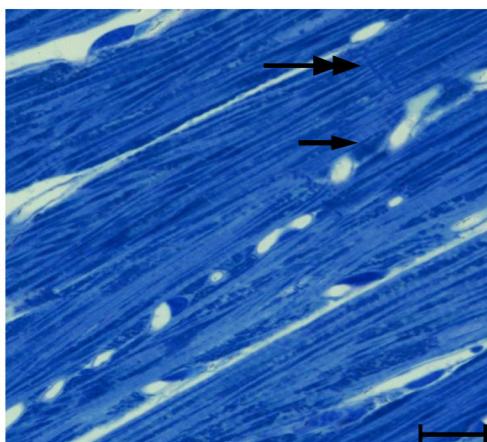
C



D



E



F

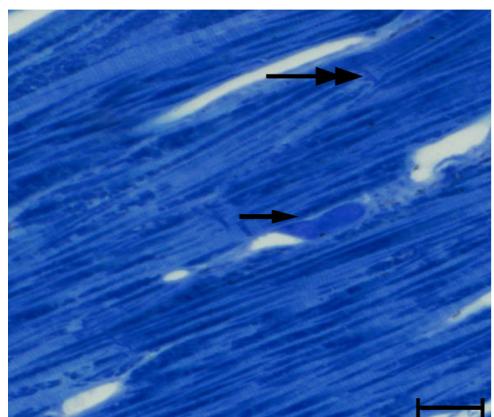


Abbildung 4: Lichtmikroskopische Aufnahmen des Myokards eines heterozygoten *Wdr36*-defizienten Tieres. (A-C: Querschnitt, D-F: Längsschnitt). Der Herzmuskel zeigt in Querschnitten die typische Cohnheim- Felderung mit mittelständigen Kernen (Pfeil). Im Längsschnitt sind bei höheren Vergrößerungen (E,F) die typischen Glanzstreifen (Doppelpfeil) sichtbar. Färbung nach Richardson, Messbalken: A/D: 50µm, B/E: 20 µm, C/F: 10µm

Ebenso war die Histologie der Milz von *Wdr36*-defizienten Tieren im Vergleich zu der von ihren Wildtyp-Geschwistertieren unverändert.

A

B

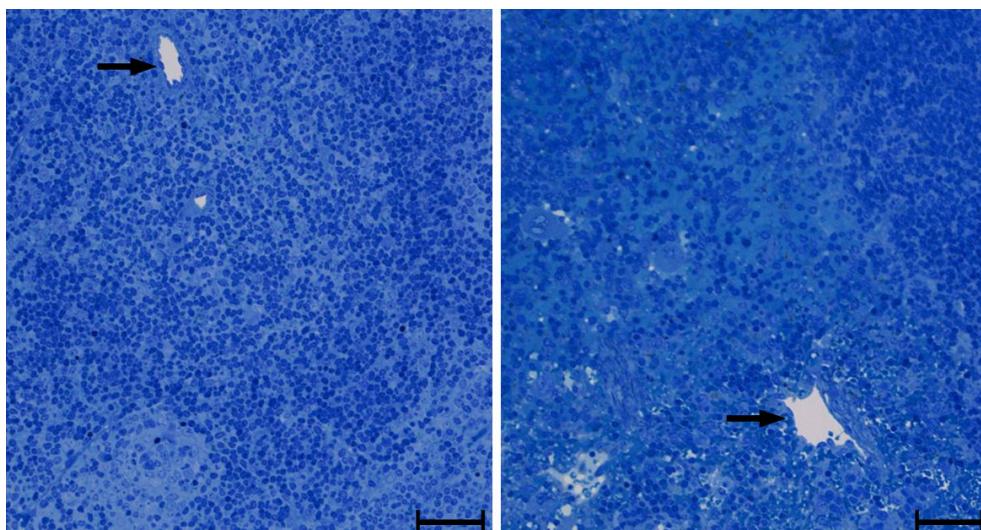


Abbildung 5: Lichtmikroskopische Aufnahme des Milzparenchyms eines Wildtyp- Tieres (A) und einer heterozygoten *Wdr36*-defizienten Maus (B). Beide Präparate lassen keinen morphologischen Unterschiede erkennen (Pfeil: Zentralarterie). Färbung nach Richardson, Messbalken: A/B: 50 µm

Weiterhin wurde die histologische Struktur der Nieren von heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen und Wildtyp-Geschwistertieren miteinander verglichen. Beide Tiere zeigten eine regelhafte Differenzierung von Mark und Rinde. Die Nierenbecken präsentierten sich zart. Nierenaplasien traten weder bei heterozygoten *Wdr36*-defizienten Tieren noch bei Wildtypen auf.

A

B

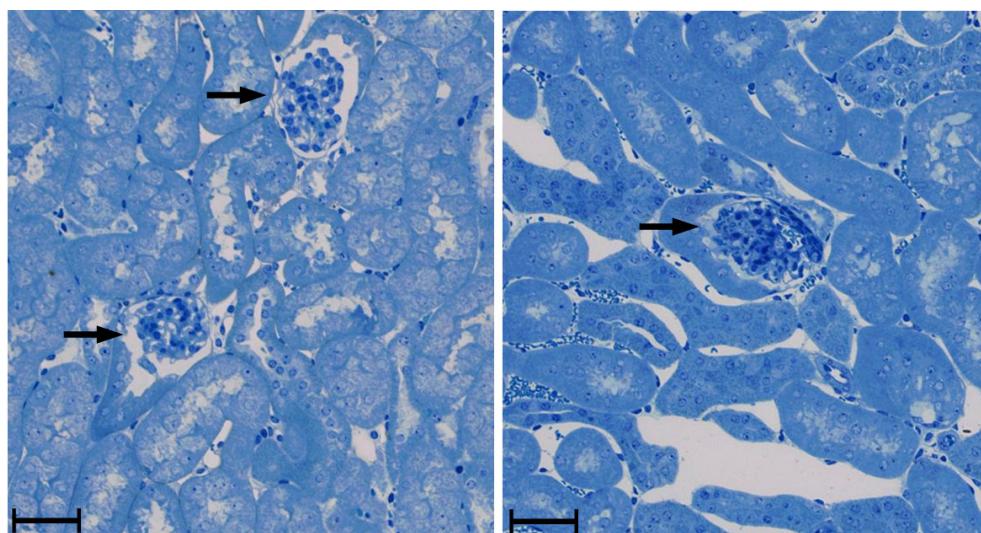


Abbildung 6: Lichtmikroskopische Aufnahme der Nierenrinde einer Wildtyp-Maus (A) und einer heterozygoten, *Wdr36*-defizienten Maus (B). Glomeruli (Pfeile) und Tubuli sind sowohl beim Wildtyp-Tier als auch beim heterozygoten *Wdr36*-Defizienten regelrecht ausgebildet. Färbung nach Richardson, Messbalken: A/B: 50µm.

Schließlich wurde noch die Leber von heterozygoten *Wdr36*-defizienten Tieren histologisch analysiert. Auch hier zeigten sich im direkten Vergleich zwischen *Wdr36*-defizienten Mäusen und Wildtyp-Tieren keine Unterschiede.

A

B

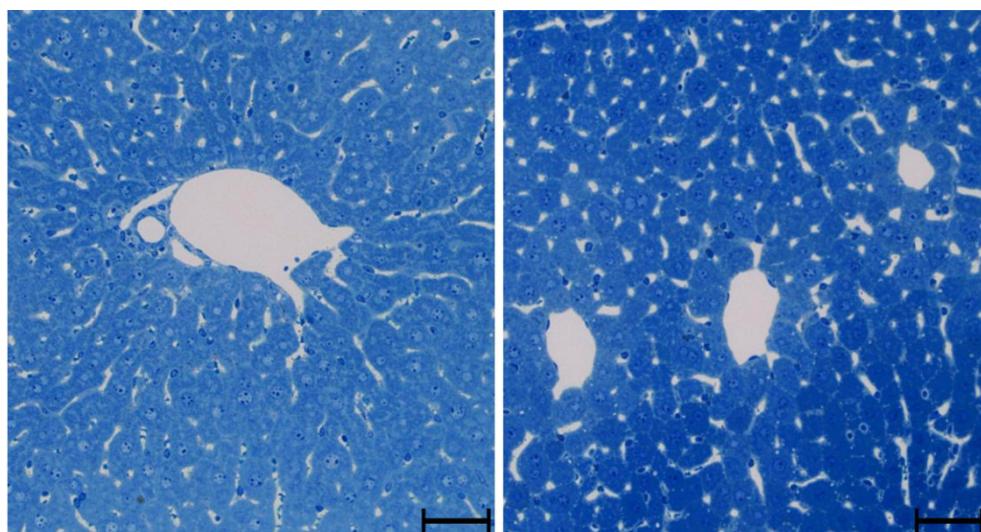
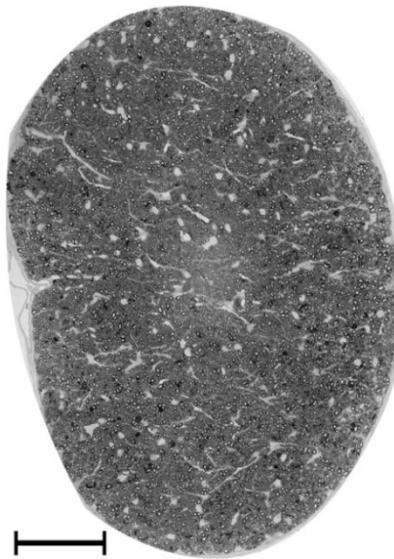


Abbildung 7: Lichtmikroskopische Abbildungen der Leber eines Wildtyp-Tiers (A) und einer heterozygoten *Wdr36*-defizienten Maus (B). Bei beiden Tieren findet sich eine regelrechte Struktur des Lebergewebes. Färbung nach Richardson, Messbalken: A/B: 50µm

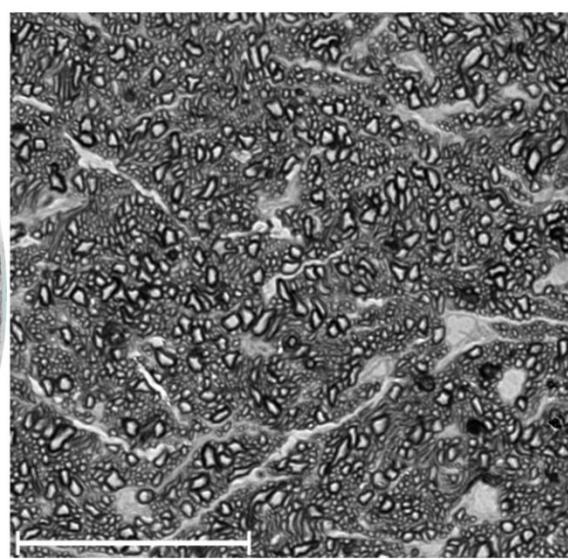
### 3.3 Quantitative Analyse der Anzahl von Axonen im Sehnerv von heterozygoten *Wdr36*-defizienten Mäusen

Da jede retinale Ganglienzelle mit genau einem Axon in den Sehnerven projiziert, entspricht die Anzahl der Axone im Sehnerv der Anzahl der Ganglienzellen der Retina. Um die absolute Anzahl der Axone des Sehnerven und somit der retinalen Ganglienzellen zu quantifizieren, wurden anhand von Semidünnschnitten die Axone jedes *Nervus opticus* manuell ausgezählt. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Sehnerven heterozygoter Tiere und denen von Wildtypmäusen. Bei beiden Gruppen konnten Axonzahlen zwischen 40 000 und 43 000 erhoben werden. Auch das mikroskopische Bild ähnelt sich stark: Die Sehnerven beider Tiergruppen zeigen gleichmäßig kontrastierte, annähernd gleich große Axone mit feinen dazwischenliegenden Gliasepten.

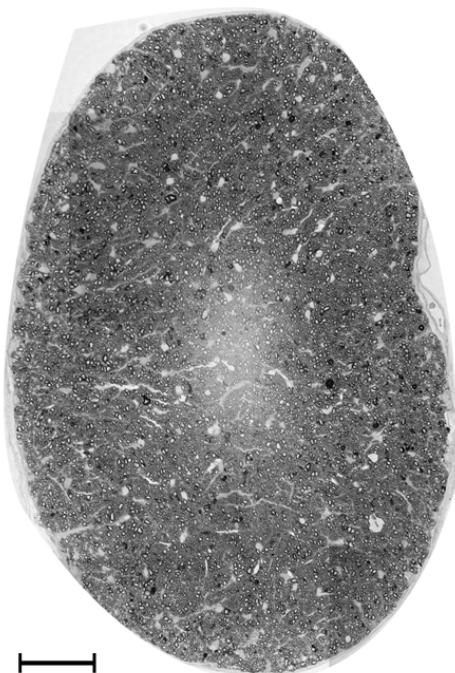
A



B



C



D

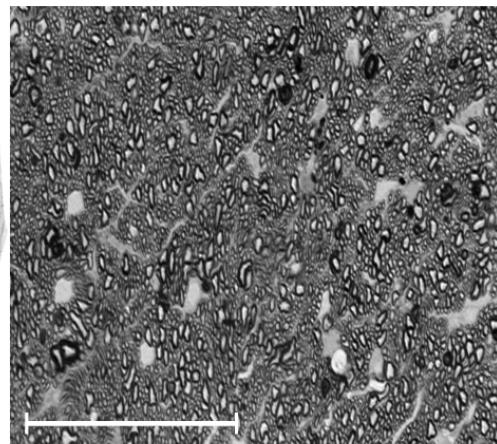


Abbildung 8: Lichtmikroskopische Aufnahme von Querschnitten durch *N.optici* von *Wdr36*-defizienten Tieren und Wildtyp-Geschwistertieren. Zwischen den Sehnerven heterozygoter *Wdr36*-defizienter Tiere (A/B) und denen von Wildtyp-Tieren (C/D) sind keine Unterschiede zu erkennen. Beide zeigen gleichmäßig kontrastierte Axone mit feinen dazwischenliegenden Gliasepten. Färbung: Paraphenyldiamin, Messbalken: A/C: 50 µm; B/D: 25 µm.

Die Auszählung der Axone der Sehnerven bestätigte den Eindruck der mikroskopischen Untersuchung. Während für die Sehnerven der Wildtypmäuse eine durchschnittliche Anzahl von  $41665 \pm 6142$  Axonen (Mittelwert  $\pm$  SD) gefunden wurde, wurden bei heterozygoten *Wdr36*-defizienten Tieren im Durchschnitt  $42746 \pm 4489$  Axone gezählt. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant.

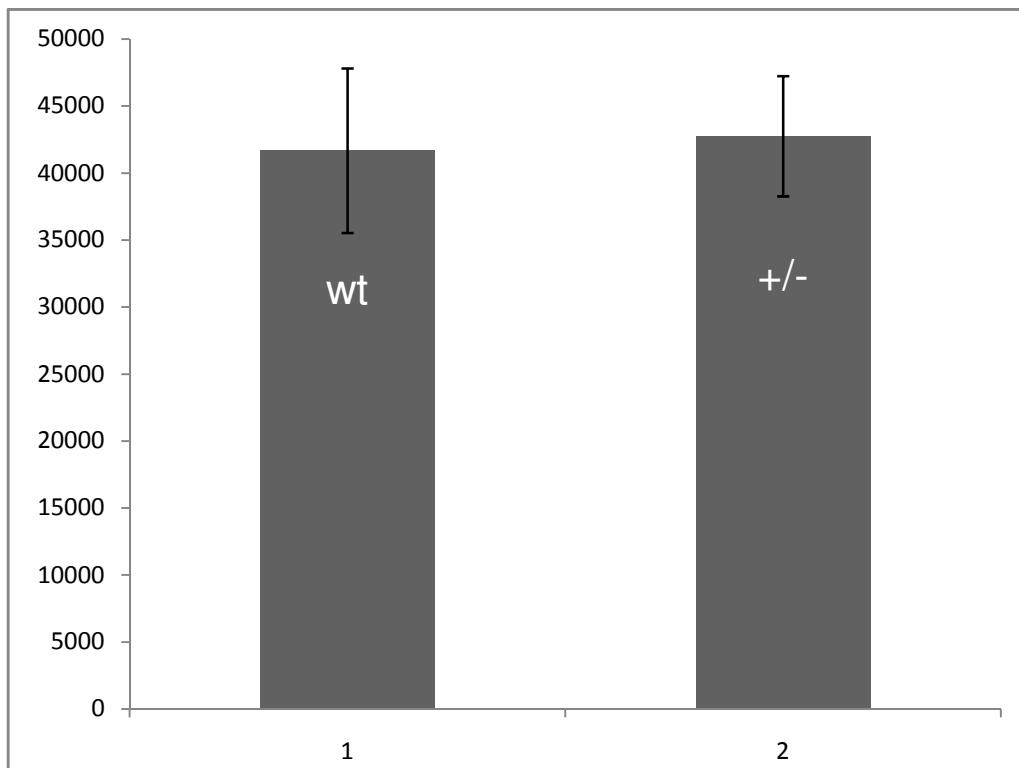


Abbildung 9: Quantifizierung der Anzahl der Axone pro Sehnerv. 1: Wildtyp-Mäuse. 2: Heterozygote *Wdr36*-defiziente Mäuse.

### 3.4 Exzitotoxischer Schaden nach Injektion von NMDA

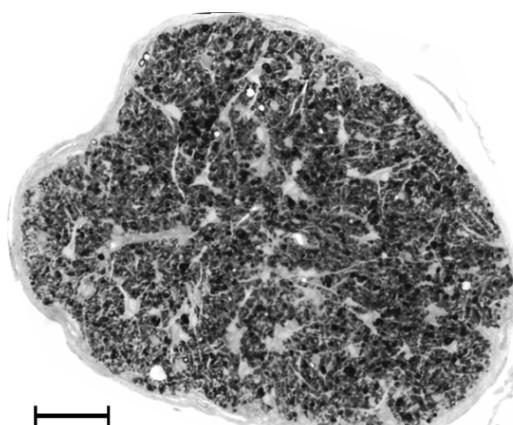
Um zu prüfen, ob die retinalen Ganglienzellen von heterozygoten *Wdr36*-defizienten Tieren empfindlicher auf einen exzitotoxischen Schaden reagieren, als die Augen von Wildtyp-Geschwistertieren, wurde in den Glaskörper der Tiere NMDA injiziert.

Die Sehnerven von mit PBS behandelten Kontrollaugen zeigten in der lichtmikroskopischen Untersuchung keinen offensichtlichen Unterschied zu denen unbehandelter Augen. So lagen die Axone regelmäßig und eng beieinander, mit gleichmäßig gefärbten und intakten Myelinscheiden. Der Anteil des glialen Stützgewebes war sehr gering.

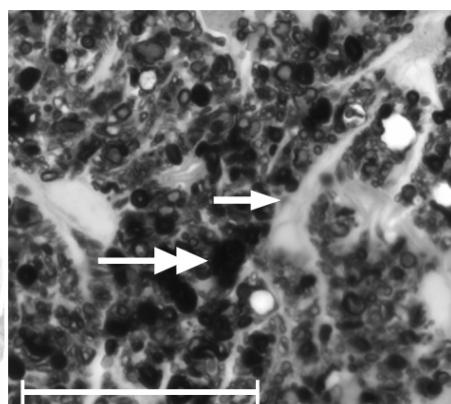
Verglichen mit unbehandelten oder PBS-behandelten Sehnerven zeigten Sehnerven von Augen, in die NMDA injiziert worden war, einen starken Axonverlust.

Lichtmikroskopisch war der Schaden bei Wildtyp-Tieren und heterozygoten WDR-36-defizienten Tieren gleichermaßen ausgeprägt.

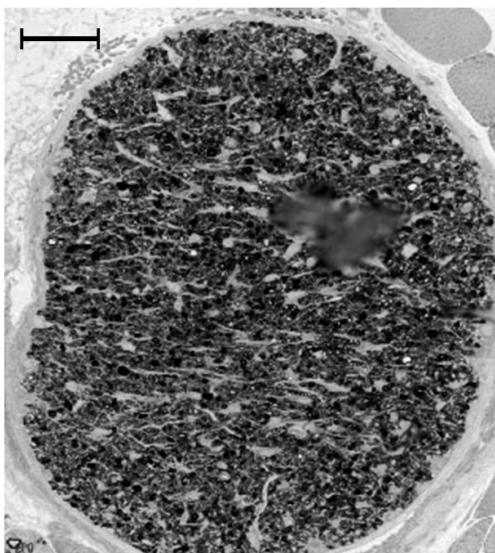
A



B



C



D

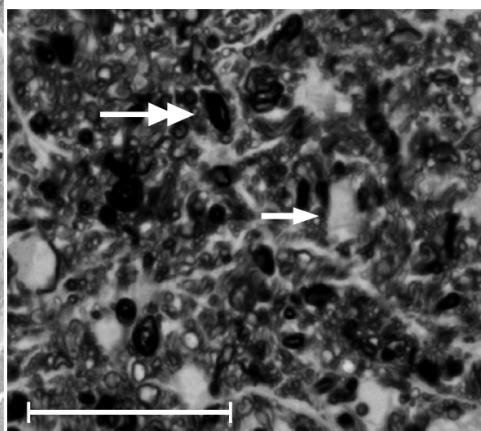


Abbildung 10: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten durch *N.optici* von mit NMDA behandelten Augen. A- D: 21 Tage nach intravitrealer Injektion von NMDA haben sich große gliale Narbenfelder (Pfeile) und intensiv anfärbbare axonale Myelinscheiden (Doppelpfeile) gebildet. Im Vergleich zu unbehandelten Augen fällt zudem ein massiver Axonverlust auf. Ein Unterschied zwischen Wildtyp-Augen (A und B) und den Augen von heterozygoten *Wdr36*-Defizienten (C und D) ist nicht zu erkennen ( $p$ -Wert 0,95 bzw. 0,71). Färbung: Paraphenyldiamin, Messbalken: A/C: 50  $\mu\text{m}$ ; B/D: 25  $\mu\text{m}$ .

Schließlich wurde noch die Anzahl der Axone des *N.opticus* aller vier Versuchsgruppen manuell ausgezählt. Die nur mit PBS behandelten Augen unterschieden sich in der Gesamtzahl ihrer Axone nicht von unbehandelten Augen. Weiterhin war kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Axone zwischen den Sehnerven von Wildtyp- Mäusen und heterozygoten *Wdr36*-defizienten Tieren festzustellen. So zeigten Wildtyp-Tiere  $43436 \pm 1981$  Axone, während bei heterozygoten *Wdr36*- defizienten Tieren eine Axonzahl von  $43525 \pm 1692$  ermittelt wurde. Im Vergleich dazu zeigten die Nn.optici der mit NMDA manipulierten Augen einen deutlichen Verlust von Axonen. So wurden bei NMDA-behandelten Wildtyp-Tieren  $15276 \pm 880$  Axone beobachtet, bzw.  $15544 \pm 915$  bei heterozygoten *Wdr36*-defizienten. Während die Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten bzw. PBS-behandelten Tieren signifikant waren, zeigte sich keine statistische Signifikanz im Vergleich zwischen NMDA-injizierten Wildtyp-Tieren und heterozygoten *Wdr36*-defizienten Tieren.

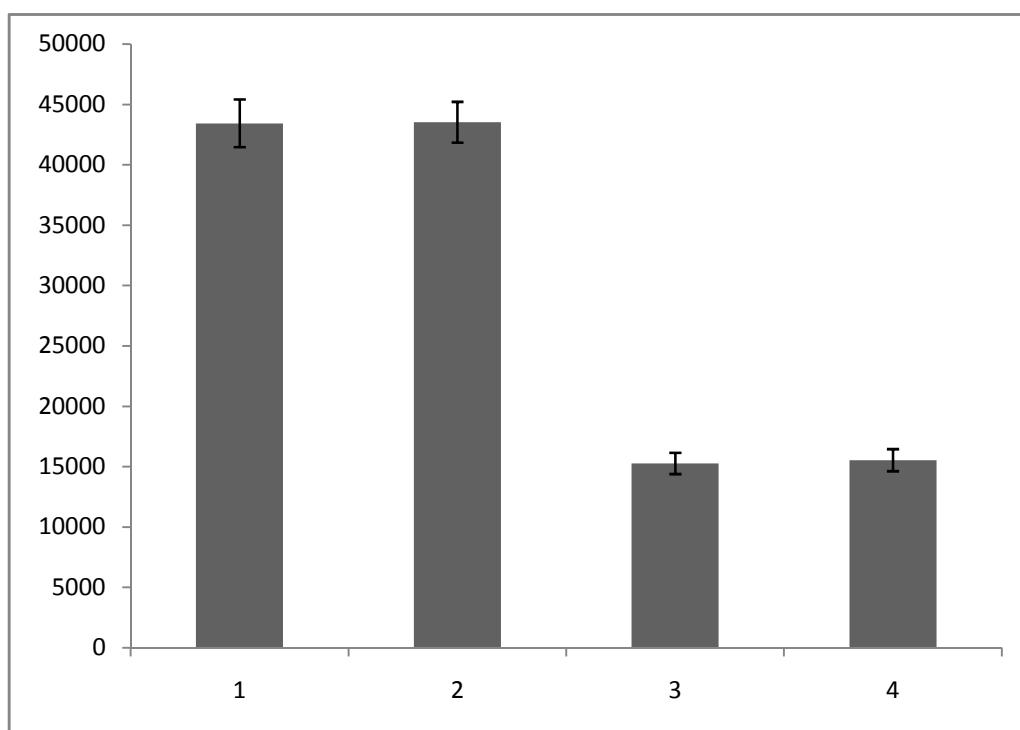


Abbildung 11: Quantitative Auswertung der Anzahl von Axonen im Sehnerv. Von links nach rechts: Wildtypaugen nach PBS- Injektion, Augen von *Wdr36*- defizienten Tieren nach PBS-Injektion, Wildtypaugen nach NMDA- Injektion, *Wdr36*- defizierte Augen nach NMDA- Injektion. Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

## 4 Diskussion

Gallenberger et al. (2011) konnten bei der Untersuchung von homozygot *Wdr36*-defizienten Tieren nachweisen, dass ein vollständiges Fehlen der Expression von *Wdr36* nicht mit dem Leben vereinbar ist. Im Gegensatz dazu zeigen unsere Daten, dass eine heterozygote Defizienz von *Wdr36* zu keinem offensichtlichen Phänotyp oder gar zu Organveränderungen führt. So konnten bei der histologischen Aufarbeitung von Herz, Leber, Nieren und Milz keine Auffälligkeiten gefunden werden. Basierend auf diesen Ergebnissen kann man davon ausgehen, dass eine um ungefähr 50% verminderte Aktivität des Gens noch immer eine für eine normale Zellfunktion ausreichende ribosomale Biosynthese garantieren kann, und somit keine Haploinsuffizienz auftritt. Folglich wiesen heterozygot *Wdr36*-defiziente Mäuse keine offensichtlichen Erkrankungen auf und blieben bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes gesund.

Patienten mit Mutationen in *Wdr36* entwickeln ein Offenwinkelglaukom mit typischerweise erhöhtem Augeninnendruck, dem klassischen Risikofaktor für die Entwicklung eines Sehnervenschadens beim Glaukom. Auch bei der Maus führt ein erhöhter Augeninnendruck zu einem Verlust der Axone des Sehnerven (Fuchshofer et al., 2012). Ein erhöhter Augeninnendruck findet sich hingegen nicht bei heterozygot *Wdr36*-defizienten Mäusen, was gegen die Entwicklung eines Hochdruckglaukoms spricht. Insbesondere konnte auch kein Verlust von Axonen im Sehnerv, ein charakteristischer Befund bei einem glaukomatösen Schaden des Sehnervens beobachtet werden, so dass auch die Entstehung eines Glaukoms bei normalen Druckwerten weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Insgesamt ist davon auszugehen, dass auch verringerte Mengen von *Wdr36* für eine normale Funktion des Kammerwasserzirkulationssystems und der Axone des Sehnerven ausreichend sind.

Um herauszufinden, ob sich die niedrigere Expression von *Wdr36* auf die Belastbarkeit der retinalen Ganglienzellen auswirkt und in einer erniedrigten Toleranzschwäche gegenüber externen Stressoren resultiert, wurde mit dem NMDA-Schadensmodell gearbeitet. Das NMDA-Schadensmodell basiert auf der spezifischen exzitotoxischen Schädigung retinaler Ganglienzellen. NMDA-Rezeptoren werden im ganzen Körper, auch in der Retina, exprimiert. Die Rezeptoren stellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Zellmembran dar. Der physiologische Ligand Glutamat aktiviert die Ionenkanäle und sorgt so für einen Influx von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen. Auch NMDA kann an den NMDA-Rezeptor binden. Da NMDA als synthetischer Agonist im Körper normalerweise nicht vorkommt, fehlen die Mechanismen für eine Inaktivierung des NMDA-Rezeptorkomplexes. Die Bindung von NMDA an den Rezeptor führt zu einer unphysiologisch langen Öffnung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanals und über die Beeinflussung von intrazellulären Signalwegen zu einer Aktivierung der Apoptosesignalkaskade. Ein genauer Mechanismus ist bislang zwar noch nicht bekannt; dennoch hat sich das NMDA-Modell als ein Modell zur Prüfung der Belastungsfähigkeit retinalen Ganglienzellen etabliert. Allerdings konnte mit diesem Modell auch kein Unterschied bezüglich der Empfindlichkeit von retinalen Ganglienzellen von heterozygot-defizienten bzw. Wildtyp-Mäusen beobachtet werden, was dagegen spricht, dass das Fehlen eines Allels von *Wdr36* diese empfänglicher für exogene Schäden macht.

Die genaue Funktion von *WDR36* bei der Entstehung eines Glaukoms ist nach wie vor umstritten. Während Pasutto et al. in mehreren Arbeiten das Vorliegen bestimmter Mutationen im *WDR36*-Gen bei Glaukompatienten nachweisen konnten, konnten Hauser et al. keinen definitiven Zusammenhang zwischen dem Auftreten der Mutationen und einer Erkrankung feststellen. Auch muss die Vererbung einer *WDR36*-Mutation nicht zwangsläufig zur Ausbildung eines Glaukoms führen. Auffallend häufig jedoch wird bei Erkrankten eine Mutation des *WDR36*-Gens gefunden.

Beiden in dieser Arbeit untersuchten Tieren konnte trotz des Fehlens eines Allels von *Wdr36* kein Glaukom nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen,

dass ältere heterozygote *Wdr36*-defiziente Tiere – älter als zwei Jahre – aufgrund einer verminderten Expression von *Wdr36* glaukomatóse Schäden am Auge entwickeln.

Darüber hinaus ist *Wdr36* offenbar an der Ribosomenreifung beteiligt (Gallenberger et al, 2011). Auf diesem Weg kann eine Fehlfunktion zu einer speziellen Art von Erkrankungen, den so genannten Ribosomopathien, führen. Hier wären an bekannten, jedoch insgesamt sehr seltenen Erkrankungen das Diamond- Blackfan-Syndrom (Erythropoiesis imperfecta, eine kongenitale hypoplastische Anämie), das 5q- minus- Syndrom (ein myelodysplastisches Syndrom) und das Treacher- Collins-Syndrom (Dysostosis mandibulofacialis) zu nennen. Ribosomopathien zeichnen sich dadurch aus, dass sie nur wenige Zellklassen betreffen, am häufigsten Knochenmark und Knochen. Ein Funktionsverlust von *Wdr36* führt über einen Ribosomenverlust zu einer stressbedingten Aktivierung des p53- Signalwegs. Diese Aktivierung führt vor allem zur Apoptose und einer Unterbrechung des Zellzyklus. Auf diese Weise entstehen die Krankheitsbilder der Ribosomopathien.

Theoretisch würde diese Aktivierung auch zur Apoptose von retinalen Ganglienzellen führen, was wiederum dem Erscheinungsbild des Glaukoms entsprechen würde. Dahingegen sprechen die Daten dieser Arbeit gegen eine stressbedingte Apoptose der heterozygot *Wdr36*- defizienten Mäuse; wäre dies der Fall, wäre mit einer erniedrigten Zahl von retinalen Ganglienzellen zu rechnen. Daher lässt sich aus unseren Daten ableiten, dass nur ein Allel des *Wdr36*- Gens ausreicht, um einem Axonverlust vorzubeugen.

## 5 Zusammenfassung

*WDR36* ist am Genort *GLC1G* auf dem Chromosom 5q22.1 lokalisiert und kodiert für ein an der ribosomalen RNA-Synthese beteiligtes Protein des Nucleolus. In mehreren Studien konnte die Bedeutung von Polymorphismen im *WDR36*-Gen für die Ausbildung eines Offenwinkelglaukoms gezeigt werden. Allerdings finden sich derartige Polymorphismen auch bei der normalen Bevölkerung, was gegen eine kausale Rolle von *WDR36* bei der Pathogenese des Glaukoms spricht. Da *WDR36* im Laufe der Evolution stark in seiner ursprünglichen Form erhalten geblieben ist, findet sich bei Mäusen eine Genexpression in ähnlichen Geweben wie beim Menschen. Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Phänotyp von *WDR36*-heterozygoten Mäusen zu analysieren.

Hierfür wurden Wildtypiere und *WDR36*-defiziente Tiere vergleichend mikroskopiert. Die histologische Untersuchung der Augen und der extraokulären Gewebe von Herz, Leber, Milz und Nieren zeigte keine pathologischen Veränderungen. Darüber hinaus wurde das exzitotoxische Schadensmodell einer NMDA-Injektion in den Glaskörper angewandt. Dieses Modell sollte genutzt werden, um einen potentiell neurodestruktive Einfluss der Verringerung der Expression von *WDR36* zu untersuchen. Die intravitreale Injektion von 10 mM NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) führte dabei sowohl bei Wildtypieren als auch bei *WDR36*-defizienten Tieren zu einer signifikanten Verringerung der Axonzahl im *N. opticus*, während bei unbehandelten Tieren kein Unterschied in der Axonzahl festzustellen war.

Aus diesen Experimenten kann abgeleitet werden, dass eine Verringerung der Expression von *WDR36* nicht zu einer verminderten Belastbarkeit der retinalen Ganglienzellen führt. Insgesamt konnte in der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass das Fehlen einer Kopie von *WDR36* keine offensichtlichen morphologischen Veränderungen im Organismus hervorruft. Die vorliegenden Ergebnisse stützen nicht die Hypothese, dass eine Haploinsuffizienz von *WDR36* ursächlich für die Entwicklung eines Offenwinkelglaukoms ist.

## 6.1 Literaturverzeichnis

Agar, Ashish, S Li, Neeraj Agarwal, Minas T Coroneo, und MA Hill. 2006. "Retinal ganglion cell line apoptosis induced by hydrostatic pressure". *Brain Research* 1086 (1) (Mai 1): 191-200.

Chi, Z.L., Akahori, M., Obazawa, M., Minami, M., Noda, T., Nakaya, N., Tomarev, S., Kawase, K., Yamamoto, T., Noda, S. et al. (2010) Overexpression of Optineurin E50K Disrupts Rab8 Interaction and Leads to a Progressive Retinal Degeneration in Mice. *Hum. Mol. Genet.*, doi:10.1093/hmg/ddq146.

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

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, 1276-1287.

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

Fuse N. (2010) Genetic bases for glaucoma. *Tohoku J. Exp. Med.*, 221, 1-10

Gallenberger M, Meinel DM, Kroeber M, Wegner M, Milkereit P, Bösl MR, Tamm ER. (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.

Haefliger, I O, N Pellanda, J C Fleischhauer, M Gekkiewa, und J Flammer. 2001. "Neuroprotection in glaucoma. What is the current status?". *Der Ophthalmologe: Zeitschrift Der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* 98 (6) (Juni): 564-567.

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. et al. (2006) Distribution of WDR36 DNA sequence variants in patients with primary open-angle glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47, 2542-2546.

Higuchi, R, C Fockler, G Dollinger, und R Watson. 1993. "Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions". *Bio/Technology (Nature Publishing Company)* 11 (9) (September): 1026-1030.

Lam, TT, A S Abler, J M Kwong, und M O Tso. 1999. "N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced apoptosis in rat retina". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40 (10) (September): 2391-2397.

Lau, Anthony, und Michael Tymianski. 2010. "Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration". *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 460 (2) (Juli): 525-542.

Li, Y, C L Schlamp, R W Nickells. 1999. "Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice". *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40 (5) (April): 1004-1008.

Livak, K J, und T D Schmittgen. 2001. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method". *Methods (San Diego, Calif.)* 25 (4) (Dezember): 402-408.

Michels-Rautenstrauss K, Mardin C, Wakili N, Jünemann AM, Villalobos L, Mejia C, Soley GC, Azofeifa J, Ozbey S, Naumann GO, Reis A, Rautenstrauss B. (2002) Novel mutations in the MYOC/GLC1A gene in a large group of glaucoma patients. *Hum Mutat.*, 20(6):479-80.

Monemi, S., Spaeth, G., DaSilva, A., Popinchalk, S., Ilitchev, E., Liebmann, J., Ritch, R., Heon, E., Crick, R.P., Child, A. et al. (2005) Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. *Hum. Mol. Genet.*, 14, 725-733.

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, 270-274.

Quigley, H.A. (1996) Number of people with glaucoma worldwide. *Br. J. Ophthalmol.*, 80, 389-393.

Quigley, H.A. and Broman, A.T. (2006) The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br. J. Ophthalmol.*, 90, 262-267.

Raff, M C, B A Barres, J F Burne, H S Coles, Y Ishizaki, und M D Jacobson. 1993. "Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system". *Science (New York, N.Y.)* 262 (5134) (Oktober 29): 695-700.

Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, Mariotti SP. (2004) Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull World Health Organ*, 82:844-851.

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

Romeis, B. 1989. "Mikroskopische Technik". 17. Auflage. *Urban und Schwarzenberg Verlag München*.

Rubin, L L. 1997. "Neuronal cell death: when, why and how". *British Medical Bulletin* 53 (3): 617-631.

Sarfarazi M, Child A, Stoilova D, Brice G, Desai T, Trifan OC, Poinoosawmy D, Crick RP. (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.

Sarfarazi M, Rezaie T. (2003) Optineurin in primary open angle glaucoma. *Ophthalmol Clin North Am.* 16(4):529-41.

Schmittgen, Thomas D, und Kenneth J Livak. 2008. "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method". *Nature Protocols* 3 (6): 1101-1108.

Schultze, W H. 1972. "Über das Paraphenylendiamin in der histologischen Färbetechnik und über eine neue Schnellfärbemethode der Nervenmarkscheide am Gefrierschnitt". *Zentralbl. Pathol.*: 36: 639-640.

Schwartzman, R A, und J A Cidlowski. 1993. "Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death". *Endocrine Reviews* 14 (2) (April): 133-151.

Senatorov, V., Malyukova, I., Fariss, R., Wawrousek, E.F., Swaminathan, S., Sharan, S.K. and Tomarev, S. (2006) Expression of mutated mouse myocilin induces open-angle glaucoma in transgenic mice. *J. Neurosci.*, 26, 11903-11914.

Shen, Yin, X-L Liu, und X-L Yang. 2006. "N-methyl-D-aspartate receptors in the retina". *Molecular Neurobiology* 34 (3) (Dezember): 163-179.

Stoilova D, Child A, Trifan OC, Crick RP, Coakes RL, Sarfarazi M. (1996) Localization of a locus (GLC1B) for adult-onset primary open angle glaucoma to the 2cen-q13 region. *Genomics.*,15;36(1):142-50.

Stone, E.M., Fingert, J.H., Alward, W.L., Nguyen, T.D., Polansky, J.R., Sunden, S.L., Nishimura, D., Clark, A.F., Nystuen, A., Nichols, B.E. et al. (1997) Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. *Science*, 275, 668-670.

Tanck, J J. 2004. "Studie zur morphometrischen Auswertung peripherer Nerven". *Dissertation am Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München*.

Trifan OC, Traboulsi EI, Stoilova D, Alozie I, Nguyen R, Raja S, Sarfarazi M. (1998) A third locus (GLC1D) for adult-onset primary open-angle glaucoma maps to the 8q23 region. *Am J Ophthalmol*. 126(1):17-28.

Wiggs JL, Allingham RR, Hossain A, Kern J, Auguste J, DelBono EA, Broomer B, Graham FL, Hauser M, Pericak-Vance M, Haines JL. (2000) Genome-wide scan for adult onset primary open angle glaucoma. *Hum Mol Genet*. 12;9(7):1109-17.

Wiggs JL, Lynch S, Ynagi G, Maselli M, Auguste J, Del Bono EA, Olson LM, Haines JL. (2004) A genomewide scan identifies novel early-onset primary open-angle glaucoma loci on 9q22 and 20p12. *Am J Hum Genet*. 74(6):1314-20. Epub 2004 Apr 23.

Williams, RW, R C Strom, D S Rice, und D Goldowitz. 1996. "Genetic and environmental control of variation in retinal ganglion cell number in mice". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16 (22) (November 15): 7193-7205.

Wirtz MK, Samples JR, Rust K, Lie J, Nordling L, Schilling K, Acott TS, Kramer PL. (1999) GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-q36. *Arch Ophthalmol.*, 117(2):237-41.

Won J, Shi LY, Hicks W, Wang J, Hurd R, Naggert JK, Chang B, Nishina PM. (2011) Mouse model resources for vision research. *J Ophthalmol.*, Epub 2010 Oct 31.

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
µ	Mikro (10 -6)
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ad	zu
a.d.	Destilliertes Wasser
AMD	Altersspezifische Makuladegeneration
ARVO	The association for research in vision and ophthalmology
Bl6/ c57	Black 6/ c57- Mäuse
BP	Basenpaare
Bzw.	Beziehungsweise
ca.	zirka
CaCo	Cacodylatpuffer
cDNA	Copy- DNA, komplementäre DNA
CDR	Cup- disc- Ratio
cm	Zentimeter
ct- Wert	cycle threshold- Wert
d	Tage
DDSA	2- Dodecenylsuccinic- acid- anhydrid
Dest.	destilliert
DIG	2R,3S,4S)-2-[(1S)-1,2-dihydroxyethyl]pyrrolidine-3,4-diol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleintriphosphat

DMP-30	2,4,6-tris(dimethylaminomethyl)phenol
ds	doppelsträngig
EM	Elektronenmikroskop
EDTA	Ethyldiamin- Triessigsäure
Et al.	Und andere (et alia)
Fw	Forward
G	Gramm
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
GLC	Gas-Flüssigkeits-Chromatographie (Gas-liquid chromatography)
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O dest.	Destilliertes Wasser
IL	Interleukin
INL	Innere Körnerschicht
IOP	Intraocular pressure, Augeninnendruck
IPL	Innere plexiforme Schicht
In vitro	Außerhalb des lebenden Organismus
In vivo	Im lebenden Organismus
J	Joule
JOAG	Juvenile- onset primary open angle glaucoma, juveniles Offenwinkelglaukom
K	Kilogramm
Kb	Kilobasenpaare

L	Liter
M	Meter
M	Molar (Mol pro Liter)
mg	Miligramm
mm	Milimeter
mmHG	Milimeter Quecksilbersäule
Min.	Minute
Mind.	mindestens
MNA	3-Nitroanilin
mRNA	MessengerRNA
MYOC	Myocilin
N	Anzahl oder nano (10-9)
N.	Nervus
Nn.	Nervi
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMDA	N- methyl- D- aspartat
NTG	Normal tension glaucoma, Normaldruckglaukom
ONL	äußere Körnerschicht
OPL	äußere plexiforme Schicht
OPTN	Optineurin
p	para
PAC	primary angle closure, primärer Kammerwinkelverschluss

PACG	primary angle closure glaucoma, primäres Engwinkelglaukom
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	Konzentration der H+- Ionen eine Lösung
POAG	Primary open angle glaucoma, primäres Offenwinkelglaukom
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR (oder RTqPCR)	Real-Time-quantitative-PCR
rev	reverse
RGC	Retinale Ganglienzellen
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Reverse Transskription
RT- PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
rTdT	rekombinante Terminale-Deoxynukleotidyl-Transferase
s	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SEM	Standartfehler des Mittelwerts
siRNA	small interfering RNA, kleine RNA
SYBR- Green I	2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-

	propylamino]-1-phenyl-1H-chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation  Farbstoff zum Nachweis doppelsträngiger DNA
S.U.	Siehe unten
Tab.	Tabelle
Taq Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS- Borat- EDTA- Puffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit, Enzymeinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
Utp21	
V	Volt
Vgl.	vergleiche
vs.	versus
WDR36	WD40-repeat36
Wt	Wildtyp
z.B.	Zum Beispiel

### 6.3 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Grundausstattung
- Tab. 2: Geräte für die Histologie
- Tab. 3: Chemikalien und Reagenzien
- Tab. 4: Verwendete kommerziell erwerbliche Kits
- Tab. 5: qPCR Primer
- Tab. 6: siRNA Primer
- Tab. 7: Ansatz für Master- Mix- cDNA
- Tab. 8: Real time PCR- Programm
- Tab. 9: Ansatz für reverse Transskriptase- Reaktion
- Tab. 10: PCR- Programm für die cDNA- Synthese
- Tab. 11: Materialien für die NMDA- Injektion
- Tab. 12: Ansatz für die Eponherstellung
- Tab. 13: Ansatz für Cacodylat- Puffer
- Tab. 14: Ansatz für EM- Fixans
- Tab. 15: Epon- Einbettung der Augen

Tab. 16: Epon- Einbettung der Sehnerven

Tab. 17: Epon- Einbettung der Abdominalorgane

Tab. 18: Ansatz für 1% Azur II

Tab. 19: Ansatz für 1% Methylenblau

Tab. 20: Ansatz für 1% Paraphenyldiamin

## 6.4 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Sagittaler Semidünnschnitt des Kammerwinkels eines Wildtyptieres
- Abb. 2: Sagittaler Semidünnschnitt des Kammerwinkels eines WDR36-defizienten Tieres
- Abb. 3: Sagittaler Semidünnschnitt durch die Retina eines Wildtyptieres
- Abb. 4: Sagittaler Semidünnschnitt durch die Retina eines WDR36-defizienten Tieres
- Abb. 5: Sagittaler Semidünnschnitt durch die Retina eines Wildtyptieres
- Abb. 6: Sagittaler Semidünnschnitt durch die Retina eines WDR36-defizienten Tieres
- Abb. 7: Sagittaler Semidünnschnitt durch den Sehnervenkopf eines Wildtyptieres
- Abb. 8: Sagittaler Semidünnschnitt durch den Sehnervenkopf eines WDR36-defizienten Tieres
- Abb. 9: Sagittaler Semidünnschnitt durch den Herzmuskel eines WDR36-defizienten Tieres
- Abb. 10: Sagittaler Semidünnschnitt durch den Herzmuskel eines WDR36-defizienten Tieres
- Abb. 11: Sagittaler Semidünnschnitt durch den Herzmuskel eines WDR36-defizienten Tieres
- Abb. 12: Longitudinaler Semidünnschnitt durch den Herzmuskel eines WDR36-defizienten Tieres
- Abb. 13: Longitudinaler Semidünnschnitt durch den Herzmuskel eines WDR36-defizienten Tieres
- Abb. 14: Longitudinaler Semidünnschnitt durch den Herzmuskel eines WDR36-defizienten Tieres
- Abb. 15: Sagittaler Semidünnschnitt durch das Milzparenchym eines Wildtyptieres

- Abb. 16: Sagittaler Semidünnschnitt durch das Milzparenchym eines WDR36-defizienten Tieres
- Abb. 17: Sagittaler Semidünnschnitt durch das Nierenparenchym eines Wildtyptieres
- Abb. 18: Sagittaler Semidünnschnitt durch das Nierenparenchym eines WDR36-defizienten Tieres
- Abb. 19: Sagittaler Semidünnschnitt durch das Leberparenchym eines Wildtyptieres
- Abb. 20: Sagittaler Semidünnschnitt durch das Leberparenchym eines WDR36-defizienten Tieres
- Abb. 21/ 22: Sagittaler Semidünnschnitt durch den Sehnerv eines Wildtyptieres
- Abb. 23/ 24: Sagittaler Semidünnschnitt durch den Sehnerv eines WDR36-defizienten Tieres
- Abb. 25: Quantifizierung der Sehnerven von Wildtyp- und WDR36- defizienten Tieren
- Abb. 26/ 27: Sagittaler Semidünnschnitt durch die mit NMDA- behandelten Sehnerven eines Wildtyptieres
- Abb. 28/ 29: Sagittaler Semidünnschnitt durch die mit NMDA behandelten Sehnerven eines WDR36-defizienten Tieres
- Abb. 30: Quantifizierung der Sehnerven von Wildtyp- und WDR36- defizienten Tieren nach PBS- und NMDA- Injektion

## 6.5 Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. med. Ernst R. Tamm für die interessante undfordernde Fragestellung meiner Arbeit, die Übernahme des Erstgutachtens und seine unermüdlichen Bemühungen um meine Arbeit. Ich danke ihm an dieser Stelle insbesondere für die oftmals zeitintensive und geduldige Unterstützung bei jeglichen Anliegen bezüglich meiner Arbeit.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Wagner danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Weiterhin gilt mein aufrichtiger Dank Herrn Martin Gallenberger für die Zusammenarbeit bei diesem Projekt und seine tatkräftige Unterstützung.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Humananatomie und Embryologie für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme persönliche Miteinander. An dieser Stelle geht ein persönlicher Dank an Frau Margit Schimmel, Frau Angelika Pach, Frau Elke Stauber und Frau Katharina Fizia für ihre Hilfe im Laboralltag. Desweiteren danke ich allen Laborkollegen für das angenehme Arbeitsklima und das positive persönliche Miteinander.

Außerhalb des Lehrstuhls danke ich allen Freunden und Kollegen, die mich bei der Fertigstellung meiner Arbeit unterstützt haben.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern und meinem Bruder danken, die mich auf meinem gesamten bisherigen Weg unterstützt haben und ohne die es weder diese Arbeit noch mein bisheriges Leben geben würde.

## 6.6 Erklärungen

Zum Antrag auf Zulassung zur Promotion als Doktor der Medizin vorgelegt von Loreen März unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Ernst R. Tamm am Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie der Universität Regensburg nach § 6 Absatz 5 der Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät und der Naturwissenschaftlichen Fakultät III (Medizinische Fächer) der Universität Regensburg vom 12. Juni 2008:

*„Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.*

*Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.*

*Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.“*

Loreen März

Regensburg, im Juli 2014

## 6.7 Curriculum vitae

<b>Persönliche Daten</b>	
Name	Loreen März
Geburtstag	31.01.1985
Geburtsort	Regensburg
Staatsangehörigkeit	Deutsch
<b>Beruflicher Werdegang</b>	
Seit 2010	Assistenzärztin, Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg
<b>Ausbildung</b>	
2004 – 2010	Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg
1995 – 2004	Albertus- Magnus- Gymnasium Regensburg
1991 - 1995	Grundschule Lappersdorf