

DER EINFLUSS DES TGF - β - SIGNALWEGS AUF DAS ÜBERLEBEN
RETINALER GANGLIENZELLEN



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER
MEDIZIN
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND
VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Natalie, Abramov
aus
Zelinograd
im Jahr
2014

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

19. 12. 2014

Die Arbeit wurde angeleitet von:

PD Dr. med. Dr. rer. nat. Barbara M. Braunger

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	- 1 -
I.1 Aufbau der Augenkammern	- 1 -
I.2 Kammerwinkel	- 2 -
I.3 Trabekelwerk und extrazelluläre Matrix	- 4 -
I.4 Ziliarkörper (Corpus ciliare) und seine Bedeutung beim Kammerwasserabfluss...	- 6 -
I.5 Kammerwasserproduktion	- 7 -
I.6 Augeninnendruck	- 7 -
I.7 Retina.....	- 8 -
I.8 Retinale Ganglienzellen	- 11 -
I.9 Glaukom.....	- 14 -
I.9.1 Allgemeines und Pathophysiologie	- 14 -
I.9.2 Primäres Offenwinkelglaukom.....	- 16 -
I.9.3 Normaldruckglaukom	- 16 -
I.9.4 Primäres Engwinkelglaukom.....	- 17 -
I.9.5 Therapiemöglichkeiten.....	- 18 -
I.10 NMDA - Schadensmodell	- 18 -
I.11 TGF - β - Signalweg	- 19 -
I.11.1 TGF - β	- 19 -
I.11.2 Smad7 und andere Smad - Proteine	- 21 -
I.12 Cre/loxP - Rekombinationssystem	- 23 -
I.13 Zielsetzung der Arbeit.....	- 25 -
II. Material - und Methodenteil	- 27 -
II.1 Materialliste	- 27 -
II.1.1 Reagenzliste	- 27 -
II.1.2 Enzyme und Kits	- 29 -

II.1.3	Verbrauchsmaterialien und Geräte	- 29 -
II.1.4	Gele, Puffer und Lösungen	- 31 -
II.1.5	Antikörper	- 35 -
II.1.6	Oligonukleotidprimer für Genotypisierungs - PCR.....	- 36 -
II.2	Versuchstiere und Tierhaltung.....	- 36 -
II.3	Molekularbiologische Methoden	- 37 -
II.3.1	Isolierung von DNA aus Mausschwanzbiopsie	- 37 -
II.3.2	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren.....	- 37 -
II.3.3	Genotypisierung der Versuchstiere	- 38 -
II.4	Proteinbiochemische Methoden	- 40 -
II.4.1	Proteinisolierung nach der TRIzol® - Methode	- 40 -
II.4.2	Western - Blot	- 41 -
II.4.3	SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese	- 41 -
II.5	Immunofärbungen	- 44 -
II.5.1	Paraffineinbettung und Herstellen von Paraffinschnitten	- 44 -
II.5.2	Immunhistochemische Färbungen.....	- 45 -
II.6	NMDA - induzierte Schädigung von Retinalen Ganglienzellen.....	- 46 -
II.7	Phänotypanalyse	- 47 -
II.7.1	Eponeinbettung von Geweben	- 47 -
II.7.2	Anfertigen von Semidünnschnitten	- 48 -
II.8	Auszählen von Axonen der Sehnerven.....	- 48 -
II.9	Angiographie	- 48 -
II.10	Elektroretinographie	- 48 -
II.11	Auswertung und Statistik.....	- 49 -
III.	Ergebnisse.....	- 51 -

III.1	Nachweis der Konditionellen Deletion von Smad7 durch Western - Blot - Analyse ...	51 -
III.2	Nachweis der Konditionellen Deletion von Smad7 durch immunhistochemische Analyse	52 -
III.3	Phänotypanalyse der α - Cre +/- - Tiere	52 -
III.4	Phänotypanalyse der Sagittalschnitte der Augen der Smad7 ^{Δoc} - Tiere	55 -
III.5	Phänotypanalyse der Smad7 ^{Δoc} - Tiere anhand der Angiographie.....	56 -
III.6	Phänotypanalyse der Nn. optici der Konditionellen Deletion von Smad7	57 -
III.7	Funktionelle Analyse der Konditionellen Deletion von Smad7 mittels Elektroretinographie	60 -
III.8	Phänotypanalyse der Konditionellen Deletion von Smad7 im Schadensmodell..	61 -
IV.	Diskussion.....	69 -
IV.1	Konditionelle Deletion von Smad7.....	69 -
IV.2	Ausblick.....	73 -
V.	Zusammenfassung.....	75 -
VI.	Anhang.....	76 -
VI.1	Literaturverzeichnis.....	76 -
VI.2	Abbildungsverzeichnis	85 -
VI.3	Tabellenverzeichnis	86 -
VI.4	Abkürzungsverzeichnis	87 -
VI.5	Symbolverzeichnis.....	91 -
VI.6	Danksagungen.....	92 -
VI.7	Erklärung.....	93 -

I. Einleitung

Weltweit ist das Glaukom die zweithäufigste Ursache einer Erblindung. [20] Schätzungen zufolge wird es im Jahr 2020 11,9 Millionen Glaukom bedingte Erblindungsfälle und 79,6 Millionen Glaukom Erkrankte geben. [20] Im Verlauf dieser neurodegenerativen Erkrankung kommt es zur Apoptose von Retinalen Ganglienzellen, was in Gesichtsfeldausfällen (Skotome) und letztlich Erblindung enden kann. Bislang existieren nur symptomatische Therapiemöglichkeiten. [31] Ein vielversprechender Therapieansatz könnte in der Protektion Retinaler Ganglienzellen durch bestimmte neuroprotektive Moleküle liegen. TGF- β ist hier ein mögliches Zielmolekül. Es ist bereits als Regulator wichtiger Zell- und Organfunktionen bekannt und spielt in der Regulation des Überlebens neuronaler Zellen eine wichtige Rolle. [12, 51, 11]

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, den TGF- β -Signalweg speziell im Hinblick auf seine Funktion beim Überleben Retinaler Ganglienzellen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu untersuchen.

I.1 Aufbau der Augenkammern

Der Augapfel wird vom Glaskörper (Corpus vitreum) und der Linse eingenommen. Der vordere Teil des Augapfels besteht aus zwei kammerwassergefüllten Räumen, der vorderen und der hinteren Augenkammer (siehe Abb. 1). Diese sind über die Pupille miteinander verbunden. [102]

Die vordere Augenkammer (Camera anterior) wird ventral durch die Hornhaut (Cornea), dorsal durch die Vorderseite der Iris und den vorderen Linsenpol gebildet. Der Kammerwinkel (Angulus iridocornealis) bildet die seitliche Begrenzung. Hier findet der Kammerwasserabfluss durch das Trabekelwerk, über den Schlemm-Kanal statt (siehe I. 2, I. 3). [102, 9]

Die Grenzlinie der hinteren Augenkammer bilden die Iris, der seitliche Linsenrand, die Glaskörpergrenzmembran und der Ziliarkörper (Corpus ciliare). Beide Kammern enthalten

das Kammerwasser. Nach posterior schließt sich der Glaskörperraum an, welcher durch den gallertigen Glaskörper ausgefüllt wird. [9]

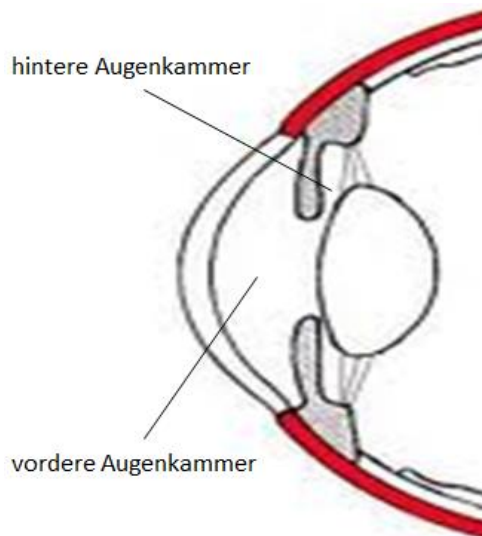


Abbildung 1 Augenkammern

Schematische Darstellung der Augenkammern, Sagittalschnitt (vordere Augenhälfte) modifiziert aus [3]

1.2 Kammerwinkel

Der Kammerwinkel (Angulus iridocornealis) befindet sich in der vorderen Augenkammer und dient dem Abfluss des im Corpus ciliare gebildeten Kammerwassers. [102] Die zum Kammerwinkel gehörenden Strukturen sind der Ziliarkörper, das Trabekelwerk und der Schlemm - Kanal (siehe Abb. 2). Der Schlemm - Kanal (Sinus venosus sclerae) liegt wie eine Art Winkel zwischen dem Kornearand und der Mündungsstelle der Iris zum Ziliarkörper und verläuft in der Sklera, wobei über viele kleine Kanäle Verbindung mit den episkleralen Venen und den Venae ciliares breves besteht. [9] Über diese führt der Schlemm - Kanal das Kammerwasser ab. Sein Endothel besteht aus Endothelzellen mit Vakuolen und einer unvollständigen Basallamina. [102] Nach außen hin wird der Schlemm - Kanal durch flache und glatte Zellen begrenzt, die Öffnungsstellen für die Sammelkanäle bilden. Diese ziehen aus dem Schlemm - Kanal in einem abgeflachten Winkel und münden direkt oder indirekt in die episkleralen Venen. [44]

Durch die Vakuolen bedingt bildet sich im Endothelverbund ein Kanälchensystem, welches es dem Schlemm - Kanal möglich macht, bei erhöhten Innendrücken des Auges den Abfluss

des Kammerwassers zu steigern. So können sich bei erhöhtem Augeninnendruck Vakuolen bis zu einer Größe von 20 µm formieren, die sich nach beiden Seiten des Endothels entleeren können. [44, 102]

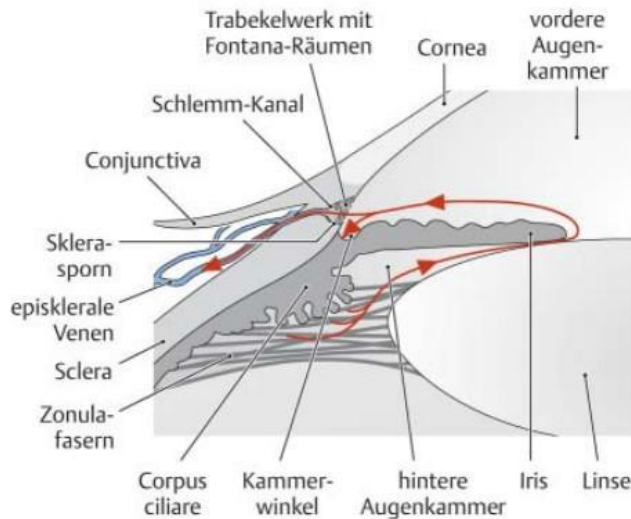


Abbildung 2 Kammerwinkel

Schematische Darstellung des Kammerwinkels. Die roten Pfeile beschreiben die Flussrichtung des Kammerwassers, welches im Ziliarkörperepithel gebildet, in die hintere Augenkammer sezerniert wird und durch die Pupille in die vordere Augenkammer fließt. Dort fließt es dann über das Trabekelwerk in den Schlemm - Kanal und die episkleralen Venen ab. Horizontalschnitt, übernommen von [2]

Ein weiterer Abflussweg wird durch spezielle Eigenschaften des Kammerwinkels im vorderen Ansatzbereich des Ziliarmuskels gewährleistet. So findet sich in diesem Bereich kein Epithel, das den Ziliarkörper auskleidet. Dadurch kann das Kammerwasser durch Einsickern in das interstitielle Gewebe des Ziliarkörpers letztlich über die Kapillaren des Ziliarmuskels abfließen. [92] Außerdem kann das Kammerwasser an dieser Stelle auch über das Lymphgefäßsystem der Orbita abtransportiert werden. Dieser unkonventionelle Abflussweg des Kammerwassers wird auch uveoskleraler Abfluss genannt und ist im Gegensatz zum konventionellen Abfluss über das Trabekelwerk (trabekulärer Abfluss) nicht vom Augeninnendruck abhängig. Damit ist der trabekuläre Abflussweg unter physiologischen Bedingungen verantwortlich für den Aufbau des Augeninnendrucks. [91, 92]

Etwa 90 % des Kammerwassers können über den konventionellen Weg täglich das Auge verlassen. Die restlichen 10 % fließen über den uveoskleralen Weg ab, durch das Einsickern

in das lockere, die Muskelzellen des Ziliarkörpers umgebende Bindegewebe und die hier stattfindende venöse Zirkulation. [44]

1.3 Trabekelwerk und extrazelluläre Matrix

Das Trabekelwerk ist eine Gewebeformation im skleralen Sulcus. Dieser ist eine ringförmige Einsenkung, die sich auf der Innenseite der Sklera im korneoskleralen Limbus befindet und von der Descemet - Membran zum Skleralsporn ragt. Der Schlemm - Kanal liegt auf der Außenseite des skleralen Sulcus, zwischen der Sklera und dem Trabekelwerk. [92]

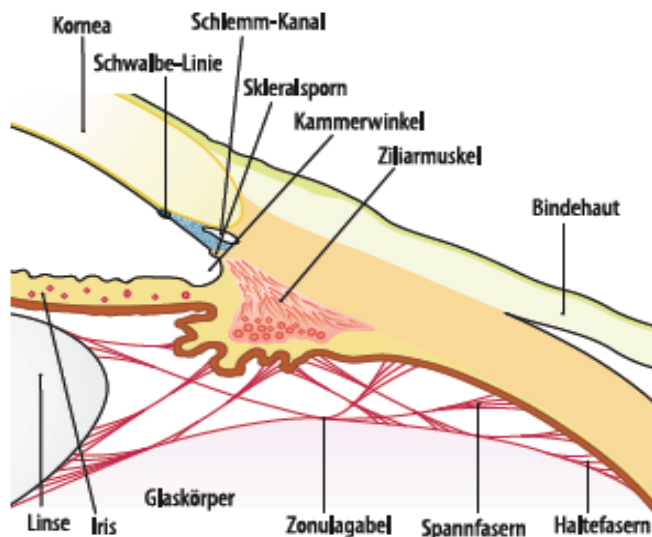


Abbildung 3 Schematische Darstellung des Trabekelwerks und des Kammerwinkels

Das Trabekelwerk befindet sich im skleralen Sulcus. Dieser liegt auf der Innenseite der Sklera im korneoskleralen Limbus und hat eine Ausdehnung von der Descemet - Membran (Basalmembran des hinteren Korneaepithels des Auges) bis zum Skleralsporn. [31]

Das Trabekelwerk besteht aus Bindegewebslamellen (kollagene und elastische Fasern). Eine Basallamina trennt die Kerne dieser Lamellen von den Trabekelwerkszellen, die durch ihre geordnete Anordnung auf der Basallamina epitheliale Eigenschaften aufweisen. Dadurch, dass zwischen diesen Bindegewebssträngen über Fortsätze Verbindungen bestehen, entsteht im Trabekelwerk eine schwammähnliche Morphologie. [92] Es bildet durch sein verzweigtes Maschenwerk zahlreiche Räume zwischen den Bindegewebsstrabekeln. Diese werden in ihrer Gesamtheit als Fontana - Räume bezeichnet. [102, 52]

Das Trabekelwerk setzt sich aus drei voneinander abgrenzbaren Abschnitten zusammen, dem uvealen und dem korneoskleralen, sowie dem juxtakanalikulären (cribriformen) Gewebe. [91] Das uveale Maschenwerk ist das Innerste, an die vordere Augenkammer grenzende und besteht aus ein bis drei [92] Schichten von Lamellen. Es gibt dem Kammerwasser mit seinen im Vergleich großen, trabekulären Räumen als erste Struktur des Kammerwinkels in der Kammerwasserpassage den geringsten Widerstand. Das korneosklerale, nach außen hin nächst gelegene Trabekulum weist kleinere intratrabekuläre Räume auf. Es bietet dem Kammerwasserabfluss damit einen höheren Widerstand. [44] Und zuletzt das juxtakanalikuläre (cribriforme) Gewebe, das sich zwischen den Lamellen des korneoskleralen Trabekelwerks und dem Endothel des Schlemm- Kanals befindet. Dieses hat keine Lamellen, sondern mehrere, etwa zwei bis fünf Lagen von Bindegewebszellen. Außerdem formieren sich diese Zellen sternförmig in einer mesenchymalen Anordnung, ähnlich denen der Fibroblasten. Dieses baut im Kammerwasserabfluss den höchsten Widerstand auf. [92] Die juxtakanalikulären Trabekelwerkszellen liegen hier in einer extrazellulären Matrix, die sich aus einer fibrillären Komponente sowie Proteoglykanen und Hyaluronsäure zusammensetzt. [5] Eine Besonderheit des juxtakanalikulären Gewebes ist der cribriforme Plexus. Dieser besteht aus elastischen Fasern, die im Kern Elastin enthalten. Die Struktur der Hülle dieser Fasern ist noch ungeklärt, soll aber aus Kollagen Typ IV und Fibronectin bestehen. Nennenswert ist diese Hüllstruktur aufgrund der Verbindung über ihre feinen Fibrillen zwischen dem cribriformen Plexus und dem Endothel des Schlemm - Kanals. Diese wiederum soll für die Haftung des Endothels entscheidend sein. [92]

Barany entdeckte 1962 kontraktile Elemente des Trabekelwerks, die Ähnlichkeit mit glatten Muskelzellen haben. [10] Aktin - Isoform- α - Smooth - Muscle - Actin ist für glatte Muskelzellen sehr typisch und wurde in Zellen des juxtakanalikulären Gewebes im Bereich des Skleralspornes vermehrt vorgefunden. Diese Zellen, die außerdem Verbindungen zu elastischen Fasern in diesem Bereich haben, sind senkrecht zu den Muskelfaserbündeln des Ziliarkörpers angeordnet. Man geht davon aus, dass das kontraktile System des Trabekelwerks und das des Ziliarmuskels (siehe I. 4) antagonistisch wirken. Durch Aktionen dieses Aktomyosinsystems wird der Abfluss des Kammerwassers gesenkt und durch Relaxation erhöht. [91]

Bevor das kontraktile System entdeckt wurde, wurden dem Trabekelwerk passive Eigenschaften beim Kammerwasserabfluss zugeschrieben, an dessen Regulation nur der Ziliarkörper beteiligt gewesen sein soll.

I.4 Ziliarkörper (Corpus ciliare) und seine Bedeutung beim Kammerwasserabfluss

Der Ziliarkörper (Corpus ciliare) ist funktionell für die Akkommodation und die Bildung des Kammerwassers zuständig. Das Corpus ciliare reicht mit seiner Ausdehnung von der Ora serrata bis zur Iriswurzel und besteht aus einem doppelreihigen Epithel und einem Stroma, das nicht nur stark vaskularisiert ist, sondern auch glatte Muskelzellen enthält, welche dem Ziliarmuskel (M. ciliaris) entsprechen. [8] Der M. ciliaris hat seinen Ursprung am Skleralsporn, an der Descemet - Membran des Korneaendothels und dem juxtakanalikulären Trabekelwerk sowie an der Wand des Schlemm - Kanals. Teilweise durchziehen die Muskelfasern des Ziliarmuskels das Trabekelwerk nur, ohne Kontakt zu diesem zu nehmen. [32] Damit gibt es eine Verbindung zwischen dem Ziliarmuskel, dem Skleralsporn und dem Trabekelwerk. Kontrahiert nun der Ziliarmuskel, übt er gleichzeitig eine Zugkraft am Skleralsporn aus. Diese wiederum weitet die trabekulären Räume auf, wodurch das Kammerwasser abfließen kann. Außerdem wird durch die Kontraktion des Ziliarkörpers auch der Schlemm - Kanal gedehnt, was ebenfalls den Abfluss des Kammerwassers begünstigt. [91]

Seinen Ansatz hat der Ziliarkörper an den elastischen Fasern der Bruch - Membran (Grenzschicht zwischen Aderhaut und Netzhaut). Damit sind diese elastischen Fasern auch die funktionellen Gegenspieler des Ziliarmuskels. [102] Histologisch setzt sich der Muskel außen aus längs verlaufenden Meridionalfasern (Brücke - Muskel), innen aus zirkulären Muskeln (Müller - Muskel) und aus retikulären Muskelfasern in der Mitte zusammen. Bei der Akkommodation wird die Funktion dieser speziellen Muskelfaseranordnung deutlich. Die zirkulären Fasern des Ziliarmuskels kontrahieren sich, die vorderen Zonulafasern entspannen sich, wodurch die Spannung der Linsenkapsel sinkt und die Brechkraft der Linse steigt. Dadurch wird ein Sehen in der Nähe möglich. [102, 9] Auf der posterioren Seite des Strahlenkörpers haben Ziliarzotten (Processus ciliares) ihren Ursprung. Diese Zotten haben in ihrem Inneren zahlreiche Blutgefäße sowie gefensterte Kapillaren und werden außen von einem zweischichtigen Epithel ausgekleidet. [102] Die äußere Schicht dieses Epithels

(Stratum pigmenti corporis ciliaris) ist pigmentiert und setzt sich mit seiner Basalmembran über elastische Fasern und eine fibroretikuläre Faserschicht in die Bruch- Membran fort. An der Basalmembran der inneren Epithelschicht inserieren die Zonulafasern (vgl. I. 2). Sie ziehen dann zur Linsen kapsel und schaffen so eine Verbindung zwischen Ziliarkörper und Linse, die für die Akkommodation unumgänglich ist. [102]

I.5 Kammerwasserproduktion

Produktionsort des Kammerwassers ist das Epithel der Ziliarzotten. Das Kammerwasser ist wichtig für die Ernährung der Kornea sowie der Linse und für die Aufrechterhaltung des Augeninnendrucks. Es stammt aus dem Blut der Kapillaren, die im Stroma der Ziliarzotten liegen. Die Bildung erfolgt mithilfe von Karboanhydrasen und durch aktiven Transport von Natrium- und Chloridionen. So gelangen diese Ionen zunächst in den perikapillären Interzellularraum. Von hier aus bewegen Transporter sie in das pigmentierte äußere Ziliarepithel (PE) und anschließend in das nicht - pigmentierte innere Ziliarepithel (NPE). Das NPE sezerniert dann das Kammerwasser unter Verbrauch von ATP sowie mithilfe von Karboanhydrasen in die hintere Augenkammer. [102]

Die Ultrafiltration des Plasmas aus den Kapillaren in den Extrazellularraum des Ziliarepithels erfolgt mit einer Geschwindigkeit von $2 \text{ mm}^3/\text{min}$. [83] Der Abfluss des Kammerwassers findet von der hinteren Augenkammer über die vordere Augenkammer und den Kammerwinkel statt. Stehen Produktion und Abfluss des Kammerwassers nicht im Gleichgewicht, führt dies zu einem abweichenden Augeninnendruck. Dieser erhöhte Druck begünstigt Krankheitsbilder wie das Glaukom. [31]

I.6 Augeninnendruck

Der intraokulare Druck (IOD) wird wesentlich von zwei Faktoren bestimmt: der Rate der Kammerwassersekretion und der des Kammerwasserabflusses. Weitere Faktoren, die einen Einfluss auf den intraokularen Druck haben, sind Herzschlag, Atmung und der arterielle Blutdruck, sodass tageszeitliche Schwankungen von 5 mmHg möglich sind, mit tendenziell höheren Druckwerten am Morgen. Statistisch gesehen beträgt der durchschnittliche

Augeninnendruck in der Bevölkerung 11 bis 21 mmHg. Der Wert von 21 mmHg darf dabei aber nicht als Obergrenze zu pathologischen Werten angesehen werden, da sich auch bei kleineren Werten Krankheitszeichen zeigen können und umgekehrt bei größeren Werten nicht zwingend eine Pathologie entstehen muss. [44]

Die Kenntnis über die am IOD beteiligten Strukturen des Auges und die der Kammerwasserphysiologie sind entscheidend für das Verständnis der Glaukomerkrankungen (vgl. I. 9) und der möglichen Therapien (vgl. I. 9. 5).

I.7 Retina

Die Retina kleidet den posterioren Teil des Auges aus und wird auch als innere Augenhaut (Tunica interna bulbi) bezeichnet. Ihre Hauptfunktion ist die Lichtrezeption. Man unterscheidet generell zwei Anteile: die lichtempfindliche Pars optica retinae und die lichtunempfindliche Pars caeca retinae. Die Pars optica retinae kleidet den Fundus oculi aus und liegt der Choroidea an. Die Ora serrata ragt bis an den Ziliarkörper und bedeckt die posteriore Fläche der Iris. Hier geht die Pars optica retinae in die Pars caeca retinae über. [8, 9] Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung.

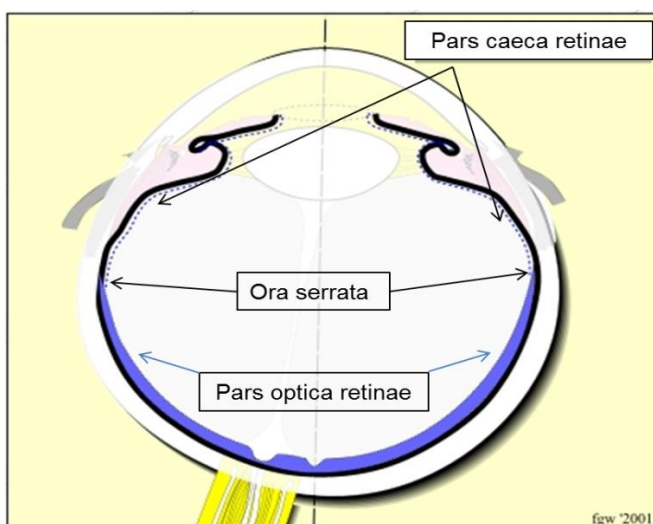


Abbildung 4 Netzhaut - Grobe Gliederung

Schematische Darstellung der Netzhaut. Die blau gestrichelte Linie im vorderen Abschnitt des Auges stellt die Pars caeca retinae dar, die blaue Fläche im hinteren Abschnitt des Auges die Pars optica retinae. Der Übergang der beiden Netzhautflächen wird als Ora serrata bezeichnet. Sagittalschnitt, modifiziert nach [4]

Die Netzhaut besteht in beiden Anteilen aus je zwei Blättern: einem äußeren Blatt, das dem Pigmentepithel (Stratum pigmentosum retinae, RPE) entspricht, und einem inneren Blatt. [9] Seinen Namen verdankt dieses einschichtige Epithel dem Melanin, das über den Stoffwechsel des Tyrosins produziert wird. So sind die Melaninzellen sehr reich an Mitochondrien, mit wichtigen zellzykluserhaltenden Enzymen des Citratzyklus sowie der Atmungskette und reich an Lysosomen und Phosphatasen ausgestattet. Diese Zellelemente ermöglichen dem Pigmentepithel Aufgaben wie den Stoffaustausch zwischen der Choroidea, den Photorezeptoren und Nervenzellen der Retina sowie die Phagozytose gealterter Außensegmente der Photorezeptoren (v. a. der Stäbchen). Außerdem ist das RPE an der Regeneration von 11 - cis - Retinal beteiligt, welches lichtbedingt eine Konformationsänderung zu all - trans - Retinal erfährt und im Rahmen des Sehzyklus zur aktivierbaren Form 11 - cis - Retinal regeneriert wird. Zusätzlich schützt es die Außensegmente der Photorezeptoren vor Oxidation. [8, 9] Das innere Blatt unterscheidet sich allerdings zwischen der Pars optica retinae und der Pars caeca retinae. In der Pars caeca retinae wird es auch als Stratum epitheliale bezeichnet, da es lediglich aus einem einschichtigen Epithel besteht. Im Bereich der Iris ist es pigmentiert. [9] In der Pars optica retinae hingegen wird das innere Blatt durch das Stratum nervosum retinae gebildet, das die Neurone der Retina enthält. [8, 9, 102]

Das Stratum nervosum retinae besteht insgesamt aus neun unterschiedlichen Schichten (siehe Abb. 5). Direkt an das Pigmentepithel angrenzend folgen nach innen hin die Innen - und Außensegmente der Photorezeptoren, wo die Umwandlung eines Lichtsignals in ein neuronales Signal im Rahmen des Phototransduktionsprozesses stattfindet. Nachfolgend bilden die Müller - Stützzellen die äußere Grenzmembran (Stratum limitans externum). Die äußere Körnerschicht (Stratum nucleare externum) enthält die Perikaryen der Zapfen und Stäbchen (1. Neuron), deren Axone über Synapsen in der äußeren plexiformen Schicht (Stratum plexiforme externum) Verbindungen zwischen Bipolar - und Horizontalzellen bilden. [9, 8] Die Bipolarzellen (2. Neuron) gehören der inneren Körnerschicht an (Stratum nucleare internum), wo sie als Interneurone zwischen Ganglienzellen und den Photorezeptoren dienen.

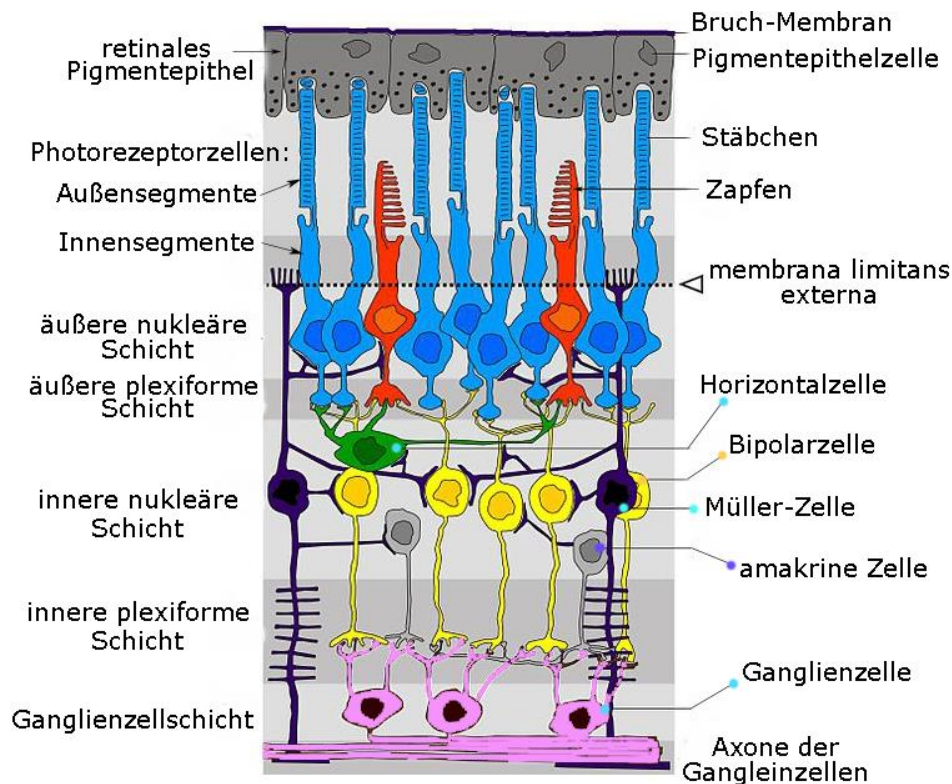


Abbildung 5 Morphologie der Retina

Schematische Darstellung eines Vertikalschnitts der Retina. Das Licht fällt von unten ein und durchdringt die einzelnen Schichten der Netzhaut bis sie auf die photorezeptiven Zellen (Stäbchen und Zapfen) im oberen Abschnitt treffen. Erste Verarbeitung der Impulse erfolgt über die zwischengeschalteten Schichten mit Horizontal-, Bipolar- und Amakrinen Zellen. Weiterleitung der Information an Schaltstellen außerhalb des Auges findet über Ganglienzellen statt, die zum Sehnerv zusammenlaufen. Modifiziert aus [34]

Weitere Zellen der inneren Körnerschicht sind die Zelleiber der Müllergliazellen und der Horizontal- und Amakrinen Zellen, welche über dendro-dendritische Synapsen die visuellen Signale modifizieren. [9] Die innere plexiforme Schicht, das Stratum plexiforme internum, besteht aus synaptischen Verbindungen zwischen Bipolar-, Horizontal- und Amakrinen Zellen und den Synapsen der Somata der Ganglienzellen des Stratum ganglionicum, die als nächste Schicht folgt. [9] Nach innen hin folgt das Stratum neurofibrarum mit markhaltigen Axonen der Ganglienzellen (Stratum neurofibrarum). Hier laufen sie zum Discus nervi optici zusammen, von wo aus sie nach ca. 2 mm [52] (Länge der Pars intraocularis des N. opticus mit noch marklosen Nervenfasern) als myelinisierte Axone des Sehnervs (am Ende der Lamina cribrosa) zum Corpus geniculatum laterale laufen. Schließlich wird das Stratum neurofibrarum durch die innere Grenzmembran (Stratum limitans internum), mit den Endfortsätzen der Müller-Stützzellen und einer Basalmembran, gegen das Corpus vitreum

abgegrenzt. [9, 8] Da sich die vorliegende Arbeit mit dem Überleben Retinaler Ganglienzellen befasst, werden diese nachfolgend detailliert besprochen.

I.8 Retinale Ganglienzellen

Wie bereits erwähnt, liegen die Retinalen Ganglienzellen auf der Innenseite der Retina, dem Glaskörper zugewandt. Die Axone der Retinalen Ganglienzellen verlaufen über deren Zellsomata liegend auf der Netzhaut entlang zur Papille, wo sie sich vereinigen und als Sehnerv zum Chiasma opticum und als Tractus opticus weiter ins Gehirn ziehen. [9]

Man unterscheidet mehrere funktionell und morphologisch unterschiedliche Subtypen von Retinalen Ganglienzellen [83, 16, 17, 46, 71]

1. Parasolzellen (Projektion in das Magnozelluläre System/M - System)
2. Midgetzellen (Projektion in das Parvozelluläre System/P - System)
3. Koniozelluläre Zellen (Projektion in das K - System, kleinzellige, heterogene Zellgruppe)
4. Photosensitive Retinale Ganglienzellen

Die großen Ganglienzellen, die Parasolzellen, gehören dem Magnozellulären System an und ziehen zum Corpus geniculatum laterale. Sie haben große Zellkörper, einen großen Axondurchmesser und weitverzweigte Dendritenbäume. Sie machen etwa 10 % der Retinalen Ganglienzellen aus. [17, 83] Ihre morphologische Größe und das Dendritensystem ermöglichen ihnen die Informationsaufnahme von vielen Sinneszellen, v. a. aber von Stäbchenzellen. Das rezeptive Feld auf der Retina ist entsprechend groß. Die vermittelte visuelle Information dieser Zellen ist bezüglich der örtlichen Auflösung daher geringer und bezüglich der Bewegungsdetektion höher. [81] Sie sind zuständig für die Bewegungswahrnehmung und die nichtfarbliche Objektwahrnehmung [56, 57]. [95]

Die mittelgroßen Ganglienzellen entsprechen dem Parvozellulären System. Sie werden Midgetzellen genannt. Sie bilden etwa 80 % der Retinalen Ganglienzellen. Ihre Zellkörper sind im Vergleich zu den anderen Ganglienzellen mittelgroß. Die Axone dieser Zellen sind klein. Das Dendritensystem ist sehr gering ausgeprägt und dicht (5 - 10 µm Durchmesser [15]), sodass sie die Information von nur wenigen Sinneszellen erhalten, bevorzugt von

Zapfenzellen. Damit sind auch die rezeptiven Felder dieser Zellen klein. [69] Sie vermitteln hochauflösende und farblich definierte visuelle Information mit einer geringen zeitlichen Auflösung. [65, 95]

Die heterogene Zellgruppe entspricht dem Koniozellulären (K -) System. Hierzu zählen die bistratifizierten Ganglienzellen und die W - Ganglienzellen (Wide - field - Zellen). W - Zellen reagieren nur langsam auf einen Lichtreiz. Die Zellen haben die kleinsten Zellkörper und Axondurchmesser. Auch zahlenmäßig sind sie mit etwa 10 % der Ganglienzellen sehr gering vertreten. Das Dendritensystem ist groß und nur wenig verzweigt. [83] Sie projizieren in die Reflexzentren, Area praetectalis sowie den Colliculus superior, und in den Hypothalamus. [69, 35] Die bistratifizierten Zellen besitzen einen größeren Dendritenbaum. Sie bilden Synapsen mit den Blau - Zapfen - Bipolaren. Zuständig sind sie für die Farbempfindlichkeit (Blau - Zellen). [49] Sie projizieren in die koniozelluläre Schicht. [37]

Zusätzlich werden noch Retinale Ganglienzellen beschrieben, welche gar nicht an der Signalweiterleitung der Photorezeptorsignale, sondern vielmehr als photosensitive Retinale Ganglienzellen an der Pupillenreaktion und circadianer Rhythmik beteiligt sind. [74]

In der Literatur findet man unterschiedliche Einteilungen der Retinalen Ganglienzellen von Säugetieren. Hauptgrund dafür ist, dass es teilweise starke artspezifische Unterschiede gibt. Aber auch die Tatsache, dass es keine einheitlichen Kriterien unter den Forschern gibt, erschwert die Einteilung dieser Zellen.

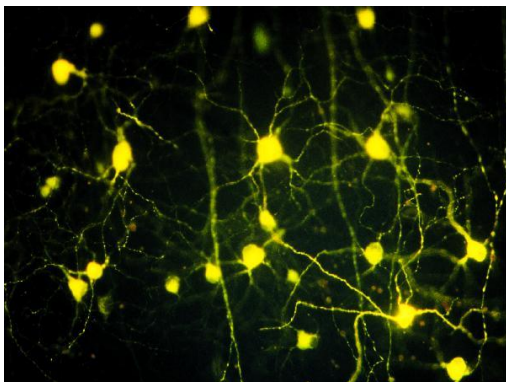


Abbildung 6 Morphologie Retinaler Ganglienzellen

Retrograd markierte Retinale Ganglienzellen mit dem Carbocyaninfarbstoff DiASP, deren Axone in ein Transplantat (Ischiasnerv) eingewachsen sind. Übernommen von [88]

Die Axone der Retinalen Ganglienzellen verlassen an der Papilla nervi optici (Discus nervi optici, siehe I. 7) die Retina. Diese ist zentral eingesenkt (Excavatio papillae), wo die Gefäße (A. et V. centralis retinae) durch den Sehnerv ziehen. An der Papille ist die Sklera, die als kollagenfaserreiche, äußere Augenhaut dem Augeninnendruck Widerstand leistet, dicker als in den übrigen Abschnitten. Dieser Bereich wird als Lamina cribrosa sclerae bezeichnet und ist etwa 1,5 mm dick. [102]

Die Form der Exkavation ist quer - oval, da viele Sehnervenfasern vor allem am oberen und unteren Pol einlaufen. Bei einem Glaukom kommt es zu einer großen Exkavation bis an den Papillenrand sowie zu einer Asymmetrie der Exkavationen beider Augen durch den Schwund der retinalen Neurone. Die Gefäße am Papillenrand können abknicken und die Darstellung der Nervenfasern neben der Papille abnehmen. [31]

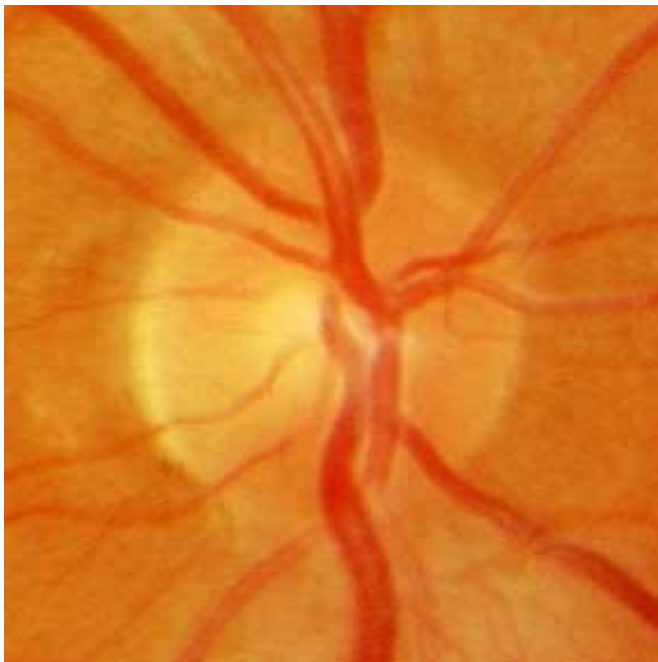


Abbildung 7 Normale Papille

Funduskopie, normalfarbige Papille, randscharf und nicht prominent mit zentral verlaufenden Gefäßen. Übernommen von [22]



Abbildung 8 Opticusatrophie

Funduskopie, weisse Papille mit einer Exkavation bis an den Papillenrand und steil verlaufenden Gefäßen am Papillenrand. Übernommen von [22]

Nachstehend wird das Glaukom mit seiner Pathophysiologie, dem klinischen Bild und der Epidemiologie in Zusammenhang mit den bisher erläuterten physiologischen sowie anatomischen Strukturen und Vorgängen dargestellt.

I.9 Glaukom

I.9.1 Allgemeines und Pathophysiologie

Laut der European Glaucoma Society handelt es sich bei einem Glaukom um eine progressive Optikusneuropathie mit Schädigung des Sehnervs bzw. mit einer Schädigung Retinaler Ganglienzellen und korrespondierenden Gesichtsfelddefekten. [20] Es gibt unterschiedliche Glaukomarten, die sich sowohl in der Pathophysiologie als auch in der Symptomatik und Therapie stark voneinander abgrenzen. Dadurch gibt es weder eine genaue Definition des Glaukoms noch einen Grenzwert des Augeninnendrucks oder ein klinisches Bild, die die Beschreibung des Glaukoms näher eingrenzen könnten. [44, 8] Klinisch äußert sich das Glaukom durch Gesichtsfeldausfälle und Sehverschlechterung. Diagnostisch zeigen sich in der Funduskopie eine Exkavation des Sehnervenkopfes (vgl. I. 8) und in der Perimetrie messbare Gesichtsfeldausfälle. Gegebenenfalls sind außerdem eine Augeninnendruckerhöhung in der Tonometrie und ein Verschluss des Kammerwinkels in der

Gonioskopie nachweisbar. Ursache der Gesichtsfeldausfälle ist ein Substanzverlust der Axone und der Untergang Retinaler Ganglienzellen. [44] Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft gibt es unterschiedliche Theorien zum Pathomechanismus des Glaukoms. Vermutlich führt nicht eine Theorie alleinig zum Krankheitsbild des Glaukoms, sondern das Zusammenspiel von mehreren dieser Mechanismen. Die mechanische Schädigung der Nervenfasern spielt dabei eine Rolle. Hierbei kommt es zu einer druckbedingten Verformung der Lamina cribrosa mit resultierendem Verlust neuronaler Axone durch Gewebsdeformation (vgl. I. 8). [103] Die Kollagenfibrillen der Lamina cribrosa verlieren ihre geordnete Struktur. Es kommt zu einer Kollagenproliferation mit Einlagerung von Fibroblasten und Astrozyten, wodurch es zu einer Kompression der Axone in diesem Bereich kommt. [93] Weitere Studien ergaben, dass aus dem erhöhten intraokularen Druck eine Fehlregulation des okularen Blutflusses resultiert. So kommt es hierbei durch direkte Druckwirkung und die Fehlregulation des Blutflusses zu retinalen Perfusionsstörungen und Ischämien. [26, 25] Dadurch entstehen freie Radikale und Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die zu einer deutlichen Erhöhung des oxidativen Stresses führen. [29] Hier sollen besonders Mitochondrien der Axone des Sehnerven eine wichtige Rolle spielen. [26] Bei Schädigung dieser, beispielsweise durch Permeabilitätsstörungen der Mitochondrienwand, werden Faktoren wie Cytochrom C freigesetzt, die wiederum zur Apoptose führen. [13, 68] Die Erhöhung freier Radikale führt weiterhin zu einer erhöhten Konzentration extrazellulären Glutamats und schließlich zum Exzitotoxischen Zelltod. [26] Außerdem soll die Apoptose der Retinalen Ganglienzellen (RGZ) durch eine Deprivation von Neurotrophinen verursacht sein. Hierbei kommt es zu einer Störung des Transports dieser neuroprotektiver Faktoren vom ZNS zu den RGZs. Diese Kommunikation findet physiologischerweise über einen kontinuierlichen, retrograden Transport vom ZNS zu den Zellkörpern der RGZs statt. [98] Auch autoimmune Faktoren sollen bei der Entstehung eines Glaukoms und der Schädigung retinaler Neurone eine Rolle spielen. [101, 33] In diesem Zusammenhang sind die Gamma - Enolase, die Glutathion - S - Transferase sowie Glucosaminoglykane oder Antiphosphatidylserine zu nennen. [33]

Die wichtigsten Formen der Glaukome sollen hier kurz erläutert werden.

I.9.2 Primäres Offenwinkelglaukom

Das Primäre Offenwinkelglaukom (POWG) tritt vorwiegend bilateral auf. Der Beginn der Erkrankung liegt meist im Erwachsenenalter und ist definiert als eine Erkrankung mit einem offenen, unauffälligen Kammerwinkel, der dem POWG seinen Namen verleiht. Man findet zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erhöhte Augeninnendrucke von über 21 mmHg, glaukomatöse Papillenveränderungen und Gesichtsfelddefekte. [44] Aktuelle Untersuchungen zeigen einen Zusammenhang zwischen der Zunahme der extrazellulären Matrix und einem verstärkten TGF - β - Signal. So kommt es unter einer Zunahme des TGF - β - Signals über die direkte Wirkung von CTGF (connective tissue growth factor) [27] auf Trabekelwerkszellen zu einer Proliferation der extrazellulären Matrix, des Aktinzytoskeletts und einer vermehrten Bildung des α - Smooth - Muscle - Actin. Dadurch wird das Trabekelwerk steifer und der Abflusswiderstand höher. [28] Weitere Untersuchungen zeigten, dass ein durch CTGF erhöhter Tonus im Trabekelwerk über einen erhöhten Abflusswiderstand zum Offenwinkelglaukom führt. [42]

Epidemiologisch nimmt das primäre Offenwinkelglaukom mit einer Häufigkeit von 40 – 70 % aller Glaukome [8] eine wichtige Rolle ein. In Großbritannien und Nordamerika sind 12 % aller Erblindungen darauf zurückzuführen. Die Verteilung zwischen den Geschlechtern ist gleichermaßen. [44] Zu den Risikofaktoren zählen ein Alter über 65 Jahre, die genetische Abstammung (gehäuftes Auftreten bei afroamerikanischer Bevölkerungsgruppe), eine positive Familienanamnese (Annahme der multifaktoriellen Vererbung), eine Myopie, Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus und Thyreotiden [8] sowie bereits bestehende Netzhauterkrankungen (Retinitis pigmentosa, rheumatogene Netzhautablösungen u. a.). [44]

I.9.3 Normaldruckglaukom

Das Normaldruckglaukom (Low - Tension - Glaukom) zählt als eine Unterform zum POWG. Zu den Krankheitskriterien zählen glaukomatöse Papillenveränderungen und Gesichtsfelddefekte, sowie ein offener Kammerwinkel bei Augeninnendrücken unter 21 mmHg. Dabei sollten andere Ursachen einer Papillenstörung ausgeschlossen werden. Die Prävalenz beträgt 0,2 % bei der Bevölkerungsgruppe über 40 Jahre. Außerdem gibt es

weitere Kriterien, die bei einem Normaldruckglaukom gehäufiger auftreten als bei einem POWG. Dazu zählen das Raynaud- Syndrom, die Migräne, systemische Hypotension (v. a. in der Nacht), reduzierte Blutflussgeschwindigkeiten in der A. ophthalmica und eine Paraproteinämie. [44]

I.9.4 Primäres Engwinkelglaukom

Charakteristisch für das primäre Engwinkelglaukom, auch bezeichnet als primäres Winkelblockglaukom, ist der Verschluss des Kammerwinkels, sodass eine Störung im Kammerwasserabfluss resultiert. Werte von 60 mmHg des intraokularen Drucks sind möglich. [8]

Pathophysiologisch ist ein Pupillarblock ursächlich für die Behinderung des Kammerwasserabflusses aus der Camera posterior in die Camera anterior. Physiologisch herrscht in der Hinterkammer ein höherer Druck als in der Vorderkammer. Dieser ist unter normalen Bedingungen dadurch bedingt, dass die Pupille einen Widerstand durch die Auflagerung der Iris auf der Linsenkapsel erzeugt. Da der Mechanismus des Pupillarblocks noch nicht endgültig aufgeklärt ist, geht man heute von folgenden Theorien aus: Zum einen soll die Kontraktion des M. dilatator pupillae eine Konnexion der Iris und der Linse und damit den Pupillarblock verstärken. Zum anderen kommt es zu einer Pupillenerweiterung und einer Vorwölbung der Iris, bis die Iris letztendlich durch einen Kontakt mit der Hornhau rückfläche den Kammerwinkel blockiert. Als Folge steigt der Augeninnendruck. [44] Eine weitere Theorie ist die Sphinkter - Theorie. Danach soll der durch den M. sphinkter pupillae bedingte Pupillarblock am größten sein bei einer Pupillenweite von etwa 4 mm. [44]

Zu den Risikofaktoren zählen die Ethnie, das Alter, das Geschlecht, die Linsengröße und eine positive Familienanamnese. Das mittlere Manifestationsalter liegt bei 60 Jahren, mit einer steigenden Inzidenz mit zunehmenden Lebensjahren, wobei Frauen mit einem Verhältnis von 4:1 häufiger betroffen sind. Bezüglich der Ethnie macht das primäre Engwinkelglaukom ca. 6 % aller Glaukome bei Kaukasiern aus und ist gehäuft zu finden bei Südasiaten. Bei positiver Familienanamnese finden sich bei Familienangehörigen ersten Grades die gleichen prädisponierenden anatomischen Gegebenheiten. Zu diesen zählt die Lage des Iris - Linsen - Diaphragmas, die abgeflachte Camera anterior und der enge Zugang zum Kammerwinkel,

der durch die große Linse, den kleinen Hornhautdurchmesser und eine kurze Achsenlänge des Bulbus gegeben ist. [44]

I.9.5 Therapiemöglichkeiten

Treten Schäden am N. opticus auf, liegt dem meist ein über einen längeren Zeitraum erhöhter Augeninnendruck zugrunde. Die heute vorhandenen Therapiemöglichkeiten setzen genau hier an, nämlich über das Senken des IOD. Damit stellt dies eine symptomatische Therapiemöglichkeit dar. Über diese wird versucht, den Augeninnendruck niedrig zu halten und damit weitere Schäden am Sehnerv zu verhindern. Der individuelle „Normaldruck“ muss für jeden Patienten durch regelmäßige Kontrollen ermittelt werden. [31]

Die aktuellen Therapieoptionen der European Glaucoma Society sind:

- Lokale Medikation mit Augentropfen als Monotherapie, bei fehlendem Ansprechen als Kombinationstherapie
- Chirurgische Verfahren wie die Trabekulektomie (Goldstandard) oder alternativ zur medikamentösen Monotherapie die Laser - Trabekuloplastik [24]

Problem dieser therapeutischen Möglichkeiten liegt darin, dass bereits aufgetretene Schäden des N. opticus dadurch nicht mehr rückgängig gemacht werden können. Umso wichtiger werden Forschungsarbeiten, die das Ziel verfolgen, die Vulnerabilität der Retinalen Ganglienzellen zu vermindern und so die potenzielle Zielzelle der Erkrankung vor Apoptose zu schützen.

I.10 NMDA - Schadensmodell

NMDA - Rezeptoren werden physiologischerweise von Glutamat und seinem Co - Transporter Glycin aktiviert. [75] NMDA - Rezeptoren und deren Agonist Glutamat nehmen in der Signaltransduktion im Zentralen Nervensystem eine wichtige Rolle ein. Sie lösen als Kationenkanäle Aktionspotentiale aus, indem sie Natrium- und Kaliumionen passieren

lassen. [75] Aber auch Kalziumionen können diese Kationenkanäle benutzen. [59] N - Methyl - D - Aspartat (NMDA), eine synthetische Verbindung, ist in der Lage, NMDA - Rezeptoren zu aktivieren. [75] Dies führt zu einem intrazellulären Einstrom von Kalziumionen und zur Exzitotoxizität. [59] Der genaue Pathomechanismus der NMDA - induzierten Apoptose der Retinalen Ganglienzellen ist weiterhin noch unklar. [87] Retinale Ganglienzellen und Amakrine Zellen reagieren besonders sensibel auf Exzitotoxizität, da sie präferentiell NMDA - Typ - Glutamatrezeptoren exprimieren. [86] Die überschießende Stimulation dieser NMDA - Rezeptoren spielt u. a. eine Rolle bei Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Chorea Huntington und dem Glaukom, die zum Formenkreis der neurodegenerativen Erkrankungen zählen. [58]

I.11 TGF - β - Signalweg

I.11.1 TGF - β

Transforming growth factor - beta (TGF - β) ist ein multifunktionelles Zytokin. Es gehört der TGF - β - Superfamilie an, zu der auch Subfamilien der Aktivine, BMPs (bone morphogenetic proteins), GDFs (growth/differentiation factors) und der GDNF (glial cell line - derived neurotrophic factor) zählen. [63, 51, 84] Insgesamt beinhaltet die TGF - β - Superfamilie mehr als 50 Mitglieder. [11]

Beim Säuger sind drei Isoformen bekannt, TGF - β 1, TGF - β 2 und TGF - β 3. Die Isoform - β 4 konnte bislang nur bei Hühnerembryos [40] und die Isoform - β 5 bei Fröschen nachgewiesen werden. [47] TGF - β findet man in verschiedenen Geweben und Zellen, wie Mesenchym, Bindegewebe, Endothel, Thrombozyten und in Immun - und Knochenzellen. [89]

Zu den zahlreichen Funktionen des TGF - β - Signalwegs gehören die Zellzykluskontrolle, die Regulation der Embryonalentwicklung, die Hämatopoese, die Angiogenese, die Chemotaxis und einige Immunfunktionen. [51, 84, 11] Weiterhin ist TGF - β an der Regulation der Apoptose während des Gewebeumbaus und des ontogenetischen Todes von Neuronen, der Apoptose in Zellen des digestiven Systems, des reproduktiven Systems, des Nervensystems [84] sowie der Apoptose der retinalen Neurone beteiligt. [12, 23, 99]

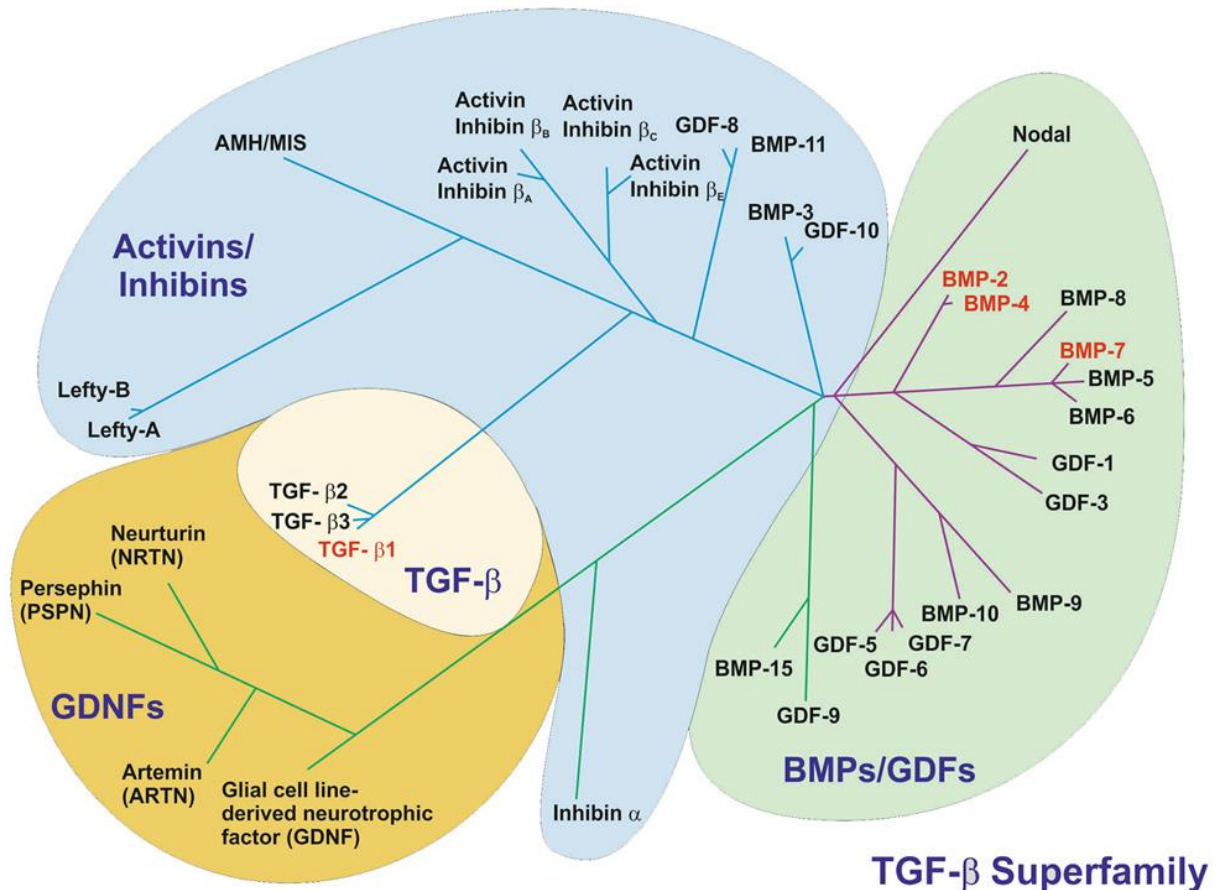


Abbildung 9 TGF - β - Familie

Die Mitglieder der TGF - β - Familie werden in vier Gruppen eingeteilt: TGF - β s, Aktive/Inhibine, BMPs (bone morphogenetic proteins)/GDFs (growth and differentiation factors) und GDNF - Liganden (glial cell line - derived neurotrophic factor), übernommen von [1]

TGF - β s weisen eine typische Struktur in ihrem molekularen Aufbau auf: Sie werden als Präproteine synthetisiert. Von diesen wird ein 110 - bis 140 - Aminosäuren langes Fragment abgespalten, das erst nach Homo - bzw. Heterodimerisierung die volle biologische Aktivität erlangt. [11] Die Mitglieder der TGF - β - Superfamilie haben eine Gemeinsamkeit in ihrer Struktur, den „Cystein - Knoten“. [64] Dieser besteht aus sieben dicht aneinander gelagerten Cysteinresten, von welchen sechs drei intramolekulare Disulfidbrücken bilden. Zwei der Disulfidbrücken sind zu einem Ring aus acht Gliedern zusammen gelagert. Durch diesen Ring verläuft der dritte, verbliebene, Cysteinrest. [64, 11]

Die Signaltransduktion von TGF - β läuft über membranständige Serin -/Threonin - Kinasen, den TGF - β - Rezeptor Typ I und II ($T\beta R$ - I und $T\beta R$ - II). Von zwei weiteren TGF - β - Rezeptoren ($T\beta R$ - III), Betaglycan und Endoglin, wird angenommen, dass sie den Zugang zu den anderen beiden TGF - β - Rezeptoren modulieren. [19, 11, 63] Serin -/Threonin - Kinase -

Rezeptoren sind Glykoproteine, bestehend aus einer extrazellulären, kurzen Ligandenbindungsregion, einem transmembranären Segment und einer intrazellulären Region mit Serin-/Threonin-Kinaseaktivität. [11] Nach Bindung von TGF- β phosphoryliert der Typ-II-Rezeptor den Typ-I-Rezeptor an der Aminosäure Serin 165 in der juxtamembranären Region. Dadurch wird der Typ-I-Rezeptor aktiviert, welcher dann intrazellulär die Signaltransduktion von TGF- β über Smad-Proteine induziert. [11, 63]

I.11.2 Smad7 und andere Smad - Proteine

Smad-Proteine haben ihren Namen von der Ableitung des homologen Gens der Fliege *Drosophila melanogaster*, genannt Mad („mothers against decapentaplegic“), und der homologen Gene des Fadenwurms *C. elegans* Sma 2, - 3 und - 4 („small body size“). [11, 63] Sie können in drei Subfamilien eingeteilt werden: die durch die TGF- β -Familie-Rezeptorkinase direkt regulierten R-Smads (Smad1, 2, 3, 5 und 8), das an der Signalübertragung teilnehmende Co-Smad (Smad 4) und die signalinhibierenden Smads (Smad6 und 7). [63, 7]

Aufgebaut sind Smad-Proteine aus einer MH-1-, einer MH-2-Domäne und einer verbindenden Region, die von unterschiedlicher Länge und Sequenz sein kann. Die MH-1-Domäne hat die Hauptaufgabe, im inaktiven Zustand der Smads die MH-2-Domäne, die u. a. in der Lage ist, die Signalkaskade weiterzuleiten, zu inhibieren. Die MH-2-Domäne kann außerdem ihre bindenden Rezeptoren phosphorylieren, selbst eine Effektorfunktion übernehmen oder an Protein-Protein-Bindungen modulierend eingreifen. Der Erhalt der homooligomeren Struktur der Smads im inaktiven Basalzustand wird ebenso durch die Domäne MH-2 übernommen. Dieser Zustand wird aber auch durch die Verbindungsregion der Smads unterstützt. [63]

Die TGF- β -Signalkaskade startet nach Anlagerung von TGF- β an den T β R-II (siehe I. 11. 1) durch Phosphorylierung des T β R-I an seiner GS-Domäne (Glycin- und Serin-reiche Region). Ist dieser aktiviert, phosphoryliert der Typ-I-Rezeptor die R-Smads mit Hilfe von SARA (scaffold protein Smad anchor for receptor activation) und dem Adapterprotein Dap2. [77] Im Falle von TGF- β als Ligand werden Smad2 und 3 phosphoryliert. [7] Als nächstes bildet das Co-Smad, Smad4, mit den R-Smads homomere und heteromere

Komplexe. Diese Komplexe wandern in den Zellkern und binden dort jeweils an eine Promoterregion der DNA, auch genannt SBE („Smad - binding element“), bestehend aus einer AGAC - Sequenz oder ihrer komplementären Sequenz, GTCT. [77] Hier, auf DNA - Ebene, können Smads auf diese Weise durch Bindung an verschiedene Transkriptionsaktivatoren oder - inhibatoren die Genexpression positiv oder negativ beeinflussen. [7]

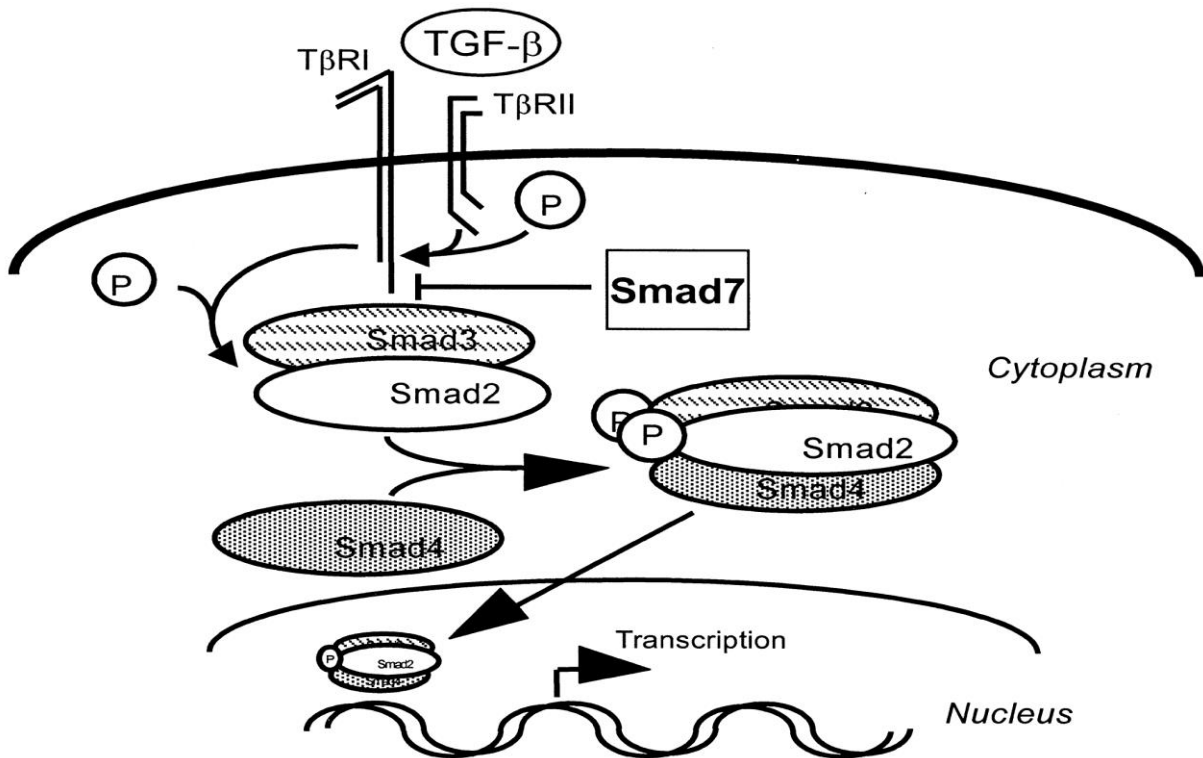


Abbildung 10 TGF - β - Signalweg

Schematische Darstellung der TGF - β - Signalkaskade. TGF - β übermittelt seine Signalwirkung über Ser - Thr - Kinasen, wobei der Typ - I - Rezeptor durch den Typ - II - Rezeptor nach Bindung von TGF - β phosphoryliert wird. Der Typ - I - Rezeptor nimmt dann nach Aktivierung die Signalweiterleitung über Smads wahr. Smad2 und 3 werden ebenfalls phosphoryliert, die dann zusammen mit Smad4 in den Zellkern wandern und dort auf DNA - Ebene nach Anlagerung an Promotoren bestimmter Zielgene deren Transkription regulieren. Smad 7 wirkt im Sinne einer negativen Rückkoppelung über die Hemmung der Phosphorylierung von Smad2 /3, inhibierend auf den TGF - β - Signalweg. [41]

Die inhibitorischen Smads, Smad6 und 7, hingegen wirken antagonistisch auf den TGF - β - Signalweg durch die Ubiquitinligasen Smurf1 und 2 oder durch die Phosphatase - I. Außerdem können die I - Smads die R - Smads direkt inhibieren, indem sie mit dem R - Smad/Co - Smad - Komplex interferieren, mit den R - Smads um die Bindung an Smad4 konkurrieren oder den Smad - DNA - Komplex im Zellkern beeinflussen. [77] Smurf1 und 2

können aber auch die I- und R-Smads ubiquitinieren und diese so dem Proteasom zum Abbau liefern. Die TGF- β -Kaskade kann durch sie folglich im negativen aber auch im positiven Sinne moduliert werden, wobei bei der Ubiquitinierung von einem positiven Effekt ausgegangen wird. [77]

Weitere Möglichkeiten, den TGF- β -Signalweg im Zusammenhang mit den Smads zu regulieren, ist die Phosphorylierung dieser durch die MAPKs (mitogen-activated protein kinases). Dabei können die R-Smads und das Co-Smad speziell durch die MAPKs Erk1 und 2 (extracellular signal-regulated kinase) und die durch Zellstress aktiv werdenden MAP-Kinasen p38 und JNK phosphoryliert werden. Es konnten sowohl negative als auch positive Effekte auf den TGF- β -Signalweg nachgewiesen werden. [77] Weiterhin sollen Acetylierungen verschiedener Smads bei der Regulierung der Signalkaskade eine Rolle spielen. [77] So auch die Co-Repressorgene c-Ski und SnoN, die direkte Target-Gene von TGF- β sind und die Kaskade im Sinne eines negativen Feedbacks beeinflussen, sobald Smad-Proteine aktiviert werden. [39] Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass Smad-Proteine in ihrer Kaskade ständig zwischen Zytoplasma und Nucleus pendeln und in Anwesenheit eines Liganden am TGF- β -Rezeptor länger im Nucleus verbleiben, dort also die Regulation verschiedener Promotoren induzieren. Diese Signaltransduktionskaskade ist folglich ein sehr komplexes Zusammenspiel vieler verschiedener Faktoren, die nicht nur von der Konzentration ihrer Mitglieder, sondern auch von der Dauer ihrer Aktivität abhängig ist. [39]

I.12 Cre/loxP - Rekombinationssystem

Mit dem Cre/loxP-Rekombinationssystem ist es möglich, gezielt DNA-Abschnitte aus dem Genom zu entfernen und/oder einzelne Abschnitte der DNA wieder einzufügen. [66] Dadurch ist eine Modifikation chromosomaler DNA gegeben. Die Rekombination ist ein physiologischer Prozess, der mithilfe spezieller Enzyme, den Rekombinasen, in allen Organismen abläuft und so z. B. die Reparatur von Mutationen gewährleistet. [61]

Das Rekombinationssystem der Cre-Rekombinase (cyclization recombination), hat ihren Ursprung im Bakteriophagen P1. [80] Sie gehört der Familie der Integrasen an und ist ein 38 kDa großes Protein. So wird die Katalyse der Rekombination von zwei loxP-Sequenzen,

die als Erkennungsstücke dienen und auch als „locus of X-over of P1“ bezeichnet werden [61], von Cre übernommen. [66] Eine loxP-Sequenz besteht jeweils aus einem die Orientierung bestimmenden Basenpaar, das in dieser Sequenz als zentrales Glied fungiert. Dieser Teil ist acht Basenpaare groß (5' - GCATACAT - 3') und wird von zwei palindromischen Basenabfolgen flankiert, bestehend aus je dreizehn Basenpaaren (5' - ATAACCTTCGTATA - 3'). [61, 66] Ist das zentrale DNA-Stück von zwei gleichgerichteten Sequenzen flankiert („gefloxt“), wird es als Ring-DNA aus dem Chromosom herausgeschnitten und intrazellulär abgebaut. Das Produkt der Rekombination ist dann eine einzelne loxP-Sequenz. [61] Auf diese Weise kann z. B. auch über die Rückreaktion fremde DNA in die Chromosomen eingebaut oder es können Inversionen sowie Translokationen durchgeführt werden. Das Besondere an der Cre-Rekombinase ist, dass sie keine Co-Faktoren, ausgenommen den physiologischen Zellvorgängen, benötigt, um die Rekombination durchzuführen. [66]

Seit den 90er Jahren weiß man, dass das Cre-loxP-Rekombinationssystem auch in Säugerzellen funktioniert und man so eine gewebsspezifische Deletion bei Mäusen durchführen kann. [66] Für diese Deletion braucht man zwei unterschiedliche Mauslinien. Eine Mauslinie trägt dabei den loxP-flankierten Abschnitt in der DNA und die andere Linie exprimiert die Cre-Rekombinase entweder ubiquitär oder selektiv nur in bestimmten Zellen („gewebsspezifische Cre-Maus“). [76] Für die Generierung der Cre-Maus wird ein Cre-Transgen ins Genom der Maus eingeschleust, das unter der Kontrolle eines Promoters steht, hinter welches es gesetzt wurde. Dieser Promoter wird danach ausgewählt, ab wann die Expression von Cre und in welchen Geweben bzw. Zellarten diese stattfinden soll. [61] Die in dieser Arbeit verwendete Cre-Maus exprimiert die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des alpha-Enhancer-Elements des Pax6-Promoters, welcher bereits ab dem Embryonaltag 8.5 im Auge aktiv wird. [100] Die Cre-Rekombinase wird mit kleiner Verzögerung ab E 10.5 in allen Zellen der inneren Schicht des Augenbechers (retinale Neurone und Müllerzellen) aktiv. [62] Die gefloxtete Mauslinie wird durch das Flankieren eines Exons durch homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen mit zwei palindromischen loxP-Sites hervorgerufen. Auf diese Weise werden die loxP-Sequenzen in die Keimbahn integriert [61, 66], aus der sich eine Zielmaus entwickelt, die einen gefloxteten DNA-Abschnitt enthält. Sie ist aber trotzdem funktionsfähig und unterscheidet sich phänotypisch nicht von ihren Wildtyp-Geschwistern. [53, 48] Um das gefloxtete Zielgen zu deletieren, wird die gefloxtete

Maus mit einer Cre - Maus verpaart. Die Nachkommen dieser gekreuzten Mauslinien haben die spezifische Deletion in allen Zellen, in denen die Cre - Rekombinase gebildet wird. Die in dieser Doktorarbeit verwendeten Smad7^{flox/flox} - Mäuse tragen die floxP - Sequenzen das Exon 1 flankierend. [45]

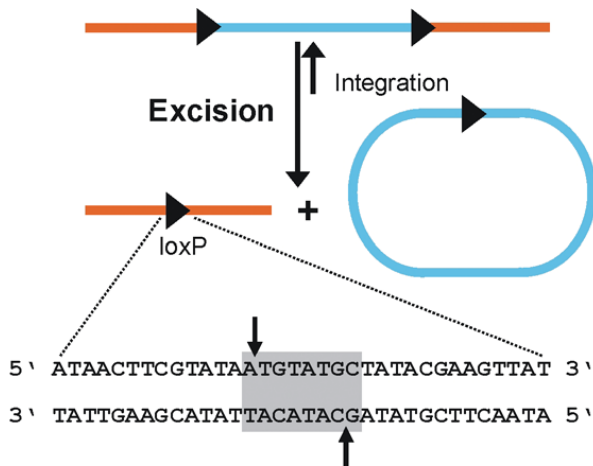


Abbildung 11 Cre/loxP - vermittelte Excision und Integration von DNA.

Die Basensequenz der loxP - Sequenz ist dargestellt. Der zentrale Abschnitt, innerhalb dem die Rekombination erfolgt, ist blau markiert. Die Schnittstelle ist durch Pfeile gekennzeichnet. [61]

I.13 Zielsetzung der Arbeit

Ein möglicher neuroprotektiver Effekt von TGF - β während des ontogenetischen Zelltods konnte durch eine Konditionelle Deletion von Smad 7 bereits gezeigt werden. [72, 18] Es sollte nun der Einfluss des TGF - β - Signalwegs auf das Überleben Retinaler Ganglienzellen in adulten Tieren unter physiologischen und pathologischen (Schadensmodell) Bedingungen untersucht werden.

Ziel war es, einen potentiellen neuroprotektiven Effekt des TGF - β - Signalwegs auf Retinale Ganglienzellen im adulten Tier zu untersuchen.

Um diese zentrale Frage der Arbeit beantworten zu können, generierten wir zunächst Mäuse mit einer Desinhibition des TGF - β - Signalwegs.

Hierfür wurden α - Cre - Mäuse, welche die Cre - Rekombinase unter der Kontrolle des alpha - Enhancer - Elements des Pax6 - Promoters exprimieren, mit Smad 7 - Gen - „geflochten“ Mäusen verpaart. Wir erwarteten bei aus dieser Verpaarung

stammenden transgenen Mäusen mit einer Konditionellen Deletion von Smad 7 in den retinalen Neuronen und Müllerzellen einen verstärkten Effekt des TGF- β -Signalwegs in den genannten Zellen. Die erfolgreiche Desinhibition des TGF- β -Signalwegs wurde mittels molekularbiologischer und immunhistochemischer Methoden bestätigt. Anschließend wurden zunächst die unbehandelten Mäuse morphologisch untersucht. Unser besonderes Augenmerk lag hierbei auf den Retinalen Ganglienzellen und deren Axonen. Anhand von Semidünnschnitten des N. opticus wurde die Anzahl an Axonen pro Sehnerv bestimmt und mit wildtypischen Geschwistertieren verglichen. Außerdem wurde der Gefäßstatus mittels *in vivo*-Angiographie von Tieren mit einer Konditionellen Deletion des Smad 7 - Gens mit ihrer Geschwisterkontrollgruppe überprüft. Dadurch sollte ein Einfluss der Desinhibition des TGF- β -Signals auf die Homöostase der retinalen Gefäße ausgeschlossen werden. Um eine veränderte Funktion am unbehandelten Tier auszuschließen, wurde zusätzlich die Netzhautfunktion mittels Elektoretinographie bei transgenen Tieren und Kontrollen analysiert.

Um eine mögliche neuroprotektive Rolle des TGF- β -Signalwegs bei Retinalen Ganglienzellen untersuchen zu können, führten wir das Schadensmodell der intravitrealen NMDA - Injektion durch. Dies führte zur exzitotoxischen Apoptose vor allem Retinaler Ganglienzellen und simuliert eine Glaukom bedingte Apoptose Retinaler Ganglienzellen. Wieder wurde die Anzahl überlebender Axone nach NMDA - Injektion bei Tieren mit einer Konditionellen Deletion von Smad 7 und Kontrollgeschwistertieren morphometrisch verglichen.

II. Material - und Methodenteil

II.1 Materialliste

II.1.1 Reagenzliste

10 x PCR - Puffer	Qiagen, Hilden
2 - Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS), 10 % (w/v)	Roth, Karlsruhe
Bioline - Puffer	Bioline USA Inc, Taunton
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Cocadylat – Natriumsalz - Trihydrat 0, 1 M	Merck, Darmstadt
Coomassie® Brillant Blue R - 250	Sigma - Aldrich, Taufkirchen
Deoxycholsäure	Roth, Karlsruhe
Diethylether	Roth, Karlsruhe
Di - Natriumhydrogenphosphat - Dihydrat	Merck, Darmstadt
DL - Dithiothreitol, min. 99 % Titration	Sigma - Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Qiagen, Hilden
2 - Dodeceny succinic - acid - anhydride (DDSA)	Roth, Karlsruhe
Dodecylsulfat (Na ₂ - Salz)	Serva, Heidelberg
Epon Araldite 502	Ted Pella, Redding, USA
Essigsäure, glazial	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	Roth, Karlsruhe
Fluorescein	Qiagen, Hilden
Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation, Hamburg
Glutaraldehyd	Serva, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycinether 100	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Immobilon™ Western HRP Substrat	Millipore Corporation, Billerica, USA

Immobilon™Western HRP Peroxidase Solution	Millipore Corporation, USA
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Ketamin	WDT, Garbsen
Magnesiumchlorid (25 mM)	Qiagen, Hilden
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylnadicanhydrid MNA	Serva, Heidelberg
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N' - Tetramethylethyldiamin, (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat - Monohydrat	Merck, Darmstadt
NMDA (10 mM)	Sigma -Aldrich, Taufkirchen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma - Aldrich, Taufkirchen
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Propylenoxid	Serva, Heidelberg
Protease - Inhibitor - Mix M	Serva, Heidelberg
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37 % (HCl)	Merck, Darmstadt
Stickstoff 2. 8	Linde, München
Tergitol	Sigma - Aldrich, Taufkirchen
Tissue - Tek®	Sakura, Zoeterwoude, NL
2,4,6 - Tri (dimethylaminomethyl) Phenol (DPM - 30)	Roth, Karlsruhe
Tris Ultrapure, MB Grade	Usb Corporation, Cleveland, USA
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Tropicamid	Pharma Stulln, Stulln
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector Laboratories,

Wasser Rotisolv (Rnase - frei)	Burlingame, USA
Xylazin	Roth, Karlsruhe
	Serumwerk Bernburg,

Tabelle 1 Reagenzliste

II.1.2 Enzyme und Kits

II.1.2.1 Enzyme

Taq Polymerase	Eigenproduktion
BioTaq™ DNA Polymerase	Bioline USA Inc, Taunton

Tabelle 2 Enzyme

II.1.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte

II.1.3.1 Verbrauchsmaterialien

Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
„Falcon“ Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nürnberg
3 MM Blotting ("Whatman") - Papiere	Neolab, Heidelberg
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nürnberg
Deckgläser, 24 x 60 mm	Menzel - Gläser, Braunschweig
Deckgläser, 18 x 18 mm	Menzel - Gläser, Braunschweig
Dispomed Einmalspritze	Dispomed Witt oHG, Geinhausen
Ecoflo Perfusionsbesteck	Dispomed Witt oHG, Geinhausen
Glaswaren	Schott, Roth, VWR
Liquid Blocker PAP - Pen	SCI Science Services, München

Microseal [®] „B“ Film	Biorad, München
Multi- Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Roth, Karlsruhe
Omnifix sterile Einmalspritzen	B. Braun, Wertheim
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
Personna Rasierklingen	American Safety Razor Company, Verona, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Powderfree Sempercare Handschuhe	Sempermed, Wien, AUS
PVDF - Western Blot Membran	Roche, Mannheim, Deutschland
Rotilabo 0, 22 µm Spritzenfilter	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nürnberg
Sterican Einmal - Injektions - Kanüle	B. Braun, Wertheim
SuperFrost [®] Plus Objektträger	Menzel - Gläser, Braunschweig
12 - Well Platten	

Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien

II.1.3.2 Geräte

Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Einbettautomat EM - TP	Leica, Nußloch
Gewebe - Infiltrationsautomat HMP 110	Microm International, Walldorf
Inolab pH - Meter	WTW GmbH, Weilheim
Julabo SW20 Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Kern PJJ 2100 - 2M Analysewaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen -

	Frommern
LAS 3000 Intelligent Dark Box	Fujifilm, Düsseldorf
Mastercycler gradient, personal	Eppendorf, Hamburg
Memmert Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Gießen
Microm HM 500 OM Kryostats	Microm International, Walldorf
Microtom Reichert Jung Supercut 2050	Cambridge Instruments, Nußloch
Mikroskop Axio Imager Z1	Zeiss, Göttingen
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA
Model 45 - 101 - i ClassII Electrophoresis System	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Paraffin Ausgießstation MPS/P2	SLEE Medical, Mainz
Pipetman Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Kelheim
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Semi - Dry Electrophoretic Transfer Cell	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
System V75 Autoklav	System GmbH, Wettenburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
UV - Vis Spectrometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 4 Geräte

II.1.4 Gele, Puffer und Lösungen

II.1.4.1 Gele

	Sammelgel	Trenngel 12 %
dH ₂ O	0,68 mL	1,6 mL

Rotiphorese® Gel 30	0,17 mL	2,0 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	0,002 mL

Tabelle 5 Polyacrylamidgele

Es wurde ein Agarosegel (1 %) verwendet, das wie folgt hergestellt wurde.

100 µl TBE - Puffer wurden mit 1 g Agarose verrührt. Das Gemisch wurde 3 min in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurde nach kurzem Schwenken des Gefäßes nochmals für 1 min erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 3 µl Ethidumbromid hinzugefügt und erneut geschwenkt. Das entstandene Gel musste unmittelbar nach dem Schwenken in den Schlitten gegossen und die Kämme in die dafür vorgesehenen Schienen eingehängt werden. Das Gel wurde mindestens 30 min ausgehärtet.

II.1.4.2 Puffer und Lösungen

0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4	100 mL 0,2 M Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O mit 0,2 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O auf pH 7,4 auf 0,1 M mit dH ₂ O verdünnen
10 x Elektrodenpuffer	250 mM Tris/HCl 400 mM Glycin 1 % (w/v) SDS in dH ₂ O lösen; ad 1 L
Coomassie - Entfärbelösung	500 ml Methanol 10 ml Essigsäure mit dH ₂ O auffüllen, ad 1 L

Coomassie - Färbelösung	<p>40 mL Methanol</p> <p>2 mL Essigsäure</p> <p>0, 2 g Coomassie - Brilliant Blue R - 250 mit dH₂O auffüllen, ad 100 mL</p>
0, 9 % NaCl	0, 9 % (w/v) in dH ₂ O, autoklavieren
PBS, 10 x, pH 7 ,4	<p>80 g Natriumchlorid</p> <p>2 g Kaliumchlorid 1</p> <p>4, 4 g Na₂HPO₄</p> <p>2, 4 g KH₂PO₄</p> <p>mit dH₂O ad 1 L, autoklavieren</p>
1 ml Sammelgel (SDS - Gel)	<p>0, 68 ml H₂O dest.</p> <p>0, 17 ml Rotiphorese® Gel 30</p> <p>0, 13 ml 1 M Tris/HCl (pH 6, 8)</p> <p>0, 01 ml 10 % SDS</p> <p>0, 01 ml 10 % APS</p> <p>0, 001 ml TEMED</p>
5 ml Trenngel 10 % (SDS - Gel)	<p>1, 9 ml H₂O dest.</p> <p>1, 7 ml Rotiphorese® Gel 30</p> <p>1, 3 ml 1, 5 M Tris/HCl (pH 8, 8)</p> <p>0, 05 ml 10 % SDS</p> <p>0,05 ml 10 % APS</p> <p>0,002 ml TEMED</p>

SDS - Lösung, 10 % (w/v)	10 g SDS in dH ₂ O lösen; ad 100 mL
SDS - PAGE - Laufpuffer, 10 x	250 mM Tris HCl 400 mM Glycin, 1 % (w/v) SDS in dH ₂ O lösen; ad 1 L
SDS - Probenpuffer, 4 x	0, 25M Tris/HCl, pH 6, 8 30 % Glycerin 8 % (w/v) SDS 0, 02 % (w/v) Bromphenolblau 0, 3 M DTT bzw. 10 % β - Mercaptoethanol
TBS, 10 x, pH 7, 4	30 g Tris 80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid mit dH ₂ O ad 1 l, autoklavieren
TBST, 1 x	100 ml 10 x TBS 0, 05 % (v/v) Tween 20 mit dH ₂ O ad 1 L
Transferpuffer, 10 x	5, 8 g Tris 2, 9 g Glycin 200 ml Methanol 3, 7 ml 10 % (w/v) SDS in dH ₂ O lösen, ad 1 L

Tris/HCl, 1, 0 M, pH 6, 8	121, 14 g Tris in dH ₂ O lösen; pH einstellen; ad 1 L
Tris/HCl, 1, 5 M, pH 8, 8	181, 71 g Tris in dH ₂ O lösen; pH einstellen; ad 1 L
Mausschwanzlyse - Puffer	50 mM KCl 10 mM Tris - HCl, pH 8, 3 2 mM MgCl ₂ 0, 1 mg/ml Gelatine 0, 45 % Nonidet P - 40 0, 45 % Tween 20

Tabelle 6 Puffer und Lösungen

Je 1 mL Lysispuffer wurden 500 µg Proteinase K vor Gebrauch frisch zugegeben.

II.1.5 Antikörper

Protein	Primärantikörper	Bezugsquelle
pSmad3	Anti - pSmad3, rabbit 1:20	Cell signaling

Tabelle 7 Primärantikörper

Sekundärantikörper	Bezugsquelle
chicken anti - rabbit, HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
goat anti - rabbit, Alexa Fluor® 488 konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 8 Sekundärantikörper

In Tabelle 8 und 9 sind die in den Westernblotanalysen und Immunofärbungen verwendeten Antikörper dargestellt. Der Proteinmolekulargewichtsmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) diente zur Größenbestimmung der detektierten Banden.

II.1.6 Oligonukleotidprimer für Genotypisierungs - PCR

Primer	Spezies	Sequenz	Position	Produktgröße
α - Cre fwd	mm	5' - atgcttctgtccgtttgccg - 3'		270 bp
α - Cre rev	mm	5' - cctgttttgacagttcagc - 3'		270 bp
Smad7 fwd	mm	5' - gtcaggttgatcaccatgcc - 3'	Exon 1	568 bp
Smad7 rev	mm	5' - actgcctggagaagtgtgtcg - 3'	Exon 1	568 bp

Tabelle 9 Oligonukleotidprimer für Genotypisierungs - PCR

II.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Die in vivo Experimente wurden mit den folgenden 2 Mauslinien durchgeführt:

- Smad7^{flox/flox} - Mäuse (Exon 1 des Smad 7 - Gens mit loxP - Sites flankiert, in Black6 - Hintergrund [45])
- α - Cre - Mäuse (Cre - Rekombinase unter der Kontrolle des Pax6 - Promoters, in FVB - N - Hintergrund) [62]

Für die Versuche wurden Tiere verwendet, die alle unter standardisierten Bedingungen (relative Luftfeuchtigkeit 55 % \pm 5 %, Raumtemperatur 23° C \pm 2° C, Futter und Wasser ad libitum) in demselben Tierstall bei einem Zwölfstunden - Hell - Dunkel - Rhythmus gehalten wurden. Die Tiere wurden im für die Versuche notwendigen Alter durch zervikale Dislokation getötet und anschließend deren Augen, inklusive Sehnerv, schonend aus der Orbita präpariert.

II.3 Molekularbiologische Methoden

II.3.1 Isolierung von DNA aus Mausschwanzbiopsie

Die genomische DNA für die PCR wurde durch eine vereinfachte Methode [70] aus Biopsien von Mäuseschwänzen isoliert. Dafür wurden etwa 0,5 cm lange Mausschwanzbiopsien in ein Gemisch aus 190 μ l Mausschwanzlysepuffer und 10 μ l Proteinase K (10 mg/ml) gegeben und über Nacht bei 55° C im Thermomixer unter starkem Schütteln (1200 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K für 15 min bei 95° C im Thermomixer unter Schütteln inaktiviert. Nach der Zentrifugation der Proben für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit von 16000 rpm wurden die Überstände abgenommen. Jeweils 50 ng DNA wurden in der PCR verwendet.

II.3.2 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die DNA - Lösungen wurden vor dem Einsatz in der PCR bezüglich ihrer Konzentration mittels einer Absorptionsmessung photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum für einzel - und doppelsträngige DNA, mit dem UV - Vis Spectrophotometer NanoDrop 2000c (Firma Thermo Fischer Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) bestimmt. Da das Absorptionsmaximum für gelöste Proteine bei 280 nm liegt und man eine Verunreinigung ausschließen sollte, müssen die Messungen für die Beurteilung der Reinheit der DNA ins Verhältnis gesetzt werden (Ratio A260/280). Bei einer Ratio $\geq 1,8$ ist die Reinheit der Nukleinsäuren ausreichend.

II.3.3 Genotypisierung der Versuchstiere

II.3.3.1 Polymerase - Kettenreaktion (PCR)

Mithilfe der PCR können unterschiedlich große DNA - Abschnitte selektiv amplifiziert werden. Die zu vervielfältigende DNA- Sequenz wird dafür bei hoher Temperatur erhitzt, um eine Denaturierung dieser zu erreichen. Anschließend wird auf die Annealingtemperatur abgekühlt. In dieser Phase können sich Oligonukleotidprimer an die denaturierte DNA anlagern. Dabei flankieren die Primer, die zu der zu vervielfältigenden DNA komplementär sind, einen spezifischen Bereich der DNA. Bei der Amplifikation wird dieser DNA - Abschnitt durch die Taq - Polymerase, die die Primer als Ausgangspunkt benötigt, zur Synthese eines diesem DNA - Abschnitt komplementären DNA - Einzelstranges verwendet. Dieser Vorgang kann zwanzig - bis fünfunddreißigmal wiederholt werden [97, 79].

II.3.3.2 Cre - Rekombinase

Um die Genotypen der α - Cre - Versuchstiere voneinander unterscheiden zu können, wurde eine PCR durchgeführt. Die Gewinnung der dafür notwendigen DNA und die Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäuren wurden in Punkt II. 3. 2 und II. 3. 3. 1 beschrieben. So wurden 50 ng der DNA mit dem folgenden Mastermix zu einem Volumen von 25 μ l angesetzt:

Mastermix Cre (für einen Ansatz)

10 x Puffer	2, 5 μ L
α - Cre - Primer fwd	0, 5 μ L
α - Cre - Primer rev	0, 5 μ L
dNTP (10mM)	0, 5 μ L
MgCl ₂ (25mM)	0, 7 μ L
H ₂ O	17, 8 μ L
Taq (Eigenproduktion)	0, 5 μ L
verdünnte DNA	2,0 μ L

Anschließend wurden die Proben vorgetext und abzentrifugiert.

Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg) mit folgendem PCR - Programm:

PCR - Programm Cre

1. Schritt:	T = 96° C	2 min
2. Schritt	T = 94° C	30 sek
3. Schritt	T = 59° C	30 sek
4. Schritt	T = 72° C	1 min
5. Schritt	gehe zu Schritt 2, Wiederholungen 29	
6. Schritt	T = 72° C	2 min
7. Schritt	T = 10° C	∞

Nach der PCR wurden die Proben jeweils mit 5 µl 6 x Orange Loading Dye vermischt. 10 µl des Gemisches wurden auf das vorher vorbereitete Agarosegel (1 %) in eine mit 1 x TBE - Puffer gefüllten Gelkammer pipettiert. Für alle durchgeführten Gelelektrophoresen (Cre, Smad7) galten die gleichen Bedingungen von 120 V, 500 mA, 150 W und 45 min. Für die Größenbestimmung der Produkte wurde der Standard (New England Biolabs) als Vergleichsprodukt herangezogen. Eine Konditionelle Deletion lag vor bei einer Bande auf Höhe von 270 bp.

Zum Ausschluss einer Verunreinigung wurden bei allen PCR eine Negativkontrolle (23 µL Mastermix und 2 µL H₂O) und eine Positivkontrolle, die genau wie die Probe behandelt wurden, mitgeführt.

II.3.3.3 Smad7^{Δoc}

Auch die Smad7^{Δoc} - Mäuse wurden mittels PCR genotypisiert. Die PCR wurde, genau wie in Punkt II. 3. 3. 2, durchgeführt mit dem folgenden Temperaturprotokoll und Mastermix:

Mastermix Smad 7

10 x Puffer Bioline	2, 5 µL
Primer Smad7 RT fw	0, 5 µL
Primer Smad7 RT rev	0, 5 µL
dNTP (10 mM)	0, 5 µL

MgCl ₂ (25 mM)	1, 2 µL
H ₂ O	17, 5 µL
Taq (MG)	0, 5 µL
verdünnte DNA	2, 0 µL

PCR - Programm Smad 7

1. Schritt: T = 95° C 3 min
2. Schritt T = 95° C 30 sek
3. Schritt T = 61° C 45 sek
4. Schritt T = 72° C 1 min
5. Schritt gehe zu Schritt 2, Wiederholungen 35
6. Schritt T = 72° C 5 min
7. Schritt T = 10° C ∞

Bei der Vorbereitung und Durchführung der Gelelektrophorese wurde wie in Punkt II. 3. 3. 2 vorgegangen. Es galten die gleichen Bedingungen von 120 V, 500 mA, 150 W und 45 min. Für die Größenbestimmung der Produkte wurde der Standard (New England Biolabs) als Vergleichsprodukt herangezogen. Eine homozygote, Konditionelle Deletion lag vor bei einer Bande auf Höhe von 568 bp.

Auch hier wurden nach den gleichen Bedingungen zum Ausschluss der Verunreinigung eine Negativ - und eine Positivkontrolle mitgeführt.

II.4 Proteinbiochemische Methoden

II.4.1 Proteinisolierung nach der TRizol® - Methode

Diese Methode dient der Extraktion der Proteine aus der Inter - und Phenol - Chloroform - Phase. [14] Die Durchführung der Protein- Extraktion wurde nach folgenden Schritten durchgeführt:

Protein-Extraktion nach RNA - Isolation mit TRizol®

Mischen des Überstandes mit 1, 5 ml Isopropanol pro ml TRizol®

10 min Inkubation bei RT

10 min Zentrifugation bei 4° C und 12000 G

Verwerfen des Überstandes, dreimaliges Waschen des Proteinpellet:

- 20 min Inkubation bei RT mit 2 ml Waschpuffer pro ml TRIzol[®]
- 5 min Zentrifugation bei 4° C und 7600 G

Anschließend Mischen des Pellet in 2 ml 95 % Ethanol pro ml TRIzol[®]

20 min Inkubation bei RT

5 min Zentrifugation bei 4° C und 7600 G

Trocknen des Pellet

je nach Pelletgröße Aufnahme in bis zu 300 µL 1 % SDS

Lösen des Pellet bei 50° C bei 750 Upm über Nacht

10 min Zentrifugation bei 4° C und 10000 G

Abnahme des Überstandes mit Gesamtprotein

Lagerung bei – 20° C bzw. – 80° C

II.4.2 Western - Blot

II.4.3 SDS - Polyacrylamid - Gelelektrophorese

Die Western - Blot - Analysen wurden mittels Gelelektrophorese durchgeführt. Diese und die Herstellung der dafür notwendigen Polyacrylamidgele erfolgten nach der Methode von Laemmli. [54]

Für das Gießen des Gels wurde eine extra dafür vorgesehene Vorrichtung der Firma peqlab Biotechnology GmbH (Erlangen) verwendet. Nachdem das Trenngel zwischen die beiden Glasplatten gebracht wurde, erfolgte eine Überschichtung mit 200 µL Isopropanol. Anschließend wurde nach stattgefundener Polymerisation der flüssige Überstand abgegossen und das Sammelgel auf das Trenngel aufgetragen. Für die Bildung von Taschen im Gel, die man später für das Aufbringen von Proteinproben benötigt, wurde in das flüssige Sammelgel ein Plastikkamm gesteckt.

Da das Gel SDS enthält, werden die Proteine während der Elektrophorese denaturiert, entsprechend ihrem Gewicht negativ geladen und so im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt.

Im Sammelgel werden somit wegen der unterschiedlichen Porengröße, der elektrophoretischen Beweglichkeit seiner Ionen und des pH - Werts zum Trenngel die darin wandernden Proteine konzentriert und im Trenngel nach ihrer Proteingröße aufgetrennt.

Vor ihrer Verwendung in der Elektrophorese mussten die Proteine dafür in 1 % SDS mit 4 x SDS Probenpuffer, der durch das darin enthaltene β - Mercaptoethanol bzw. DDT reduzierend wirkt, 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert und unmittelbar danach kurz zentrifugiert werden.

Die Elektrophoresekammer wurde nach Anleitung mit dem angefertigten Gel bestückt und der Puffertank mit 1 x Laufpuffer befüllt. Die Proteinproben (einheitliche Proteinmenge je nach Versuch 10 - 20 μ g) wurden mit jeweils 5 μ L Proteinmolekulargewichtsmarker (Fermentas, St. Leon - Rot) in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde bei 20 mA (pro Gel) für 75 - 90 min durchgeführt. Anschließend wurde das Sammelgel abgetrennt und konnte verworfen werden.

II.4.3.1 Semidry - Blotting

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine aus dem Trenngel auf eine Polyvinylfluorid - (PVDF) - Membran (Roche, Mannheim) wurde mittels „Elektroblotting“ in einer „Semidry Blotting“- Apparatur (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen) durchgeführt. Dafür musste die PVDF - Membran auf die Größe des Trenngels zugeschnitten und in Methanol getränkt werden. Nachdem die Membran für etwa 1 min in Aqua dest. gewaschen wurde, erfolgte eine Äquilibration mit Transferpuffer für 5 min. Zusätzlich wurden die für den Blot benötigten Whatman - Papiere ebenfalls mit Transferpuffer beschichtet. Der Blot wurde bei 25 V für 90 min wie folgt durchgeführt:

Aufbau Semidry Blot

Kathode (-)

3 Lagen Whatman - Papier

Trenngel mit Proteinen

PVDF - Membran

2 Lagen Whatman - Papier

Anode (+)

II.4.3.2 Nachweis spezifischer Proteinbanden

Der Nachweis der spezifischen Proteinbanden erfolgte nach dem Prinzip der Antigen - Antikörperreaktion. Gegen das gesuchte Protein wurde ein Primärantikörper eingesetzt. Für diesen Antigen - Antikörper - Komplex wurde ein Sekundärantikörper verwendet, der diesen spezifisch bindet. Der Sekundärantikörper selbst ist an Meerrettich - Peroxidase (HRP) gekoppelt. Somit kann dieser, nach Zugabe von Luminol, durch ein Chemilumineszenz - Signal nachgewiesen werden, da die Meerrettich - Peroxidase die Umwandlung von Luminol in die oxidierte Form bewirkt, welche ein Lumineszenzsignal aussendet.

Die Membranen wurden nach dem Semidry - Blot vorab 1 h bei Raumtemperatur blockiert, anschließend die Primärantikörper zugegeben und über Nacht bei 4° C inkubiert. Vor der weiteren Verwendung müssen die Membranen für jeweils 10 min mit TBST gewaschen werden. So wurde der Sekundärantikörper auch für 1 h bei Raumtemperatur hinzugefügt. Nachfolgend wurde wieder dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Membranen dann mit 1 ml HRP Substrate Luminol Reagent und HRP Peroxidase Solution (1:1 gemischt) (Multipore Corporation, Billerica, USA) in einer Folie für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Protein	Blockierungslösung	Primärantikörper	Sekundärantikörper
pSmad3	4 % PFA	Anti - pSmad3, rabbit 1:20 Cell Signaling	Anti - rabbit, biotinylated (Vector) 1:500, Streptavidin Alexa 488 (Invitrogen)
GAPDH	5 % Magermilch	GAPDH, HRP - konjugiert 1:10000 Cell Signaling Technology, Germany	-

Tabelle 10 Übersicht über die nachgewiesenen Proteine und die Verwendung der spezifischen Antikörper

Die Aufnahme des entstandenen Chemilumineszenz- Signals erfolgte digital mit dem LAS 3000 (Fujifilm, Düsseldorf) mit einer entsprechenden Umsetzung in Graustufen. Die

Analyse und die Quantifizierung der Chemilumineszenz- Signale wurden mit der Software Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4. 06 (Raytest, Straubenhardt) durchgeführt.

II.5 Immunofärbungen

II.5.1 Paraffineinbettung und Herstellen von Paraffinschnitten

Für die Paraffineinbettung wurden die Augen der Tiere folgendermaßen behandelt:

Die Augen wurden nach Tötung der Tiere vorsichtig aus der Orbita enukleiert. Diese wurden über Nacht in 4 % PFA - Lösung fixiert, am nächsten Morgen dreimal in 0,1 M Phosphatpuffer dreimal für 20 min gewaschen und zusätzlich in 50 % Isopropanol für 1 h und in 70 % Isopropanol ebenfalls für 1 h gespült. Das Lagern der Augen bis zur nächsten Bearbeitung erfolgte in 70 % Isopropanol.

Die Paraffineinbettung wurde im HMP 110 (Microm International, Walldorf) nach folgendem Programm durchgeführt:

Einbettprogramm

- 70 % Isopropanol 1 h
- 80 % Isopropanol 1 h
- 96 % Isopropanol I 1 h
- 96 % Isopropanol II 2 h
- 100 % Isopropanol I 1 h
- 100 % Isopropanol II 1 h
- 100 % Isopropanol III 2 h
- Xylol I 1 h
- Xylol II 1,5 h
- Paraffin I 2 h
- Paraffin II 8 h

Anschließend erfolgte die Ausbettung der Präparate mit der Ausgießstation MPS/P2 (SLEE Medical, Mainz). Hier wurde unmittelbar nach dem Ausgießen auch die Haltevorrichtung für die Paraffinschnitte eingesetzt. Die Paraffinblöcke wurden dann mit dem Microtom Reichert

Jung Supercut 2050 (Cambridge Instruments, Nußloch) geschnitten. Nach dem Schneiden wurden die Schnitte vorsichtig mit einem Pinsel in ein 30° C warmes Wasserbad gelegt. Sobald die Schnitte faltenfrei waren, wurden sie auf einen Objektträger (SuperFrost®Plus, Menzel - Gläser, Braunschweig) gebracht. Es wurden midsagittale Schnitte verwendet, mit geöffneter Pupille und Papille.

II.5.2 Immunhistochemische Färbungen

Mit immunhistochemischen Färbungen kann man bestimmte Proteine in Geweben nachweisen. Dafür wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt, bei der ein Primär- und ein Sekundärantikörper verwendet wurden. Dabei bindet der Primärantikörper an das zu bestimmende Antigen. Um nun diesen gebundenen Primärantikörper nachweisen zu können, wurde ein Sekundärantikörper, der mit dem Fluorochrom, hier Alexa 488, gekoppelt war, verwendet. Dieser Sekundärantikörper band an ein Epitop des Primärantikörpers und ermöglichte folglich dessen Detektion.

Für die Markierung der Zellkerne wurde außerdem der in die DNA interkalierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI benutzt. Um den Fluoreszenzfarbstoff und das Fluorochrom sichtbar zu machen, wurden diese mit Licht entsprechender Wellenlänge (Alexa 488: 488 nm, DAPI: 381 nm) angeregt. Das dabei emittierte Licht, wurde jeweils mittels eines Filters, der für die jeweilige Wellenlänge durchlässig ist, unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager. Z1, Zeiss, Göttingen) betrachtet.

Für die Herstellung von immunhistochemischen Färbungen zum Nachweis von pSmad2/3 wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

immunhistochemischer Nachweis von pSmad2/3

- Entparaffinieren:

Reagenz	Zeit
Xylol I	10 min
Xylol II	10 min
100 % Isopropanol I	10 min
100 % Isopropanol II	10 min

- 96 % Isopropanol 5 min
- 96 % Isopropanol 5 min
- 80 % Isopropanol 5 min
- 80 % Isopropanol 5 min
- 70 % Isopropanol 5 min
- 50 % Isopropanol 5 min
- 45 min Blockierlösung (0,2 % (v/v) BSA (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 0,1 M Phosphatpuffer mit 0,01 % (v/v) NaN₃) mit Proteaseinhibitor - Mix (1:1000)
- 120 min Primärantikörper gegen pSmad3 (Cell signaling)
- 2 x 5 min 0,1 M Phosphatpuffer
- 60 min Sekundärantikörper (ant - rabbit, biotinylated (Vector) 1:500, Streptavidin Alexa 488 (Invitrogen))
- 3 x 5 min 0,1 M Phosphatpuffer
- 1:10 DAPI Eindeckeln

Bis zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden die Schnitte bei 4° C gelagert. Die einzelnen Färbungen wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (Axio Imager. Z1, Zeiss, Göttingen) und dem Bildbearbeitungs - und Analysesystem Axiovision 4.8 (Carl Zeiss, Göttingen) zu einem digitalen Bild zusammengefügt.

II.6 NMDA - induzierte Schädigung von Retinalen Ganglienzellen

Die Injektion von NMDA (10 mM in sterilem PBS) in die Tieraugen wurde nach einer Kurzzeit - Inhalationsnarkose der Mäuse mit Isofluran (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) durchgeführt. Es wurden jeweils 3 µl NMDA in die Glaskörper der Augen mit Hilfe einer 25 µl - Hamilton - Spritze (Roth, Karlsruhe, Deutschland) und einer dünnen Injektionsnadel (33 g beveled NanoFil needle, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) injiziert. In das jeweilige Partnerauge wurden 3 µl PBS gespritzt. Die Entnahme der Augen erfolgte drei Wochen nach der Injektion. Nach der Einbettung in Epon wurden Semidünnschnitte der

Sehnerven angefertigt, welche für die Auszählung der Axone der Nn. optici der NMDA - Versuche verwendet wurden.

II.7 Phänotypanalyse

II.7.1 Eponeinbettung von Geweben

Die präparierten Sehnerven wurden in einer modifizierten Fixierung nach Ito und Karnovsky 52 (2, 5 % Paraformaldehyd, 2, 5 % Glutaraldehyd in 0, 1 M Cacodylatpuffer) 12 h immunfixiert. Anschließend erfolgte eine mehrfache, jeweils mehrstündige Spülung dieser in 0, 1 M Cacodylatpuffer (pH 7, 4), um überschüssige Fixierlösung auszuwaschen. Die Nachfixierung der Sehnerven wurde mit Osmiumferrocyanid durchgeführt. Hier wurde die Fixierlösung mit Aqua bidest. ausgewaschen. Unmittelbar nach dem Spülen erfolgte die Entwässerung der Sehnerven in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70 %, 80 %, 90 %, 100 %). Nachfolgend wurden die Schnitte in Epon (Araldite 502, Ted Pella, Redding, USA) im Einbettautomat (EM - TP, Leica, Nußloch, Deutschland) über Propylenoxid nach den Standardmethoden eingebettet:

- Propylenoxid/Epon 2:1
- Propylenoxid/Epon 1:1
- Propylenoxid/Epon 1:2
- 100 % Epon
- Aushärten im Brutschrank 24 h bei 60° C

Für die Einbettung wurden außerdem folgende Stammlösungen im Verhältnis 1:1 mit 2 % Beschleuniger DMP - 30 verwendet:

Stammlösung A der Eponlösung:

62 ml Glycidether 100, 100 ml DDSA

Stammlösung B der Eponlösung:

100 ml Glycidether 100, 89 ml MNA (Serva, Heidelberg, Deutschland)

II.7.2 Anfertigen von Semidünnschnitten

Die Semidünnschnitte der Sehnerven wurden mit dem Reichert Ultramikrotom geschnitten. Anschließend erfolgte eine Färbung nach Richardson und die Beurteilung mit einem Lichtmikroskop (Axio Imager. Z1, Zeiss, Göttingen). Von diesen Schnitten wurden für die spätere Auszählung der Sehnerven Übersichtsaufnahmen (Mosaik - Aufnahmen) erstellt.

II.8 Auszählen von Axonen der Sehnerven

Die Gesamtzahl der Axone der einzelnen Sehnerven wurde mit dem Programm ImageJ ausgezählt. Die Fläche der Sehnerven wurde mit dem Bildbearbeitungs - und Analysesystem Axiovision 4. 8 (Carl Zeiss, Göttingen) ausgemessen.

II.9 Angiographie

Als Vorbereitung auf die Angiographie wurde die Hornhautpflege Corneregel (Bausch & Lomb) auf die Augen der Mäuse aufgetragen und eine Anästhesie mit Ketamin (65 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (13 mg/kg Körpergewicht) subkutan durchgeführt. Zur Weitstellung der Pupillen wurden Tropicamid- Augentropfen (Mydriaticum Stulln; Pharma Stulln) verwendet. Vorab wurde von beiden Augen mittels Funduskamera eine native Fundusaufnahme angefertigt und die Augen im Seitenvergleich miteinander verglichen. Anschließend wurden die Fundusaufnahmen unmittelbar nach der intraperitonealen Injektion von 0,02 ml Fluoreszein (Quiagen, Hilden) angefertigt (Frühphase/venöse Phase). Dies erfolgte ebenso nach 10 min (Spätphase/arterielle Phase). Die Auswertung folgte anschließend durch Vergleich der Fundusaufnahmen bezüglich des Phänotyps.

II.10 Elektroretinographie

Vor der Durchführung wurden die Versuchstiere zwölf Stunden dunkeladaptiert. Die Anästhesie erfolgte mittels subkutaner Injektion von Ketamin (65 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (13 mg/kg Körpergewicht) und die Weitstellung der Pupillen mit Tropicamid -

Augentropfen (Mydriaticum Stulln; Pharma Stulln). Silberne Nadelelektroden dienten als indifferente Elektroden an der Haut von Kopf und Schwanz der Mäuse und eine goldene Ringelektrode am Auge als aktive Elektrode. Um das Auge während der Untersuchungszeit feucht zu halten und einen sicheren elektrischen Kontakt zu gewährleisten, wurde Corneregel (Bausch & Lomb) auf die Augen aufgetragen. Die Elektoretinographien wurden mit Hilfe einer Ganzfeld - Kugel (Ganzfeld QC 450 SCX, Roland Consult) und einer Verstärker- und Empfängereinheit (RETI - Port, Roland Consult) aufgenommen. Außerdem wurden die ERGs von beiden Augen gleichzeitig aufgenommen, mit einem Bandpass (1 bis 300 Hz) gefiltert und anschließend die Mittelwerte festgehalten. Einzelne skotopische Spannungsänderungen wurden mittels einer Serie von zehn LED- Lichtblitzreihen von - 3,5 bis 1,0 log cd.s/m² mit einem Zwischenstimulationsintervall von 2 bis 20 sek für die höchste Intensität aufgezeichnet. Für die Erhebung der temporalen Eigenschaften wurden Spannungsänderungen auf blitzende Lichtstimuli mit einer Intensität von 0,5 log cd.s/m² und einer Frequenzbreite von 4 bis 25 Hz aufgenommen. Nach einer zehnminütigen Adaptation an eine weiße Hintergrundbeleuchtung (25 cd/m²) wurden einzelne photopische Spannungsänderungen (hell - adaptiert) auf eine Serie von drei Xenon - Blitzreihen (1, 2 und 3 log cd.s/m²) und Spannungsänderungen auf einen flimmernden Lichtstimulus (Intensität 1,0 log cd.s/m²) mit einer Frequenz von 4 bis 25 Hz gemessen. Das Scotopic Threshold Response (STR), das durch sehr schwaches weißes Flimmern (Intensität - 4,05, - 3,70 und - 3,53 log cd.s/m²) entstand, wurde nach einer Dunkeladaptation von 16 Stunden gemessen. Für flackernde Wellenformen wurde eine schnelle Fouriertransformation verwendet, um die Antwortstärke und - phase zu ermitteln und die Signifikanz der Signale zu beurteilen. Alle Analysen erfolgten mit R 2. 14. 2 (The R Foundation for Statistical Computing) und ggplot 2. 0. 5.1 (Wickham, 2009).

II.11 Auswertung und Statistik

Zur Auswertung der numerischen Daten sowie deren graphische Darstellung diente die Software Microsoft® Excel (Microsoft® Corporation, Redmond, USA). Die statistische Analyse der Versuche wurde mit dem „Student’s“ T - Test durchgeführt. Dabei galt ein statistisch signifikanter Unterschiede für $p < 0,05$ und ein statistisch hoch signifikanter Unterschiede

für $p < 0,01$. In den Diagrammen wurde dies mit * ($p < 0,05$) bzw. ** ($p < 0,01$) gekennzeichnet.

III. Ergebnisse

III.1 Nachweis der Konditionellen Deletion von Smad7 durch Western - Blot - Analyse

Zum Nachweis der erfolgreichen Konditionellen Deletion von Smad7 wurden Western - Blot - Analysen auf das intrazelluläre Signalprotein pSmad3 durchgeführt. Im Kontrolltier wirkt das inhibitorische Smad - Protein Smad7 hemmend auf die Phosphorylierung von Smad3 (siehe I. 11. 1 und I. 11. 2), wo hingegen bei den Smad7^{Δoc} - Tieren dieser inhibierende Effekt von Smad7 entfällt und eine verstärkte Phosphorylierung von Smad3 (pSmad3) resultiert. Erwartungsgemäß zeigten Smad7^{Δoc} - Mäuse eine deutlich intensivere pSmad3 - Bande auf Höhe von 54 kDa, welche im Vergleich zu den Kontrollgeschwistertieren (control) deutlich schwächer war. Die densitometrische Auswertung bestätigte die signifikante Erhöhung an pSmad3 bei den Tieren mit einer Desinhibition des TGF - β - Signalwegs (Smad7^{Δoc}) (Abb. 12).

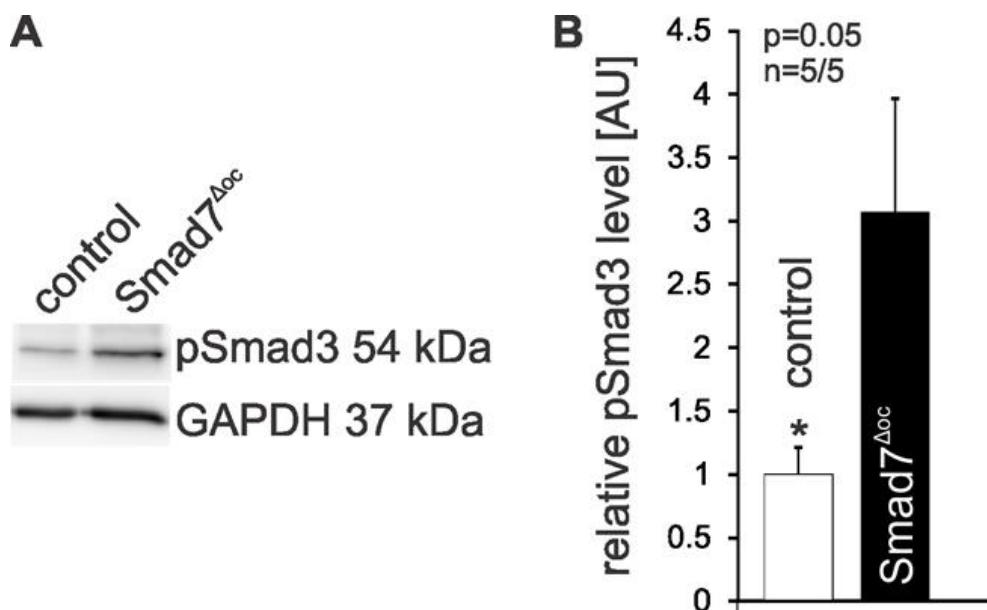


Abbildung 12 Westernblot - Analysen retinaler Proteine auf pSmad3

A. Westernblot - Analysen retinaler Proteine auf pSmad3 von Smad7^{Δoc} - Mäusen (Smad7^{Δoc}) und deren Kontrollen (control). GAPDH ist die Ladungskontrolle. **B.** Densitometrische Auswertung der Westernblot - Analysen. mRNA - Level von pSmad3 in der Retina von Smad7^{Δoc} - Mäusen (Smad7^{Δoc}) und der Retina der Kontrolltiere (control). Durchgeführt in Zusammenarbeit mit Dr. Barbara Braunger, Universität Regensburg. Veröffentlicht in [12]

III.2 Nachweis der Konditionellen Deletion von Smad7 durch immunhistochemische Analyse

Der Nachweis der Konditionellen Deletion konnte auch immunhistochemisch in der Retina an P 10 erfolgen. Abbildung 13 zeigt ein pSmad3 - Signal bei der Geschwisterkontrolle (control) in der Ganglienzellschicht und der Inneren Plexiformen Schicht. Bei den Smad7^{Δoc} - Mäusen ist das pSmad3 - Signal deutlich verstärkt im Vergleich zur Geschwisterkontrolle und zeigt sich zusätzlich vermehrt in der Inneren Körnerschicht sowie in der Äußeren Plexiformen Schicht. Die Antikörperkontrolle ist sauber und die Färbung damit spezifisch. Insgesamt sprechen die Ergebnisse für eine deutlich stärkere Phosphorylierung von Smad3 und damit für ein vermehrtes TGF - β - Signal in der Retina der Smad7^{Δoc} - Mäuse.

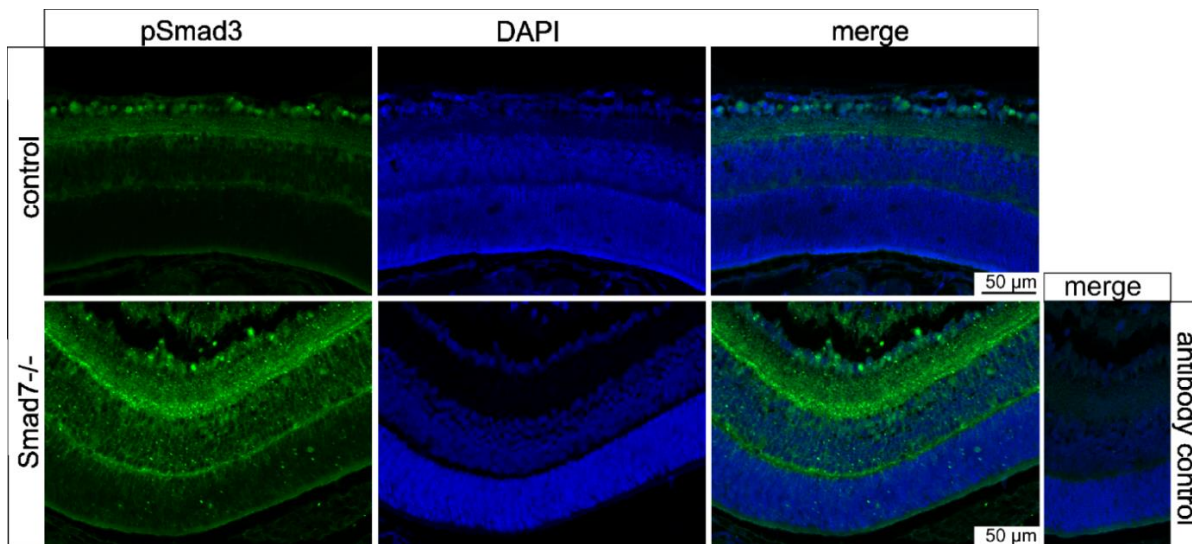


Abbildung 13 Nachweis der Konditionellen Deletion von Smad7 durch immunhistochemische Analyse

Geschwisterkontrolltiere (control) verglichen mit Smad7^{Δoc} - Tieren (Smad7^{-/-}). Ein pSmad3 - Signal bei der Geschwisterkontrolle (control) in der Ganglienzellschicht und der Inneren Plexiformen Schicht. Bei den Smad7^{Δoc} - Mäusen (Smad7^{-/-}) ist das pSmad3 - Signal deutlich verstärkt im Vergleich zur Geschwisterkontrolle und zeigt sich zusätzlich vermehrt in der Inneren Körnerschicht sowie in der Äußeren Plexiformen Schicht. Die Antikörperkontrolle ist sauber. Immunhistochemische Färbung durchgeführt in Zusammenarbeit mit Dr. Barbara Braunger, Universität Regensburg. Veröffentlicht in [12]

III.3 Phänotypanalyse der α - Cre +/- - Tiere

Um festzustellen, ob die Cre - Rekombinase, die für die Smad7 - Deletion verwendet wurde, selbst einen Einfluss auf Retinale Ganglienzellen hat, ist die α - Cre- Maus (α - Cre +/-) mit

ihren Wildtyp - Geschwistertieren (wildtype) verglichen worden. Nach Präparation der Nervi optici, Einbettung in Epon und dem Anfertigen von Semidünnschnitten ließen sich phänotypisch keine strukturellen Unterschiede feststellen (Abb. 14).

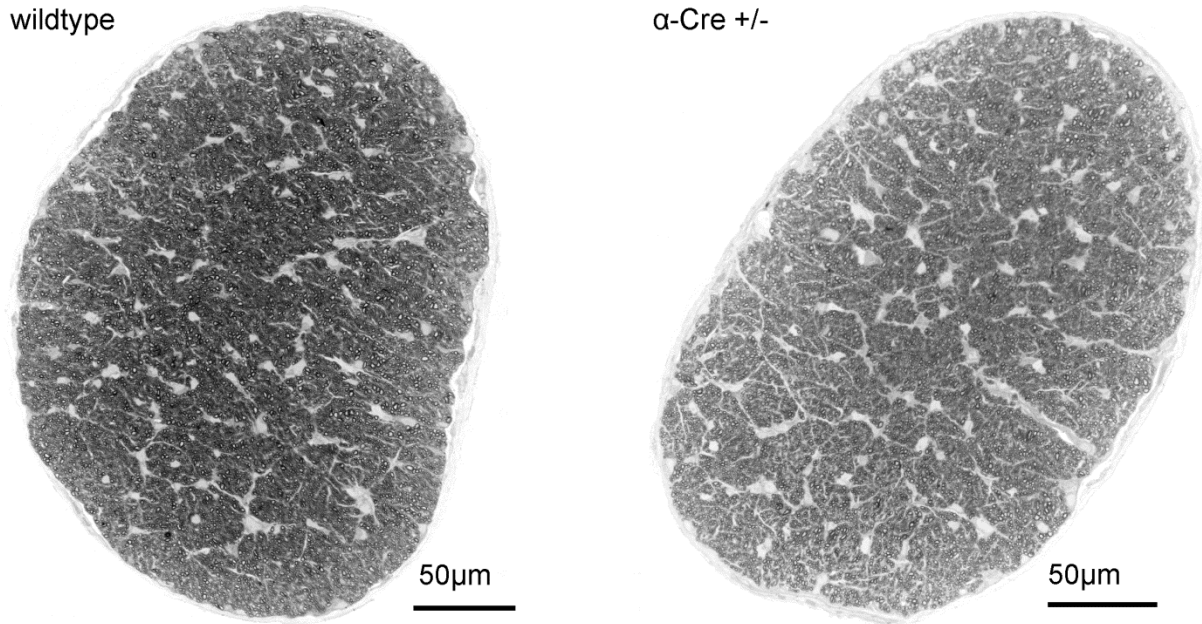


Abbildung 14 Phänotypanalyse der α - Cre +/- - Tiere

Sagittalschnitte der Sehnerven der α - Cre +/- - Mäuse mit den Wildtypieren (wildtype). Alter ein Monat.

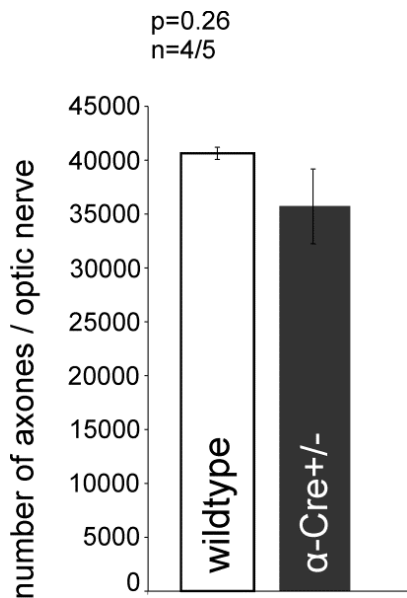


Abbildung 15 Statische Auswertung der Phänotypanalyse der α - Cre +/- - Tiere

Absolute Zahl der Axone/Sehnerv der α - Cre +/- verglichen mit den Wildtyp - Kontrolltieren (wildtype). Gezeigt sind Mittelwert \pm SEM; n=4/5, p=0,26.

Auch die Zählung der Axone der Retinalen Ganglienzellen ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den α - Cre - Mäusen und den Wildtyp - Kontrolltieren ($p=0.26$). Die Anzahl der Axone lag bei den Wildtypen durchschnittlich bei $40.645,5 \pm 563$ (Mittelwert \pm SEM) Axonen/Sehnerv und bei den transgenen Tieren bei $35.721,2 \pm 3478$ (Mittelwert \pm SEM) Axonen/Sehnerv (Abb. 15).

III.4 Phänotypanalyse der Sagittalschnitte der Augen der $\text{Smad7}^{\Delta\text{oc}}$ - Tiere

Zum Nachweis eines möglichen Effektes durch die Smad7 - Deletion wurden Sagittalschnitte der Augen von sieben Wochen alten $\text{Smad7}^{\Delta\text{oc}}$ - Tieren zur Beurteilung struktureller Veränderungen herangezogen. Es konnten keine strukturellen Veränderungen in den Sagittalschnitten der Augen verzeichnet werden (Abb. 16). Auch die mit abgebildete detaillierte Aufnahme der Retina zeigte keine strukturellen Veränderungen zwischen Tieren mit einer konditionellen Deletion von Smad7 ($\text{Smad7}^{\Delta\text{oc}}$) und ihren Kontrollgeschwistertieren (control).

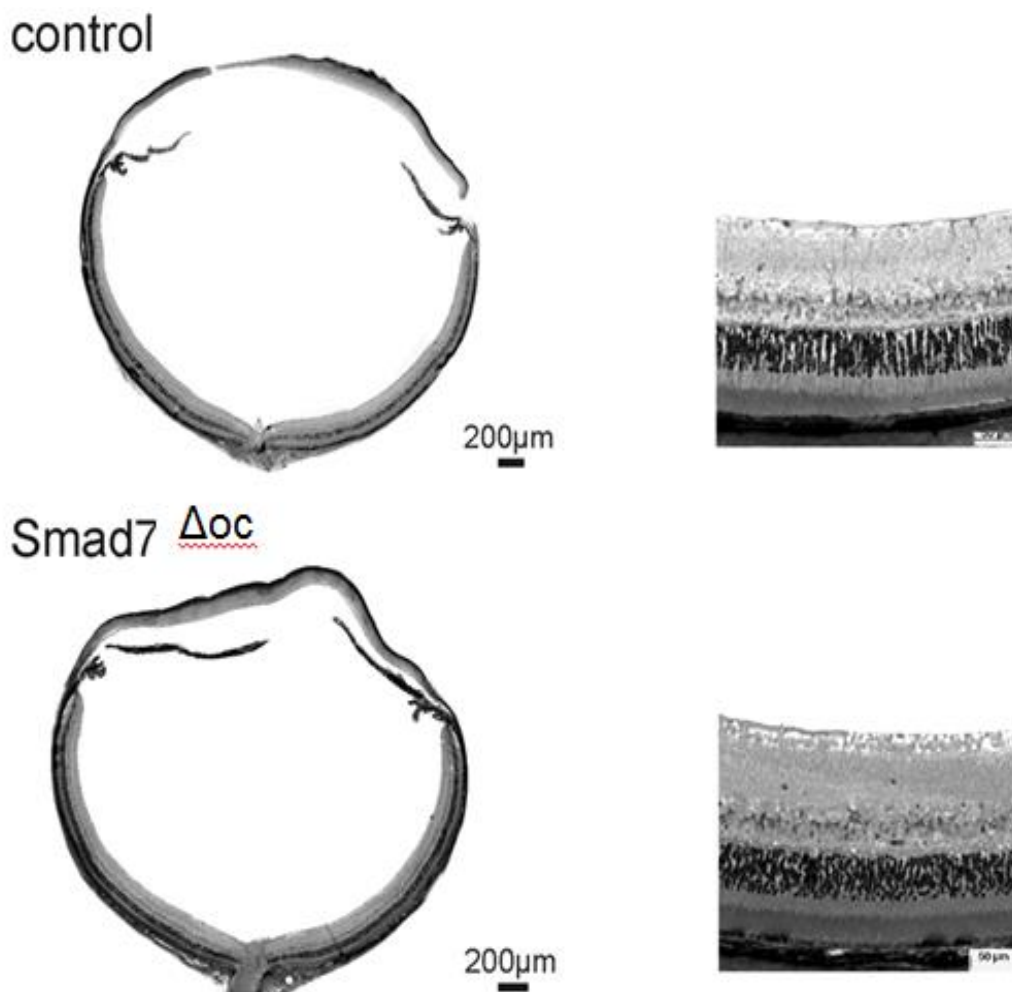


Abbildung 16 Phänotypanalyse der Sagittalschnitte der Augen der $\text{Smad7}^{\Delta\text{oc}}$ - Tiere
 Phänotyp der $\text{Smad7}^{\Delta\text{oc}}$ - Tiere ($\text{Smad7}^{\Delta\text{oc}}$) verglichen mit Kontrollgeschwistertieren (control), Alter sieben Wochen. Links Panoramaaufnahme ohne Nachweis struktureller Veränderungen. Rechts Retina (Vergrößerung 20 x) ohne Nachweis struktureller Veränderungen. Durchgeführt in Zusammenarbeit mit Dr. Barbara Braunger, Universität Regensburg

III.5 Phänotypanalyse der $\text{Smad7}^{\Delta\text{oc}}$ - Tiere anhand der Angiographie

Um die Frage beantworten zu können, ob die Smad7 - Deletion und damit das verstärkte $\text{TGF} - \beta$ - Signal einen Effekt auf die Gefäßsituation der Augen hat, ist eine Angiographie an den adulten $\text{Smad7}^{\Delta\text{oc}}$ - Mäusen und an den adulten Kontrollmäusen durchgeführt worden. Abbildung 17 zeigt links die nativen Fundusaufnahmen der Augen und rechts die Fluoreszenzangiographie der Augen der Kontrollmäuse und der $\text{Smad7}^{\Delta\text{oc}}$ - Mäuse.

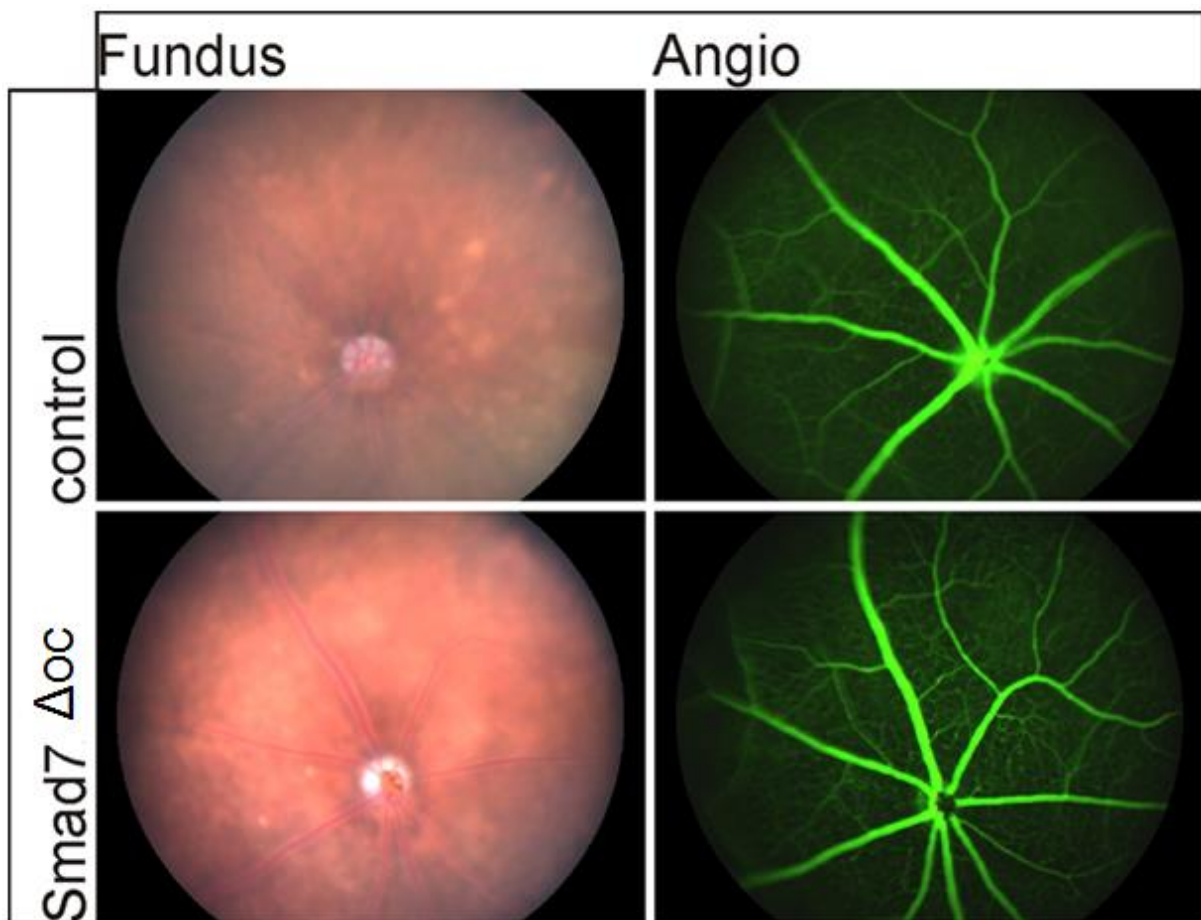


Abbildung 17 Phänotypanalyse der $\text{Smad7}^{\Delta\text{oc}}$ - Tiere anhand der Angiographie

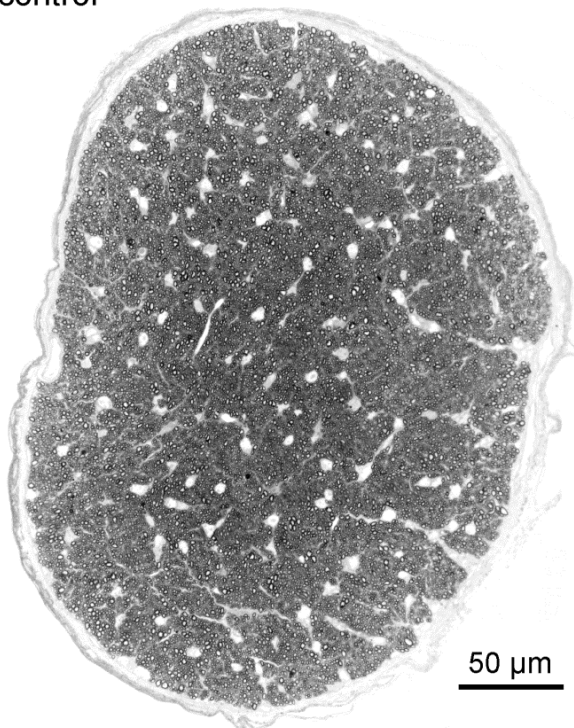
Phänotypaufnahmen von $\text{Smad7}^{\Delta\text{oc}}$ - Tieren ($\text{Smad7}^{\Delta\text{oc}}$) verglichen mit adulten Kontrollgeschwistermäusen (control) anhand von Fundusaufnahmen (links) und angiographischen Aufnahmen (rechts), physiologischer Normalbefund, Alter sechs Monate. Durchgeführt in Zusammenarbeit mit Dr. Cornelia Volz und Prof. Dr. Herbert Jägle, Universitätsklinikum Regensburg.

Es ließen sich auch hier keine strukturellen Unterschiede nachweisen. Sowohl die dargestellten Fundus- als auch die Angiographieaufnahmen entsprachen physiologischen Normalbefunden. Aus dem erhöhten $\text{TGF} - \beta$ - Signal ergaben sich somit keine Veränderungen in der Gefäßsituation.

III.6 Phänotypanalyse der Nn. optici der Konditionellen Deletion von Smad7

Abbildung 18 zeigt Semidünnschnitte von acht Wochen alten Tieren. Phänotypisch ließen sich bereits Unterschiede erkennen: Smad7^{Δoc} - Tiere wiesen weniger ausgebildetes Gliagewebe auf und eine höhere Dichte an Axonen. Die quantitative Auswertung bestätigte dies. Smad7 - Deletionstiere haben eine signifikant höhere Anzahl an Axonen im Vergleich zu ihren Kontrollgeschwistertieren ($p=0.02$). Der Mittelwert der Axone/Sehnerv liegt bei den Kontrollen bei $40.345,9 \pm 2285$ (Mittelwert \pm SEM) und bei den Smad7 - Deletionstieren bei $47.777,5 \pm 892$ (Mittelwert \pm SEM)(Abb. 19).

control



Smad7^{Δoc}



Abbildung 18 Phänotypanalyse der Nn. optici der Konditionellen Deletion von Smad7 (Smad7^{Δoc}), Alter acht Wochen

Semidünnschnitte der Sehnerven der Smad7 - Deletion (Smad7^{Δoc}) verglichen mit den Kontrollgeschwistertieren (control) von acht Wochen alten Tieren. Smad7^{Δoc} - Tiere weisen weniger ausgebildetes Gliagewebe auf und eine höhere Dichte an Axonen.

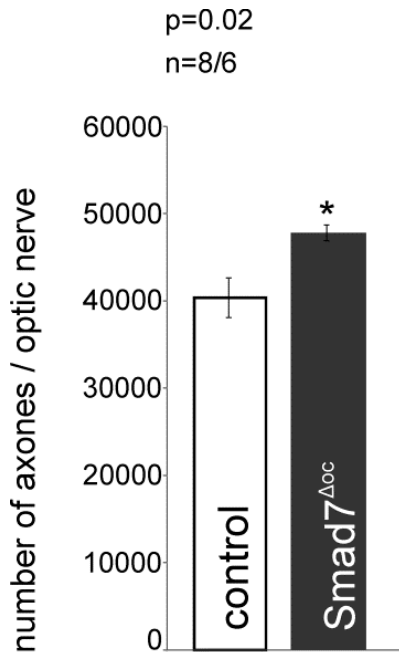


Abbildung 19 Statistische Auswertung der Phänotypanalyse der Nn. optici der Konditionellen Deletion von Smad7 (Smad7^{Δoc}), Alter acht Wochen

Absolute Anzahl der Axone/Sehnerv der acht Wochen alten Tiere der Konditionellen Deletion (Smad7^{Δoc}) verglichen mit den Kontrollgeschwistertieren (control). Gezeigt sind Mittelwert \pm SEM; n=8/6, p=0.02.

Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um einen stabilen Befund handelte und um mögliche degenerative Veränderungen im weiteren Verlauf auszuschließen, wurden zusätzlich die Sehnerven von sechs Monate alten Tieren untersucht. Auch die adulten Tiere im Alter von sechs Monaten zeigten eine signifikant höhere Anzahl an Axonen (p=0.004) bei den transgenen Tieren (Smad7^{Δoc}) im Vergleich zu ihren Kontrollgeschwistertieren (control) (Abb. 21), die sich auch phänotypisch unterschieden (Abb. 20). Die Kontrollen lagen mit dem Mittelwert von $33.064,8 \pm 1170$ (Mittelwert \pm SEM) Axonen/Sehnerv deutlich niedriger als die Deletionstiere mit einem Mittelwert von $49.866,7 \pm 1897$ (Mittelwert \pm SEM) Axone/Sehnerv.

Damit resultierte aus dem erhöhten TGF- β -Signal eine höhere Anzahl an Axonen bei den Mäusen mit einer konditionellen Smad7-Deletion.

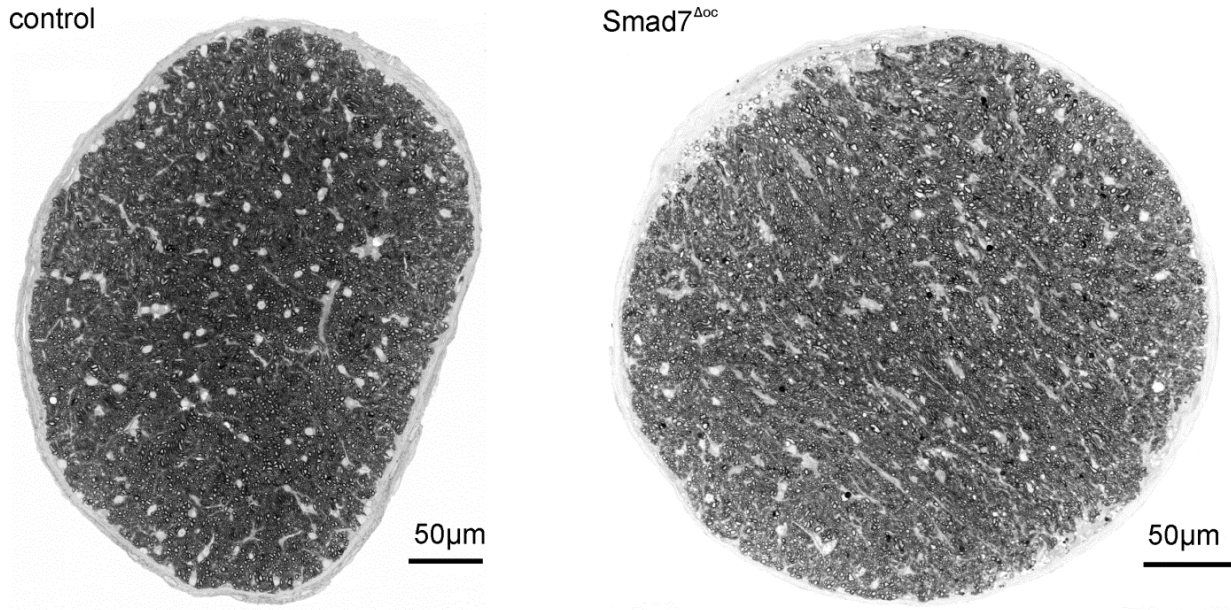


Abbildung 20 Phänotypanalyse der Nn. optici der Konditionellen Deletion von Smad7 ($Smad7^{\Delta oc}$), Alter sechs Monate

Semidünnschnitte der Sehnerven der Konditionellen Deletion von Smad7 ($Smad7^{\Delta oc}$) verglichen mit den Kontrollgeschwistertieren (control) von sechs Monate alten Tieren. $Smad7^{\Delta oc}$ -Tiere weisen ein geringer ausgeprägtes Gliagewebe auf und eine höhere Dichte an Axonen.

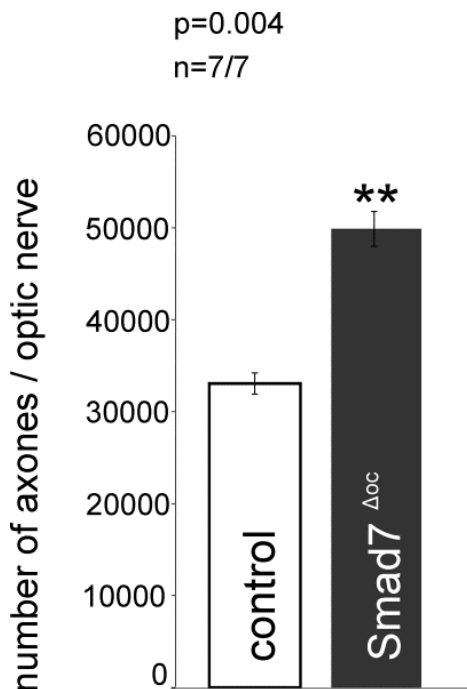


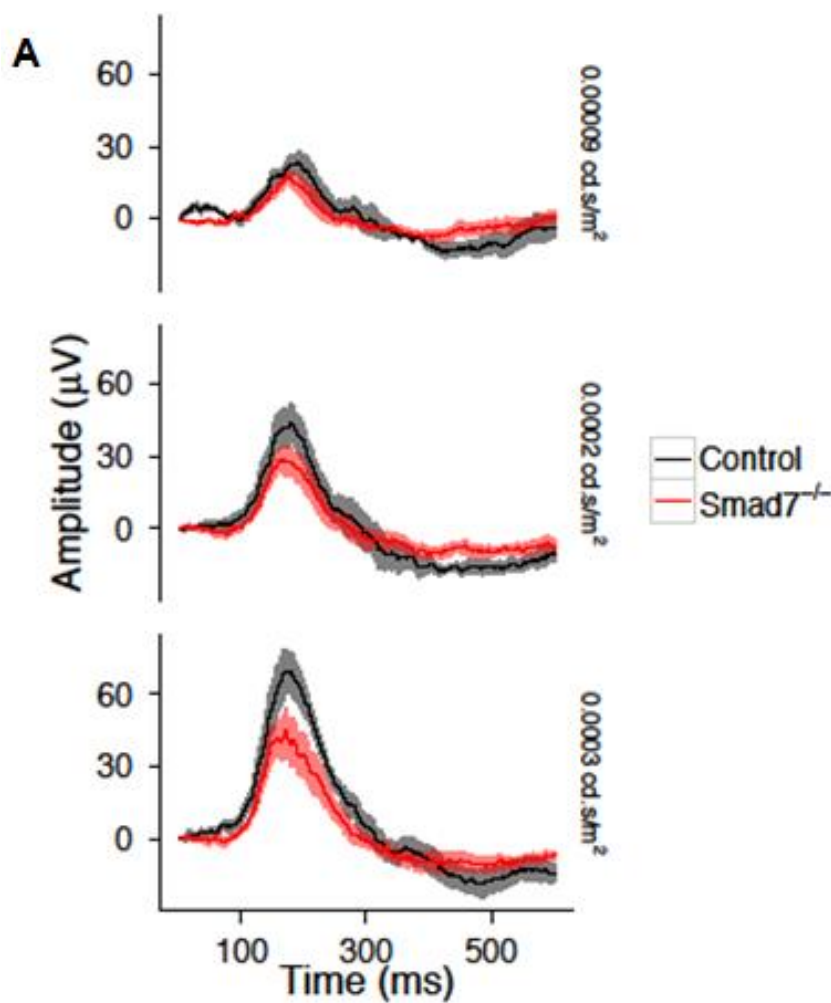
Abbildung 21 Statistische Auswertung der Phänotypanalyse der Nn. optici der Konditionellen Deletion von Smad7 ($Smad7^{\Delta oc}$), Alter sechs Monate

Absolute Anzahl der Axone/Sehnerv von sechs Monate alten Tieren der Smad7 - Deletion ($Smad7^{\Delta oc}$) verglichen mit den Kontrollgeschwistertieren (control). Gezeigt sind Mittelwert \pm SEM; n=7/7, p=0.004

Um zu überprüfen, ob eine erhöhte Anzahl an Retinalen Ganglienzellen auch in einer verbesserten retinalen Funktion mündete, wurden in Kooperation mit Prof. Dr. H. Jägle (Universitätsklinikum Regensburg) funktionelle Elektretinographie (ERG) - Untersuchungen durchgeführt.

III.7 Funktionelle Analyse der Konditionellen Deletion von Smad7 mittels Elektretinographie

Um auch die Funktionalität der Retinalen Ganglienzellen bei den Smad7 - Knockouttieren beurteilen zu können, wurden scotopic threshold response (STR) - Elektretinographien durchgeführt.



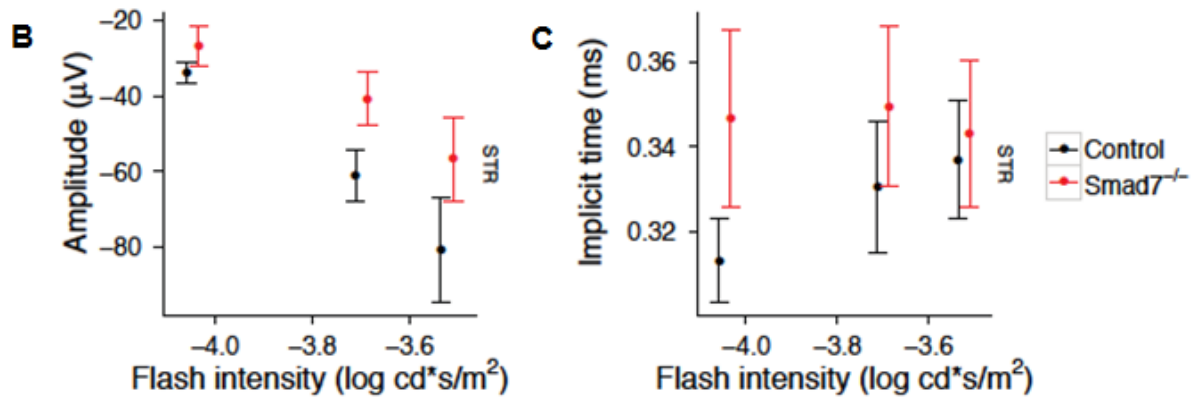


Abbildung 22 STR - Elektroretinographie

Auswertung der funktionellen Analyse der Konditionellen Deletion von Smad7 (Smad7^{-/-} = (Smad7^{Δoc})) verglichen mit den Kontrollgeschwistertieren (control). **A.** Exemplarische Darstellung der STR - erg - Antworten bei unterschiedlicher Belichtungsintensität. Diese Signale zeigen bei der konditionellen Smad7 - Deletion (Smad7^{-/-} = (Smad7^{Δoc})) einen geringeren Peak und eine Erhöhung des Tiefenpunktes der Amplitude. **B.** Auswertung STR. Smad7^{Δoc} - Tiere zeigen eine geringere Amplitude. **C.** Auswertung der implicit time. Smad7^{Δoc} - Tiere zeigen eine verlängerte implicit time. Angefertigt in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Herbert Jägle, Universitätsklinikum Regensburg.

Abbildung 22 (A) zeigt die Kurvenverläufe der STR - Signale der dunkeladaptierten Augen. Diese, durch sehr kurze Lichtimpulse geringer Intensität, hervorgerufenen Signale, zeigten bei der konditionellen Smad7 - Deletion (Smad7^{-/-} = (Smad7^{Δoc})) einen geringeren Peak und eine Erhöhung des Tiefenpunktes der Amplitude. Abbildung 22 (B) zeigt die statistische Auswertung der STR - ERGs. Smad7^{Δoc} - (Smad7^{-/-}) Tiere zeigten eine geringere Amplitude und eine verlängerte implicit time.

III.8 Phänotypanalyse der Konditionellen Deletion von Smad7 im Schadensmodell

Um eine mögliche neuroprotektive Wirkung des TGF- β - Signalwegs auf Retinale Ganglienzellen im adulten Tier untersuchen zu können, wurde ein exzitotoxischer Zelltod der Retinalen Ganglienzellen und Amakrinen Zellen durch intravitreale Injektion von NMDA induziert (vgl. I. 10).

Die Morphologie der Nn. optici ist anhand von sagittalen Semidünnschnitten lichtmikroskopisch untersucht worden. Die PBS - injizierten Augen zeigten im Vergleich zu den NMDA - injizierten Augen deutliche Unterschiede: das Gliagewebe war bei den NMDA - injizierten Augen vermehrt vorhanden und die Axone erschienen lockerer gepackt und weniger zahlreich vorhanden (Abb. 23). Diese Veränderungen zeigten sich unabhängig vom

Genotyp bei den Kontrollgeschwistertieren gleichermaßen wie bei den Smad7 - Deletionstieren (Abb. 25). Die morphologischen Veränderungen bestätigten sich auch in der Auszählung der Axone der Nn. optici: bei den Kontrollgeschwistertieren waren bei den PBS - injizierten Augen mit 39690 ± 1388 (Mittelwert \pm SEM) Axonen/Sehnerv hochsignifikant ($p < 0,001$) mehr Axone als bei den NMDA - injizierten Augen mit 17749 ± 476 (Mittelwert \pm SEM) Axonen/Sehnerv vorhanden (Abb. 24). Bei der Smad7 - Gruppe waren die Axone der PBS - injizierten Augen mit 48355 ± 1450 (Mittelwert \pm SEM) Axonen/Sehnerv ebenfalls hochsignifikant höher ($p < 0,001$) als die NMDA - injizierten Augen mit 18191 ± 529 (Mittelwert \pm SEM) Axonen/Sehnerv (Abb. 26). Die Ergebnisse sprechen für eine Degeneration der Axone und bestätigen die Effizienz des gewählten Schadensmodells in beiden Gruppen.

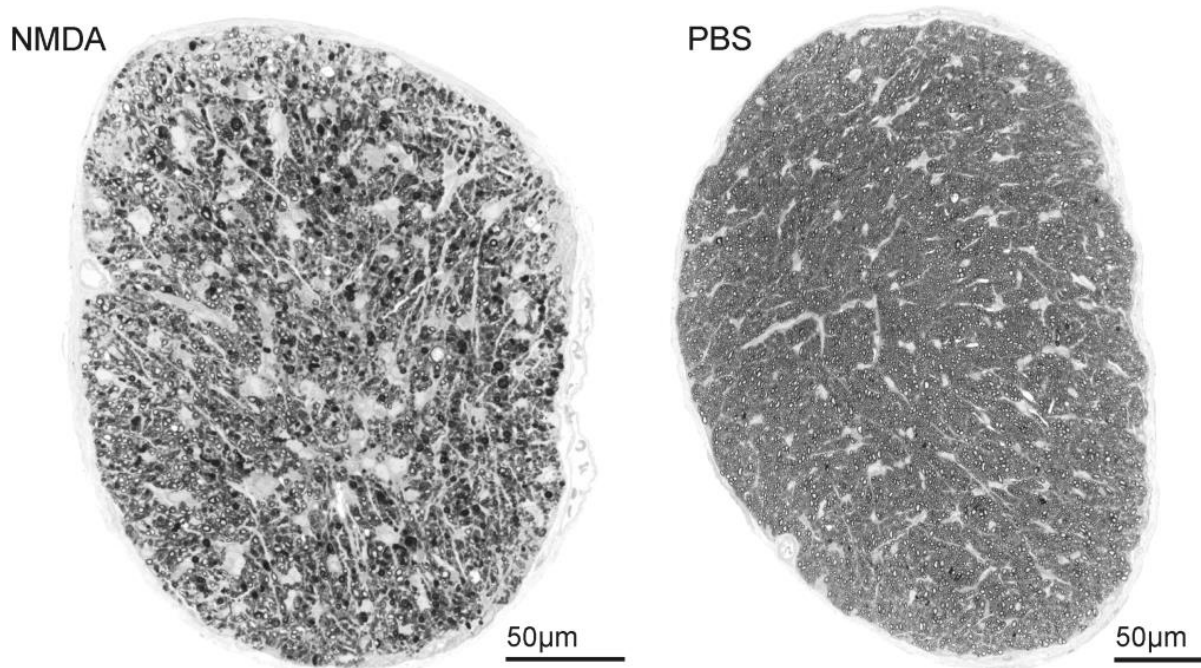


Abbildung 23 Phänotypanalyse der Kontrollgeschwistertiere im NMDA - Schadensmodell

Semidünnschnitte der Sehnerven von Kontrollgeschwistertieren (control) im NMDA - Schadensmodell; Vergleich von NMDA - injizierten Augen und den PBS - injizierten Augen der Kontrollgeschwister. Das Gliagewebe ist bei den NMDA - injizierten Augen (NMDA) vermehrt vorhanden und die Axone erscheinen lockerer gepackt und weniger zahlreich vorhanden.

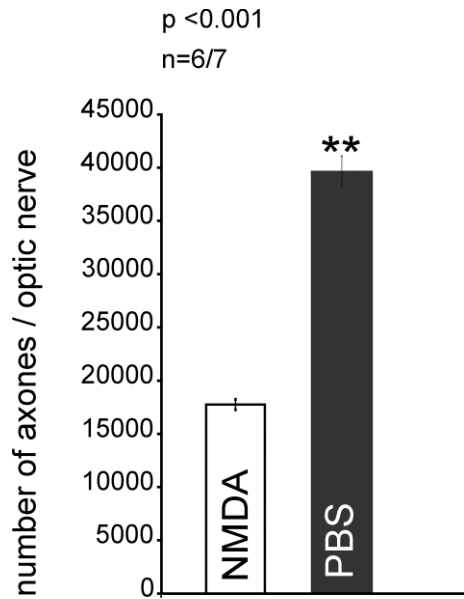


Abbildung 24 Statistische Auswertung der Kontrollgeschwistertiere im NMDA - Schadensmodell

Absolute Zahl der Axone/Sehnerv von NMDA - injizierten Augen verglichen mit PBS - injizierten Augen der Kontrollgeschwistertiere (control). Gezeigt sind Mittelwert \pm SEM; n=6/7, p<0.001.

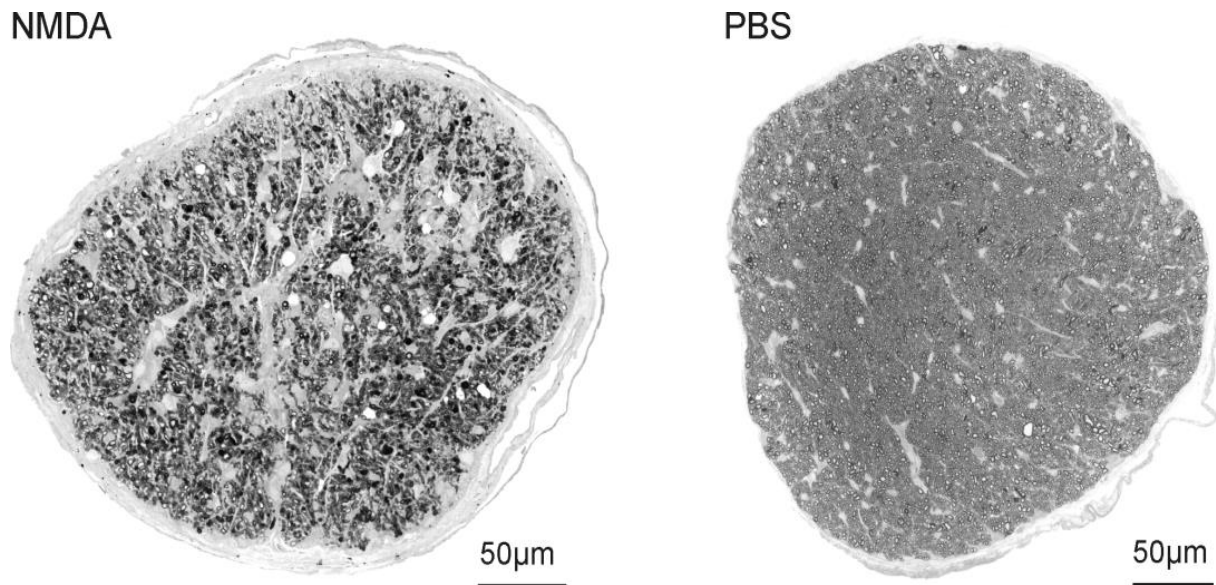


Abbildung 25 Phänotypanalyse der Smad7 - Deletionsgruppe im NMDA - Schadensmodell

Semidünnschnitte der Sehnerven der Smad7 - Deletion ($Smad7^{AOC}$) im NMDA - Schadensmodell; NMDA - injizierte Augen verglichen mit PBS - injizierten Augen der Smad7 - Deletionsgruppe. Das Gliagewebe ist bei den NMDA - injizierten Augen vermehrt vorhanden und die Axone erscheinen lockerer gepackt und weniger zahlreich vorhanden.

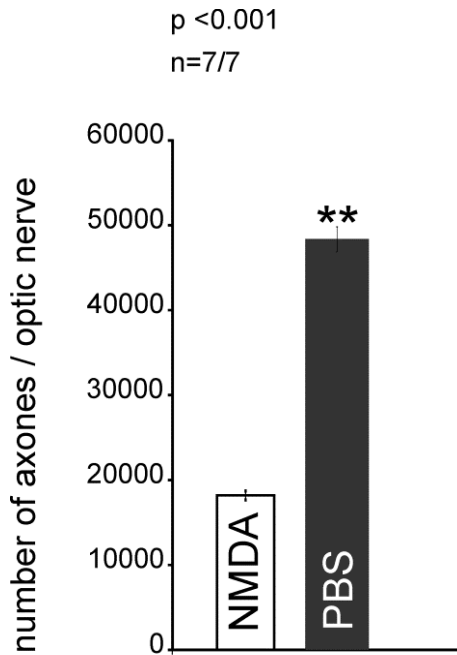


Abbildung 26 Statistische Auswertung der Smad7 - Deletionsgruppe im NMDA - Schadensmodell

Absolute Zahl der Axone/Sehnerv der Smad7 - Deletion ($Smad7^{\Delta oc}$) im NMDA - Schadensmodell; NMDA -injizierte Augen verglichen mit PBS - injizierten Augen der Smad7 - Deletionsgruppe. Gezeigt sind Mittelwert \pm SEM; $n=7/7$, $p<0.001$.

Nach durchgeführter Prüfung der Funktionalität des Schadensmodells erfolgte anschließend der Vergleich der Kontrollgeschwistertiere und der Smad7 - Deletionstiere im NMDA - Schadensmodell und in der PBS - Kontrolle.

Die NMDA - injizierten Augen der Smad7 - Deletion ($Smad7^{\Delta oc}$) zeigten mit 20769 ± 529 (Mittelwert \pm SEM) eine hochsignifikant ($p=0,003$) höhere Anzahl an Axonen/Sehnerv im Vergleich zu den Kontrollgeschwistertieren (control) mit 17749 ± 476 (Mittelwert \pm SEM) Axonen/Sehnerv (Abb. 28), was sich auch in der lichtmikroskopischen Untersuchung der Semidünnschnitte phänotypisch zeigte (Abb. 27).

control

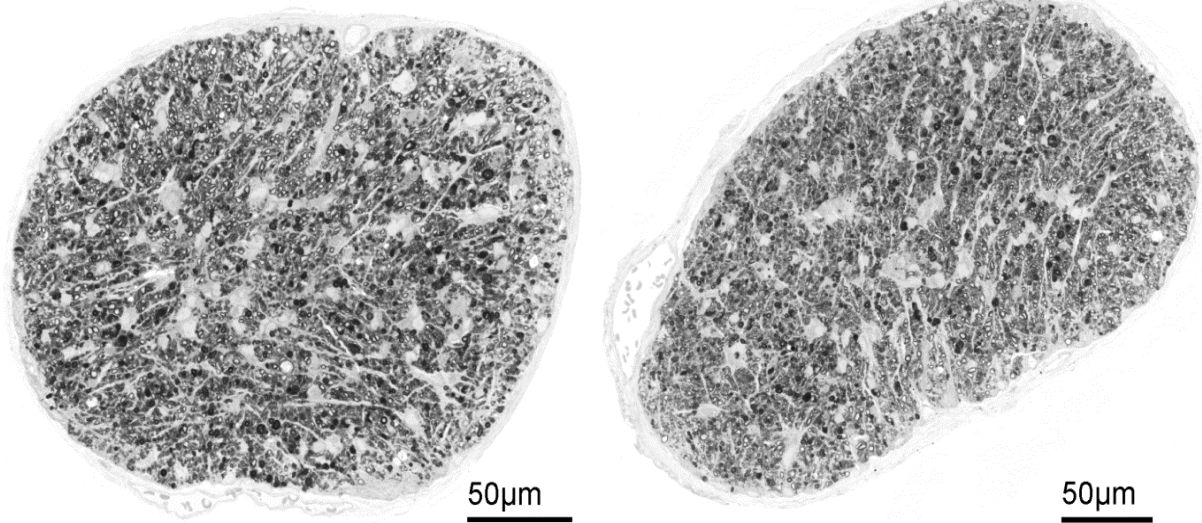
Smad7^{Δoc}

Abbildung 27 Phänotypanalyse der NMDA - injizierten Nn. optici der Smad7 - Deletionsgruppe und der control - Gruppe im NMDA - Schadensmodell

Semidünnschnitte von Sehnerven der NMDA - injizierte Augen von Kontrollgeschwistertieren (control) verglichen mit NMDA - injizierten Augen der Smad7 - Deletion (Smad7^{Δoc}). NMDA - injizierte Smad7^{Δoc} - Sehnerven zeigen weniger Gliagewebe und dichter gepackte Axone als die NMDA - injizierten Sehnerven der Kontrollgeschwistertiere (control).

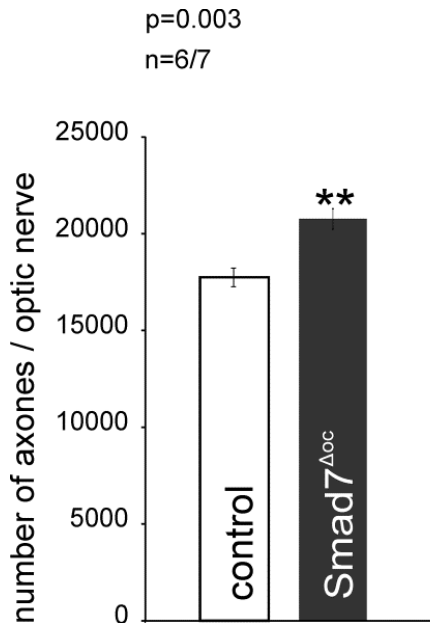


Abbildung 28 Statistische Auswertung der NMDA - injizierten Nn. optici der Smad7 - Deletionsgruppe und der control - Gruppe im NMDA - Schadensmodell

Absolute Zahl der Axone/Sehnerv der NMDA - injizierte Augen von Kontrollgeschwistertieren (control) verglichen mit NMDA - injizierten Augen der Smad7 - Deletion (Smad7^{Δoc}). Gezeigt sind Mittelwert ± SEM); n=6/7, p=0.003

Auch die PBS - injizierten Augen zeigten die gleichen Veränderungen: eine hochsignifikant ($p=0,003$) höhere Anzahl an Axonen in der Auszählung bei der Smad7 - Deletion ($\text{Smad7}^{\Delta\text{oc}}$) mit 48355 ± 1450 (Mittelwert \pm SEM) verglichen mit der Kontrollgruppe (control) mit 39690 ± 1388 (Mittelwert \pm SEM) Axonen/Sehnerv (Abb. 30). Phänotypisch zeigten sich dichter gepackte Axone und weniger Gliagewebe bei den Smad7 - Deletionstieren (Abb. 29).

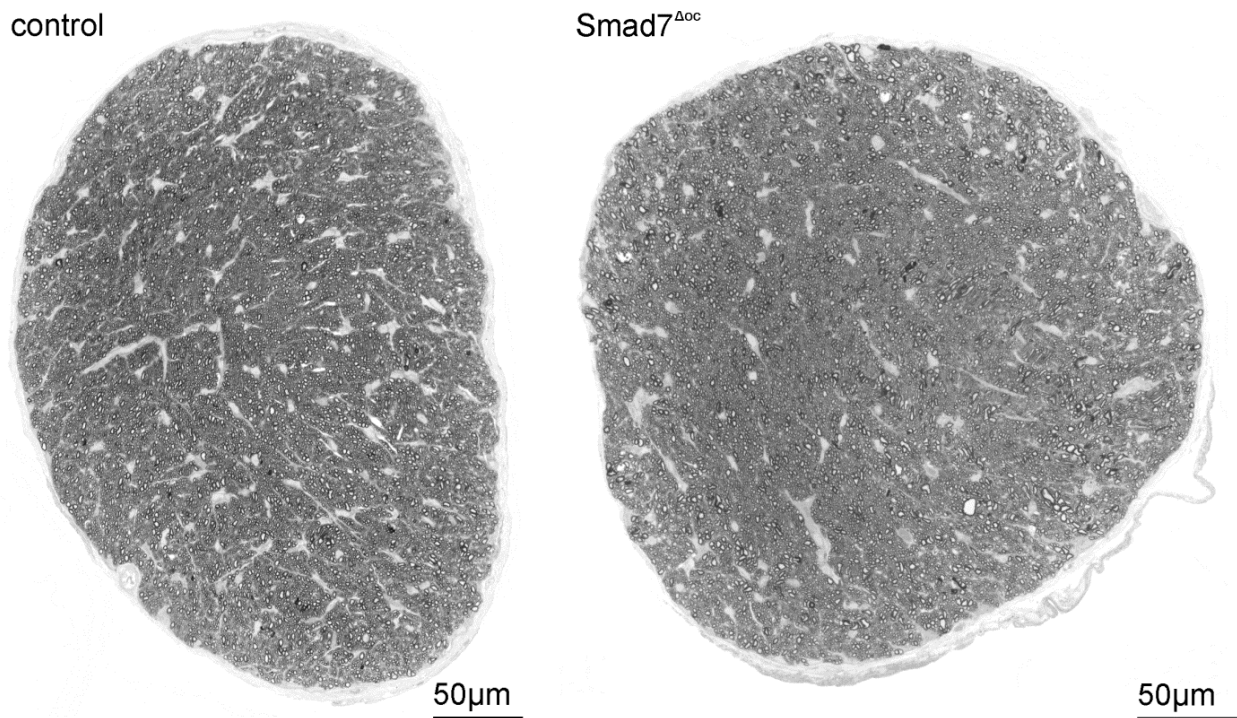


Abbildung 29 Phänotypanalyse der PBS - injizierten Nn. optici der Smad7 - Deletionsgruppe und der control - Gruppe im NMDA - Schadensmodell

PBS - injizierte Augen der Kontrollgeschwistertiere (control) verglichen mit PBS - injizierten Augen der Smad7 - Deletionstiere ($\text{Smad7}^{\Delta\text{oc}}$). Es zeigen sich dichter gepackte Axone und weniger Gliagewebe bei den Smad7 - Deletionstieren ($\text{Smad7}^{\Delta\text{oc}}$)

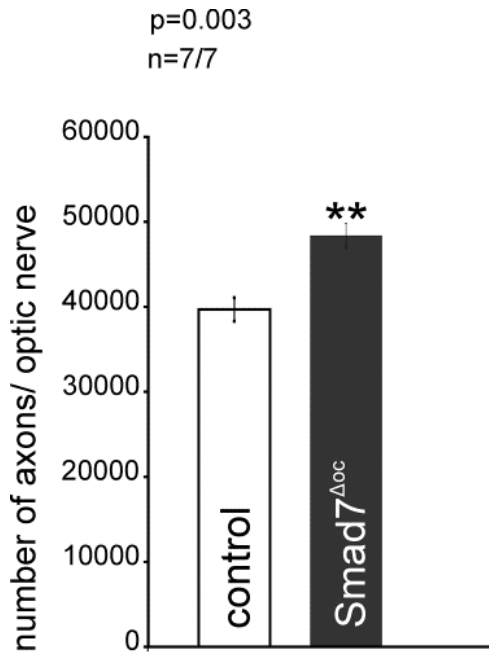


Abbildung 30 Statistische Auswertung der PBS - injizierten Nn. optici der Smad7 - Deletionsgruppe und der control - Gruppe im Schadensmodell

Absolute Zahl der Axone/Sehnerv der PBS - injizierte Augen der Kontrollgeschwistertiere (control) verglichen mit PBS - injizierten Augen der Smad7 - Deletionstiere (Smad7^{Δoc}). Gezeigt sind Mittelwert ± SEM; n=7/7, p=0.003.

Um eine Aussage über einen möglichen schützenden Effekt durch TGF - β machen zu können, mussten die PBS - und für die NMDA - injizierten Augen auf gleiche Ausgangsbedingungen normiert werden, da die Kontrollgruppe zu Beginn der Versuche weniger Axone hatte als die Smad7 - Gruppe. Weil die PBS - Injektion auch schon einen leicht negativen Effekt auf die Proliferation der Retinalen Ganglienzellen vermuten ließ, wurden die hier gezeigten Ergebnisse nicht auf die unbehandelten, sondern auf die PBS - Werte des Partnerauges normiert.

$$\frac{\text{Axone nach NMDA} \times 100}{\text{Axone nach PBS}} \quad [\%]$$

Die Anzahl der überlebenden Axone nach der Normierung auf die Ausgangswerte ergab folgendes Ergebnis: Smad7 - Deletionstiere zeigten mit $43,2 \pm 1,66$ (Mittelwert ± SEM) keinen signifikanten ($p=0.81$) Unterschied zu ihren Kontrollgeschwistertieren mit $43,8 \pm 1,79$ (Mittelwert ± SEM) im Schadensmodell (Abb. 31).

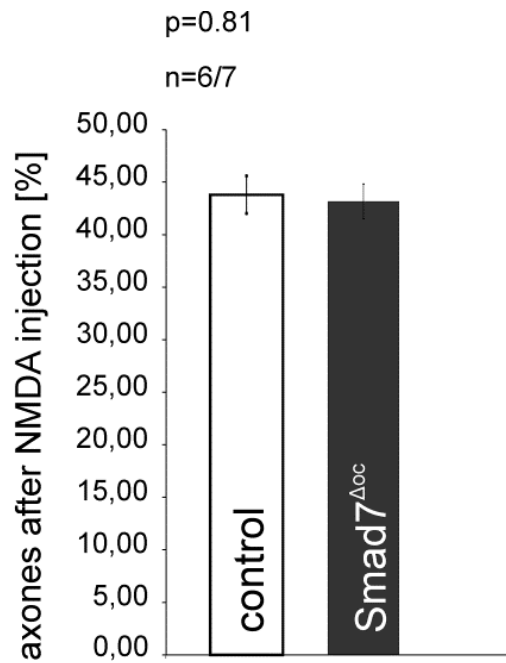


Abbildung 31 Statistische Auswertung der überlebenden Axone im NMDA - Schadensmodell

Die Anzahl der überlebenden Axone/Sehnerv nach der Normierung auf die Ausgangswerte (PBS - Werte). Kontrollgeschwistertiere (control) verglichen mit den Smad7 - Deletionstieren (Smad7^{Δoc}). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM; n=6/7, p=0.81.

IV. Diskussion

IV.1 Konditionelle Deletion von Smad7

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von TGF- β auf das Überleben Retinaler Ganglienzellen in adulten Tieren untersucht werden. Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe erbrachten bereits einen positiven Effekt des verstärkten TGF- β -Signals auf Retinale Ganglienzellen während der embryonalen Entwicklung. [72, 18] So zeigte S. Pielmeier entgegen der bisherigen Meinung zum ontogenetischen Zelltod in der Retina, dass TGF- β einen protektiven Effekt auf die Neurone der Retina während des ontogenetischen Zelltodes hat und untersuchte apoptotische Zellen in der Retina von Jungtieren an Tag d 4, d 7 und d 10 nach der Geburt. [72] C. Demmer zeigte ebenfalls den positiven Effekt von TGF- β in retinalen Neuronen und untersuchte die Retina auf apoptotische Zellen am Embryonaltag E 12.5, E 14.5 und E 16.5. [18]

Da Smad7 einen inhibierenden Effekt auf den TGF- β -Signalweg über die Hemmung der Phosphorylierung von Smad2/3 hat [63], wurde durch die Konditionelle Deletion von Smad7 ein verstärktes TGF- β -Signal erwartet. Dafür wurden in der vorliegenden Arbeit transgene Mäuse mithilfe des Cre-loxP-Rekombinationssystems gezüchtet, welche spezifisch nur in retinalen Neuronen und Müllerzellen eine Inhibition von Smad7 hatten. Die Konditionelle Deletion von Smad7 konnte mithilfe von Westernblotanalysen und immunhistochemischen Analysen über die Verstärkung des pSmad3-Signals bestätigt werden.

Publizierte Daten anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass eine Expression der Cre-Rekombinase in Photorezeptoren zu einer retinalen Degeneration und Dysfunktion mit u. a. einer Atrophie des Retinalen Pigmentepithels und einer Dysfunktion der Photorezeptoren führt. [94] Außerdem kann die Cre-Rekombinase in sehr hoher Konzentration chromosomale Neuordnungen und Aberrationen in Säugetierzellen entstehen lassen, die durch sog. „Pseudo-loxP-sites“ [82] hervorgerufen werden. [60] Um eine mögliche Beeinflussung unserer Ergebnisse allein durch die Expression der Cre-Rekombinase auszuschließen, wurde zunächst die Morphologie der in dieser Arbeit verwendeten Cre-Maus (α -Cre +/-) mit ihren wildtypischen Geschwistertieren verglichen und zusätzlich morphometrisch die Anzahl der Axone im Sehnerv bestimmt. Es konnte hierbei kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. So gehen wir davon aus, dass die in

dieser Arbeit erzielten Befunde unter Verwendung dieser α -Cre-Maus zur Generierung einer konditionellen Deletion von Smad7 in retinalen Neuronen und Müllerzellen, spezifisch für die konditionelle Deletion von Smad7 sind.

Dem TGF- β -Signalweg werden sowohl pro- als auch anti-angiogene Eigenschaften zugeschrieben. [96, 99] In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass bei erwachsenen Mäusen mit einer systemischen TGF- β -Inhibition durch lösliches Endoglin Veränderungen in der Retina auftreten. [99] Endoglin ist ein akzessorischer Rezeptor für TGF- β . [55] Es interagiert negativ mit ALK5 und wird in aktivierten Endothelzellen exprimiert. [55] Die Arbeitsgruppe um Patricia D'Amore konnte hierbei neben Störungen der Blut-Retina-Schranke, Leckagen und minderperfundierten Gefäßen auch ultrastrukturelle Veränderungen in Zellkontakten (tight junctions) zwischen Endothelzellen und Perizyten zeigen und zudem Kernkondensationen als Zeichen der Apoptose. [99] Um eine mögliche Veränderung der retinalen Gefäße, ausgelöst durch das desinhibierte TGF- β -Signal in den Smad7-Deletionstieren, erfassen zu können, wurden Fundusaufnahmen und Fluoreszenzangiographien angefertigt. In den vorliegenden Untersuchungen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen zwischen den Smad7-Deletionstieren und den Kontrollgeschwistertieren. Ein zu erwartender Befund, da die Desinhibition des TGF- β -Signalwegs in dem gewählten Tiermodell auf retinale Neurone und Müllergliazellen beschränkt war, nicht jedoch Zellen des Gefäßsystems betraf (Endothelzellen, perivaskuläre Zellen). Potentiell denkbar wären jedoch indirekte Effekte, z. B. durch einen gesteigerten TGF- β -Signalweg in Müllergliazellen, welche wiederum Moleküle sezernieren können, die den Gefäßstatus beeinflussen. [90, 21, 30] Möglicherweise hat zwar ein vermindertes oder gestörtes TGF- β -Signal einen negativen Effekt auf die Gefäßsituation, da hier Faktoren wie NO (Stickstoffmonoxid), ein vasoaktives Molekül, ebenso vermindert sind und auf diese Weise zu einer Dysregulation in der Gefäßformation und -funktion führen. [99] Das erhöhte TGF- β -Signal dagegen wird die Freisetzung von NO aus dem Endothel nicht unbegrenzt induzieren, da dieser Freisetzungsmechanismus einer Autoregulation [99] unterliegt. Eine zu hohe Konzentration an NO im Gefäßsystem eines gesunden Auges könnte zu einer unphysiologischen Gefäßpermeabilität führen und so durch eine Ödembildung im Gefäßbett wiederum einen Schaden induzieren.

Die phänotypischen Untersuchungen der Smad7 - Deletion hingegen zeigten sowohl bei den Tieren im Alter von acht Wochen als auch bei den Tieren im Alter von sechs Monaten signifikante Veränderungen. Die Konditionelle Deletion von Smad7 und damit das verstärkte TGF - β - Signal führten zu einer signifikant höheren Anzahl an Axonen im N. opticus bei den acht Wochen alten Tieren und zu einer hochsignifikant höheren Anzahl bei den sechs Monate alten Tieren. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit weiteren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, die eine erniedrigte Apoptoserate in der Retina während der embryonalen und postnatalen Entwicklung bei einem desinhibierten TGF - β - Signal zeigten. [72, 18, 12] Dieser Effekt ist vermutlich durch die vermehrte Expression des neurotrophen Faktors NGF (nerve growth factor) bei Smad7 ^{Δ oc} - Mäusen vermittelt. [12] Andere Untersuchungen zeigten ebenfalls eine verbesserte Zusammenarbeit neurotropher Faktoren wie FGF - 2 (fibroblast growth factor - 2), NGF (nerve growth factor), NT - 3 (neurotrophine 3), GDNF (glial cell derived neurotrophic factor) und CNTF (ciliary neurotrophic factor) durch die Erhöhung von TGF - β . [51]

Außerdem zeigte unsere Arbeitsgruppe, dass im Umkehrschluss ein niedriges TGF - β - Signal eine höhere Apoptoserate während der retinalen Synaptogenese und der Proliferation von Vorläuferzellen hervorruft. [12] Weiterhin resultierte aus dem erniedrigten TGF - β - Signal ein Verlust von Retinalen Ganglienzellen und Neuronen in der inneren Körnerschicht in adulten Tieren. [12]

Zur Prüfung der Funktionalität der retinalen Neurone und der Retinalen Ganglienzellen im Besonderen sind STR - ERGs durchgeführt worden. Dabei zeigten die Smad7 ^{Δ oc} - Mäuse eine geringere Amplitude und eine verlängerte implicit time. Eine geringere Amplitude spricht für eine schlechtere Antwort der durch Belichtung angeregter Zellen. Bei der Amplitude (Spitze der b - Welle bis Tiefpunkt der a - Welle) handelte es sich um das gemessene Summenaktionspotenzial der Müllerzellen sowie der Bipolarzellen und durch die enge Verschaltung dieser Zellen mit den Retinalen Ganglienzellen damit auch um die Aktionspotenziale der Retinalen Ganglienzellen. Die implicit time ist die time - to - peak. [36] Die verlängerte implicit time spricht hier für eine spätere Antwort der angeregten Zellen auf den Belichtungsreiz. Damit war die Funktionalität der retinalen Neurone der Smad7 ^{Δ oc} - Mäuse schlechter als die der Geschwistertiere. Die vorliegende Ergebniskonstellation wirft die Frage auf, warum trotz erhöhter Axonenzahl der Smad7 ^{Δ oc} - Tiere die Funktion deren

retinaler Neurone schlechter war. Die Inhibierung von Smad7 und damit die verstärkte Aktivierung des TGF- β -Signalwegs, wie bereits diskutiert, führen möglicherweise zu einer erhöhten Synapsenbildung. Dies bewirkt wiederum eine bessere Neuritenaussprossung und ein mögliches, verstärktes Längenwachstum der Axone. [38] Eine kritische Betrachtung dieses Aspektes liefert unter der Berücksichtigung der vorliegenden Ergebnisse des STR-ERGs folgende Erklärung: Unter physiologischen Bedingungen kommt es während des ontogenetischen Zelltods zu einer Apoptose derer Neurone, die nicht fähig sind, synaptische Verbindungen zu ihren Nachbarzellen herzustellen. Durch ihre Funktionsbeeinträchtigung werden diese Nervenzellen selektiert. [73] Ein überschießendes, erhöhtes TGF- β -Signal wirkt aber eventuell genau hier durch gesteigerte Synaptogenese der Nervenzellen diesem Selektionsdruck entgegen. Dadurch überleben auch die Nervenzellen, die unter physiologischen Bedingungen während des ontogenetischen Zelltods aufgrund einer schlechteren Funktion selektiert worden wären. Diese funktionsbeeinträchtigten Nervenzellen könnten möglicherweise das schlechtere Ergebnis der Smad7^{Δoc}-Tiere in den durchgeführten STR-ERGs erklären, da sie während des ontogenetischen Zelltods nur überleben konnten, weil es ein unphysiologisch hohes TGF- β -Signal gegeben hat.

Zentrale Fragestellung der vorliegenden Doktorarbeit war, die Auswirkung des verstärkten TGF- β -Signals und der damit verbundenen anti-apoptotischen Wirkung während der Entwicklung nun im adulten Tier auf das Überleben Retinaler Ganglienzellen im NMDA-Schadensmodell zu untersuchen. Im vorliegenden NMDA-Schadensmodell zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der Smad7-Deletion und ihren Kontrollgeschwistertieren. Damit konnte ein neuroprotektiver Effekt durch eine gesteigerte Aktivität des TGF- β -Signalwegs im verwendeten Schadensmodell nicht nachgewiesen werden. Eine Erklärung dafür findet sich in der Existenz alternativer TGF- β -Signalwege. So ist eine negative Wirkung auf den TGF- β -Signalweg im Schadensfall über das Zusammenwirken von TGF- β auf Smad-unabhängigen Signalwegen mit anderen Faktoren des Zellzyklus wie GTPase Ras, die MAPKs (mitogen-activated protein kinases), p38 und JNKs (c-Jun N-terminal kinases) möglich. [6] Weiterhin ist Smad7 auch als positiver Effektor von TGF- β bereits beschrieben worden, sodass er am TGF- β -Rezeptor nicht als kompetitiver Inhibitor, sondern über alternative Signalwege als Aktivator von TGF- β fungiert. [6] Durch den Nachweis der erhöhten Phosphorylierung von Smad3 ist dies in dem

angewandten Tiermodell jedoch eher unwahrscheinlich. Denkbar wäre, dass gerade Smad7 möglicherweise nur im Schadensfall nicht hemmend, sondern aktivierend auf TGF- β wirkte und hier deshalb keinen schützenden Effekt durch TGF- β bewirken konnte. Andererseits könnte auch der implizierte Schaden durch NMDA so hoch gewesen sein, dass Reparaturmechanismen der Zelle nicht mehr greifen konnten. Der entstehende Schaden an Retinalen Ganglienzellen bei der NMDA - Injektion ist bereits als dosisabhängig beschrieben worden.[67, 59] Im Vergleich zu früheren Untersuchungen bezüglich dem dosisabhängigen NMDA - Schaden, entspricht die von uns verwendete NMDA - Dosis von 10 mM [85] einem sehr hohen Schaden mit einem hohen Verlust an Retinalen Ganglienzellen. [67] Heute weiß man, dass besonders Amakrine Zellen und Retinale Ganglienzellen auf Exzitotoxizität reagieren, da sie präferentiell NMDA - Typ - Glutamatrezeptoren exprimieren (siehe I. 10.) [86] Im Pathomechanismus unterscheidet sich das NMDA - Schadensmodell also gänzlich vom druckbedingten oder ischämischen Schadensmodell bei einer Glaukomerkrankung (siehe I. 9. 1). Bei diesem wird der Schaden an Neuronen des N. opticus schleichend gesetzt, sodass ein möglicher protektiver Effekt durch TGF- β noch wirken kann, gemeinsame Endstrecke ist jedoch in jedem Fall die Apoptose der Retinalen Ganglienzellen.

Da die TGF- β - Signalkaskade ein sehr weitreichender Signalweg ist und mit zahlreichen anderen Signalwegen interagiert [63], ist eine Aussage über seine Wirkung auf bestimmte Gewebe und seine Aktivierung oder Inhibierung im Schadensfall schwierig. In den vorliegenden Untersuchungen konnte für einen desinhibierten TGF- β - Signalweg kein protektiver Effekt auf Retinale Ganglienzellen im NMDA - Schadensmodell nachgewiesen werden.

IV.2 Ausblick

Nachdem in der vorliegenden Arbeit im unbehandelten Tier ein positiver Effekt der Konditionellen Deletion von Smad7 und damit eines vermehrten TGF- β - Signals in der Zelle auf die Anzahl Retinaler Ganglienzellen gezeigt werden konnte, werden weitere Untersuchungen auf dem Gebiet folgen müssen. Es werden weitere Zellzählungen von Axonen im NMDA - Schadensmodell notwendig sein, um zu klären, ob nicht ein geringerer Schaden der Zelle doch zu einer Neuroprotektion durch TGF- β führt, wie zum Beispiel bei

langsamen Schäden an Retinalen Ganglienzellen, die eher den physiologischen Bedingungen im Auge entsprechen. Dafür werden NMDA - Schadensversuche aufgebaut werden müssen, in denen Smad7 - Deletionstieren unterschiedliche Konzentrationen NMDA verabreicht werden. Auf diese Weise wird man einen möglichen Grenzwert festlegen können, den man auf die Höhe des notwendigen Schadens am Auge übertragen kann, bei dem neuroprotektive Mechanismen durch TGF - β noch greifen können. Auch die Verwendung anderer Schadensmodelle, die vergleichbar zur Glaukomerkrankung eine Apoptose Retinaler Ganglienzellen hervorrufen, wäre denkbar. Hier wären Mikrobeadinjektionen möglich, welche zu einer Druckerhöhung führen, oder das optic - nerve - crush - Modell, oder ein genetischer Ansatz unter Verwendung der an unserem Lehrstuhl befindlichen CTGF - Überexpressionsmäuse. [43]

Schon viele Funktionen, die in der Zelle durch TGF - β reguliert werden, sind dank intensiver Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet entdeckt worden. Dazu gehören Zellzykluskontrolle, Regulation der frühen Entwicklung, die Ausbildung extrazellulären Gewebes, die Hämatopoese, die Angiogenese, die Chemotaxis aber auch Funktionen des Immunsystems und der Induktion von Apoptose. [77, 84, 63, 45, 51] So gewinnt auch seine Stellung bei Erkrankungen des Auges immer weiter an Bedeutung, da wichtige Krankheiten wie das Glaukom, die diabetische Retinopathie unter der Signalregulation durch TGF - β zu stehen scheinen. [78] Da das Zusammenwirken von TGF - β mit anderen Faktoren des Zellzyklus und seine Signaltransduktion über zahlreiche andere Signalwege wie GTPasen, MAPKs, ERKs u. a. immer mehr in den Vordergrund der Forschung rückt und es bis heute nicht sicher geklärt ist, wie diese unterschiedlichen Kaskaden intrazellulär ablaufen, werden auch hier weitere intensive Forschungsansätze folgen. [6] In diesem Zusammenhang wird geklärt werden müssen, in welchem Verhältnis das inhibitorische Smad7 auf TGF - β Einfluss nimmt, da auch hier immer noch gegenteilige Meinungen in der Literatur existieren, ob und wann Smad7 negativ oder positiv auf den TGF - β - Signalweg wirkt. [50] Smad7 wird auch weiterhin ein wichtiger Ansatzpunkt in der gegenwärtigen Forschung des TGF - β - Signalwegs bleiben, da hier mögliche Therapieansätze oben genannter Erkrankungen liegen.

V. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss des TGF- β - Signalwegs auf das Überleben Retinaler Ganglienzellen im adulten unbehandelten Tier und im NMDA - Schadensmodell zu untersuchen. Durch eine Konditionelle Deletion von Smad7 mithilfe der α - Cre - Maus konnte der inhibitorische Einfluss von Smad7 auf den TGF- β - Signalweg in retinalen Neuronen und Müllerzellen entfernt und somit ein verstärktes TGF- β - Signal erzielt werden.

Zum Ausschluss eines möglichen Einflusses der verwendeten Cre - Rekombinase selbst auf die Befunde, wurden α - Cre - Mäuse mit ihren wildtypischen Geschwistertieren verglichen.

Die Auswirkungen des verstärkten TGF- β - Signals auf Retinale Ganglienzellen wurden anschließend in acht Wochen alten Tieren und sechs Monate alten Tieren anhand von Axonzählungen der Nn. optici untersucht. In Sehnerven von Tieren mit einem verstärkten TGF- β - Signal zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl an Axonen, was auf einen neuroprotektiven Effekt des verstärkten TGF- β - Signalwegs für Retinale Ganglienzellen schließen lässt. Zusätzlich wurde die retinale Gefäßsituation durch *in-vivo* - Fundusaufnahmen und Fluoreszenzangiographien der Augen und die Funktion der Retinalen Ganglienzellen durch Elektroretinographien auf mögliche Effekte durch das erhöhte TGF- β - Signal beurteilt. Hier zeigten sich keine signifikanten Veränderungen.

Zur Untersuchung einer neuroprotektiven Rolle des verstärkten TGF- β - Signalwegs im adulten Tier wurde als Modell ein experimentell induzierter Netzhautschaden angewendet, der exzitotoxische Schaden von Retinalen Ganglienzellen durch Injektion von N - Methyl - D - Aspartat (NMDA). In diesem Modell konnte kein Hinweis auf eine neuroprotektive Rolle des verstärkten TGF- β - Signalwegs für Retinale Ganglienzellen gezeigt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine zelltypspezifische Konditionelle Deletion des inhibitorischen Smad7 - Proteins in retinalen Neuronen und Müllerzellen Retinale Ganglienzellen nicht vor einem NMDA - induzierte Exzitotoxischen Zelltod schützt. Jedoch schützt das verstärkte TGF- β - Signal Retinale Ganglienzellen während der Entwicklung vor Apoptose, was sich letztlich in einer signifikant höheren Anzahl von Axonen im N. opticus des adulten Tieres widerspiegelt.

VI. Anhang

VI.1 Literaturverzeichnis

1. Google Image Result for <http://www.bioscience.org/2013/v18/af/4189/fig1.jpg>.
Zugegriffen: 18. Februar 2014
2. Medicine Modul, Anatomie Auge | StudyBlue.
<http://www.studyblue.com/notes/n/anatomie-auge/deck/8605490>. Zugegriffen: 15. Februar 2014
3. (2009) auge_start. http://www.hs-arnoldstein.ksn.at/d4/Berichte/06_07/Auge/auge_start_seite1.htm. Zugegriffen: 02. Februar 2014
4. (2011) eye vision. http://www.anatomie-amsterdam.nl/sub_sites/anatomie-zintuigen/zintuig_2003_eye_vision/bouw_oog.htm. Zugegriffen: 09. Februar 2014
5. Acott TS, Kelley MJ (2008) Extracellular matrix in the trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 86(4): 543–561. doi: 10.1016/j.exer.2008.01.013
6. Aristidis Moustakas CH Non-smad tgf-beta signals, Moustakas, 2005. *Journal of Cell Science* 2005(118)
7. Attisano L (2002) Signal Transduction by the TGF-beta Superfamily. *Science* 296(5573): 1646–1647. doi: 10.1126/science.1071809
8. Augustin AJ, Collins JF, Kriegelstein GK (2001) *Augenheilkunde*. Mit 138 Tabellen, 2nd edn. Springer, Berlin [u.a.]
9. Aumüller G (2007) *Anatomie*. 208 Tabellen. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart
10. BARANY EH (1962) The mode of action of pilocarpine on outflow resistance in the eye of a primate (*Cercopithecus ethiops*). *Invest Ophthalmol* 1: 712–727
11. Bottner M, Kriegelstein K, Unsicker K (2000) The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem* 75(6): 2227–2240

12. Braunger BM, Pielmeier S, Demmer C et al (2013) TGF- Signaling Protects Retinal Neurons from Programmed Cell Death during the Development of the Mammalian Eye. *Journal of Neuroscience* 33(35): 14246–14258. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0991-13.2013
13. Cande C, Cohen I, Daugas E et al (2002) Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* 84(2-3): 215–222
14. Chomczynski P (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 15(3): 532-4, 536-7
15. Dacey DM (1993) The mosaic of midget ganglion cells in the human retina. *J Neurosci* 13(12): 5334–5355
16. Dacey DM, Lee BB (1994) The 'blue-on' opponent pathway in primate retina originates from a distinct bistratified ganglion cell type. *Nature* 367(6465): 731–735. doi: 10.1038/367731a0
17. Dacey DM, Petersen MR (1992) Dendritic field size and morphology of midget and parasol ganglion cells of the human retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(20): 9666–9670
18. Demmer C (2012) Programmierter Zelltod in der Retina von α -Cre;TGF- β -R2fl/fl und α -Cre;Smad7fl/fl Mäusen während ihrer Embryonalentwicklung, Universität Regensburg
19. Derynck R, Lindquist PB, Lee A et al (1988) A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J* 7(12): 3737–3743
20. Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (2012) Stellungnahme der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft zur Glaukomvorsorge
21. Dorrell MI, Friedlander M (2006) Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina. *Prog Retin Eye Res* 25(3): 277–295. doi: 10.1016/j.preteyeres.2006.01.001
22. Dr. med. et MME A. Gruber (2006) Augenheilkunde Uni Graz. <http://e-learning.studmed.unibe.ch/augenheilkunde/index.html>. Zugegriffen: 11. März 2014

23. Dunker N, Schuster N, Krieglstein K (2001) TGF-beta modulates programmed cell death in the retina of the developing chick embryo. *Development* 128(11): 1933–1942
24. European Glaucoma Society EGS Home page. <http://www.eugs.org/eng/default.asp>. Zugegriffen: 21. Februar 2014
25. Flammer J, Orgul S (1998) Optic nerve blood-flow abnormalities in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 17(2): 267–289
26. Flammer J, Orgul S, Costa VP et al (2002) The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 21(4): 359–393
27. Fuchshofer R, Tamm ER (2009) Modulation of extracellular matrix turnover in the trabecular meshwork. *Exp Eye Res* 88(4): 683–688
28. Fuchshofer R, Tamm ER (2012) The role of TGF-beta in the pathogenesis of primary open-angle glaucoma. *Cell Tissue Res* 347(1): 279–290. doi: 10.1007/s00441-011-1274-7
29. Galang N, Sasaki H, Maulik N (2000) Apoptotic cell death during ischemia/reperfusion and its attenuation by antioxidant therapy. *Toxicology* 148(2-3): 111–118
30. Garcia M, Vecino E (2003) Role of Muller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. *Histol Histopathol* 18(4): 1205–1218
31. Grehn F (2012) *Augenheilkunde. Mit ... 20 Tabellen*, 31st edn. Springer-Lehrbuch. Springer, Heidelberg
32. Grehn F, Mackensen G (1993) *Die Glaukome*. Kohlhammer, Stuttgart
33. Grus FH, Joachim SC, Wuenschig D et al (2008) Autoimmunity and Glaucoma. *Journal of Glaucoma* 17(1): 79–84. doi: 10.1097/IJG.0b013e318156a592
34. Helmut Hinghofer-Szalkay (2014) *Physiologie: Neuronal-visuelles System*. <http://user.medunigraz.at/helmut.hinghofer-szalkay/XIV.6.htm>. Zugegriffen: 08. Februar 2014
35. Hendry S, Yoshioka T (1994) A neurochemically distinct third channel in the macaque dorsal lateral geniculate nucleus. *Science* 264(5158): 575–577. doi: 10.1126/science.8160015

36. Ido Perlman The Electroretinogram: ERG by Ido Perlman – Webvision.
<http://webvision.med.utah.edu/book/electrophysiology/the-electroretinogram-erg/>.
Zugegriffen: 15. März 2014
37. Irvin GE, Casagrande VA, Norton TT (1993) Center/surround relationships of magnocellular, parvocellular, and koniocellular relay cells in primate lateral geniculate nucleus. *Vis Neurosci* 10(2): 363–373
38. Ishihara A, Saito H, Abe K (1994) Transforming growth factor- β 1 and - β 2 promote neurite sprouting and elongation of cultured rat hippocampal neurons. *Brain Research* 639(1): 21–25. doi: 10.1016/0006-8993(94)91759-0
39. Itoh S, Dijke P ten (2007) Negative regulation of TGF- β receptor/Smad signal transduction. *Current Opinion in Cell Biology* 19(2): 176–184. doi: 10.1016/j.ceb.2007.02.015
40. Jakowlew SB, Dillard PJ, Sporn MB et al (1988) Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a messenger ribonucleic acid encoding transforming growth factor beta 4 from chicken embryo chondrocytes. *Mol Endocrinol* 2(12): 1186–1195
41. JASN It's a Smad World: Regulation of TGF- β Signaling in the Kidney.
<http://jasn.asnjournals.org/content/13/4/1126/F1.expansion>. Zugegriffen: 18. Februar 2014
42. Junglas B, Kuespert S, Seleem AA et al (2012) Connective tissue growth factor causes glaucoma by modifying the actin cytoskeleton of the trabecular meshwork. *Am J Pathol* 180(6): 2386–2403. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.02.030
43. Junglas B, Kuespert S, Seleem AA et al (2012) Connective tissue growth factor causes glaucoma by modifying the actin cytoskeleton of the trabecular meshwork. *Am J Pathol* 180(6): 2386–2403. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.02.030
44. Kanski JJ (2004) *Klinische Ophthalmologie. Lehrbuch und Atlas*, 5th edn. Urban und Fischer, München, Jena
45. Kleiter I, Pedré X, Mueller AM et al (2007) Inhibition of Smad7, a negative regulator of TGF-beta signaling, suppresses autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 187(1-2): 61–73. doi: 10.1016/j.jneuroim.2007.04.014

46. Kolb H, Linberg KA, Fisher SK (1992) Neurons of the human retina: a Golgi study. *J Comp Neurol* 318(2): 147–187. doi: 10.1002/cne.903180204
47. Kondaiah P, Sands MJ, Smith JM et al (1990) Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta 5) mRNA in *Xenopus laevis*. *J Biol Chem* 265(2): 1089–1093
48. Kos CH (2004) Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr Rev* 62(6 Pt 1): 243–246
49. Kouyama N, Marshak DW (1992) Bipolar cells specific for blue cones in the macaque retina. *J Neurosci* 12(4): 1233–1252
50. Krampert M, Chirasani SR, Wachs F et al (2010) Smad7 regulates the adult neural stem/progenitor cell pool in a transforming growth factor beta- and bone morphogenetic protein-independent manner. *Mol Cell Biol* 30(14): 3685–3694. doi: 10.1128/MCB.00434-09
51. Kriegstein K, Strelau J, Schober A et al (2002) TGF- β and the regulation of neuron survival and death. *Journal of Physiology-Paris* 96(1-2): 25–30. doi: 10.1016/S0928-4257(01)00077-8
52. Kühnel W (2008) Taschenatlas Histologie, 12th edn. Thieme, Stuttgart, New York
53. Kuhn R, Schwenk F, Aguet M et al (1995) Inducible gene targeting in mice. *Science* 269(5229): 1427–1429
54. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680–685
55. Lebrin F, Goumans M, Jonker L et al (2004) Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J* 23(20): 4018–4028. doi: 10.1038/sj.emboj.7600386
56. Lee BB (2004) Paths to colour in the retina. *Clinical and Experimental Optometry* 87(4-5): 239–248. doi: 10.1111/j.1444-0938.2004.tb05054.x
57. Lee BB, Martin PR, Valberg A (1988) The physiological basis of heterochromatic flicker photometry demonstrated in the ganglion cells of the macaque retina. *J Physiol* 404: 323–347

58. Lipton SA (2006) Paradigm shift in neuroprotection by NMDA receptor blockade: memantine and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 5(2): 160–170. doi: 10.1038/nrd1958
59. Li Y, Schlamp CL, Nickells RW (1999) Experimental induction of retinal ganglion cell death in adult mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(5): 1004–1008
60. Loonstra A, Vooijs M, Beverloo HB et al (2001) Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(16): 9209–9214. doi: 10.1073/pnas.161269798
61. Lukowski Robert WSWPFSFR (2005) Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus. *BIOspectrum* 11(3/05): 287–290
62. Marquardt T, Ashery-Padan R, Andrejewski N et al (2001) Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* 105(1): 43–55
63. Massagué J TGF- β signal transduction
64. McDonald NQ, Hendrickson WA (1993) A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* 73(3): 421–424
65. Monasterio FM de, Gouras P (1975) Functional properties of ganglion cells of the rhesus monkey retina. *J Physiol* 251(1): 167–195
66. Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26(2): 99–109
67. Nakano N, Ikeda HO, Hangai M et al (2011) Longitudinal and simultaneous imaging of retinal ganglion cells and inner retinal layers in a mouse model of glaucoma induced by N-methyl-D-aspartate. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(12): 8754–8762. doi: 10.1167/iovs.10-6654
68. Nickells RW (1999) Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death. *Surv Ophthalmol* 43 Suppl 1: S151-61
69. Perry VH, Cowey A (1984) Retinal ganglion cells that project to the superior colliculus and pretectum in the macaque monkey. *Neuroscience* 12(4): 1125–1137

70. Peter W.Laird^{1-2*} AZKLMARJa (1991) Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research* 19(15): 4293
71. Peterson BB, Dacey DM (1998) Morphology of human retinal ganglion cells with intraretinal axon collaterals. *Vis Neurosci* 15(2): 377–387
72. Pielmeier S (2012) Der Einfluss des TGF-beta Signalwegs auf den ontogenetischen Zelltod in der Retina, Universität Regensburg
73. Rager G, Rager U (1978) Systems-matching by degeneration. I. A quantitative electron microscopic study of the generation and degeneration of retinal ganglion cells in the chicken. *Exp Brain Res* 33(1): 65–78
74. Ramsey DJ, Ramsey KM, Vavvas DG (2013) Genetic Advances in Ophthalmology: The Role of Melanopsin-Expressing, Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells in the Circadian Organization of the Visual System. *Semin Ophthalmol* 28(5-6): 406–421. doi: 10.3109/08820538.2013.825294
75. Rassow J (2006) Biochemie. 50 Tabellen. Duale Reihe. Thieme, Stuttgart
76. Rossant J, McMahon A (1999) "Cre"-ating mouse mutants-a meeting review on conditional mouse genetics. *Genes Dev* 13(2): 142–145
77. Ross S, Hill CS (2008) How the Smads regulate transcription. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40(3): 383–408. doi: 10.1016/j.biocel.2007.09.006
78. Saika S (2006) TGFbeta pathobiology in the eye. *Lab Invest* 86(2): 106–115. doi: 10.1038/labinvest.3700375
79. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487–491
80. Sauer B, Henderson N (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(14): 5166–5170
81. Schiller PH, Logothetis NK, Charles ER (1990) Functions of the colour-opponent and broad-band channels of the visual system. *Nature* 343(6253): 68–70. doi: 10.1038/343068a0

82. Schmidt EE, Taylor DS, Prigge JR et al (2000) Illegitimate Cre-dependent chromosome rearrangements in transgenic mouse spermatids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(25): 13702–13707. doi: 10.1073/pnas.240471297
83. Schmidt RF (ed) (2007) *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie ; mit 77 Tabellen ; [+ IMPP-Fragen Physiologie online]*, 30th edn. Springer-Lehrbuch. Springer, Heidelberg
84. Schuster N, Krieglstein K (2002) Mechanisms of TGF- β -mediated apoptosis. *Cell and Tissue Research* 307(1): 1–14. doi: 10.1007/s00441-001-0479-6
85. Seitz R, Hackl S, Seibuchner T et al (2010) Norrin mediates neuroprotective effects on retinal ganglion cells via activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway and the induction of neuroprotective growth factors in Muller cells. *J Neurosci* 30(17): 5998–6010. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0730-10.2010
86. Seitz R, Tamm ER N -Methyl-d-Aspartate (NMDA)-Mediated Excitotoxic Damage: A Mouse Model of Acute Retinal Ganglion Cell Damage, vol 935, pp 99–109
87. Shen Y, Liu X, Yang X (2006) N-methyl-D-aspartate receptors in the retina. *Mol Neurobiol* 34(3): 163–179. doi: 10.1385/MN:34:3:163
88. Speck D (2011) Neurowissenschaftliche Gesellschaft e.V. <http://nwg.glia.mdc-berlin.de/de/picturedb/index.php?searchType=Keywords&action=search&search=Ganglien&alphalist=G>. Zugegriffen: 15. Februar 2014
89. Sporn MB, Roberts AB (1990) TGF-beta: problems and prospects. *Cell Regul* 1(12): 875–882
90. Stone J, Itin A, Alon T et al (1995) Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci* 15(7 Pt 1): 4738–4747
91. Tamm ER (2009) The trabecular meshwork outflow pathways: Structural and functional aspects. *Experimental Eye Research* 88(4): 648–655. doi: 10.1016/j.exer.2009.02.007

92. Tamm ER (2013) Functional morphology of the outflow pathways of aqueous humor and their changes in open angle glaucoma (Funktionelle Morphologie der Abflusswege des Kammerwassers und ihre Veränderungen beim Offenwinkelglaukom). *Ophthalmologie* 110(11): 1026–1035. doi: 10.1007/s00347-012-2670-4
93. Thale AB, Gordes RS, Rochels R et al (1996) Veränderungen der Extrazellulärmatrix in der Lamina cribrosa von Patienten mit sekundärem Glaukom. *Der Ophthalmologe* 93(5): 586–591. doi: 10.1007/s003470050044
94. Thanos A, Morizane Y, Murakami Y et al (2012) Evidence for baseline retinal pigment epithelium pathology in the Trp1-Cre mouse. *Am J Pathol* 180(5): 1917–1927. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.01.017
95. Trepel M (2009) *Neuroanatomie. Struktur und Funktion ; [mit dem Plus im Web]*, 4th edn. Elsevier, Urban & Fischer, München
96. van Royen N, Hoefer I, Buschmann I et al (2002) Exogenous application of transforming growth factor beta 1 stimulates arteriogenesis in the peripheral circulation. *FASEB J* 16(3): 432–434. doi: 10.1096/fj.01-0563fje
97. Vosberg HP (1989) The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. *Hum Genet* 83(1): 1–15
98. Vrabcic JP, Levin LA (2007) The neurobiology of cell death in glaucoma. *Eye (Lond)* 21 Suppl 1: S11-4. doi: 10.1038/sj.eye.6702880
99. Walshe TE, Saint-Geniez M, Maharaj ASR et al (2009) TGF- β Is Required for Vascular Barrier Function, Endothelial Survival and Homeostasis of the Adult Microvasculature. *PLoS ONE* 4(4): e5149. doi: 10.1371/journal.pone.0005149
100. Walther C, Gruss P (1991) Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113(4): 1435–1449
101. Wax MB (2011) The case for autoimmunity in glaucoma. *Experimental Eye Research* 93(2): 187–190. doi: 10.1016/j.exer.2010.08.016

102. Welsch U, Sobotta J (2006) Lehrbuch Histologie. Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie ; mit 21 Tabellen, 2nd edn. Elsevier, Urban und Fischer, München, Jena

103. Yan DB, Coloma FM, Metheetrairut A et al (1994) Deformation of the lamina cribrosa by elevated intraocular pressure. Br J Ophthalmol 78(8): 643–648

VI.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Augenkammern	- 2 -
Abbildung 2 Kammerwinkel	- 3 -
Abbildung 3 Schematische Darstellung des Trabekelwerks und des Kammerwinkels	- 4 -
Abbildung 4 Netzhaut - Grobe Gliederung	- 8 -
Abbildung 5 Morphologie der Retina	- 10 -
Abbildung 6 Morphologie Retinaler Ganglienzellen	- 12 -
Abbildung 7 Normale Papille	- 13 -
Abbildung 8 Opticusatrophie	- 14 -
Abbildung 9 TGF - β - Familie	- 20 -
Abbildung 10 TGF - β - Signalweg	- 22 -
Abbildung 11 Cre/loxP - vermittelte Excision und Integration von DNA.	- 25 -
Abbildung 12 Westernblot - Analysen retinaler Proteine auf pSmad3.....	- 51 -
Abbildung 13 Nachweis der Konditionellen Deletion von Smad7 durch immunhistochemische Analyse.....	- 52 -
Abbildung 14 Phänotypanalyse der α - Cre +/- - Tiere	- 53 -
Abbildung 15 Statische Auswertung der Phänotypanalyse der α - Cre +/- - Tiere	- 53 -
Abbildung 16 Phänotypanalyse der Sagittalschnitte der Augen der Smad7 ^{Δoc} - Tiere	- 55 -
Abbildung 17 Phänotypanalyse der Smad7 ^{Δoc} - Tiere anhand der Angiographie	- 56 -
Abbildung 18 Phänotypanalyse der Nn. optici der Konditionellen Deletion von Smad7 (Smad7 ^{Δoc}), Alter acht Wochen.....	- 57 -
Abbildung 19 Statistische Auswertung der Phänotypanalyse der Nn. optici der Konditionellen Deletion von Smad7 (Smad7 ^{Δoc}), Alter acht Wochen	- 58 -
Abbildung 20 Phänotypanalyse der Nn. optici der Konditionellen Deletion von Smad7 (Smad7 ^{Δoc}), Alter sechs Monate.....	- 59 -

Abbildung 21 Statistische Auswertung der Phänotypanalyse der Nn. optici der Konditionellen Deletion von Smad7 (Smad7^{Δoc}), Alter sechs Monate - 59 -

Abbildung 22 STR - Elektroretinographie - 61 -

Abbildung 23 Phänotypanalyse der Kontrollgeschwistertiere im NMDA - Schadensmodell. - 62 -

-

Abbildung 24 Statistische Auswertung der Kontrollgeschwistertiere im NMDA - Schadensmodell - 63 -

Abbildung 25 Phänotypanalyse der Smad7 - Deletionsgruppe im NMDA - Schadensmodell- 63 -

-

Abbildung 26 Statistische Auswertung der Smad7 - Deletionsgruppe im NMDA - Schadensmodell - 64 -

Abbildung 27 Phänotypanalyse der NMDA - injizierten Nn. optici der Smad7 - Deletionsgruppe und der control - Gruppe im NMDA - Schadensmodell - 65 -

Abbildung 28 Statistische Auswertung der NMDA - injizierten Nn. optici der Smad7 - Deletionsgruppe und der control - Gruppe im NMDA - Schadensmodell - 65 -

Abbildung 29 Phänotypanalyse der PBS - injizierten Nn. optici der Smad7 - Deletionsgruppe und der control - Gruppe im NMDA - Schadensmodell - 66 -

Abbildung 30 Statistische Auswertung der PBS - injizierten Nn. optici der Smad7 - Deletionsgruppe und der control - Gruppe im Schadensmodell..... - 67 -

Abbildung 31 Statistische Auswertung der überlebenden Axone im NMDA - Schadensmodell - 68 -

VI.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Reagenzliste - 29 -

Tabelle 2 Enzyme..... - 29 -

Tabelle 4 Verbrauchsmaterialien - 30 -

Tabelle 5 Geräte - 31 -

Tabelle 6 Polyacrylamidgele - 32 -

Tabelle 7 Puffer und Lösungen - 35 -

Tabelle 8 Primärantikörper - 35 -

Tabelle 9 Sekundärantikörper..... - 36 -

Tabelle 10 Oligonukleotidprimer für Genotypisierung - PCR..... - 36 -
 Tabelle 12 Übersicht über die nachgewiesenen Proteine und die Verwendung der
 spezifischen Antikörper - 43 -

VI.4 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
bidest.	Bidestillatus
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bp	Basenpaare
ca.	Circa
Co - Smad	collaborating Smad
Cre	cyclization recombination
d	“day” Tag, destillatus
d. h.	das heißt
Da	Dalton
DAPI	4',6 - Diamidin - 2 - phenylindol
DHA	Docosahexaensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpt	Dioptrien (m^{-1})
E	Embryonaltag, Extinktion

Erk	extracellular signal - regulated kinase
FGF	„fibroblast growth factor“ Fibroblastenwachstumsfaktor
fl/fl	flox/flox
fwd	vorwärts (Primer)
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd - 3 - phosphat- Dehydrogenase
GDF	growth differentiation factor
GDNF	glial cell line - derived neurotrophic factor
GFP	green fluorescent protein
GS	Glycin und Serin
GZL	„ganglion cell layer“ Ganglienzellschicht
H ₂ O	Wasser
INL	„inner nuclear layer“ innere Körnerschicht
IOD	Intraokularer Druck
I - Smad	inhibitory Smad
JNK	Jun N - terminale Kinase
k	Kilo (10 ³)
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat

l	Liter
loxP	locus of crossover (x) in P1 bacteriophage
M	molar, „musculus“ Muskel
m	milli (10^{-3}), Meter
MAPK	Mitogen - activated protein kinase
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MH	mad homology
min	Minute
mm	Millimeter, musculus (Plural)
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
n	nano (10^{-9})
N	Teilchenzahl
N.	„nervus“ Nerv
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NGF	nerve growth factor
ONL	„outer nuclear layer“ äußere Körnerschicht
OS	Ora serrata
PAK2	p21 - activated kinase 2
Pax	paired box

PBS	„phosphate buffered saline“ <u>phosphatgepufferte Salzlösung</u>
PCR	„polymerase chain reaction“ Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pos.	Positiv
R	Rezeptor
rev	rückwärts (Primer)
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm	„revolutions per minute“ Umdrehungen pro Minute
R - Smad	Receptor - regulated Smad
rTdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase, Recombinant
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s. o.	siehe oben
SARA	Smad anchor for receptor activation
SEM	„standard error of the mean“ Standardfehler
Smad	Sma - and Mad - related Protein
Smurf	Smad ubiquitination regulatory factors
SSC	Standard Saline Citrate

Taq	Thermus aquaticus
TBE - Puffer	TRIS - Borat - EDTA - Puffer
TGF - β	Transforming growth factor - β
TNF	„tumor necrosis factor“ Tumornekrosefaktor
Tris - HCl	Tris - (hydroxymethyl) - aminomethan - Salzsäure
TUNEL	TdT - mediated dUTP - biotin nick end labelling
ü. N.	über Nacht
V	Volt
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
W	Watt
w/v	“weight per volume” Gewicht pro Volumen
Wdh.	Wiederholungen

VI.5 Symbolverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	mikro (10^{-6})
∞	unendlich

α	anti, alpha
β	beta

VI.6 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei Allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ernst R. Tamm für die Vergabe des Dissertationsthemas. Dieses ermöglichte mir, einen Blick über mein Forschungsfeld der Humanmedizin hinaus und einen Erfahrungsschatz, von welchem ich auch außerhalb der Labortätigkeit profitieren kann. Außerdem danke ich Ihm für seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Ein besonderer Dank geht an Frau PD Dr. Dr. Barbara M. Braunger für ihre außerordentliche und exzellente Unterstützung, sowohl fachlich als auch menschlich. Ihr Ideenreichtum und ihre Hilfsbereitschaft haben dazu beigetragen, dass das Erarbeiten dieses Dissertationsthemas stets von viel Interesse und Motivation begleitet waren und dass dies letztlich zum Gelingen dieser Arbeit geführt hat. Ihr danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens.

Frau Prof. Dr. C. Wagner möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Herrn Dr. Stefan Pielmeier danke ich für die praktische Hilfestellung und gute Zusammenarbeit innerhalb des Labors.

Ich möchte mich bei den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Humananatomie und Embryologie, hier insbesondere bei Frau Elke Stauber, Silvia Babl, Margit Schimmel und Angelika Pach, für die fachliche Unterstützung und das Teilen Ihres Fachwissens bedanken.

Herrn Dr. Marcus Koch danke ich für seine Hilfsbereitschaft während der Labortätigkeit und seinen anspornenden Zuspruch.

Frau Bahar Ademoglu danke ich für die gute, wissenschaftliche und kollegiale Zusammenarbeit im Labor und die freundschaftliche Begleitung während des gesamten Medizinstudiums.

VI.7 Erklärung

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

Regensburg, den 19. 12. 2014

Natalie Abramov

