

Untersuchungen zur gewebsspezifischen Expression
von *ASB10* in der Maus – Eine Reportergenanalyse



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

vorgelegt von
Christopher Goßler
aus Roth
im Jahre 2020

Untersuchungen zur gewebsspezifischen Expression
von *ASB10* in der Maus – Eine Reportergenanalyse



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

vorgelegt von
Christopher Goßler
aus Roth
im Jahre 2020

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 23.07.2020
Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. med. Ernst R. Tamm

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	5
I.1	Anatomie des Auges	5
I.2	Glaukom	9
I.3	Genetik des Glaukoms	11
I.4	Das Gen ASB10	13
I.5	Zielsetzung der Arbeit	16
II.	Material und Methoden	17
II.1	Verwendete Materialien	17
II.1.1	Verbrauchsmaterialien und Geräte	17
II.1.1.1	Liste der Verbrauchsmaterialien	17
II.1.1.2	Geräteliste	18
II.1.2	Liste der Reagenzien	18
II.1.3	Enzyme	20
II.1.4	Zusammensetzung von Gelen, Puffern und Lösungen	20
II.1.4.1	Verwendete Gele	20
II.1.4.2	Puffer und Lösungen	20
II.1.5	Oligonukleotid-Primer	21
II.2	Versuchstiere und deren Haltung	22
II.2.1	Verwendete Mauslinien	22
II.2.2	Gewebepräparation	23
II.2.2.1	Präparation der adulten Tiere	23

II.2.2.2 Präparation der Embryonen	23
II.3 Methoden der Molekularbiologie	24
II.3.1 DNA-Isolierung aus Mausschwanz-Biopsien	24
II.3.2 Polymerase-Kettenreaktion	24
II.3.3 Gelelektrophorese	26
II.4 Histologische Arbeitstechniken	27
II.4.1 Einbettung und Herstellung von Kryoschnitten	27
II.4.2 <i>LacZ</i> -Färbung	28
II.5 Mikroskopie/Fotografie	29
III. Ergebnisse	30
III.1 ASB10-Knock-Out	30
III.2 Lokalisation der ASB10-Expression in adulten Mäusen	31
III.3 Lokalisation der ASB10-Expression in Embryonen	47
IV. Diskussion	50
V. Zusammenfassung	55
VI. Anhang	56
VI.1 Literaturverzeichnis	56
VI.2 Abbildungsverzeichnis	64
VI.3 Tabellenverzeichnis	65
VI.4 Abkürzungsverzeichnis	66
VI.5 Danksagung	70
VI.6 Erklärung	71

I. Einleitung

I.1 Anatomie des Auges

Das Auge ist eines der wichtigsten Sinnesorgane des Menschen, zuständig für das Sehen in Form von Registrierung und Verarbeitung von Lichtreizen. Es besteht aus dem Augapfel (*Bulbus oculi*) mit dem Sehnerv (*Nervus opticus*) sowie aus den ihn umgebenden Hilfsstrukturen: den Augenlidern, der Bindehaut, dem Tränenapparat und den äußeren Augenmuskeln. Der Augapfel hat die Form einer Kugel. Er ist überwiegend durch den Glaskörper (*Corpus vitreum*) ausgefüllt und aus drei Schichten aufgebaut: einer stabilen Außenhülle (*Tunica fibrosa bulbi*), der Gefäßhaut (*Tunica vasculosa bulbi* oder *Uvea*) und der *Tunica interna bulbi* als innerste Schicht (Schünke et al., 2009).

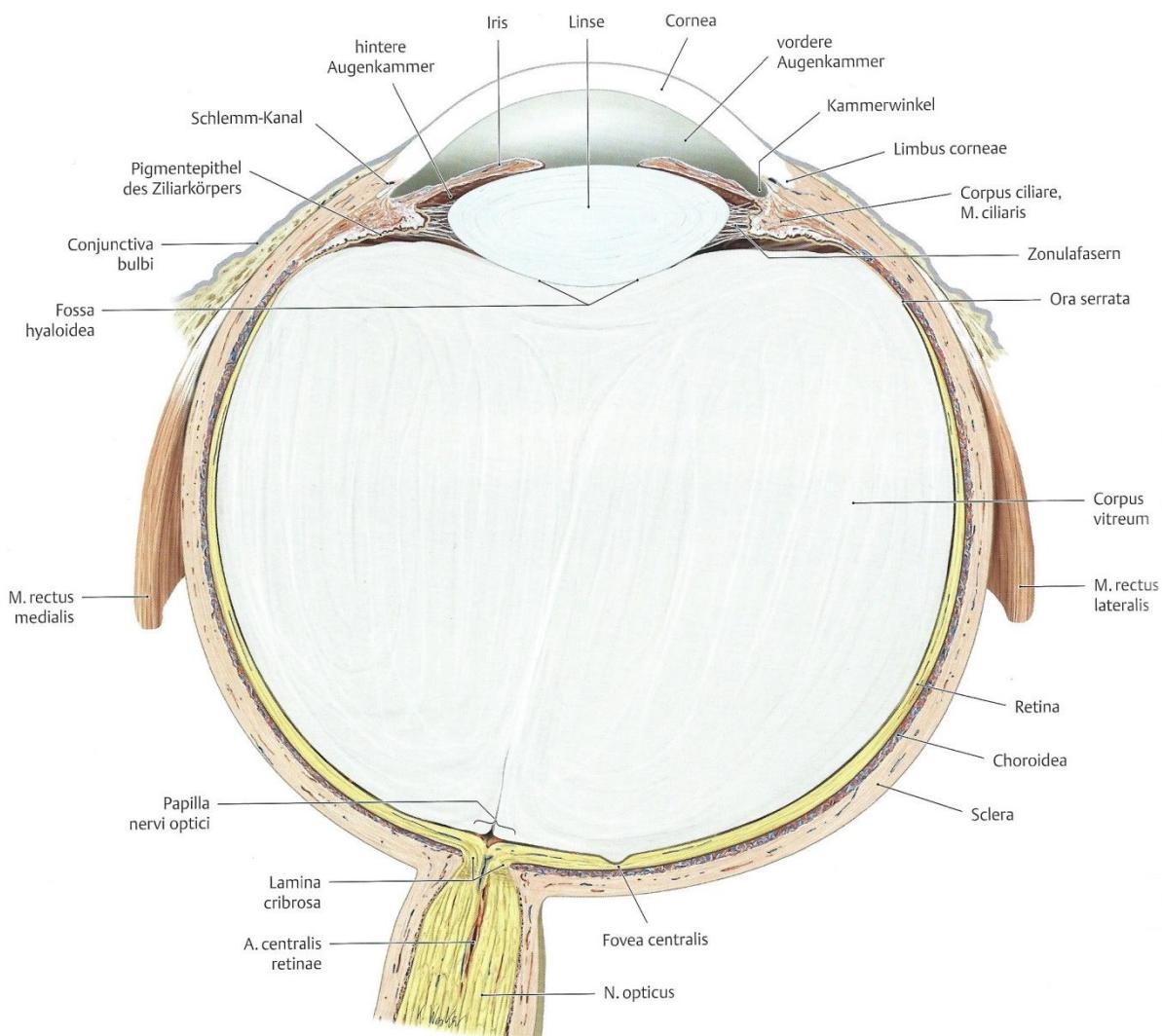


Abbildung 1: Schematischer Horizontalschnitt durch das menschliche Auge

Aus: Schünke et al., 2009.

Die äußere Schicht besteht größtenteils aus der Lederhaut (*Sclera*). Im vorderen Augenabschnitt allerdings wird die Außenhülle des Augapfels von der durchsichtigen Hornhaut (*Cornea*) gebildet. Stärker gekrümmt als der restliche Teil des *Bulbus*, wölbt sie sich über die Rundung des Augapfels hervor und geht am *Limbus corneae* in die Lederhaut über. Gemeinsam bilden *Cornea* und *Sclera* die derbe bindegewebige Außenhülle des Augapfels, die *Tunica fibrosa bulbi*, die vor allem der mechanischen Stabilität des *Bulbus* dient. Darüber hinaus setzen hier die äußeren Augenmuskeln an, die zur Bewegung des Augapfels benötigt werden.

Die mittlere Schicht (*Tunica vasculosa bulbi* oder *Uvea*) besteht aus der Regenbogenhaut (*Iris*), dem Ziliarkörper (*Corpus ciliare*) und der Aderhaut (*Choroidea*), wobei die beiden erstgenannten lediglich im vorderen Augenabschnitt vorhanden sind, während sich die *Choroidea* von dort um den gesamten *Bulbus* zieht. Zu den Aufgaben dieser Schicht gehören die Regulation der Pupillenweite und damit des Lichteinfalls in das Auge durch Kontraktion des *Musculus dilatator pupillae* sowie des *Musculus constrictor pupillae* der *Iris* (die darüber hinaus dem Auge seine charakteristische Farbe verleiht), sowie die Nah- und Fernakkommodation durch Kontraktion und Entspannung des *Musculus ciliaris* (gelegen im Ziliarkörper). Darüber hinaus produziert das Epithel des *Corpus ciliare* das Kammerwasser, welches für die Ernährung der avaskulären Linse erforderlich ist und im Kammerwinkel durch das Trabekelwerk und den Schlemm-Kanal wieder abfließt. Der Ziliarkörper geht an der *Ora serrata* in die *Choroidea* über, die zahlreiche Gefäße zur Versorgung der äußeren Netzhautschichten führt.

Die Netzhaut (*Retina*) bildet schließlich die innerste Schicht des Augapfels, die *Tunica interna bulbi*. Sie besteht aus einem lichtsensiblen Anteil (*Pars optica*), der die Sinneszellen (*Stratum nervosum*) und das Pigmentepithel (*Stratum pigmentosum*) beinhaltet, sowie einem lichtunempfindlichen, „blindem“ Anteil (*Pars caeca*), der den Ziliarkörper und die Rückseite der *Iris* bedeckt (*Pars ciliaris retinae* und *Pars iridica retinae*). Der Übergang von *Pars caeca* zu *Pars optica* vollzieht sich ebenfalls entlang der *Ora serrata*. Im lichtempfindlichen Teil der *Retina* liegen der Austrittspunkt des Sehnerven aus dem Augapfel (*Papilla nervi optici*, „blinder Fleck“) sowie, temporal davon gelegen, die *Macula lutea* („gelber Fleck“) mit der *Fovea centralis*, der Stelle des schärfsten Sehens, auf welche das einfallende Licht fokussiert wird.

Die Netzhaut ist schichtweise aufgebaut, wobei die lichtempfindlichen Teile der Photorezeptoren außen (zur *Choroidea* hin) liegen, sodass das Licht zunächst alle

weiter innen gelegenen Schichten der *Retina* durchdringen muss. Die durch das Licht ausgelösten Aktionspotentiale werden dann dem Lichteinfall entgegengesetzt nach innen und zur *Papilla nervi optici* geleitet (Schünke et al., 2009).

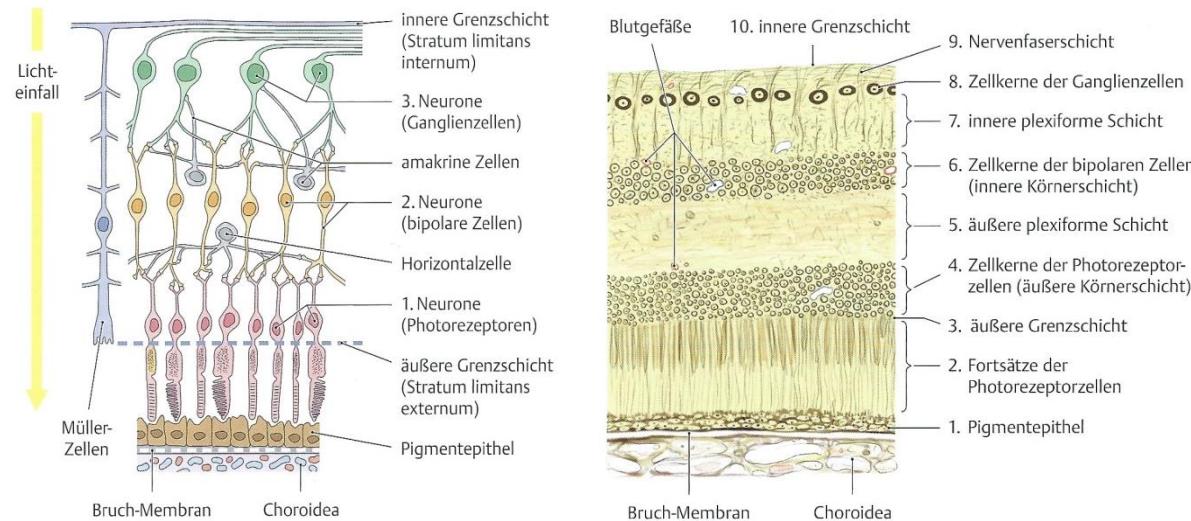


Abbildung 2: Aufbau der Netzhaut

Links: Schema der ersten drei Neurone der Sehbahn, rechts: die Schichten der Netzhaut. Modifiziert nach: Schünke et al., 2009.

Die erste und äußerste Schicht der *Retina* ist das Pigmentepithel, welches unter anderem den Stoffwechsel zwischen der *Choroidea* und den Photorezeptoren vermittelt. Deren Fortsätze bilden die zweite Schicht, in der die Lichtreize aufgenommen werden (Phototransduktion). Es gibt zwei unterschiedliche Typen von Photorezeptoren: Stäbchen für das skotopische Sehen (bei Nacht) und Zapfen für das photopische Sehen (bei Tag). Die Perikaryen der Photorezeptoren bilden die äußere Körnerschicht. Die Abgrenzung zwischen den Fortsätzen und den Perikaryen der Photorezeptoren nennt man äußere Grenzschicht. Hier enden die Zellfortsätze der Müller-Zellen, die die inneren Anteile der *Retina* radiär durchspannen und stützen. Die fünfte Schicht heißt äußere plexiforme Schicht, hier kommt es zur Verschaltung der Photorezeptoren (als erste Neurone der Sehbahn) mit den zweiten Neuronen der Sehbahn, den bipolaren Zellen. Deren Perikaryen befinden sich in der inneren Körnerschicht, gemeinsam mit den Zellkernen der Müller-Zellen und der amakrinen Zellen (welche Querverbindungen zwischen den Nervenzellen herstellen). Daran schließt sich die innere plexiforme Schicht an, in der es wiederum zu synaptischen Verschaltungen zwischen den bipolaren Zellen und den Ganglienzellen kommt (welche die dritten Neuronen der Sehbahn darstellen). Die Perikaryen der

Ganglienzellen bilden die achte Schicht der Netzhaut, während ihre Axone die neunte Schicht bilden. Diese verlaufen hier parallel zur Wand des *Bulbus* und ziehen zur *Papilla nervi optici*, wo sie den Augapfel als *Nervus opticus* verlassen und zum *Corpus geniculatum laterale* im Zwischenhirn verlaufen. Als zehnte und innerste Schicht der *Retina* stellt schließlich die innere Grenzschicht, bestehend aus den Zellfortsätzen der Müller-Zellen sowie einer Basallamina, die Abgrenzung der Netzhaut vom Glaskörper dar.

Zu erwähnen ist noch, dass die *Pars optica* der *Retina*, mit Ausnahme der *Ora serrata* und der *Papilla nervi optici*, keine feste Verbindung zum retinalen Pigmentepithel aufweist, sondern ihm lediglich anliegt und durch den Augeninnendruck daran angepresst wird. Dies ist die anatomische Begründung der Möglichkeit einer Netzhautablösung, die unbehandelt zur Erblindung führen kann (Schünke et al., 2009; Lüllmann-Rauch, 2009).

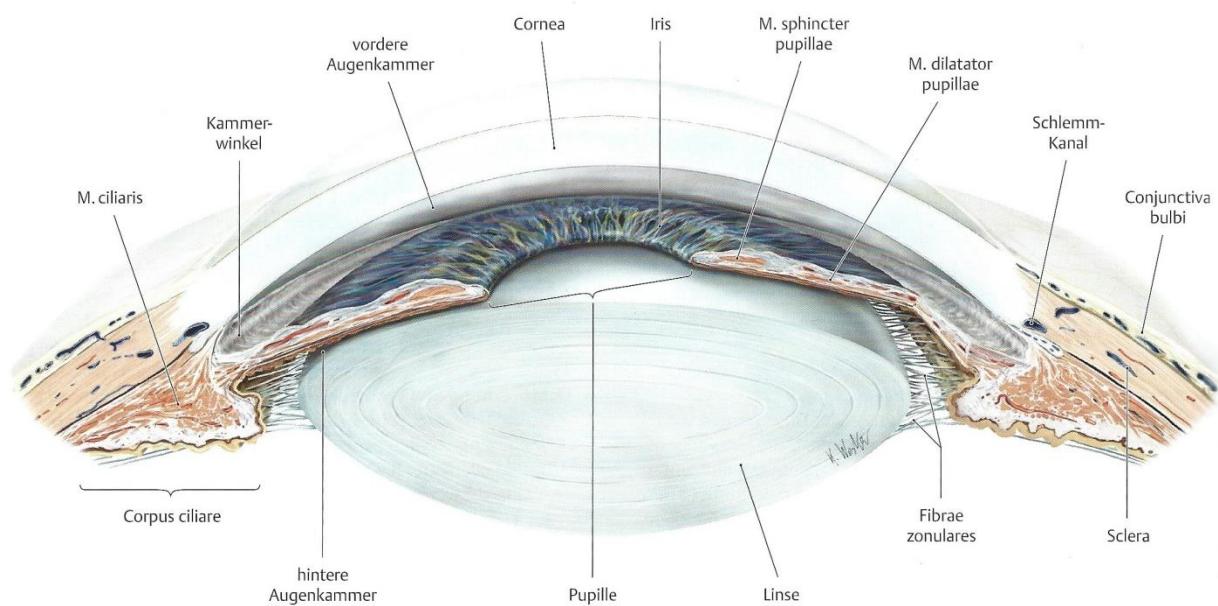


Abbildung 3: Horizontalschnitt durch den vorderen Augenabschnitt

Aus: Schünke et al., 2009.

Im vorderen Augenabschnitt befindet sich mit der *Cornea*, der mit Kammerwasser gefüllten vorderen Augenkammer (*Camera anterior*), der von der *Iris* gebildeten Pupille sowie der Linse (*Lens*) der Großteil des dioptrischen Apparats, der noch durch den Glaskörper ergänzt wird, der den *Bulbus* überwiegend ausfüllt. Dieser dioptrische Apparat ist verantwortlich für die Brechung des einfallenden Lichts und eine Fokussierung desselben auf die *Retina*. Die Gesamtbrechkraft des gesunden menschlichen Auges liegt bei 58,8 Dioptrien, woran die einzelnen Bestandteile des

dioptrischen Apparats unterschiedlichen Anteil haben, abhängig von ihrer Dichte: die Hornhaut weist mit +43 Dioptrien die größte Brechkraft auf, die Linse bricht das eintreffende Licht mit bis zu +19,5 Dioptrien, und die mit Kammerwasser gefüllte vordere Augenkammer mit -3,7 Dioptrien (Eysel, 2010).

Das Kammerwasser (mit einer Menge von ungefähr 0,3 ml pro Auge) bestimmt den Innendruck des Auges (intraokulärer Druck, IOD), der physiologisch bei etwa 15 mmHg liegt. Wie oben bereits erwähnt, wird das Kammerwasser (etwa 0,15 ml/h) vom Epithel des Ziliarkörpers in der hinteren Augenkammer (*Camera posterior*) produziert, die nach ventral durch die *Iris*, nach dorsal durch den Glaskörper und nach den Seiten durch den Ziliarkörper sowie die Linse begrenzt ist. Von dort fließt das Kammerwasser durch die Pupille in die vordere Augenkammer, welche zwischen *Cornea* und *Iris* liegt, und drainiert anschließend durch die Spalten des Trabekelwerks im Bereich des Kammerwinkels in den Schlemm-Kanal (*Sinus venosus sclerae*). Dieser leitet es in die episkleralen Venen. Treibende Kraft dieses Kammerwasserflusses ist ein Druckgradient zwischen den Augenkammern und den episkleralen Venen (Schünke et al., 2009).

Ein erhöhter Abflusswiderstand innerhalb des Trabekelwerkes führt zu einem verminderten Abfluss des Kammerwassers und in Folge dessen zu einer Zunahme des intraokulären Drucks. Dieser stellt einen Risikofaktor für die Entstehung eines Glaukoms dar (Grehn, 2012).

I.2 Glaukom

Das Glaukom (auch „grüner Star“ genannt) ist weltweit eine der häufigsten Erblindungsursachen; diesbezüglich steht es in Industrienationen an zweiter Stelle nach der altersbedingten Makuladegeneration, in Entwicklungsländern nach der Katarakt (Grehn, 2012). Im Jahr 2010 betrug die globale Prävalenz des Glaukoms geschätzt 60,5 Millionen Personen (Quigley et al., 2006), für die Jahre 2020 und 2040 wird sie mit 76 Millionen beziehungsweise 111,8 Millionen Erkrankten vorausgesagt (Tham et al., 2014). Da das Glaukom meist erst in fortgeschrittenen Stadien Symptome (in Form von Gesichtsfeldausfällen) verursacht, wird auch in Industrienationen die Hälfte aller Fälle nicht diagnostiziert (Quigley, 2011).

Unter der klinischen Definition „Glaukom“ fasst man mehrere Krankheiten unterschiedlicher Ätiologie zusammen, die jedoch alle eine typische Schädigung der

Papilla nervi optici und des Gesichtsfeldes sowie als relevantesten Risikofaktor einen Augeninnendruck gemeinsam haben (Grehn, 2012; Quigley, 2011). Weitere Risikofaktoren sind unter anderem *Diabetes mellitus*, erhöhte Triglycerid-Werte sowie hohes Alter (Bonovas et al., 2004; Ko et al., 2016).

Wie oben bereits erwähnt, beträgt der intraokuläre Druck physiologischerweise ungefähr 15 mmHg, wobei man innerhalb eines Bereiches von 10 – 21 mmHg von Normalwerten spricht. Bei einem Glaukom führen nun verschiedene pathologische Prozesse durch mechanische Beeinflussung und Minderperfusion zu einer Schädigung der Axone der retinalen Ganglienzellen und in Folge zum für das Glaukom typischen Schadensmuster der Papille, einer sogenannten Exkavation. Dies kann auf Veränderungen des Trabekelwerks mit einer Erhöhung des Abflusswiderstandes des Kammerwassers und folgendem Druckanstieg im Auge zurückgehen. Allerdings kann diese Schädigung der Nervenfasern auch durch andere, noch unbekannte Faktoren selbst ohne erhöhten Augeninnendruck hervorgerufen werden, da einerseits sogenannte Normaldruckglaukome (NDG) auch bei physiologischen Augeninnendruckwerten auftreten können, andererseits der IOD auch über dem Normbereich liegen kann, ohne zu Schäden des Sehnervs zu führen (sogenannte okuläre Hypertension) (Grehn, 2012; Quigley, 2011).

Man unterscheidet primäre Glaukome, die spontan auftreten, sowie sekundäre Glaukome, die in Folge anderer Erkrankungen, nach Traumata oder als unerwünschte Arzneimittelwirkung entstehen. Ferner werden beide Gruppen unterteilt in Offenwinkelglaukome sowie Winkelblockglaukome.

Das primäre Offenwinkelglaukom (POWG) ist die häufigste Form des Glaukoms. Im Jahr 2013 machte es fast 70 Prozent aller Glaukome weltweit aus, wobei die Prävalenz in Afrika am höchsten war (Tham et al., 2014). Es handelt sich hierbei um eine meist beidseitig im höheren Lebensalter auftretende Erkrankung, gekennzeichnet durch eine langsame Progredienz über Jahre (Heijl et al., 2009) sowie durch die typische Exkavation der Papille mit daraus resultierender Gesichtsfeldeinschränkung, die durch den Untergang der Axone der retinalen Ganglienzellen hervorgerufen wird. Der Kammerwinkel erscheint hierbei unverändert offen (nicht verlegt). Der IOD kann erhöht sein, er kann sich aber auch im Normbereich befinden (Grehn, 2012; Quigley, 2011).

Das primäre Winkelblockglaukom (PWBG) ist global betrachtet seltener als das Offenwinkelglaukom. 2013 waren circa 30 Prozent aller Glaukome weltweit

Winkelblockglaukome, wobei die Prävalenz in Asien am höchsten lag (Tham et al., 2014). Bei dieser Form kommt es zu einer Verlegung des Kammerwinkels durch die *Iris*. Dies kann entweder akut passieren („Glaukomanfall“) oder sich über einen längeren Zeitraum entwickeln. Meist liegt hierbei durch einen eingeschränkten Kammerwasserfluss durch den Zwischenraum zwischen Pupille und Linse bereits eine Anstauung von Kammerwasser in der hinteren Augenkammer vor, die die *Iris* leicht vor dem Kammerwinkel an die *Cornea* andrückt. Kommt es nun zu einer Erweiterung der Pupille (*Mydriasis*), sei es durch Dunkeladaptation oder medikamentös ausgelöst, kann der Durchfluss des Kammerwassers ganz zum Erliegen kommen und der Druck die *Iris* fest an die *Cornea* pressen. Der Kammerwinkel wird komplett blockiert, wodurch der Augeninnendruck relativ rasch und von Schmerzen sowie Sehstörungen begleitet ansteigt. Die chronische Form entsteht durch Verklebungen der *Iris* und der *Cornea* (*Goniosynechien*), die meist als Folge eines akuten Winkelblocks auftreten und den Kammerwinkel dauerhaft verlegen. Hier steigt der Druck im Auge langsam an, sodass das chronische Winkelblockglaukom erst spät Symptome verursacht (Grehn, 2012; Quigley, 2011).

I.3 Genetik des Glaukoms

Trotz des gegenwärtigen Wissensstandes bezüglich der Pathophysiologie des Glaukoms ist die genaue Ursache der Erkrankung nach wie vor unbekannt. Allerdings fanden sich bereits vor einiger Zeit Hinweise darauf, dass Glaukome (speziell das primäre Offenwinkelglaukom) eine hereditäre Komponente aufweisen. So konnten mehrere Studien nachweisen, dass Verwandte ersten Grades von Patienten mit primären Offenwinkelglaukomen ein erhöhtes Risiko im Vergleich zur Normalbevölkerung tragen, an einem solchen Glaukom zu erkranken, und darüber hinaus zu schwereren Verläufen neigen (Teikari, 1987; Tielsch et al., 1994; Wolfs, 1998; Wu et al., 2006).

Über die Jahre wurden mehrere Gene lokalisiert und identifiziert, die mit dieser Form des Glaukoms assoziiert sind (Allingham et al., 2009). Das erste dieser Gene war Myocilin (MYOC) (Sheffield et al., 1993; Stone et al., 1997), gefolgt von Optineurin (OPTN) (Rezaie et al., 2002), WDR36 (Monemi et al., 2005) und diversen weiteren, wobei sich zeigte, dass insbesondere die früh (bei Kindern und jungen Erwachsenen) auftretenden Formen des POWG einer Mendelschen Vererbung folgen (autosomal-

dominant bzw. autosomal-rezessiv), wohingegen den in höherem Lebensalter auftretenden Glaukomen eine komplexe Genetik zugrunde liegt (Wang et al., 2014). Somit hat sich das Verständnis des genetischen Hintergrundes dieser Erkrankung stetig verbessert. Aktuell werden siebzehn Genloci (GLC1A-GLC1Q) für das primäre Offenwinkelglaukom in der Datenbank des HGNC (HGNC Database, HUGO Gene Nomenclature Committee, Stand 11.09.2019) aufgelistet, wobei noch nicht alle dazugehörigen Gene identifiziert sind.

Genlocus	Chromosom	Name des Gens	Literatur
GLC1A	1q23-1q24	MYOC	Sheffield et al., 1993 Stone et al., 1997
GLC1B	2cen-q13		Stoilova et al., 1996
GLC1C	3q21-q24		Wirtz et al., 1997
GLC1D	8q23		Trifan et al., 1998
GLC1E	10p14	OPTN	Rezaie et al., 2002 Sarfarazi et al., 1998
GLC1F	7q35-q36	ASB10	Wirtz et al., 1999
GLC1G	5q22.2	WDR36	Monemi et al., 2005
GLC1H	2p16.3-p15		Suriyapperuma et al., 2007
GLC1I	15q11-q13		Allingham et al., 2005
GLC1J	9q22		Wiggs et al., 2004
GLC1K	20p12		Wiggs et al., 2004
GLC1L	3p21-p22		Baird et al., 2005
GLC1M	5q22.1-q32		Fan et al., 2007 Pang et al., 2006
GLC1N	15q22-q24		Wang et al., 2006
GLC1O	19q13.3	NTF4	Ip et al., 1992 Pasutto et al., 2009
GLC1P	12q14		Fingert et al., 2011
GLC1Q	4q35.1-q35.2		Porter et al., 2011

Tabelle 1: Übersicht der beim HGNC gelisteten Glaukom-assoziierten Genloci

Stand: 11.09.2019. Modifiziert nach: Allingham et al., 2009.

Zusätzlich zu diesen Genloci, die bis jetzt bekannt sind, wurden noch diverse weitere Genvarianten identifiziert, die mit dem primären Offenwinkelglaukom assoziiert sind. Allerdings sind diese Gene zusammen nur für einen geringen Teil der Glaukome verantwortlich, dem Großteil liegt nach wie vor eine unbekannte Genetik zugrunde (Allingham et al., 2009; Fan et al., 2006; Takamoto et al., 2014).

I.4 Das Gen ASB10

Eine wichtige Methode, um Glaukom-assoziierte Gene zu identifizieren, ist die Kopplungsanalyse. Hierfür werden Familien mit mehreren erkrankten Mitgliedern untersucht, um diese Erkrankung mit einem bestimmten chromosomalen *Locus* in Verbindung bringen zu können. Die Wahrscheinlichkeit, mittels dieser Analyse einen Zusammenhang zu finden, steigt mit der Anzahl betroffener Individuen in der Familie sowie der Anzahl an untersuchten Familien. Wurde eine Verbindung zu einem bestimmten Genlocus gefunden, können die darin enthaltenen Gene genauer analysiert werden (Allingham et al., 2009).

Unter Einsatz dieser Methode wurde in einer Familie, in der seit mindestens vier Generationen Familienmitglieder vom primären Offenwinkelglaukom betroffen waren, der Genlocus GLC1F auf Chromosom 7q35-q36 identifiziert, was einer Region von 7,9 Mbp entspricht (Wirtz et al., 1999).

Durch weitere Analysen wurde diese Region auf 2,24 Mbp eingegrenzt, innerhalb derer sich 42 Gene befinden. Mittels Sequenzierung dieser Gene innerhalb der Familie identifizierte man eine synonyme Mutation einer Base (c.765C>T, Thr255Thr) innerhalb des ASB10-Gens. Familienmitglieder mit dieser Mutation waren am primären Offenwinkelglaukom erkrankt, wohingegen Individuen ohne diese Mutation gesund waren, was ASB10 als das für die Erkrankung verantwortliche Gen dieses *Locus* sehr wahrscheinlich machte (Pasutto et al., 2012).

Die systematische Sequenzierung des ASB10-Gens zunächst innerhalb dieser Familie und danach in zwei Kohorten (amerikanisch und deutsch, Pasutto et al., 2012) ergab mehrere synonyme Genvarianten (darunter die erwähnte Mutation Thr255Thr, welche durch Beeinflussung des Spleißens der mRNA die Struktur des Proteins ändert) sowie diverse nicht-synonyme Varianten, die durch Austausch von Aminosäuren die Ladung und/oder die Polarität des Proteins verändern. Diese Varianten traten bei Patienten sowohl mit der adulten als auch der juvenilen Form des Offenwinkelglaukoms (JOWG) sowie bei Normaldruckglaukom-Patienten auf. Bei der Kontrollgruppe fanden sich ebenfalls solche Varianten, wenngleich mit niedrigerer Frequenz. In anderen Kohorten wurden weitere Mutationen des ASB10-Gens gefunden (Fingert et al., 2012), wobei man hier keine Assoziation nicht-synonymer Varianten von ASB10 mit dem POWG nachweisen konnte.

Ankyrin repeat and suppressor of cytokine signaling (SOCS) box containing protein-10 (ASB10) ist Teil einer aus achtzehn ähnlich aufgebauten Genen (ASB1-ASB18)

bestehenden Familie (Kile et al., 2000). Jedes dieser Gene weist eine bestimmte, von Gen zu Gen variierende Anzahl an *ankyrin repeat* (ANK)-Domänen sowie eine c-terminal gelegene *suppressor of cytokine signaling* (SOCS)-Box auf (Keller et al., 2013). Das ASB10-Gen codiert für sieben ANK-Domänen sowie die c-terminale SOCS-Box und existiert in zwei Isoformen (Variante 1 (v1) und Variante 3 (v3)), die sich am N-Terminus unterscheiden. Die Ursache hierfür sind verschiedene Möglichkeiten des Spleißens des ersten (5')-Exons.

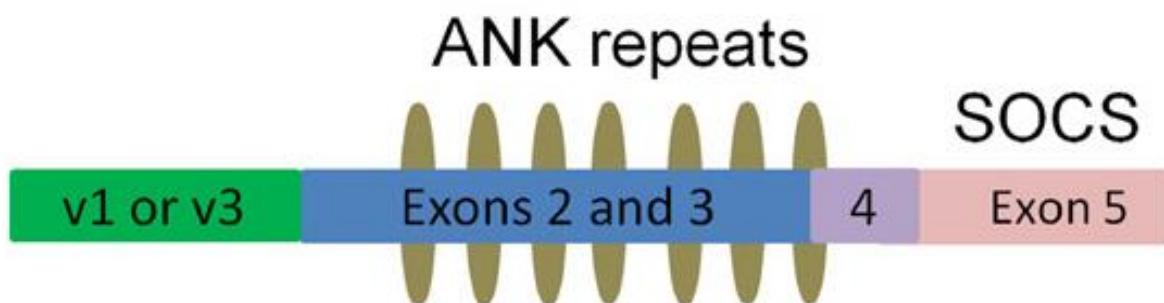


Abbildung 4: Schematischer Aufbau von ASB10

Dargestellt sind die Exons des ASB10-Gens, die sieben ANK-Domänen, die c-terminale SOCS-Box, sowie die n-terminalen Isoformen (v1 und v3). Modifiziert nach: Keller et al., 2013.

Die mögliche Funktion des durch ASB10 codierten Proteins ergibt sich aus dieser oben erwähnten Struktur. So sind ANK-Domänen eine häufig auftretende Struktur und dienen typischerweise zur Vermittlung bestimmter Interaktionen zwischen Proteinen (Mosavi et al., 2004), wobei die Anzahl der Ankyrin-Wiederholungen dafür verantwortlich zu sein scheint, welches Protein das jeweilige ASB-Protein als sein spezifisches Substrat bindet. Die c-terminale SOCS-Box wiederum bindet einen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex, der eine wichtige Rolle im *proteasomalen* Abbau intrazellulärer Proteine spielt (Kohroki et al., 2005).

Da man darüber hinaus nachweisen konnte, dass ASB3 die Ubiquitinierung und den folgenden Abbau des Tumornekrosefaktor-alpha-Rezeptors Typ II vermittelt (Chung et al., 2005), sowie, dass ASB4 und ASB9 dieselben Vorgänge bei Insulinrezeptor-Substrat 4 (Li et al., 2011) beziehungsweise Kreatinkinase B (Debrincat et al., 2007) bewirken, wurde eine ähnliche Beteiligung von ASB10 an Ubiquitin-vermittelten intrazellulären Abbauprozessen sehr wahrscheinlich.

Keller et al. (Keller et al., 2013) konnten diese Annahme schließlich stützen, indem sie mittels immunhistochemischer Methoden den Nachweis erbrachten, dass das ASB10-Protein in Zellen des menschlichen Trabekelwerkes eine teilweise

Kolokalisation mit bestimmten Biomarkern sowohl des Ubiquitin-vermittelten *proteasomalen* Abbausystems als auch des *Autophagosom-Lysosom*-Abbauweges aufweist (siehe Abbildung 5).

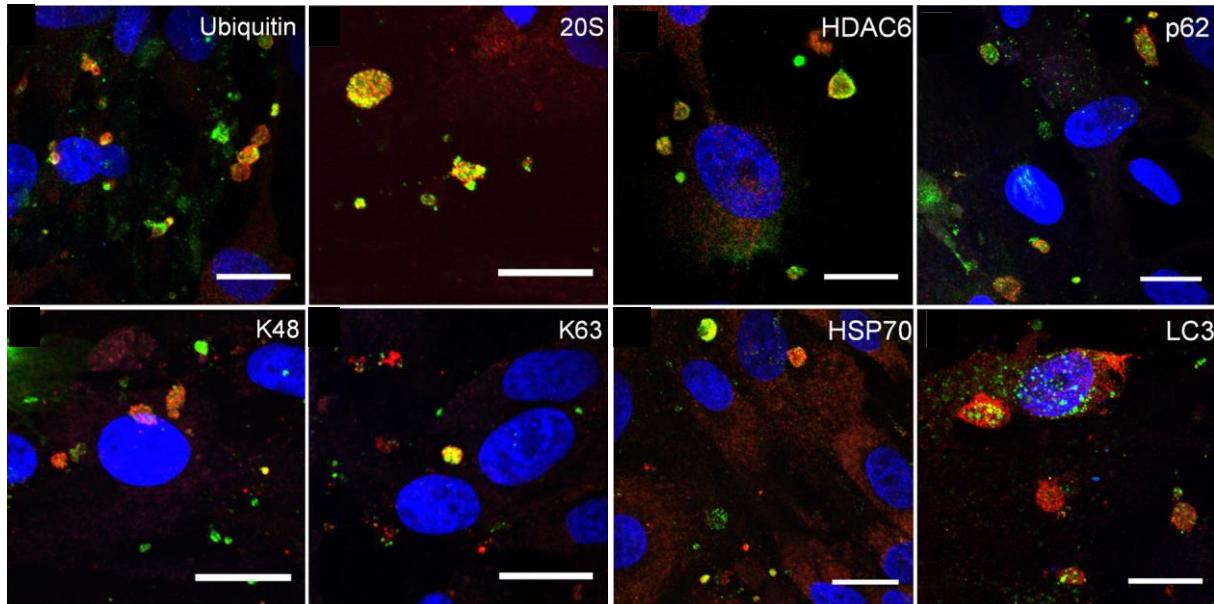


Abbildung 5: Kolokalisation von ASB10-Antikörpern (rot) mit Antikörpern gegen mehrere Biomarker der zellulären Abbaupfade (grün).

Die Abbildung zeigt Fluoreszenzfärbungen menschlicher Trabekelwerkszellen. In grün wurden gefärbt: Gesamt-Ubiquitin (**Ubiquitin**), die alpha-4-Untereinheit des 20S-Proteasoms (**20S**), Histon-Deacetylase 6 (**HDAC6**), p62 (**p62**), K48-gebundenes Ubiquitin (**K48**), K63-gebundenes Ubiquitin (**K63**), Hitzeschockprotein 70 (**HSP70**), light chain 3 (**LC3**). Die Zellkerne (blau) wurden mit DAPI dargestellt. Die Maßstabsbalken entsprechen 20 µm. Modifiziert nach: Keller et al., 2013.

Dies sind die zwei hauptsächlichen Wege der Zelle, fehlerhafte oder nicht mehr benötigte intrazelluläre Proteine zu beseitigen, welche andernfalls die Zelle in ihrer Funktion beeinträchtigen könnten (Dikic, 2017). *Proteasomen* sind Proteinkomplexe von der Form eines Hohlzylinders. Abzubauende Proteine werden zunächst mit einer Kette aus mehreren Ubiquitin-Molekülen als Substrat des *Proteasoms* markiert, anschließend entfaltet, durch das *Proteasom* hindurchgeführt und dabei in Fragmente zerteilt, welche dann weiter abgebaut werden. Bei Beeinträchtigung oder Überlastung dieses Abbauweges steht der Zelle als Alternative die *Autophagozytose* zur Verfügung (Pandey et al., 2007). Hierbei werden die abzubauenden Proteine von der Zelle mit einer de novo synthetisierten doppelten Membran umschlossen. Das so gebildete *Autophagosom* fusioniert mit einem *Lysosom*, welches abbauende Enzyme

enthält, zu einem *Autolysosom*, in welchem der Inhalt schließlich verdaut wird (Lüllmann-Rauch, 2009).

ASB10 scheint an beiden Abbaupfaden beteiligt zu sein, indem es über die ANK-Domänen die abzubauenden Proteine bindet und über den durch die SOCS-Box gebundenen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex die Proteine mit einer Polyubiquitinkette als Substrat für den Abbau markiert (Keller et al., 2013).

I.5 Zielsetzung der Arbeit

Varianten des Gens ASB10 sind mit dem Glaukom assoziiert (Pasutto et al., 2012). Das entsprechende Protein zeigt in Zellen des menschlichen Trabekelwerkes eine Kolokalisation mit Biomarkern Ubiquitin-vermittelter Abbauprozesse und ist vermutlich integraler Bestandteil dieser Prozesse (Keller et al., 2013). Jedoch tritt Ubiquitin nicht nur im Trabekelwerk, sondern nahezu in jeder Zelle des menschlichen Körpers auf, da die meisten dieser Zellen Stoffwechsel betreiben und somit einer Möglichkeit des Abbaus fehlerhafter oder überschüssiger Proteine bedürfen. Aufgrund der Rolle, die ASB10 bei der Ubiquitinierung der abzubauenden Proteine zu spielen scheint, ist daher anzunehmen, dass ASB10 nicht nur im Auge, sondern noch in weiteren Organen und Geweben des Körpers exprimiert wird.

Ziel dieser Arbeit war es daher, unter Verwendung heterozygoter ASB10-Reportermäuse mittels histologischer Färbemethoden die ASB10-Expression sowohl innerhalb verschiedener Organe und Gewebe adulter Mäuse als auch in Mausembryonen zu lokalisieren und zu analysieren.

II. Material und Methoden

II.1 Verwendete Materialien

II.1.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

II.1.1.1 Liste der Verbrauchsmaterialien

Materialien	Bezugsquelle
Biosphere Filter Tips	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Deckgläser 24x50 mm, 24x60 mm	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig
Ecoflo® Perfusionsbesteck	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Einmalspritzen 1 ml, 20 ml	Henry Schein Inc., Melville, USA
Glaspipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Glaswaren	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe; Schott AG, Mainz; VWR International GmbH, Darmstadt
Handschuhe Nitril (dünn)	Kimberly-Clark Worldwide Inc., Irving, USA
Handschuhe Nitril (dick)	VWR International GmbH, Darmstadt
Labortücher	Kimberly-Clark Worldwide Inc., Irving, USA
Liquid Blocker Circle Writer (Fine)	Science Services GmbH, München
Ohrmarken	H. Hauptner & Richard Herberholz GmbH & Co. KG, Solingen
Parafilm	Bemis Company Inc., Neenaw, USA
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
PCR Soft Tubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Personna® Rasierklingen	American Safety Razor Company, Verona, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Präparierbesteck	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg; Heiko Wild GmbH, Tuttlingen
Reaktionsgefäße Multi® 1,5 ml, 2 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Serologische Pipetten	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Sterile Injektions-Kanülen	Henry Schein Inc., Melville, USA
SuperFrost®Plus Objektträger	Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig
Well-Platten (6/12/24 Wells)	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg; VWR International GmbH, Darmstadt

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

II.1.1.2 Geräteliste

Geräte	Bezugsquelle
Ausbettautomat (Paraffin) MPS/P2	SLEE medical GmbH, Mainz
Consort E835 Electrophoresis Power Supply	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Einbettautomat (Paraffin) HMP110	Microm International GmbH, Walldorf
Gelelektrophoresekammern	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Julabo SW 20 Wasserbad	Julabo GmbH, Seelbach
Mastercycler Personal	Eppendorf AG, Hamburg
Memmert Wärmeschrank	Memmert GmbH, Schwabach
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Microm HM 500 OM Kryostat	Microm International GmbH, Walldorf
Mikroskop Axio Imager Z1	Carl Zeiss AG, Göttingen
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA
NanoDrop-1000 Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Perfusionsautomat PHD 2000	Harvard Apparatus, Holliston, USA
Pipetman Pipetten	Gilson Inc., Middleton, USA
Pipettierhilfe Macroman	Gilson Inc., Middleton, USA
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Kelheim
Research Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Sprout Minizentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Stemi 2000 CS Stereomikroskop	Carl Zeiss AG, Göttingen
Supercut 2050 (Paraffin)	Reichert-Jung, Wien, Österreich
T-100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA
Waagen Kern 510-33, Vibra CG-620	Kern & Sohn GmbH, Balingen; Shinko Denshi Co. Ltd., Tokyo, Japan
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf AG, Hamburg

Tabelle 3: Geräte

II.1.2 Liste der Reagenzien

Reagenzien	Bezugsquelle
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal)	Bioline GmbH, Luckenwalde
10x PCR-Puffer	Labor-Eigenproduktion
Agarose peqGOLD Universal	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Aluminiumsulfat ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$)	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Borat (Natriumtetraborat)	Merck KGaA, Darmstadt
DePeX	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
dNTPs (10 mM)	Bioline GmbH, Luckenwalde
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA, Dinatriumsalz-Dihydrat)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Gelatine	
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Glutaraldehyd (25%)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isofluran	Abbott Laboratories, Chicago, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3 \text{ H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhexacyanoferrat(III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kernechtrot	Merck KGaA, Darmstadt
Ketamin	WDT eG, Garbsen
Magnesiumchlorid (MgCl_2 , 50 mM)	Bioline GmbH, Luckenwalde
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat (NaDC)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe; Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriummonohydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Darmstadt
Paraffin	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nußloch
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Tergitol	Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, USA
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Tris/HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wasser Rotisolv®	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wintergrünöl (Salicylsäuremethylester)	Apotheker Bauer & Cie. oHG, München

Xylazin	Serumwerk Bernburg AG, Bernburg
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Zedernholzöl	Merck KGaA, Darmstadt

Tabelle 4: Reagenzien

II.1.3 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Proteinase K	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Taq DNA-Polymerase	Labor-Eigenproduktion

Tabelle 5: Enzyme

II.1.4 Zusammensetzung von Gelen, Puffern und Lösungen

II.1.4.1 Verwendete Gele

Gel	Zusammensetzung
Agarose-Gel 1%	1g Agarose 100 ml 1x TBE-Puffer 3 µl Ethidiumbromid

Tabelle 6: Gele

II.1.4.2 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Glutaraldehyd, 0,2%	8 µl Glutaraldehyd 25% 1 ml 1x PBS
Kernechtrot-Färbelösung	0,2 g Kernechtrot 10 g Al ₂ (SO ₄) ₃ 200 ml A.d. Unter Rühren und Erhitzen lösen, vor Gebrauch abkühlen lassen und filtrieren.
LacZ-Färbelösung	0,03 g K ₃ [Fe(CN) ₆] 0,04 g K ₄ [Fe(CN) ₆] x 3 H ₂ O 0,75 ml X-Gal (25 mg/ml in DMSO) 18 ml LacZ-Waschpuffer
LacZ-Waschpuffer	2 ml 1 M MgCl ₂ 10 ml 1% (w/v) NaDC 10 ml 2% (v/v) Tergitol 978 ml 0,1 M Phosphatpuffer
Mausschwanz-Lysepuffer	50 mM KCl

	10 mM Tris/HCl, pH = 8,3 2 mM MgCl ₂ 0,1 mg/ml Gelatine 0,45% (v/v) Tergitol 0,45% (v/v) Tween 20 Grundlage: steriles H ₂ O Je 1 ml Lysepuffer wurden vor Gebrauch 500 µg Proteinase K frisch zugegeben.
PBS, 10x	80 g NaCl 2 g KCl 18,05 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ Lösen in A.d., ad 1 l. pH = 7,4
Paraformaldehyd (PFA), 8%	8 g PFA 100 ml Phosphatpuffer Unter Rühren und Erwärmen lösen.
Phosphatpuffer, 0,1 M	A: Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 35,6 g auf 2 l A.d. B: NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O; 13,8 g auf 1 l A.d. Verhältnis A:B = 5:1 pH = 7,4
TBE, 10x	108 g Tris 55 g Borat 40 ml 0,5 M EDTA, pH = 8 Lösen in A.d., ad 1 l.

Tabelle 7: Puffer und Lösungen

II.1.5 Oligonukleotid-Primer

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

Primer	Orientierung	Sequenz von 5' nach 3'	Amplikon
Neo-Ndp	Forward	TGAATGAAC TG CAGGAC GAG	515 bp
	Reverse	AATATCACGGGTAGCCAACG	
ASB10-Test-WT	Forward	CTCAGTTCTCAGCACCCACA	480 bp
	Reverse	CTTCAGTCCGACCATCCACT	
TIE2-GFP	Forward (1263)	ATTCTCGTGGAACTGGATGG	567 bp
	Reverse (1264)	GGACAGGTAATGGTTGTCTGG	

Tabelle 8: Oligonukleotid-Primer

II.2 Versuchstiere und deren Haltung

II.2.1 Verwendete Mauslinien

Die Tierexperimente wurden mit den beiden folgenden Mauslinien durchgeführt:

- 1) ASB10^{+/−}-Mäuse im C57BL/6-Hintergrund.
- 2) PLVAP^{+/−}- bzw. PLVAP^{−/−}-Mäuse im C57BL/6-Hintergrund.

Beide Mauslinien waren zuvor bereits am Institut etabliert worden. Die Tiere wurden alle unter standardisierten artgerechten Bedingungen (Raumtemperatur 23°C ± 2°C, relative Luftfeuchtigkeit 55% ± 5%, 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus, Futter und Wasser ad libitum) im selben Tierstall gehalten.

Bei der Mauslinie ASB10^{+/−} erfolgt der Knock-Out des ASB10-Gens durch das Einschieben einer Kassette zwischen Exon 2 und Exon 3 (vgl. Abb. 6). Dieses eingeschobene Konstrukt enthält jeweils eine promotergesteuerte *LacZ*- und Neomycin-Kassette, was den Nachweis des Knock-Outs mittels für diese Kassetten spezifischer Polymerase-Kettenreaktionen ermöglicht.

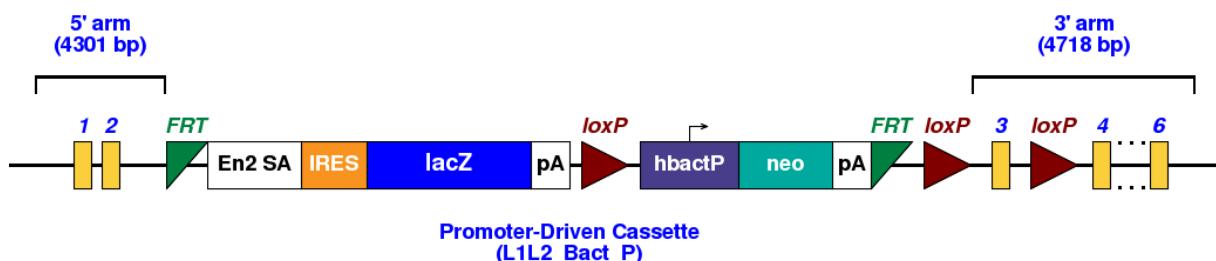


Abbildung 6: Schematische Darstellung der zum ASB10^{+/−}-Knock-Out führenden Insertion

(International Mouse Phenotyping Consortium, www.mousephenotype.com)

Zum Zwecke der Zucht der Mauslinie ASB10^{+/−} wurden entweder zwei ASB10^{+/−}-Tiere oder ein ASB10^{+/−}-Tier mit einem ASB10^{+/+}-Tier desselben genetischen Hintergrundes (C57BL/6) verpaart. In den Wochen nach der Verpaarung der Tiere wurde täglich kontrolliert, ob Jungtiere in den Käfigen waren, um das Alter der Nachkommen möglichst genau bestimmen zu können. Im Alter von drei bis vier Wochen wurden die Nachkommen von der Mutter abgesetzt und unter kurzer Isofluran-Inhalationsnarkose mit nummerierten Ohrmarken versehen. Anschließend wurde zum Zwecke der Bestimmung des Genotyps der Jungtiere eine Mausschwanz-Biopsie entnommen (circa 0,5 cm der Schwanzspitze).

Zum Zeitpunkt der Versuche mit den adulten Tieren waren die Mäuse stets sechs bis acht Wochen alt. Für die Versuche mit den Embryonen wurde der Kaiserschnitt stets am Embryonaltag E 10,5 bis 11,5 durchgeführt. Hierbei erfolgte die vorherige Verpaarung der Elterntiere ($ASB10^{+/-} \times ASB10^{+/-}$ bzw. $ASB10^{+/-} \times ASB10^{+/+}$ sowie $PLVAP^{+/-} \times PLVAP^{+/-}$) lediglich über eine Dauer von maximal zwei Nächten, um den entsprechenden Embryonaltag möglichst präzise festlegen zu können.

Für alle Versuche wurden heterozygote ($ASB10^{+/-}$, $PLVAP^{+/-}$) bzw. homozygote ($PLVAP^{-/-}$) Reportermäuse verwendet, als Kontrolle dienten stets homozygote Wildtyp-Geschwistertiere ($ASB10^{+/+}$, $PLVAP^{+/+}$).

II.2.2 Gewebepräparation

II.2.2.1 Präparation der adulten Tiere

Für die Gewebepräparation der adulten Tiere wurden die Mäuse nach kurzer Isofluran-Inhalationsnarkose durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurden die Peritonealhöhle, der Thorax und der Schädel eröffnet und folgende Organe und Gewebe entnommen: Herz, Thymus, Lunge (rechter Flügel), Leber (zwei kaudale Segmente des rechten Lappens), Niere (rechts), Uterus (rechtes Horn) bzw. Hoden (rechts), Milz und Pankreas, Dünndarm (oraler Abschnitt), Aorta abdominalis, Speicheldrüse (rechts), Skelettmuskel (*M. soleus* bzw. *gastrocnemius* rechts), Auge (rechts), Gehirn, sowie ein Spinalganglion (rechtsseitig). Alle Organe wurden unmittelbar nach der Entnahme in isotoner Kochsalzlösung (0,89% NaCl) gespült und anschließend unfixiert zur Herstellung von Kryoschnitten eingebettet.

II.2.2.2 Präparation der Embryonen

Um embryonales Gewebe untersuchen zu können, wurde das schwangere Weibchen unter kurzer Inhalationsnarkose mit Isofluran durch intraperitoneale Injektion einer Mischung aus Xylazin und Ketamin (0,1 ml Xylazin und 0,3ml Ketamin) narkotisiert. Bei ausreichender Tiefe der Narkose (fehlende Reaktion auf Schmerzreize an den Extremitäten) wurde die Peritonealhöhle eröffnet und das Diaphragma von kaudal durchstoßen, um einen beidseitigen Pneumothorax und somit den Tod durch Hypoxie herbeizuführen. Daraufhin wurde der gesamte Uterus abgesetzt und in eine Petrischale (gefüllt mit 1xPBS-Puffer, auf Eis gelagert) überführt. Hier wurden die

Embryonen von den sie umgebenden Eihäuten befreit und in eine weitere Petrischale mit 1xPBS-Puffer auf Eis verbracht, in welcher jedem Embryo ein Stück des Schwanzes zur Genotypisierung abgeschnitten wurde, bevor er zur Herstellung der *LacZ*-Färbung in eine nummerierte Well-Platte überführt wurde.

II.3 Methoden der Molekularbiologie

II.3.1 DNA-Isolierung aus Mausschwanz-Biopsien

Zur Bestimmung des Genotyps der verwendeten Tiere wurde zunächst die benötigte DNA aus Mausschwanz-Biopsien isoliert. Hierfür wurde ein circa 0,5 cm langes Stück des Schwanzes in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit je 200 µl Lysepuffer (mit Proteinase K) über Nacht bei 55 °C und 750 Upm im Thermomixer inkubiert. Im Anschluss wurde durch Erhitzen der Probe auf 95 °C für 10 min die Proteinase K inaktiviert und somit die Lyse gestoppt. Nach Zentrifugation der Probe (10 min bei maximaler Umdrehung von 13000 Upm) wurde der Überstand als Template für die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt.

II.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren zur Vervielfältigung (*Amplifizierung*) bestimmter, durch spezifische Oligonukleotid-Primer exakt festgelegter DNA-Sequenzen. Der entsprechende Abschnitt der DNA (*Amplikon*) wird hierbei exponentiell vervielfältigt, sodass selbst kleinste Mengen DNA im Anschluss mittels Gelelektrophorese nachgewiesen werden können.

Der Knock-Out des ASB10-Gens wurde durch eine Neomycin-PCR überprüft, die das Vorhandensein der in das Gen eingeschobenen Neomycin-Kassette detektiert (vgl. Abb. 6). Folgender Reaktionsansatz wurde für je eine DNA-Probe verwendet:

Reagenz	Volumen
10x PCR-Puffer	2,5 µl
5x Glycerol	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Primer: Neo-Ndp fwd (1:10 mit H ₂ O verdünnt)	0,5 µl
Primer: Neo-Ndp rev	0,5 µl

(1:10 mit H ₂ O verdünnt)	
Taq-DNA-Polymerase	0,3 µl
H ₂ O	13,95 µl
DNA-Template	1 µl
Summe	25 µl

Tabelle 9: Ansatz der Neomycin-PCR

Die einzelnen Schritte der PCR wurden anschließend in einem Thermocycler gemäß dem folgenden Programm durchgeführt:

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Zyklen
1) Denaturierung	94 °C	2 min	
2) Denaturierung	94 °C	20 sec	
3) Primeranlagerung	59 °C	20 sec	
4) Elongation	72 °C	40 sec	35x (Schritte 2 bis 4)
5) Elongation	72 °C	5 min	
6) Aufbewahrung	10 °C	∞	

Tabelle 10: Programm der Neomycin-PCR

Um zusätzlich herauszufinden, ob bei den Tieren ein heterozygoter (ASB10^{+/}) oder ein homozygoter (ASB10^{-/-}) ASB10-Knock-Out vorlag, wurde jede DNA-Probe auch für eine ASB10-Wildtyp-spezifische PCR verwendet:

Reagenz	Volumen
10x PCR-Puffer	2,5 µl
5x Glycerol	5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Primer: ASB10-Test-WT fwd (1:10 mit H ₂ O verdünnt)	0,5 µl
Primer: ASB10-Test-WT rev (1:10 mit H ₂ O verdünnt)	0,5 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,3 µl
H ₂ O	13,95 µl
DNA-Template	1 µl
Summe	25 µl

Tabelle 11: Ansatz der ASB10-Wildtyp-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Zyklen
1) Denaturierung	94 °C	2 min	

2) Denaturierung	94 °C	30 sec	35x (Schritte 2 bis 4)
3) Primeranlagerung	58 °C	30 sec	
4) Elongation	72 °C	40 sec	
5) Elongation	72 °C	5 min	
6) Aufbewahrung	10 °C	∞	

Tabelle 12: Programm der ASB10-Wildtyp-PCR

PV-1-Knock-Out-Mäuse wurden zur Kontrolle der Spezifität der *LacZ*-Färbung in den Embryonen eingesetzt. Zum Nachweis des PV-1-Knock-Out wurde die folgende PCR verwendet:

Reagenz	Volumen
10x PCR-Puffer	1,5 µl
5x Glycerol	3 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,3 µl
dNTPs (10 mM)	0,3 µl
Primer: TIE2-GFP fwd (1263) (1:10 mit H ₂ O verdünnt)	0,3 µl
Primer: TIE2-GFP rev (1264) (1:10 mit H ₂ O verdünnt)	0,3 µl
Taq-DNA-Polymerase	0,3 µl
H ₂ O	8 µl
DNA-Template	1 µl
Summe	15 µl

Tabelle 13: Ansatz der PV-1-KO/TIE2-GFP-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer	Zyklen
1) Denaturierung	94 °C	3 min	
2) Denaturierung	94 °C	30 sec	35x (Schritte 2 bis 4)
3) Primeranlagerung	60 °C	1 min	
4) Elongation	72 °C	1 min	
5) Elongation	72 °C	5 min	
6) Aufbewahrung	10 °C	∞	

Tabelle 14: Programm der PV-1-KO/TIE2-GFP-PCR

II.3.3 Gelelektrophorese

Zum Nachweis der mittels der PCR amplifizierten DNA-Abschnitte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Es handelt sich hierbei um eine Methode zur Trennung geladener Teilchen, wie z.B. DNA-Fragmente, nach ihrer Größe. Bei

Kenntnis der Länge des Amplikons lässt sich somit eine Aussage über sein Vorhandensein und damit den Genotyp des Tieres treffen.

Für das Agarose-Gel wurde 1 g Agarose in 100 ml 1x TBE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Die beim Erhitzen verdunstete Flüssigkeit wurde in Form von dH₂O wieder aufgefüllt und die Lösung etwas abgekühlt. Nach Hinzugabe von 3 ml Ethidiumbromid (0,01%), welches sich in die DNA einlagert und unter UV-Licht somit das vervielfältigte DNA-Fragment sichtbar macht, wurde die Agaroselösung in eine Gelkammer gegossen und mit Plastikkämmen versehen, welche in das noch flüssige Gel hineinragten und so für die Bildung von Taschen sorgten, in die später die Proben aufgetragen werden konnten. Nach Aushärtung des Gels wurden die Kämme entfernt, das Gel in eine Elektrophoresekammer überführt und diese mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt.

Anschließend wurden je 12,5 µl der Proben in die Taschen pipettiert. Das im Rahmen der PCR bereits zugegebene Glycerol diente hierbei zur Verhinderung einer Rückdiffusion nach der Beladung der Taschen. Zusätzlich zu den DNA-Proben wurden 3,5 µl eines Größenstandards aufgetragen.

Die Elektrophorese erfolgte schließlich bei einer Spannung von 130 V über einen Zeitraum von 35 min. Da die DNA infolge ihrer negativ geladenen Phosphatreste effektiv ein Polyanion ist, wandert sie hierbei zur Anode. Nach der Auf trennung der Fragmente wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen und in einen Transilluminator überführt, in welchem die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mithilfe einer Kamera dokumentiert wurden.

II.4 Histologische Arbeitstechniken

II.4.1 Einbettung und Herstellung von Kryoschnitten

Zur Herstellung der *LacZ*-Färbungen der Organe wurden Kryoschnitte benötigt. Da sich fixiertes Gewebe als einer *LacZ*-Färbung nicht zugänglich erwies, wurden die entnommenen Organe unmittelbar nach ihrer Entnahme lediglich kurzzeitig in 0,89% NaCl gespült, um sie von Blutrückständen zu reinigen, und anschließend unfixiert in Tissue-Tek® eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefrosten. Anschließend wurden von den gefrorenen Blöcken mit einem Kryotom 12 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgetragen und bis zur Färbung bei -20 °C gelagert.

II.4.2 *LacZ*-Färbung

Wie oben bereits erwähnt (vgl. Abb. 6), wurde der Knock-Out des ASB10-Gens durch Insertion eines Genkonstrukts erzielt, welches unter anderem eine Promoter-gesteuerte *LacZ*-Kassette enthält. Das Protein, für welches diese Kassette codiert, ist ein Enzym, die β -*Galactosidase*. Diese spaltet Lactose in Glucose und Galactose. Durch den Einschub dieses Konstrukts wurde in den ASB10^{+/−}-Mäusen das *LacZ*-Gen anstelle des ASB10-Gens abgelesen, und in den Zellen statt dem ASB10-Protein die β -*Galactosidase* produziert. Dies kann man zum Erstellen einer sog. *LacZ*-Färbung nutzen. Sie basiert auf einer enzymatischen Umsetzung: Stellt man dem Enzym als Substrat 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid (*X-Gal*) zur Verfügung, wird dieses unter Abspaltung von Galactose zu 5-Brom-4-chlor-indoxyl umgesetzt. Nach Oxidation und Dimerisierung entsteht daraus 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo, ein unlöslicher blauer Farbstoff. Da das *LacZ*-Gen anstelle des ASB10-Gens abgelesen wird, ist die Blaufärbung in denjenigen Geweben am intensivsten, in denen ASB10 am stärksten exprimiert wird.

Im Falle der Organe adulter Mäuse erwies sich die Herstellung von Kryoschnitten und anschließende Färbung derselben als effektivste Methode. Folgendes Vorgehen wurde hierfür angewendet: Die in einer Kühltruhe bei -20 °C gelagerten Objektträger wurden herausgeholt und die Schnitte mit einem PAP-Stift umkreist. Daraufhin wurden sie in 0,2% Glutaraldehyd für 10 min bei 4 °C fixiert und danach dreimal je 5-10 min mit *LacZ*-Waschpuffer bei RT gewaschen. Anschließend wurde jeder der mit dem PAP-Stift umkreisten Schnitte mit *LacZ*-Färbelösung bedeckt und die Objektträger in feuchte Kammern gelegt. Der Färbevorgang fand über Nacht statt, bei 37 °C und lichtgeschützt (in einem Brutschrank). Nach erfolgter Färbung wurden die Schnitte kurzzeitig in 1x PBS gespült, um sie von Rückständen der Färbelösung zu säubern, und nach Waschen in dH₂O mit Kernechtrot-Färbelösung für 2 min gegengefärbt. Schließlich, nachdem den Schnitten mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe Wasser entzogen worden war (1x 5 min Isopropanol 70%, 1x 5 min Isopropanol 80%, 2x 5 min Isopropanol 96%, 2x 10 min Isopropanol 100%, 2x 10 min Xylol), wurden sie mit DePeX eingedeckelt und bis zur Auswertung mittels Mikroskopie bei RT gelagert.

Die Embryonen wurden im Ganzen gefärbt. Dazu wurden sie zunächst in einer Well-Platte ohne vorherige Fixierung mit *LacZ*-Färbelösung bedeckt und für zwei Stunden vor Licht geschützt bei 37 °C gefärbt (im Wärmeschrank). Nach dreimaligem Spülen

der Embryonen mit *LacZ*-Waschpuffer (2x kurzzeitig, 1x 10 min) erfolgte die Fixierung mit 8% PFA bei 4 °C über Nacht. Anschließend wurde ein Protokoll durchgeführt, um das Gewebe der Embryonen transparent zu machen. Dazu wurden die Embryonen zunächst ebenfalls mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (2x 30 min dH₂O, 30 min Isopropanol 70%, 30 min Isopropanol 96%, 2x 30 min Isopropanol 100%). Daraufhin wurden sie für 30 min mit Wintergrünöl (Salicylsäuremethylester) bedeckt. Dieser Schritt erfolgte in kleinen Glasgefäßen, da Wintergrünöl bestimmte Kunststoffe zersetzen kann. Eine Lagerung der nun transparenten Embryonen in Wintergrünöl war nicht möglich, da der Ester über mehrere Tage die *LacZ*-Färbung lösen würde. Daher wurden die Embryonen bis zum Fotografieren bei 4 °C in Zedernholzöl gelagert.

II.5 Mikroskopie/Fotografie

Die Analyse der gefärbten und eingedeckelten Kryoschnitte erfolgte mittels des Mikroskops Axio Imager Z1. Zur Fotografie der gefärbten ganzen Embryonen wurde eine auf ein Stereomikroskop montierte Kamera verwendet.

III. Ergebnisse

III.1 ASB10-Knock-Out

Bereits bei der Etablierung der verwendeten ASB10-Mauslinie am Institut hatte sich herausgestellt, dass sich bei der Verpaarung zweier heterozygoter ASB10^{+/−}-Tiere keine homozygoten ASB10^{−/−}-Tiere unter den Nachkommen befanden. Daraus ergab sich die Vermutung, dass der homozygote Knock-Out von ASB10 möglicherweise bereits in einem frühen embryonalen Stadium letal ist. Um diesen Verdacht zu überprüfen, wurden Mauseembryonen am Embryonaltag E10,5 präpariert und für jedes Tier sowohl eine Knock-Out-spezifische Neomycin-PCR als auch eine Wildtyp-spezifische ASB10-PCR durchgeführt (vgl. Kap. II.3.2). Hierbei zeigte sich, dass keiner der Embryonen einen homozygoten ASB10^{−/−}-Genotyp aufwies (vgl. Abb. 7), was die genannte Hypothese von der früh-embryonalen Letalität der homozygoten ASB10-Deletion stützt. Daher wurden alle Versuche der vorliegenden Arbeit mit ASB10^{+/−}-Mäusen durchgeführt.

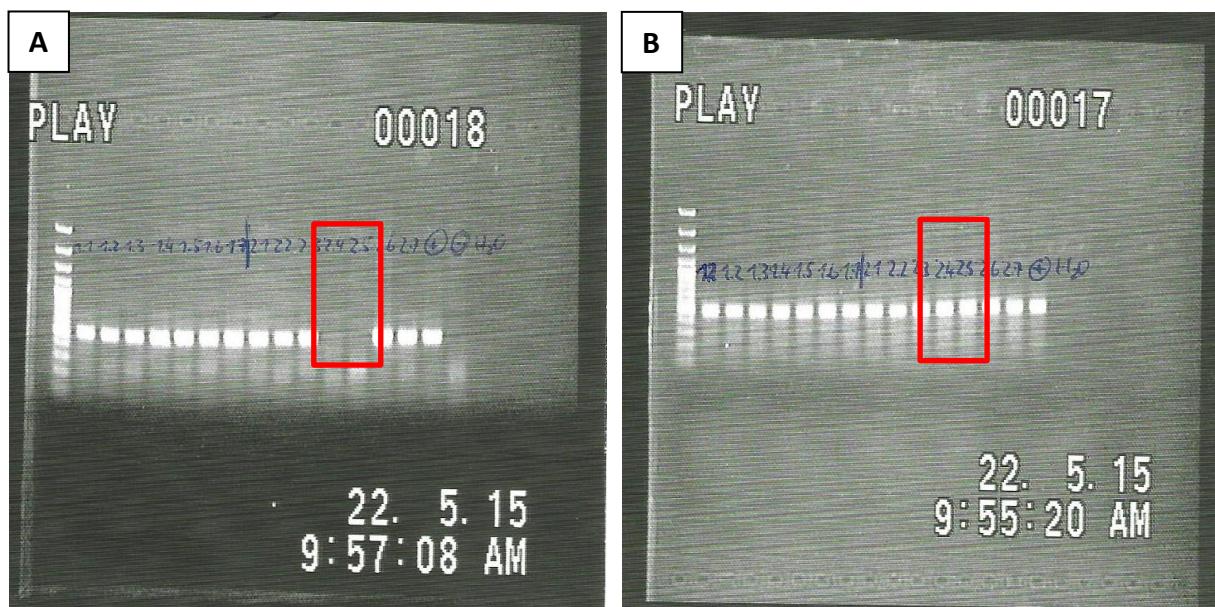


Abbildung 7: PCRs zweier Würfe der Embryonalpräparation

ASB10-Knock-out-PCR (**A**) und ASB10-Wildtyp-PCR (**B**) zweier Würfe von am Embryonaltag E 10,5 präparierten Embryonen. Lediglich die Embryonen 2.4 und 2.5 zeigen keinen ASB10-Knock-out (vgl. **A**), jedoch zeigt sich kein Embryo ohne Ausprägung des Wildtyp-Allels (vgl. **B**).

III.2 Lokalisation der ASB10-Expression in adulten Mäusen

Um die ASB10-Expression in adulten Mäusen lokalisieren und darstellen zu können, wurden *LacZ*-Färbungen von Kryoschnitten mehrerer Organe von ASB^{+/−}-Mäusen im Vergleich mit homozygoten Wildtyp-Geschwistertieren angefertigt. Hiernach stellten sich ASB10-exprimierende Strukturen gefärbt (in Form multipler blauer Punkte) dar. Um die *LacZ*-Färbung den anatomischen Strukturen präziser zuordnen zu können, wurde die Hälfte der auf diese Weise gefärbten Schnitte anschließend mit einer Kernechtrot-Lösung gegengefärbt. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Organ-Präparation stets sechs bis acht Wochen alt.

Die Gefrierschnitte der Wildtypen wiesen hierbei nach Durchführung des Färbeprotokolls keine Blaufärbung auf, sodass von einer spezifischen Reaktion der *LacZ*-Färbung auf den Knock-Out des ASB10-Gens entsprechend seiner Expression (vgl. Kap. II.4.2) ausgegangen werden kann. Exemplarisch seien hier Aufnahmen der Retina eines Wildtyps nach *LacZ*-Färbung dargestellt (vgl. Abb. 8, G und H).

Das Auge (vgl. Abb. 8, A bis F) zeigt nach der beschriebenen Präparation und Färbung eine Expression von ASB10 in der *Retina*, dem Sehnerv und dem Ziliarepithel, sowie in deutlich geringerem Maße auch in der Leder-, Gefäß- und der Hornhaut. In der *Retina* folgt die Blaufärbung dem schichtförmigen Aufbau, indem sie sich auf die Innensegmente der Photorezeptoren bis zur äußeren Grenzschicht, die äußere plexiforme Schicht, die innere Körnerschicht sowie die Perikaryen der Ganglienzellen konzentriert. Die übrigen Schichten der Netzhaut zeigen sich fast vollständig ohne blaue Färbung.

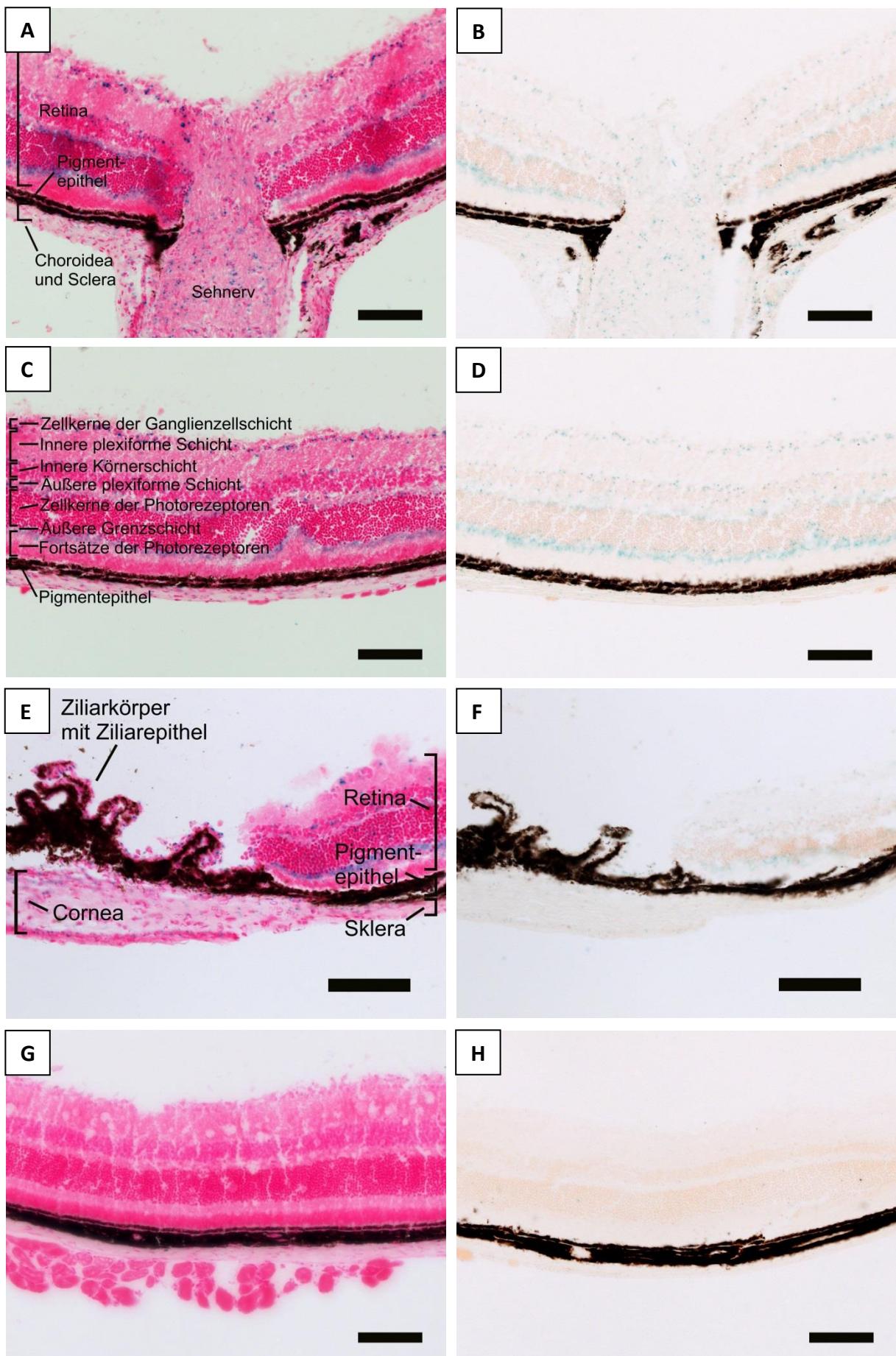


Abbildung 8: Detailaufnahmen des Auges

Detailaufnahmen der Papille (**A** und **B**), der Netzhaut (**C** und **D**) und des Ziliarkörpers (**E** und **F**) einer ASB10⁺⁻-Maus sowie der Netzhaut eines Wildtyps (**G** und **H**). **A**, **C**, **E** und **G** mit Kernechtrot gegengefärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

Diese Verteilung der *LacZ*-Färbung ist durchaus nachvollziehbar. Wenn ASB10, wie oben bereits erwähnt, an zellulären Abbauprozessen beteiligt ist (Keller et al., 2013), muss es auch in dem Kompartiment der Zelle exprimiert werden, in dem der größte Teil des Stoffwechsels stattfindet und in dem daher auch die größere Menge zu beseitigenden Materials entsteht. Im Falle der Photorezeptoren der Netzhaut findet der Stoffwechsel vor allem in den Innensegmenten statt, in den Ganglienzellen (und anderen Neuronen) im Bereich ihrer Perikaryen (Lüllmann-Rauch, 2009).

Die *LacZ*-Färbung kann entlang der *Retina* bis zum Ziliarkörper und der Papille verfolgt werden. Das Ziliarepithel, von welchem, wie bereits erwähnt, das Kammerwasser produziert wird, stellt sich kräftig gefärbt dar. Der Sehnerv zeigt eine gleichmäßige blaue Färbung, wobei sich eine Konzentrierung der Färbung um die erkennbaren Zellkerne feststellen lässt. Da sich die Perikaryen der Ganglienzellen in der *Retina* befinden und der Sehnerv lediglich aus ihren Axonen gebildet wird, sind dies die Zellkerne der Gliazellen. Dies führt zu der Annahme, dass auch die Gliazellen ASB10 exprimieren.

Die Gefrierschnitte des Gehirns unterstützen diese Hypothese (vgl. Abb. 9). Sie zeigen eine deutliche Konzentration der Blaufärbung in denjenigen Arealen, die relativ viele Zellkerne enthalten.

Der Neocortex des Mäuse-Gehirns ist lissencephalisch (d. h. im Gegensatz zum menschlichen Gehirn ohne *Gyri* und *Sulci*) aufgebaut und besteht aus insgesamt sechs Schichten (I – VI), wobei die Schichten II und III nicht unmittelbar voneinander getrennt werden können und daher zusammengefasst werden. Schicht I, welche den zellreichen Hirnhäuten (*Meningen*) direkt anliegt, enthält überwiegend Neuropil und nur wenige Zellkerne von Neuronen und Gliazellen, wohingegen die folgende Schicht II/III zahlreiche Perikaryen von Körnerzellen (auch Sternzellen genannt) sowie kleinen Pyramidenzellen enthält. Die weiteren Schichten bestehen aus den Zellkernen von Körnerzellen (IV), großen Pyramidenzellen (V) sowie fusiformen Zellen (VI) (Conti et al., 2004).

In begrenztem Ausmaß spiegelt sich diese Aufteilung auch in der *LacZ*-Färbung wider (vgl. Abb. 9, A und B). So stellen sich die Hirnhäute deutlich gefärbt dar, wobei

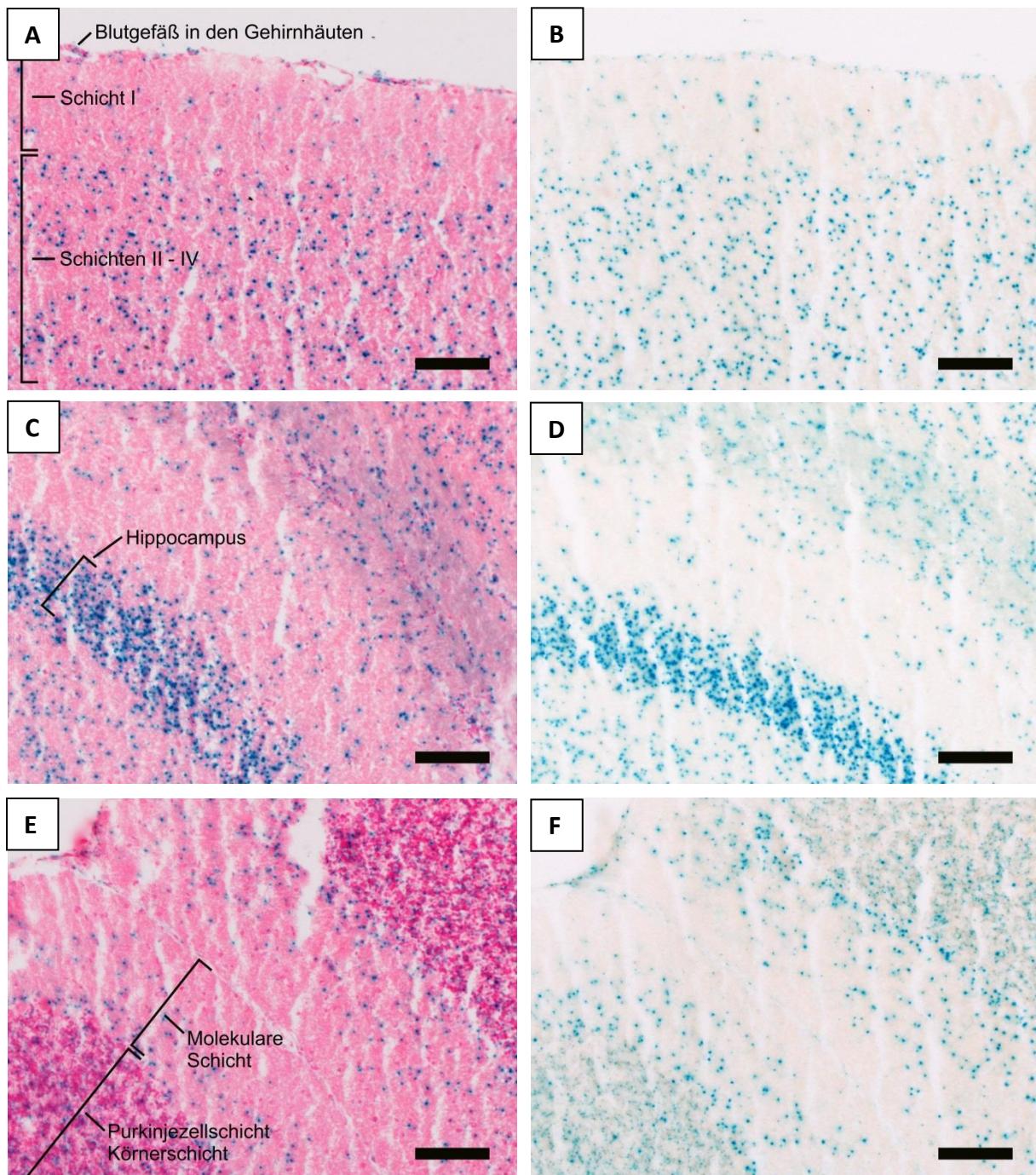


Abbildung 9: Detailaufnahmen des Gehirns

Detailaufnahmen der Großhirnrinde (A und B), des Hippocampus (C und D) sowie des Kleinhirns (E und F). A, C und E mit Kernechtrot gegengefärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

insbesondere die in ihnen enthaltenen Blutgefäße eine blaue Färbung aufweisen. In der direkt darunter gelegenen Schicht I hingegen lassen sich lediglich vereinzelte blaue Farbpunkte erkennen, die sich meist in der Nähe eines Zellkerns befinden. Die sich daran anschließenden zellkernreichen Schichten II bis VI lassen sich zwar in den Gefrierschnitten nicht voneinander unterscheiden, grenzen sich jedoch durch

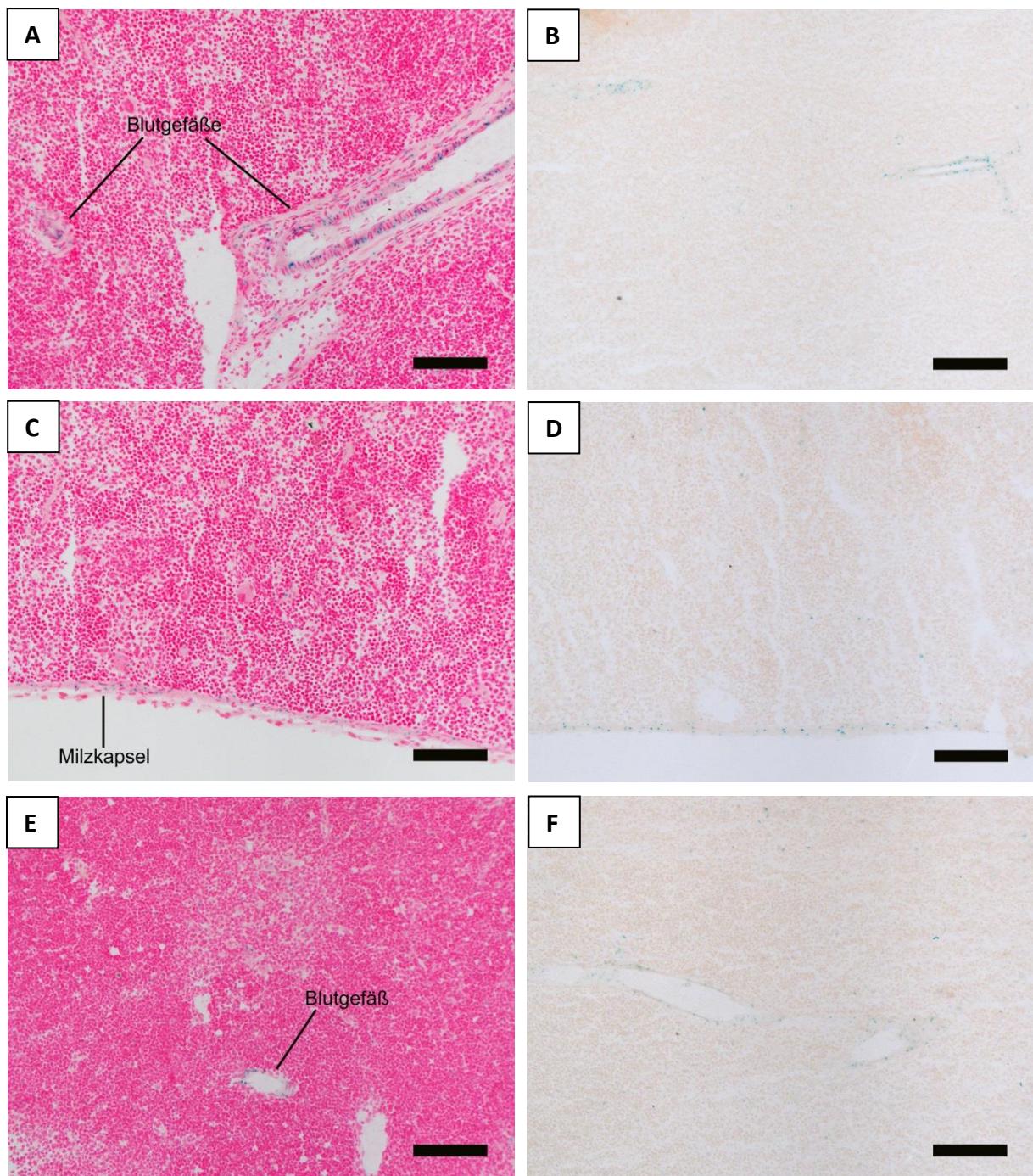


Abbildung 10: Detailaufnahmen von Milz und Thymus

Detailaufnahmen von Blutgefäßen im Parenchym der Milz (A und B) und des Thymus (E und F) sowie der Milzkapsel (C und D). A, C und E mit Kernechtrot gegengefärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

ihre starke Reaktion auf die *LacZ*-Färbung deutlich von der ersten Schicht ab. Ebenso verhält es sich mit dem auf den Schnitten erkennbaren Hippocampus (vgl. Abb. 9, C und D): auch hier zeigt sich eine ausgeprägte Färbung speziell in den zellkernhaltigen Arealen.

Die Rinde des menschlichen Kleinhirns (*Cerebellum*) schließlich ist ähnlich dem Cortex des Großhirns schichtförmig aufgebaut (Lüllmann-Rauch, 2009), aus der außen gelegenen, weitgehend zellkernlosen molekularen Schicht, nach innen gefolgt von der Purkinjezellschicht und der Körnerschicht (welche beide eine große Anzahl von Zellkernen aufweisen). Ebenso lässt sich in den Gefrierschnitten des Maus-Kleinhirns ein schichtförmiger Aufbau mit unterschiedlicher Ausprägung der *LacZ*-Reaktion in den einzelnen Schichten erkennen (vgl. Abb. 9, E und F). So stellt sich die nach außen gelegene, weitgehend zellkernlose Schicht nur vereinzelt gefärbt dar. Die nach innen folgenden Schichten weisen hingegen eine hohe Dichte an Zellkernen sowie eine starke Blaufärbung auf.

Zusammenfassend zeigt das Gehirn als ein sehr stoffwechselaktives Organ eine insgesamt deutliche Blaufärbung, die auf eine hohe ASB10-Expression schließen lässt. Da der Stoffwechsel der Neurone in ihren Perikaryen stattfindet, stellen sich die Bereiche des Gehirns mit der höchsten Dichte an Zellkernen entsprechend am stärksten gefärbt dar.

Die Milz (vgl. Abb. 10, A bis D) zeigt insgesamt eine geringe Färbungsreaktion, in ihrem Gewebe sind lediglich vereinzelt Punkte blauer Färbung erkennbar. Relativ stark gefärbt hingegen sind, wie es auch bereits in den Hirnhäuten der Fall war, die Anschnitte der im Parenchym verlaufenden Blutgefäße. Dies legt die Vermutung nahe, dass die glatte Muskulatur der Gefäßwand möglicherweise auch ASB10 exprimiert. Darüber hinaus weist die Milzkapsel eine im Vergleich zum Milzgewebe stärker ausgeprägte *LacZ*-Reaktion auf.

Ähnlich der Milz lässt sich auch beim Thymus (vgl. Abb. 10, E und F) nahezu keine Blaufärbung des Parenchyms erkennen. Die darin angeschnittenen Blutgefäße jedoch zeigen auch hier eine starke Reaktion auf die *LacZ*-Färbung.

Eine sehr ausgeprägte Farbreaktion zeigt die Niere (vgl. Abb. 11 und 12, A und B). Bereits auf der Übersichtsaufnahme sieht man eine homogene Färbung des Nierenparenchyms, die sich zum Nierenbecken und zum Harnleiter (*Ureter*) hin intensiviert.

Das Nierenparenchym besteht aus den Nierenkörperchen, den sogenannten *Nephronen*. Jedes *Nephron* besteht aus einem *Glomerulus*, einem Gefäßknäuel, in welchem durch Filtration von Flüssigkeit und Stoffen aus dem Blut der Primärharn erzeugt wird, sowie dem *Tubulus*-System. Dieses ist ein Gangsystem, dessen Epithel dieses Filtrat (den Primärharn) durch Entzug von Flüssigkeit konzentriert und seine

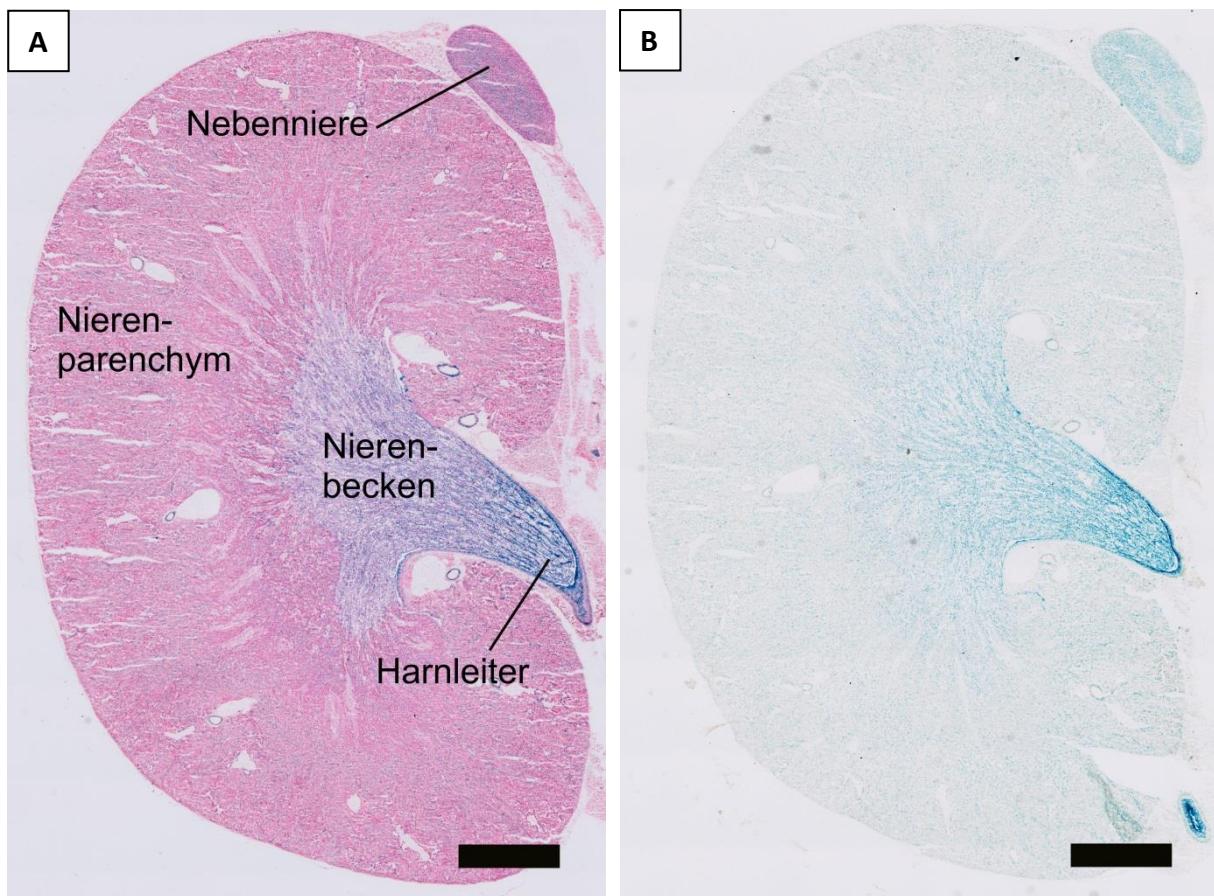


Abbildung 11: Übersichtsaufnahmen von Niere und Nebenniere

Bild A mit Kernechtrot gefärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen 1000 µm.

Zusammensetzung durch Resorption und Exkretion verschiedener Stoffe an die aktuellen Bedürfnisse des Organismus anpasst. Hierdurch entsteht schließlich der Endharn (Lang, 2010; Lüllmann-Rauch, 2009). Beide Strukturen lassen sich in den Gefrierschnitten der Niere deutlich erkennen, und es zeigt sich eine intensive Färbung sowohl der *Glomeruli* als auch der *Tubulus*-Anschnitte. Im Falle der *Glomeruli* lässt sich die Blaufärbung nicht präzise einer bestimmten anatomischen Struktur zuordnen. In den *Tubuli* hingegen lässt sich die Farbreaktion nahezu ausschließlich im Epithel nachweisen. Dies erscheint nachvollziehbar, da zur Anpassung der Urinzusammensetzung auch aktive Stoffwechselvorgänge erforderlich sind.

Darüber hinaus sind im Gewebe der Niere ebenfalls Anschnitte von Blutgefäßen zu erkennen, die sich erneut intensiv gefärbt darstellen. Die oben erwähnte Vermutung, dass ASB10 möglicherweise in glatter Muskulatur exprimiert wird (welche auch in der Wand von Blutgefäßen vorhanden ist), erhält Unterstützung durch die intensive

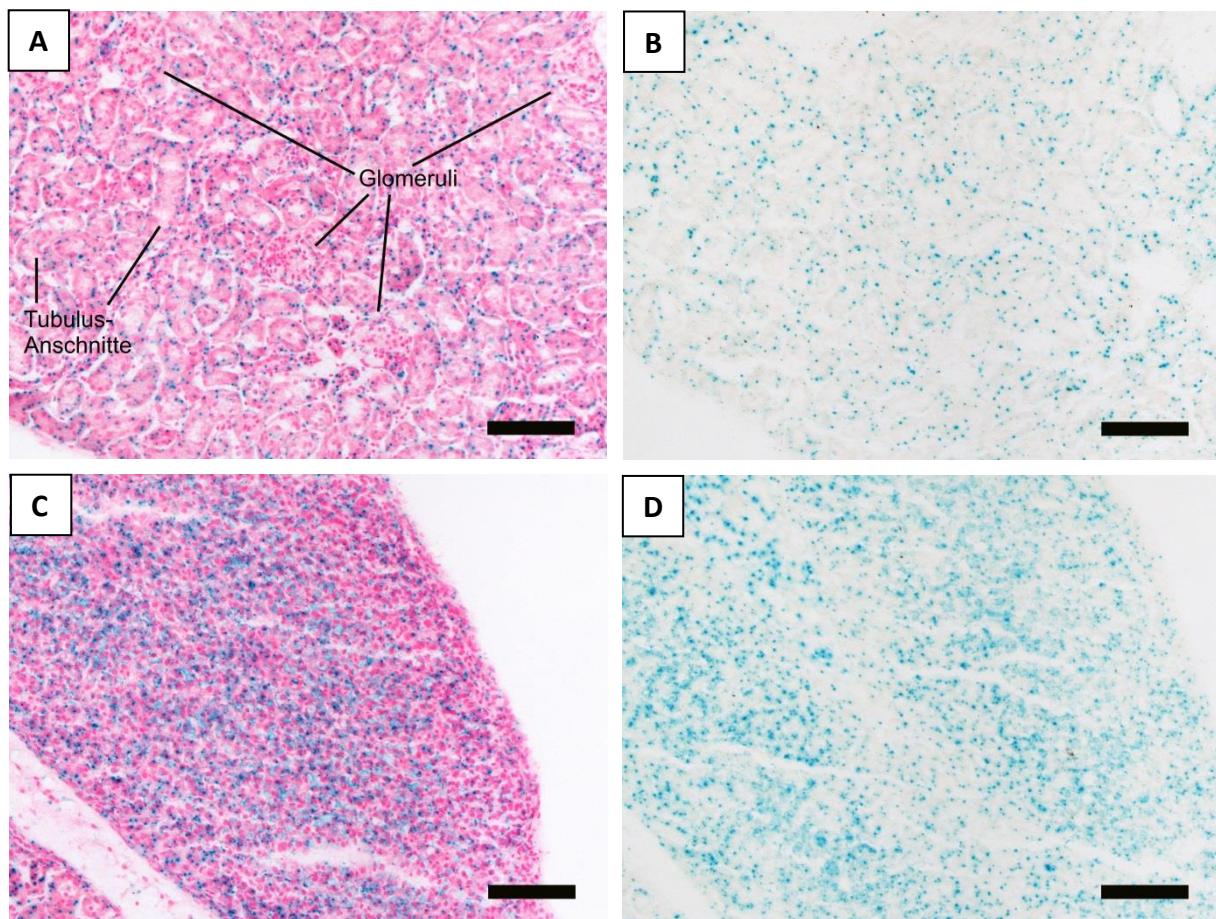


Abbildung 12: Detailaufnahmen von Niere und Nebenniere

Detailaufnahmen von Nierenparenchym (A und B) und Nebenniere (C und D). A und C mit Kernechtrot gegengefärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

Farbreaktion des Harnleiters, dessen Wand zwei bis drei Schichten glatter Muskulatur enthält (Lüllmann-Rauch, 2009).

Bei der kranial der Niere gelegenen Nebenniere (vgl. Abb. 11 und 12, C und D) handelt es sich um eine endokrine Drüse, bestehend aus zwei verschiedenen Anteilen: Rinde und Mark. Während die Rinde der Nebenniere diverse Steroidhormone synthetisiert, handelt es sich bei ihrem Mark anatomisch um ein sympathisches Ganglion des vegetativen (autonomen) Nervensystems (Lüllmann-Rauch, 2009). Ein neuronales Ganglion stellt eine Ansammlung der Perikaryen von Nervenzellen dar. Da Neurone sehr stoffwechselaktiv sind und ihr Stoffwechsel in den Perikaryen stattfindet, stellt dies eine mögliche Erklärung für die intensiv ausgeprägte blaue Färbungsreaktion des Nebennierengewebes dar.

Eine ausgeprägte Reaktion auf die LacZ-Färbung zeigt auch das Herz. Die Wand des Herzens ist aus drei Schichten aufgebaut. Von innen nach außen sind dies das Endokard, welches aus Endothel besteht und sich in die Intima der zu- und

abführenden Gefäße fortsetzt, das Myokard, eine Schicht gestreifter Muskulatur aus Herzmuskelzellen (*Kardiomyozyten*), und das Epikard, welches als Serosa-Überzug die Außenfläche des Herzens bedeckt (Lüllmann-Rauch, 2009). Hier zeigt das Myokard, welches die stärkste der drei Wandschichten darstellt, eine deutliche Reaktion auf die *LacZ*-Färbung (vgl. Abb. 13, A und B).

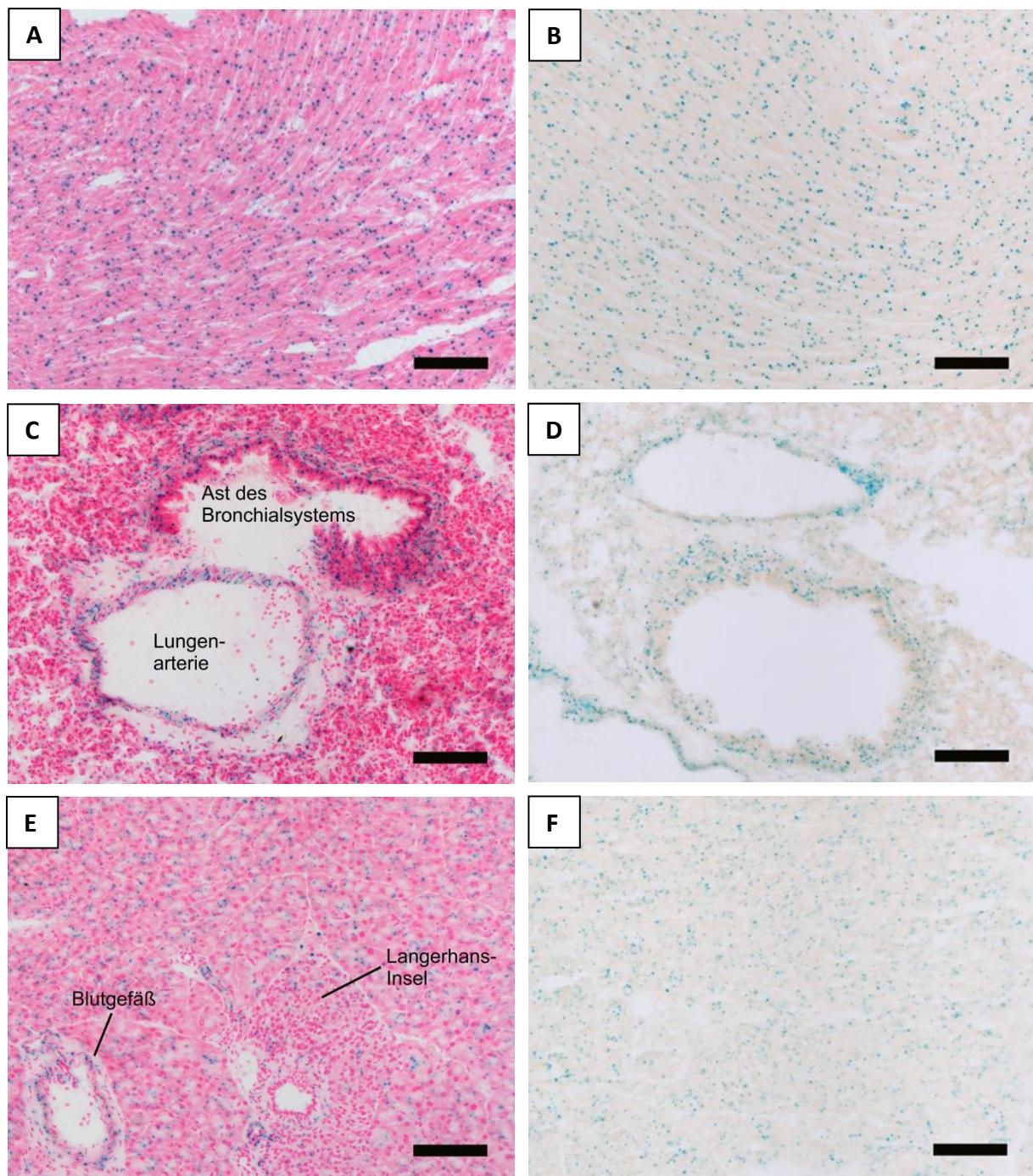


Abbildung 13: Detailaufnahmen von Herz, Lunge und Pankreas

Detailaufnahmen von Myokard (**A** und **B**), Lungenparenchym mit Bronchus und Lungenarterie (**C** und **D**) sowie Pankreasparenchym mit einer Langerhansschen Insel (**E** und **F**). **A**, **C** und **E** mit Kernechtrot gegengefärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

Bei Betrachtung der Lunge lässt sich in ihrem Parenchym lediglich eine leichte Blaufärbung feststellen (vgl. Abb. 13, C und D). Jedoch heben sich in diesem Organ mehrere Strukturen durch ihre kräftigere Färbung hervor: Ein Ast der Lungenarterie (*Arteria pulmonalis*) sowie, diesen begleitend, ein Ast des Bronchialsystems (*Bronch(iol)us*), erkennbar an dem ihn auskleidenden hochprismatischen Epithel.

Ähnlich den Blutgefäßen enthält auch die Wand des Bronchialsystems eine Schicht glatter Muskulatur, die zur Regulation der Weite der Atemwege dient (Lüllmann-Rauch, 2009) und eine deutliche Reaktion auf die *LacZ*-Färbung zeigt. Bei genauerer Betrachtung des *Bronch(iol)us* fällt zudem auf, dass die Blaufärbung nicht nur in der Muskelschicht vorhanden ist, sondern darüber hinaus auch im Epithel.

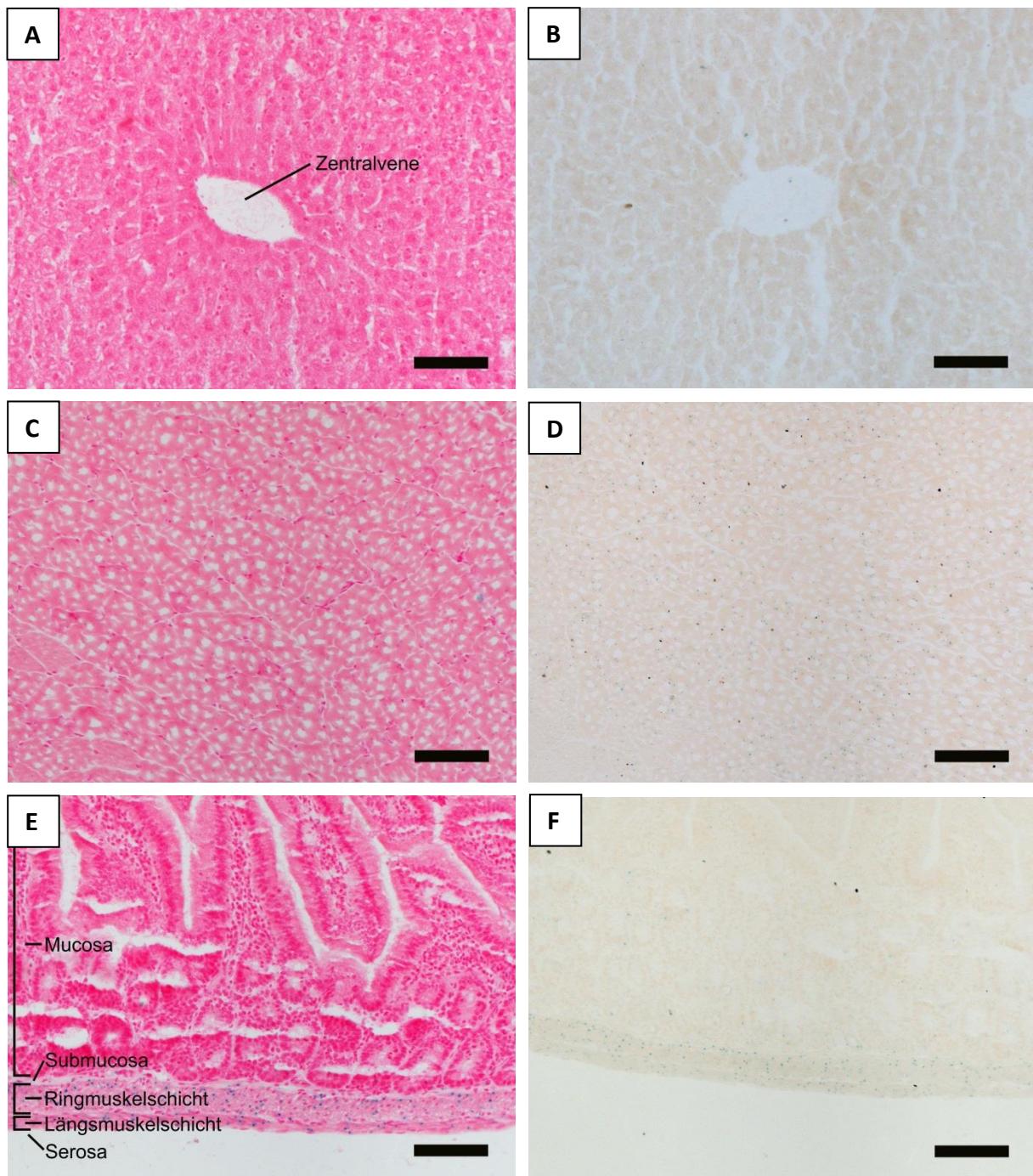


Abbildung 14: Detailaufnahmen von Leber, Skelettmuskel und Dünndarm

Detailaufnahmen des Leberparenchyms mit Zentralvene (A und B), eines Ausschnittes der Wadenmuskulatur (C und D) und der Dünndarmwand (E und F). A, C, und E mit Kernechtrot gefärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

Das Pankreas lässt sich funktionell und histologisch in zwei Anteile gliedern. Das exokrine Pankreas, welches den Hauptteil der Masse des Organs bildet und aus serösen Azinus-Zellen besteht, dient der Sekretion diverser Verdauungsenzyme. Das endokrine Pankreas, gebildet durch die sogenannten Langerhansschen Inseln, ist für die Produktion und Abgabe verschiedener Hormone wie beispielsweise Insulin

verantwortlich (Lüllmann-Rauch, 2009). In den Gefrierschnitten (vgl. Abb. 13, E und F) weisen beide Anteile der Bauchspeicheldrüse nach der *LacZ*-Reaktion eine ausgeprägte Blaufärbung auf.

Das Parenchym der Leber zeigt keine Blaufärbung nach Durchführung der *LacZ*-Farbreaktion (vgl. Abb. 14, A und B). Dies ist insofern bemerkenswert, dass die Leberzellen (*Hepatozyten*) überaus stoffwechselaktive Zellen sind. Ihre Funktionen umfassen sowohl die Produktion und Sekretion von Gallenflüssigkeit, Serumproteinen, Lipoproteinen und Gerinnungsfaktoren als auch die Resorption, Metabolisierung und Elimination verschiedener körpereigener und körperfremder Substanzen mittels zellulärer Abbauprozesse. Darüber hinaus ist die Leber für die Aufrechterhaltung des Blutzuckerspiegels wichtig, indem sie Glucose sowohl in Form von Glykogen speichern und bei Bedarf wieder freisetzen als auch durch Glukoneogenese direkt produzieren kann (Lüllmann-Rauch, 2009).

Exemplarisch für die Skelettmuskulatur wurde die Wadenmuskulatur (*Musculus gastrocnemius* und *Musculus soleus*) auf ASB10-Expression untersucht. Der Schnitt durch den Muskel offenbart seinen Aufbau aus längsverlaufenden Muskelfasern, welche das Zellindividuum der Skelettmuskulatur darstellen, mit ihren randständigen Zellkernen (Lüllmann-Rauch, 2009). Im Inneren einiger Fasern lässt sich eine leichte Blaufärbung erkennen, wobei sie hier im Vergleich zur Herzmuskelatur sowie zur glatten Muskulatur relativ schwach ausgeprägt ist (vgl. Abb. 14, C und D).

Der Dünndarm als muskuläres Hohlorgan zeigt ebenfalls eine kräftige *LacZ*-Reaktion. Die Wand des Dünndarms ist von innen (luminal) nach außen aus mehreren Schichten aufgebaut: einer Schleimhaut (*Tunica mucosa*) mit darunter befindlichem Bindegewebe (*Tela submucosa*), einer Muskelschicht aus glatter Muskulatur (*Tunica muscularis*), bestehend aus einem ringförmig verlaufenden Anteil innen und einem längs verlaufenden Anteil außen, sowie einer Außenschicht aus *Peritoneum* (*Tunica serosa*, bei intraperitonealer Lage) bzw. Bindegewebe (*Tunica adventitia*, bei retroperitonealer Lage) (Lüllmann-Rauch, 2009). Nach *LacZ*-Färbung der Schnitte tritt eine deutliche Blaufärbung nahezu ausschließlich in den beiden glatten Muskelschichten und nur vereinzelt in der Schleimhaut auf (vgl. Abb. 14, E und F).

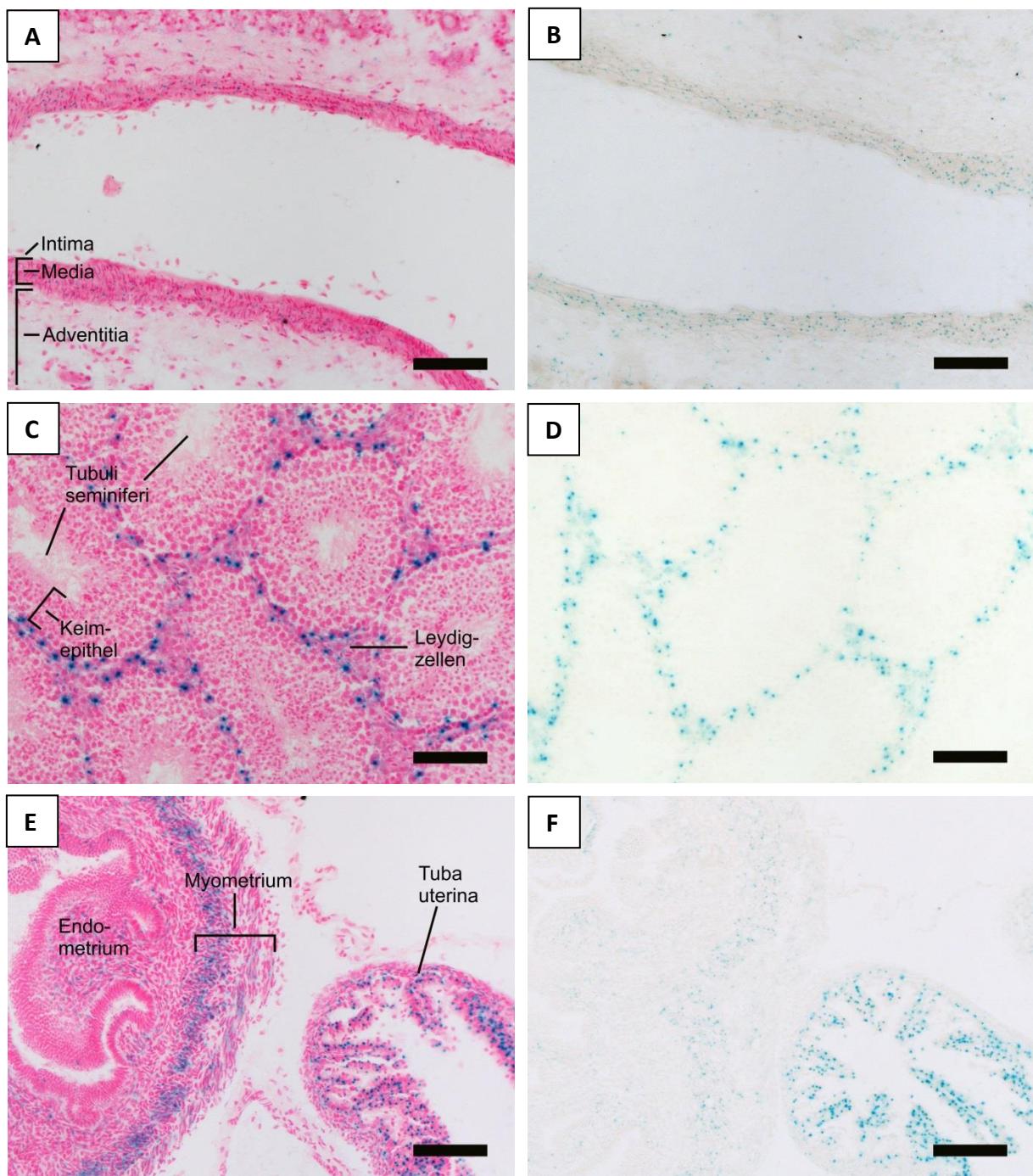


Abbildung 15: Detailaufnahmen von Aorta, Hoden und Uterus

Gezeigt sind die Wand der *Aorta abdominalis* im Längsschnitt (A und B) sowie Gewebe von Hoden (C und D) und *Uterus* mit *Tuba uterina* (E und F). A, C und E mit Kernechtrot gegefärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

Mehrmals waren in Schnitten verschiedener Organe auch Anschnitte von Blutgefäßen enthalten, die sehr häufig ein deutliches Ansprechen auf die *LacZ*-Färbung aufwiesen. Um dies genauer zu untersuchen, erfolgte die Präparation der *Aorta abdominalis*. Die Arterienwand ist ebenfalls schichtweise aufgebaut: zuinnerst die sehr schmale *Intima* mit dem *Endothel*, welches das *Lumen* der Gefäße

auskleidet, anschließend die *Media* als breiteste Schicht, die vor allem aus glatter Muskulatur sowie elastischen und kollagenen Fasern besteht, und nach außen hin eine Bindegewebsschicht (*Adventitia*) zur Verankerung des Gefäßes in seiner Umgebung (Lüllmann-Rauch, 2009). Bei Betrachtung des Längsschnittes durch die *Aorta abdominalis* (vgl. Abb. 15, A und B) erkennt man eine betonte Blaufärbung der glatten Muskelschicht zusammen mit einer etwas schwächer ausgeprägten Farbreaktion des die Aorta umgebenden Bindegewebes.

Bei den männlichen Mäusen wurden darüber hinaus die Hoden präpariert. Der Schnitt durch die Hoden (*Testes*) zeigt ihren Aufbau aus Hodenkanälchen (*Tubuli seminiferi*), welche von dem aus Sertoli-Zellen und Keimzellen gebildeten Keimepithel ausgekleidet werden, sowie aus zwischen den Kanälchen lokalisierten Gruppen von Leydig-Zellen (vgl. Abb. 15, C und D). Die Funktion der Sertoli-Zellen, welche der Basalmembran der Hodenkanälchen aufsitzen, besteht in der Bildung der Blut-Hoden-Schranke zur Schaffung des für die Spermatogenese notwendigen Milieus. Zudem dienen sie als Stützzellen, zwischen deren Ausläufern sich die Keimzellen entwickeln können. Die Leydig-Zellen wiederum sind für die Produktion der Androgene (vor allem Testosteron) verantwortlich (Lüllmann-Rauch, 2009).

Bei Betrachtung der gefärbten Gefrierschnitte des Hodens fällt vor allem auf, dass die Blaufärbung sich entlang der Basallamina der *Tubuli seminiferi* konzentriert. In diesem Bereich befinden sich die Zellkerne der Sertoli-Zellen sowie die *Spermatogonien*, die Ausgangszellen der Spermatogenese. Die zwischen den *Tubuli* gelegenen Leydig-Zellen hingegen stellen sich deutlich schwächer gefärbt dar.

Im Falle der weiblichen Mäuse wurde ein Teil der Gebärmutter (*Uterus*) sowie des Eileiters (*Tuba uterina*) präpariert und gefärbt. Der *Uterus* ist ein Hohlorgan, dessen Wand von innen nach außen aus folgenden Schichten aufgebaut: einer Schleimhaut (*Endometrium*), einer Schicht glatter Muskulatur (*Myometrium*), sowie einer Bindegewebsschicht (*Perimetrium*). Bei der *Tuba uterina* handelt es sich ebenfalls um ein Hohlorgan aus glatter Muskulatur mit einer auf charakteristische Weise gefalteten Schleimhaut, welches den *Uterus* mit dem Eierstock (*Ovar*) verbindet (Conti et al., 2004; Lüllmann-Rauch, 2009). Betrachtet man die Gefrierschnitte der beiden Organe (vgl. Abb. 15, E und F), fällt auf, dass sich im Falle des *Uterus* vor allem das *Myometrium*, speziell der innere Anteil, intensiv *LacZ*-gefärbt darstellt. Doch auch das *Endometrium* weist eine leichte Blaufärbung auf. Der Eileiter zeigt ebenfalls eine kräftige Färbung, wobei sich hier bei genauer Betrachtung

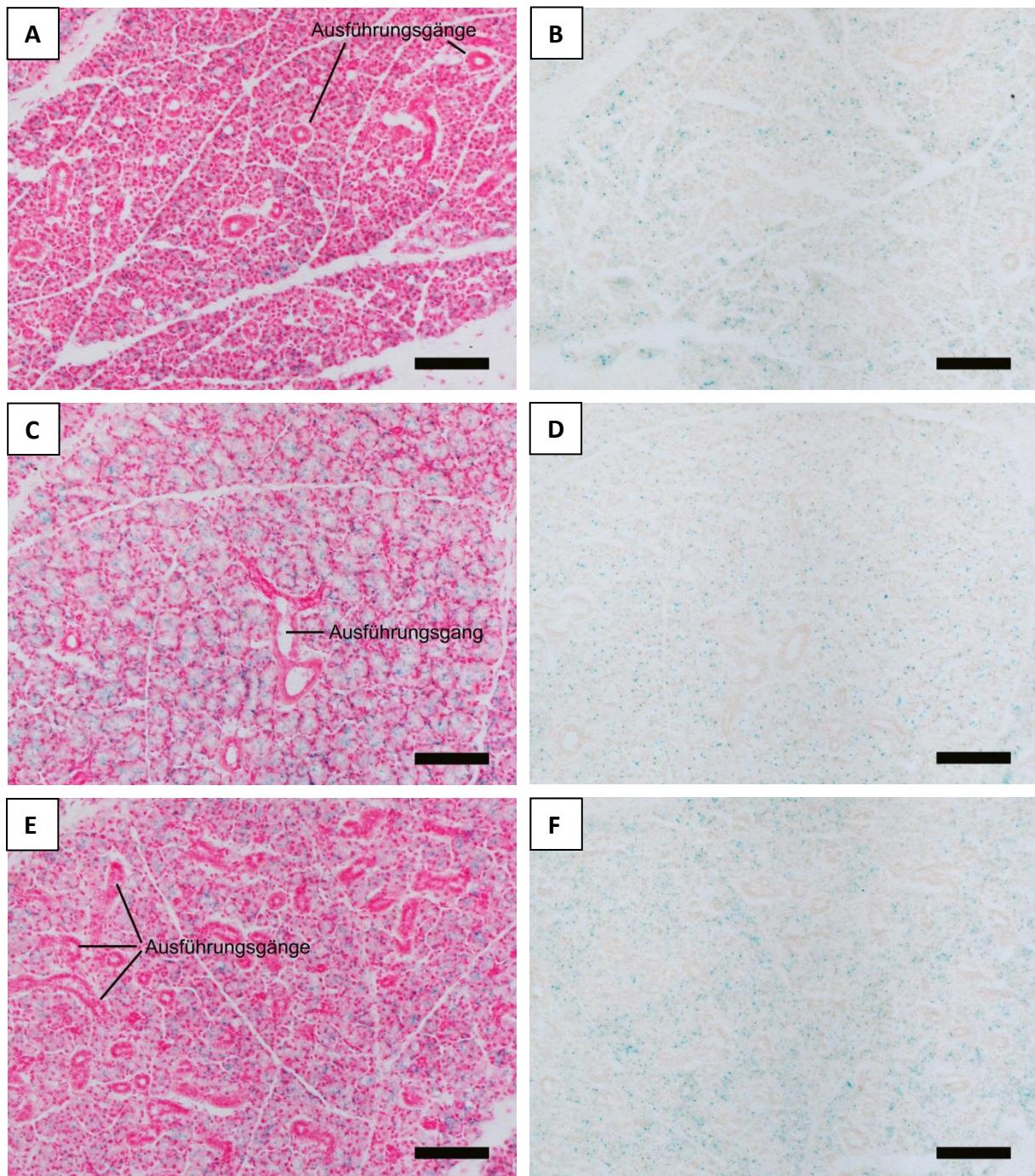


Abbildung 16: Detailaufnahmen der Speicheldrüsen

Gezeigt sind Aufnahmen der Gl. parotis (A und B), der Gl. sublingualis (C und D) und der Gl. submandibularis (E und F). A, C und E mit Kernechtrot gegenfärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

herausstellt, dass die Blaufärbung in der glatten Muskelschicht lediglich dezent ausgeprägt ist. Wesentlich deutlicher lässt sich die *LacZ*-Färbung in der *Mucosa* und den von ihr gebildeten Schleimhautfalten lokalisieren.

Weiterhin wurden die Speicheldrüsen der Mäuse präpariert. Diese werden nach der Viskosität des von ihnen produzierten Sekretes als mukös (zähflüssig), serös

(dünnflüssig) und seromukös (mittlere Viskosität) beschrieben. Die drei größten Speicheldrüsen der Maus sind die seröse *Glandula parotis*, die muköse *Glandula sublingualis* und die seromuköse *Glandula submandibularis*. Es handelt sich hierbei um tubuloalveolare Drüsen, die durch Bindegewebssepten in Läppchen unterteilt werden. Die Zellen sind in Form von *Acini* angeordnet, deren *Lumina* sich in die Ausführungsgänge der Drüsen fortsetzen (Conti et al., 2004). Alle drei Gewebe weisen nach der *LacZ*-Reaktion eine Blaufärbung von vergleichbarer Intensität auf, die sich in allen Fällen auf die Drüsen-*Acini* beschränkt und die Ausführungsgänge weitestgehend ausspart (vgl. Abb. 16).

Schließlich wurde als weiterer Bestandteil des zentralen Nervensystems ein Spinalganglion untersucht. Dieses enthält die Perikaryen sensibler afferenter Fasern und besteht im Querschnitt aus Anschnitten von Blutgefäßen und Nervenfasern, den

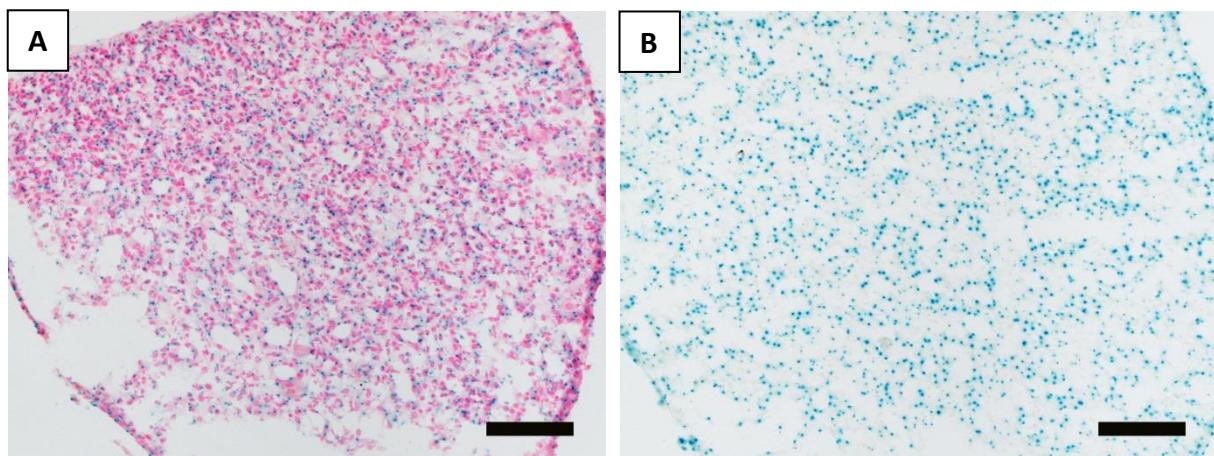


Abbildung 17: Detailaufnahmen eines Spinalganglions

Bild A mit Kernechtrot gefärbt. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

Zellkernen der Nervenzellen sowie aus Satellitenzellen, welche die Neuronen umgeben (Conti et al., 2004). Betrachtet man die *LacZ*-gefärbten Schnitte, erkennt man zahlreiche kleine Zellkerne, welche sich am ehesten den Satellitenzellen zuordnen lassen, sowie vereinzelt größere, welche vermutlich die Zellkerne der Nervenzellen sind (vgl. Abb. 17). Die Blaufärbung konzentriert sich vor allem auf die Satellitenzellen, wobei eine exakte Trennung nicht möglich ist.

III.3 Lokalisation der ASB10-Expression in Embryonen

Zur Darstellung der ASB10-Expression in Mäusen im Embryonalstadium wurden sowohl *ASB10^{+/−}*-Embryonen als auch ihre homozygoten Wildtyp-Geschwistertiere im

Ganzen nach dem *LacZ*-Färbeprotokoll behandelt, das auch zur Färbung der Gefrierschnitte der adulten Mäuse verwendet wurde. Nach Durchführung des Färbevorgangs stellten sich ASB10-exprimierende Strukturen blau dar. Daraufhin wurde das Gewebe der Embryonen mithilfe von Wintergrünöl (Salicylsäuremethylester) und des vorher bereits beschriebenen Protokolls in einen transparenten Zustand überführt. Die Präparation der Embryonen fand stets am Embryonaltag 10,5 bis 11,5 statt.

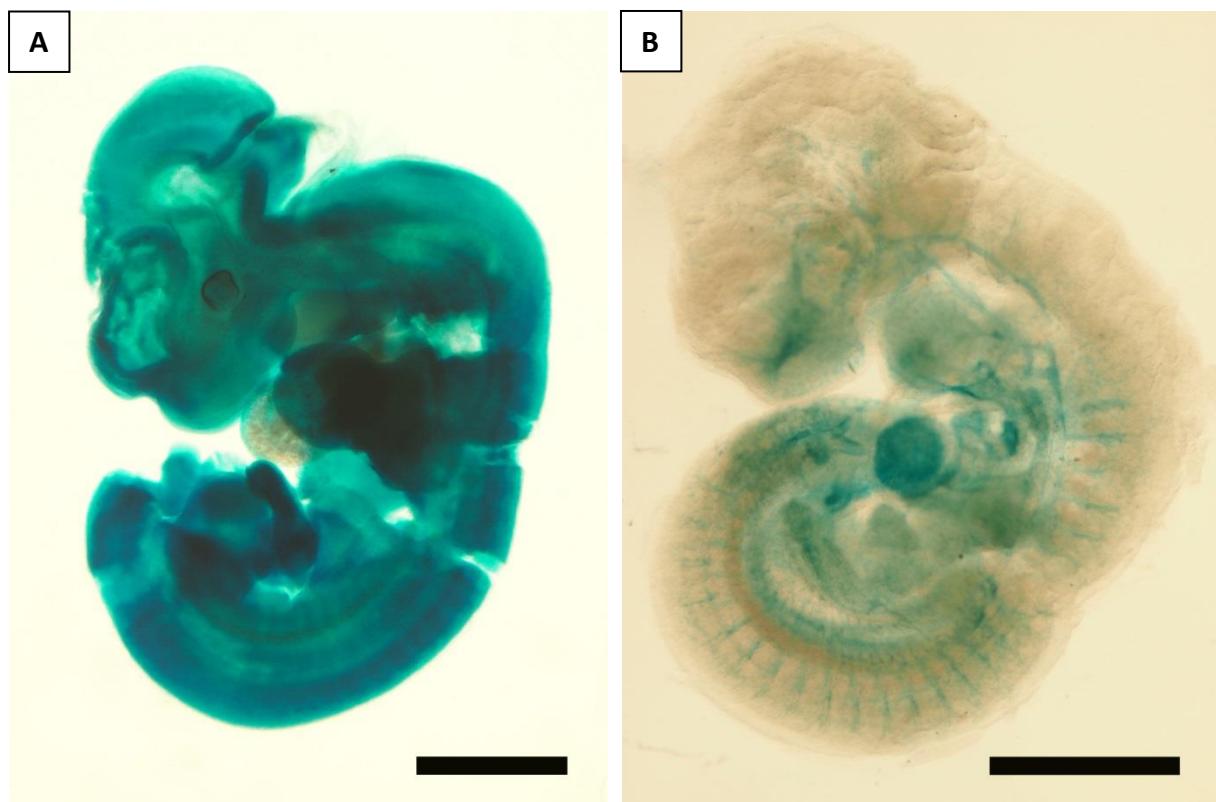


Abbildung 18: Aufnahmen von Embryonen

Gezeigt sind Aufnahmen von *LacZ*-Färbungen eines ASB10-defizienten Embryonen (**A**) und eines PLVAP-defizienten Embryonen (**B**). Die Maßstabsbalken entsprechen 1000 µm.

Die ASB10^{+/−}-Embryonen wiesen nach Durchführung beider Protokolle eine vollständige Blaufärbung auf, welche auf eine ubiquitäre Expression von ASB10 hinweist (vgl. Abb. 18). Die Spezifität der *LacZ*-Färbung wurde überprüft, indem PLVAP-Reportermaus-Embryonen (PLVAP^{+/−} bzw. PLVAP^{−/−}) nach demselben *LacZ*-Färbeprotokoll behandelt wurden. Bei PLVAP (plasmalemma vesicle-associated protein, Synonym: PV-1) handelt es sich um ein Membranprotein, welches spezifisch im Endothel der Blutgefäße exprimiert wird (Stan et al., 1999a, 1999b). Nachdem das Gewebe der entsprechenden Embryonen im Anschluss an den Färbevorgang in

einen transparenten Zustand überführt worden war, stellten sich ausschließlich die Gefäße blau gefärbt dar (vgl. Abb. 18). Daher kann von einer hohen Spezifität der durchgeführten *LacZ*-Färbung ausgegangen werden.

Somit zeigt sich bereits im Embryonalstadium eine ubiquitäre Expression von ASB10 in der Reportermaus.

IV. Diskussion

ASB10 gehört zu einer Familie von insgesamt 18 ähnlich aufgebauten Genen (ASB1-ASB18) (Kile et al., 2000), von denen jedes eine bestimmte, von Gen zu Gen variierende Anzahl an *ankyrin repeat* (ANK)-Domänen sowie eine c-terminal gelegene *suppressor of cytokine signaling* (SOCS)-Box aufweist (Keller et al., 2013). Mehrere andere Mitglieder dieser Familie vermitteln die Ubiquitinierung und den nachfolgenden Abbau bestimmter Substrate (Chung et al., 2005; Debrincat et al., 2007; Li et al., 2011), und auch für ASB10 konnte in Zellen des menschlichen Trabekelwerks eine Kolokalisation mit Biomarkern Ubiquitin-vermittelter intrazellulärer Abbauprozesse nachgewiesen werden (Keller et al., 2013). Dies stützt die Hypothese einer Beteiligung von ASB10 an diesen Abbauvorgängen.

Ferner sind Mutationen des ASB10-Gens mit dem primären Offenwinkelglaukom assoziiert. So ergab eine systematische Sequenzierung des ASB10-Gens mehrere synonome sowie nicht-synonome Genvarianten, welche die Struktur, die Ladung und/oder die Polarität des Proteins verändern. Diese Varianten konnten bei Patienten sowohl mit der adulten als auch der juvenilen Form des Offenwinkelglaukoms sowie bei Normaldruckglaukom-Patienten signifikant häufiger nachgewiesen werden als bei der Kontrollgruppe (Pasutto et al., 2012).

Um diese Zusammenhänge weiterzuverfolgen, wurde mit Hilfe von ASB10^{+/−}-Reportermäusen versucht, die Expression von ASB10 sowohl im adulten Organismus als auch im Embryonalstadium darzustellen. In der vorliegenden Arbeit konnte dabei eine unselektive Expression im Embryonalstadium sowie, mit Ausnahme des Parenchyms von Leber, Milz und Thymus, in allen untersuchten adulten Organen und Geweben eine ASB10-Expression nachgewiesen werden.

Hierbei stellte sich die Intensität der *LacZ*-Färbung in organabhängig unterschiedlicher Ausprägung dar. So zeigen Myokard, Nervengewebe und Nierenparenchym die deutlichste Färbung, im Falle der glatten Muskulatur (beispielsweise in der Wand von Dünndarm und Aorta) ist sie etwas schwächer ausgeprägt, und die Skelettmuskulatur weist lediglich eine dezente Färbung auf. Da die Intensität der *LacZ*-Färbereaktion mit der Expression von ASB10 korreliert, ist ein Erklärungsmodell für diesen Effekt ein höherer Protein-Turnover in diesen Geweben und eine mit gesteigerter Proteolyse einhergehende gesteigerte Expression von Ubiquitin-Ligase-Komplexen.

Wie bereits erwähnt, existieren zwei wichtige Systeme, um das intrazelluläre Gleichgewicht von Proteinsynthese und Proteolyse stabil zu halten: Das Ubiquitin-Proteasom-System und der Autophagie-Lysosom-Abbauweg. Ersteres ist das Abbausystem für missgefaltete, beschädigte oder kurzlebige Proteine, wohingegen Letzteres für den Abbau von großen zellulären Komponenten wie Proteinaggregaten oder nicht funktionierenden Zellorganellen verantwortlich ist. Die Ubiquitinierung der Substrate über E3-Ubiquitin-Ligasen ist essentieller Bestandteil beider Systeme (Dikic, 2017). Da ASB10, wie beschrieben, einen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex zur Ubiquitinierung von Proteinen enthält (Keller et al., 2013), und für andere E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexe eine gesteigerte Expression im Zusammenhang mit gesteigerter Proteolyse nachgewiesen werden konnte (beispielsweise Milan et al., 2015), könnte man auch für ASB10 eine stärkere Expression in Geweben mit erhöhtem Protein-Turnover erwarten.

Jedoch ist einschränkend hinzuzufügen, dass die Aktivität von E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexen auch über ihre Expression hinaus durch diverse andere post-transkriptionale Modifikationen wie Phosphorylierung gesteigert werden kann (Zheng et al., 2017) und somit eine gesteigerte Expression dieser Enzyme nicht in jedem Fall zwingend erforderlich ist.

Zudem existieren im menschlichen Organismus mehrere hundert verschiedene E3-Ubiquitin-Ligase-Enzyme, welche die Ubiquitinierung spezifischer Substrate vermitteln (Zheng et al., 2017). Diese Substrate sind, wie oben dargelegt, für einige Mitglieder der ASB-Genfamilie (ASB3, ASB4 und ASB9) bekannt, wobei sich beispielsweise für ASB4 eine Bindung verschiedener Substrate gezeigt hat. So vermittelt es sowohl den Abbau von Insulin-Rezeptor-Substrat 4 (Li et al., 2011) als auch von Inhibitor of DNA binding 2 (ID2, siehe Townley-Tilson et al., 2014). Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist jedoch noch kein Substrat identifiziert worden, dessen Ubiquitinierung durch ASB10 vermittelt wird. Daher ist auch eine Aussage zur Verteilung potentieller Substrate von ASB10 im Organismus nicht möglich. Sollten diese Substrate jedoch in der Leber, dem Thymus und der Skelettmuskulatur nicht oder nur in geringem Maße vorhanden sein, wäre dies ein weiterer Grund für das Expressionsmuster von ASB10.

Darüber hinaus hat sich für andere Mitglieder der ASB-Familie gezeigt, dass sie mehrere Substrate binden.

Wie oben bereits erwähnt, lässt sich exklusive des jeweiligen Parenchyms von Leber, Milz und Thymus in allen untersuchten Organen und Geweben eine Expression von ASB10 nachweisen. Darüber hinaus zeigen die Embryonen eine vollständige *LacZ*-Färbung, was auch hier auf eine starke ASB10-Expression hindeutet. Diese verbreitete Expression innerhalb des Organismus wäre für ein Protein, das an intrazellulären Abbauprozessen beteiligt ist, durchaus zu erwarten und stützt somit die Hypothese von ASB10 als Bestandteil dieser Abbauwege.

Dies wirft jedoch die Frage auf, inwiefern sich Mutationen und Funktionsverlust eines nahezu ubiquitär im Organismus exprimierten Gens selektiv in lediglich einem Organ, in diesem Fall dem Auge, manifestieren können.

Die Tatsache, dass ein intaktes ASB10-Gen durchaus für den gesamten Organismus überlebensnotwendig ist, zeigt sich daran, dass die homozygote Defizienz des Gens bereits in einem frühen embryonalen Entwicklungsstadium letal ist. Wie bereits erwähnt, befanden sich unter den an Embryonaltag E 10,5 bis 11,5 präparierten Embryonen trotz eines statistisch zu erwartenden Anteils von 25% des ASB10^{-/-}-Genotyps lediglich ASB10⁺⁻- und ASB10⁺⁺-Exemplare, was den Schluss nahelegt, dass die homozygot ASB10-defizienten Embryonen zu diesem Zeitpunkt bereits verstorben waren.

Weitere Hinweise auf eine systemische Bedeutung von ASB10 ergaben sich im Rahmen einer Gesamt-Exon-Sequenzierung von Patienten mit systemischer Sklerose. Hier zeigte sich eine Assoziation von ASB10 mit einem signifikant erhöhten Risiko einer systemischen Sklerose (Gao et al., 2016), einer Autoimmunerkrankung mit gesteigerter Bindegewebsproduktion und Fibrosierung. Diese Assoziation ist zudem insofern interessant, dass das Potential einer Fibrosierung des Trabekelwerkes und der *Papilla nervi optici* für die Pathogenese des Glaukoms noch Gegenstand aktueller Diskussion ist (Keller et al., 2017).

Darüber hinaus existieren Erkrankungen, die trotz Mutation unselektiv exprimierter Gene durch nahezu selektive Beeinträchtigung eines Organs manifest werden. Ein Beispiel für eine solche Erkrankung ist die Lebersche hereditäre Optikusneuropathie (Lebersche kongenitale Amaurose). Hierbei handelt es sich um eine Mitochondriopathie, bei welcher ausschließlich maternal vererbte Punktmutationen der mitochondrialen DNA zu einer Atrophie des Sehnervs führen (Grehn, 2012). Verschiedene Gene wurden identifiziert, die zur Manifestation der Erkrankung führen. Die meisten dieser Gene werden vornehmlich im Auge exprimiert (Kumaran et al.,

2017), jedoch existieren auch Gene, deren Mutationen selektiv den Phänotyp der Krankheit am Auge herbeiführen, obwohl sie eine ausgeprägte Expression auch außerhalb des Auges zeigen, beispielsweise das Gen LCA5 (den Hollander et al., 2007). Ein ähnliches Verhalten von ASB10 bezüglich seiner Expression und Manifestation ist denkbar.

Zudem hat sich, wie oben bereits erwähnt, beispielsweise für ASB4 eine Bindung verschiedener Substrate gezeigt. So vermittelt es sowohl den Abbau von Insulin-Rezeptor-Substrat 4 (Li et al., 2011) als auch von Inhibitor of DNA binding 2 (ID2, siehe Townley-Tilson et al., 2014). Ebenso könnte ASB10 in verschiedenen Organen verschiedene Substrate binden. Da zudem bereits gezeigt werden konnte (Pasutto et al., 2012), dass mehrere der untersuchten Genvarianten von ASB10 durch Beeinflussung des Spleißens der mRNA die Struktur des Proteins beeinflussen sowie durch Austausch von Aminosäuren die Ladung und/oder die Polarität des Proteins verändern, ist es vorstellbar, dass sich diese Varianten lediglich in der Bindung bestimmter, auf spezifische Organe beschränkter Substrate äußern.

Die Methodik der vorliegenden Arbeit basiert auf histologischen Färbungen der adulten und embryonalen Versuchstiere. Um die Spezifität der *LacZ*-Färbung zu überprüfen, wurden einerseits adulte und embryonale Wildtyp-Mäuse den identischen Färbeprotokollen unterzogen, andererseits wurden Embryonen der Linie PLVAP^{+/−} bzw. PLVAP^{−/−} auf dieselbe Weise gefärbt. Beide Kontrollen bestätigten die Spezifität der verwendeten *LacZ*-Färbeprotokolle.

Zusammenfassend konnte im embryonalen und adulten Versuchsorganismus Maus eine ausgeprägte, nahezu ubiquitäre Expression von ASB10 nachgewiesen werden, die der postulierten Funktion von ASB10 als ein am intrazellulären Abbau beteiligtes Protein entspricht. Ein solches Expressionsmuster steht jedoch nicht im Widerspruch zu einer selektiven Manifestation einer Mutation in einem Organ. Zudem gibt es Hinweise auf eine systemische Bedeutung von ASB10, da einerseits der homozygote Knock-Out des Gens in der Maus noch vor dem Embryonaltag 10,5 letal wirkt, und andererseits beim Menschen eine Assoziation von ASB10-Mutationen mit einer systemischen Autoimmunerkrankung festgestellt wurde.

Bezüglich der genauen Auswirkungen einer ASB10-Defizienz im Auge sind jedoch noch viele Fragen ungeklärt. Die Expression von ASB10 zeigt sich hier, wie oben dargestellt, am deutlichsten in bestimmten Schichten der Retina, im Sehnerv sowie im Ziliarepithel. Dies sind die Strukturen, die für die weitere Untersuchung der

Pathogenese des Glaukoms am relevantesten sein dürften, da es, wie ebenfalls zuvor dargelegt, beim Glaukom zum Untergang der Axone der retinalen Ganglienzellen kommt und die Erhöhung des Augeninnendrucks hierfür der relevanzeste Risikofaktor ist (Grehn, 2012; Quigley, 2011).

Demzufolge sollten eine weitere Erforschung der Wirkung von ASB10 in den Neuronen des Auges sowie im Ziliarepithel an nächster Stelle stehen. So wäre die Untersuchung des neuronalen Stoffwechsels bei ASB10-Defizienz denkbar. Ebenso könnten mittels Elektronenmikroskopie die vorderen Augenabschnitte von ASB10-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen auf strukturelle Unterschiede untersucht werden.

Zudem wurde nach wie vor kein Substrat von ASB10 identifiziert. So könnten in ASB10-defizienten Mäusen verschiedene, für den neuronalen Stoffwechsel oder Kammerwasserabfluss relevante Substanzen in gesteigertem Maße vorhanden sein, da ihr Abbau reduziert wird. Der Nachweis könnte hier mittels qPCR erfolgen.

V. Zusammenfassung

Hintergrund: Bei ASB10 handelt es sich um ein möglicherweise mit dem Glaukom assoziiertes Gen. Die Funktion von ASB10 liegt vermutlich in der Ubiquitinierung eines spezifischen Substrates, somit ist es Bestandteil zellulärer Abbauprozesse. In dieser Arbeit soll die Expression von ASB10 im Versuchsorganismus Maus (adult und embryonal) dargestellt werden.

Methoden: Es wurde eine ASB10^{+/−}-Mauslinie verwendet, bei welcher eine promotergesteuerte *LacZ*-Kassette in das ASB10-Gen eingeschoben wurde. Somit konnte die Genexpression mittels einer *LacZ*-Färbung von Gefrierschnitten der einzelnen Organe sichtbar gemacht werden.

Zudem wurden Kaiserschnitte von trächtigen Mäusen und anschließend *LacZ*-Färbungen der Embryonen durchgeführt, um die Expression von ASB10 im embryonalen Stadium zu zeigen.

Ergebnisse: Es zeigte sich eine nahezu ubiquitäre Expression von ASB10 im embryonalen sowie im adulten Organismus der Maus. Die Intensität der durchgeführten *LacZ*-Färbung zeigt eine deutliche Varianz zwischen den einzelnen Organen, am stärksten ausgeprägt ist sie in Myokard, Nierenparenchym und Nervengewebe, kaum bis gar nicht vorhanden ist die Färbung in Skelettmuskulatur, Thymus- und Leberparenchym, die weiteren Organe zeigen eine intermediäre Intensität der Färbung. Dies kann sowohl auf eine unterschiedliche Expression von ASB10 in den einzelnen Organen als auch auf eine unterschiedliche Verteilung des Substrates bzw. der Substrate von ASB10 zurückzuführen sein.

Zudem zeigte sich auch bei Genotypisierung der Embryonen kein homozygoter ASB10^{−/−}-Genotyp, sodass von einer Letalität der homozygoten ASB10-Defizienz in einem frühen embryonalen Stadium ausgegangen werden muss.

Schlussfolgerung: Die gezeigte ubiquitäre Expression von ASB10 steht im Einklang mit der Hypothese, dass ASB10 an der Ubiquitinierung und damit an zellulären Abbauprozessen beteiligt ist. Bezuglich der Bedeutung von ASB10 als ein mit dem Glaukom assoziiertes Gen kann durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedoch noch keine präzise Aussage getroffen werden.

VI. Anhang

VI.1 Literaturverzeichnis

Allingham, R. Rand; Liu, Yutao; Rhee, Douglas J. (2009): The genetics of primary open-angle glaucoma: a review. In: *Experimental eye research* 88 (4), S. 837–844. DOI: 10.1016/j.exer.2008.11.003.

Allingham, R. Rand; Wiggs, Janey L.; Hauser, Elizabeth R.; Larocque-Abramson, Karen R.; Santiago-Turla, Cecilia; Broomer, Bob et al. (2005): Early adult-onset POAG linked to 15q11-13 using ordered subset analysis. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 46 (6), S. 2002–2005. DOI: 10.1167/iovs.04-1477.

Baird, Paul N.; Foote, Simon J.; Mackey, David A.; Craig, Jamie; Speed, Terence P.; Bureau, Alexandre (2005): Evidence for a novel glaucoma locus at chromosome 3p21-22. In: *Human genetics* 117 (2-3), S. 249–257. DOI: 10.1007/s00439-005-1296-x.

Bonovas, S.; Peponis, V.; Filioussi, K. (2004): Diabetes mellitus as a risk factor for primary open-angle glaucoma: a meta-analysis. In: *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* 21 (6), S. 609–614. DOI: 10.1111/j.1464-5491.2004.01173.x.

Chung, Alicia S.; Guan, Ying-Jie; Yuan, Zheng-Long; Albina, Jorge E.; Chin, Y. Eugene (2005): Ankyrin repeat and SOCS box 3 (ASB3) mediates ubiquitination and degradation of tumor necrosis factor receptor II. In: *Molecular and cellular biology* 25 (11), S. 4716–4726. DOI: 10.1128/MCB.25.11.4716-4726.2005.

Conti, C. J.; Gimenez-Conti, I. B.; Benavides, F.; Frijhoff, A. F. W.; Conti, M. A. (2004): Atlas of Laboratory Mouse Histology. Online verfügbar unter <http://ctrgenpath.net/static/atlas/mousehistology/>, zuletzt geprüft am 03.12.2017.

Debrincat, Marlyse A.; Zhang, Jian-Guo; Willson, Tracy A.; Silke, John; Connolly, Lisa M.; Simpson, Richard J. et al. (2007): Ankyrin repeat and suppressors of cytokine signaling box protein asb-9 targets creatine kinase B for degradation. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (7), S. 4728–4737. DOI: 10.1074/jbc.M609164200.

den Hollander, Anneke I.; Koenekoop, Robert K.; Mohamed, Moin D.; Arts, Heleen H.; Boldt, Karsten; Towns, Katherine V. et al. (2007): Mutations in LCA5, encoding

the ciliary protein lebercillin, cause Leber congenital amaurosis. In: *Nature genetics* 39 (7), S. 889–895. DOI: 10.1038/ng2066.

Dikic, Ivan (2017): Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. In: *Annual review of biochemistry* 86, S. 193–224. DOI: 10.1146/annurev-biochem-061516-044908.

Eysel, Ulf (2010): Sehen und Augenbewegungen. In: Robert F. Schmidt, Florian Lang und Manfred Heckmann (Hg.): *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie*. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 345–385.

Fan, Bao Jian; Ko, Wendy Charles; Wang, Dan Yi; Canlas, Oscar; Ritch, Robert; Lam, Dennis S. C.; Pang, Chi Pui (2007): Fine mapping of new glaucoma locus GLC1M and exclusion of neuregulin 2 as the causative gene. In: *Molecular vision* 13, S. 779–784.

Fan, Bao Jian; Wang, Dan Yi; Lam, Dennis Shun Chiu; Pang, Chi Pui (2006): Gene mapping for primary open angle glaucoma. In: *Clinical biochemistry* 39 (3), S. 249–258. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2005.11.001.

Fingert, John H.; Robin, Alan L.; Stone, Jennifer L.; Roos, Ben R.; Davis, Lea K.; Scheetz, Todd E. et al. (2011): Copy number variations on chromosome 12q14 in patients with normal tension glaucoma. In: *Human molecular genetics* 20 (12), S. 2482–2494. DOI: 10.1093/hmg/ddr123.

Fingert, John H.; Roos, Ben R.; Solivan-Timpe, Frances; Miller, Kathy A.; Oetting, Thomas A.; Wang, Kai et al. (2012): Analysis of ASB10 variants in open angle glaucoma. In: *Human molecular genetics* 21 (20), S. 4543–4548. DOI: 10.1093/hmg/dds288.

Gao, Li; Emond, Mary J.; Louie, Tin; Cheadle, Chris; Berger, Alan E.; Rafaels, Nicholas et al. (2016): Identification of Rare Variants in ATP8B4 as a Risk Factor for Systemic Sclerosis by Whole-Exome Sequencing. In: *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)* 68 (1), S. 191–200. DOI: 10.1002/art.39449.

Grehn, Franz (2012): *Augenheilkunde*. 31., überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-11333-8>.

Heijl, Anders; Bengtsson, Boel; Hyman, Leslie; Leske, M. Cristina (2009): Natural history of open-angle glaucoma. In: *Ophthalmology* 116 (12), S. 2271–2276. DOI: 10.1016/j.ophtha.2009.06.042.

HGNC Database, HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC), EMBL Outstation - Hinxton, European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridgeshire, CB10 1SD, UK (2017). Online verfügbar unter <http://www.genenames.org>, zuletzt geprüft am 03.12.2017.

Ip, N. Y.; Ibanez, C. F.; Nye, S. H.; McClain, J.; Jones, P. F.; Gies, D. R. et al. (1992): Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (7), S. 3060–3064.

Keller, Kate E.; Wirtz, Mary K. (2017): Working your SOCS off: The role of ASB10 and protein degradation pathways in glaucoma. In: *Experimental eye research* 158, S. 154–160. DOI: 10.1016/j.exer.2016.06.003.

Keller, Kate E.; Yang, Yong-Feng; Sun, Ying Ying; Sykes, Renee; Acott, Ted S.; Wirtz, Mary K. (2013): Ankyrin repeat and suppressor of cytokine signaling box containing protein-10 is associated with ubiquitin-mediated degradation pathways in trabecular meshwork cells. In: *Molecular vision* 19, S. 1639–1655.

Kile, B. T.; Viney, E. M.; Willson, T. A.; Brodnicki, T. C.; Cancilla, M. R.; Herlihy, A. S. et al. (2000): Cloning and characterization of the genes encoding the ankyrin repeat and SOCS box-containing proteins Asb-1, Asb-2, Asb-3 and Asb-4. In: *Gene* 258 (1-2), S. 31–41.

Ko, Fang; Boland, Michael V.; Gupta, Priya; Gadkaree, Shekhar K.; Vitale, Susan; Guallar, Eliseo et al. (2016): Diabetes, Triglyceride Levels, and Other Risk Factors for Glaucoma in the National Health and Nutrition Examination Survey 2005-2008. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 57 (4), S. 2152–2157. DOI: 10.1167/iovs.15-18373.

Kohroki, Junya; Nishiyama, Takehiro; Nakamura, Takaaki; Masuho, Yasuhiko (2005): ASB proteins interact with Cullin5 and Rbx2 to form E3 ubiquitin ligase complexes. In: *FEBS letters* 579 (30), S. 6796–6802. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.11.016.

Kumaran, Neruban; Moore, Anthony T.; Weleber, Richard G.; Michaelides, Michel (2017): Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: clinical

features, molecular genetics and therapeutic interventions. In: *The British journal of ophthalmology* 101 (9), S. 1147–1154. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2016-309975.

Lang, Florian (2010): Niere. In: Robert F. Schmidt, Florian Lang und Manfred Heckmann (Hg.): *Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie*. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 629–663.

Li, Ji-Yao; Chai, Biaoxin; Zhang, Weizhen; Wu, Xiaobin; Zhang, Chao; Fritze, Danielle et al. (2011): Ankyrin repeat and SOCS box containing protein 4 (Asb-4) colocalizes with insulin receptor substrate 4 (IRS4) in the hypothalamic neurons and mediates IRS4 degradation. In: *BMC neuroscience* 12, S. 95. DOI: 10.1186/1471-2202-12-95.

Lüllmann-Rauch, Renate (2009): *Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen*. 3., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Milan, Giulia; Romanello, Vanina; Pescatore, Francesca; Armani, Andrea; Paik, Ji-Hye; Frasson, Laura et al. (2015): Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy. In: *Nature communications* 6, S. 6670. DOI: 10.1038/ncomms7670.

Monemi, Sharareh; Spaeth, George; DaSilva, Alexander; Popinchalk, Samuel; Ilitchev, Elena; Liebmann, Jeffrey et al. (2005): Identification of a novel adult-onset primary open-angle glaucoma (POAG) gene on 5q22.1. In: *Human molecular genetics* 14 (6), S. 725–733. DOI: 10.1093/hmg/ddi068.

Mosavi, Leila K.; Cammett, Tobin J.; Desrosiers, Daniel C.; Peng, Zheng-Yu (2004): The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 13 (6), S. 1435–1448. DOI: 10.1110/ps.03554604.

Pandey, Udai Bhan; Nie, Zhiping; Batlevi, Yakup; McCray, Brett A.; Ritson, Gillian P.; Nedelsky, Natalia B. et al. (2007): HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. In: *Nature* 447 (7146), S. 859–863. DOI: 10.1038/nature05853.

Pang, Chi Pui; Fan, Bao Jian; Canlas, Oscar; Wang, Dan Yi; Dubois, Stephane; Tam, Pancy Oi Sin et al. (2006): A genome-wide scan maps a novel juvenile-onset primary open angle glaucoma locus to chromosome 5q. In: *Molecular vision* 12, S. 85–92.

Pasutto, Francesca; Keller, Kate E.; Weisschuh, Nicole; Sticht, Heinrich; Samples, John R.; Yang, Yong-Feng et al. (2012): Variants in ASB10 are associated with open-angle glaucoma. In: *Human molecular genetics* 21 (6), S. 1336–1349. DOI: 10.1093/hmg/ddr572.

Pasutto, Francesca; Matsumoto, Tomoya; Mardin, Christian Y.; Sticht, Heinrich; Brandstatter, Johann H.; Michels-Rautenstrauss, Karin et al. (2009): Heterozygous NTF4 mutations impairing neurotrophin-4 signaling in patients with primary open-angle glaucoma. In: *American journal of human genetics* 85 (4), S. 447–456. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.08.016.

Porter, Louise F.; Urquhart, Jill E.; O'Donoghue, Eamonn; Spencer, A. Fiona; Wade, Emma M.; Manson, Forbes D. C.; Black, Graeme C. M. (2011): Identification of a novel locus for autosomal dominant primary open angle glaucoma on 4q35.1-q35.2. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (11), S. 7859–7865. DOI: 10.1167/iovs.10-6581.

Quigley, Harry A. (2011): Glaucoma. In: *The Lancet* 377 (9774), S. 1367–1377. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)61423-7.

Quigley, H. A.; Broman, A. T. (2006): The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. In: *The British journal of ophthalmology* 90 (3), S. 262–267. DOI: 10.1136/bjo.2005.081224.

Rezaie, Tayebeh; Child, Anne; Hitchings, Roger; Brice, Glen; Miller, Lauri; Coca-Prados, Miguel et al. (2002): Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. In: *Science (New York, N.Y.)* 295 (5557), S. 1077–1079. DOI: 10.1126/science.1066901.

Sarfarazi, M.; Child, A.; Stoilova, D.; Brice, G.; Desai, T.; Trifan, O. C. et al. (1998): Localization of the fourth locus (GLC1E) for adult-onset primary open-angle glaucoma to the 10p15-p14 region. In: *American journal of human genetics* 62 (3), S. 641–652. DOI: 10.1086/301767.

Schmidt, Robert F.; Lang, Florian; Heckmann, Manfred (Hg.) (2010): Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Online verfügbar unter <http://gbv.eblib.com/patron/FullRecord.aspx?p=3066576>.

Schünke, Michael; Schulte, Erik; Schumacher, Udo; Voll, Markus (2009): Kopf, Hals und Neuroanatomie. 115 Tabellen. 2., überarb. und erw. Aufl. Stuttgart: Thieme

(Prometheus / Michael Schünke Erik Schulte Udo Schumacher. Unter Mitarb. von Jürgen Rude. III. von Markus Voll Karl Wesker, 3).

Sheffield, V. C.; Stone, E. M.; Alward, W. L.; Drack, A. V.; Johnson, A. T.; Streb, L. M.; Nichols, B. E. (1993): Genetic linkage of familial open angle glaucoma to chromosome 1q21-q31. In: *Nature genetics* 4 (1), S. 47–50. DOI: 10.1038/ng0593-47.

Stan, R. V.; Ghitescu, L.; Jacobson, B. S.; Palade, G. E. (1999): Isolation, cloning, and localization of rat PV-1, a novel endothelial caveolar protein. In: *The Journal of cell biology* 145 (6), S. 1189–1198.

Stan, R. V.; Kubitz, M.; Palade, G. E. (1999): PV-1 is a component of the fenestral and stomatal diaphragms in fenestrated endothelia. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (23), S. 13203–13207.

Stoilova, D.; Child, A.; Trifan, O. C.; Crick, R. P.; Coakes, R. L.; Sarfarazi, M. (1996): Localization of a locus (GLC1B) for adult-onset primary open angle glaucoma to the 2cen-q13 region. In: *Genomics* 36 (1), S. 142–150. DOI: 10.1006/geno.1996.0434.

Stone, E. M.; Fingert, J. H.; Alward, W. L.; Nguyen, T. D.; Polansky, J. R.; Sundén, S. L. et al. (1997): Identification of a gene that causes primary open angle glaucoma. In: *Science (New York, N.Y.)* 275 (5300), S. 668–670.

Suriyapperuma, Sardha P.; Child, Anne; Desai, Trushna; Brice, Glen; Kerr, Andrea; Crick, Ronald Pitts; Sarfarazi, Mansoor (2007): A new locus (GLC1H) for adult-onset primary open-angle glaucoma maps to the 2p15-p16 region. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 125 (1), S. 86–92. DOI: 10.1001/archopht.125.1.86.

Takamoto, Mitsuko; Araie, Makoto (2014): Genetics of primary open angle glaucoma. In: *Japanese journal of ophthalmology* 58 (1), S. 1–15. DOI: 10.1007/s10384-013-0286-0.

Teikari, J. M. (1987): Genetic factors in open-angle (simple and capsular) glaucoma. A population-based twin study. In: *Acta ophthalmologica* 65 (6), S. 715–720.

Tham, Yih-Chung; Li, Xiang; Wong, Tien Y.; Quigley, Harry A.; Aung, Tin; Cheng, Ching-Yu (2014): Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. In: *Ophthalmology* 121 (11), S. 2081–2090. DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.05.013.

- Tielsch, J. M.; Katz, J.; Sommer, A.; Quigley, H. A.; Javitt, J. C. (1994): Family history and risk of primary open angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 112 (1), S. 69–73.
- Townley-Tilson, W. H. Davin; Wu, Yaxu; Ferguson, James E.; Patterson, Cam (2014): The ubiquitin ligase ASB4 promotes trophoblast differentiation through the degradation of ID2. In: *PLoS one* 9 (2), S. e89451. DOI: 10.1371/journal.pone.0089451.
- Trifan, O. C.; Traboulsi, E. I.; Stoilova, D.; Alozie, I.; Nguyen, R.; Raja, S.; Sarfarazi, M. (1998): A third locus (GLC1D) for adult-onset primary open-angle glaucoma maps to the 8q23 region. In: *American journal of ophthalmology* 126 (1), S. 17–28.
- Wang, Dan Yi; Fan, Bao Jian; Chua, John K. H.; Tam, Pancy O. S.; Leung, Christopher K. S.; Lam, Dennis S. C.; Pang, Chi Pui (2006): A genome-wide scan maps a novel juvenile-onset primary open-angle glaucoma locus to 15q. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 47 (12), S. 5315–5321. DOI: 10.1167/iovs.06-0179.
- Wang, Ryan; Wiggs, Janey L. (2014): Common and rare genetic risk factors for glaucoma. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 4 (12), S. a017244. DOI: 10.1101/cshperspect.a017244.
- Wiggs, J. L.; Lynch, S.; Ynagi, G.; Maselli, M.; Auguste, J.; Del Bono, E. A. et al. (2004): A genomewide scan identifies novel early-onset primary open-angle glaucoma loci on 9q22 and 20p12. In: *American journal of human genetics* 74 (6), S. 1314–1320. DOI: 10.1086/421533.
- Wirtz, M. K.; Samples, J. R.; Kramer, P. L.; Rust, K.; Topinka, J. R.; Yount, J. et al. (1997): Mapping a gene for adult-onset primary open-angle glaucoma to chromosome 3q. In: *American journal of human genetics* 60 (2), S. 296–304.
- Wirtz, M. K.; Samples, J. R.; Rust, K.; Lie, J.; Nordling, L.; Schilling, K. et al. (1999): GLC1F, a new primary open-angle glaucoma locus, maps to 7q35-q36. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 117 (2), S. 237–241.
- Wolfs, Roger C. W. (1998): Genetic Risk of Primary Open-angle Glaucoma. In: *Arch Ophthalmol* 116 (12), S. 1640. DOI: 10.1001/archopht.116.12.1640.
- Wu, Johnny; Hewitt, Alex W.; Green, Catherine M.; Ring, Maree A.; McCartney, Paul J.; Craig, Jamie E.; Mackey, David A. (2006): Disease severity of familial glaucoma

compared with sporadic glaucoma. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 124 (7), S. 950–954. DOI: 10.1001/archopht.124.7.950.

Zheng, Ning; Shabek, Nitzan (2017): Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation. In: *Annual review of biochemistry* 86, S. 129–157. DOI: 10.1146/annurev-biochem-060815-014922.

VI.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Horizontalschnitt durch das menschliche Auge	5
Abbildung 2: Aufbau der Netzhaut	7
Abbildung 3: Horizontalschnitt durch den vorderen Augenabschnitt	8
Abbildung 4: Schematischer Aufbau von ASB10	14
Abbildung 5: Kolokalisation von ASB10-Antikörpern (rot) mit Antikörpern gegen mehrere Biomarker der zellulären Abbauwege (grün)	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung der zum ASB10 ^{+/−} -Knock-Out führenden Insertion	22
Abbildung 7: PCRs zweier Würfe der Embryonalpräparation	30
Abbildung 8: Detailaufnahmen des Auges	33
Abbildung 9: Detailaufnahmen des Gehirns	34
Abbildung 10: Detailaufnahmen von Milz und Thymus	35
Abbildung 11: Übersichtsaufnahmen von Niere und Nebenniere	37
Abbildung 12: Detailaufnahmen von Niere und Nebenniere	38
Abbildung 13: Detailaufnahmen von Herz, Lunge und Pankreas	40
Abbildung 14: Detailaufnahmen von Leber, Skelettmuskel und Dünndarm	42
Abbildung 15: Detailaufnahmen von Aorta, Hoden und Uterus	44
Abbildung 16: Detailaufnahmen der Speicheldrüsen	46
Abbildung 17: Detailaufnahmen eines Spinalganglions	47
Abbildung 18: Aufnahmen von Embryonen	48

VI.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der beim HGNC gelisteten Glaukom-assozierten Genloci	12
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	17
Tabelle 3: Geräte	18
Tabelle 4: Reagenzien	20
Tabelle 5: Enzyme	20
Tabelle 6: Gele	20
Tabelle 7: Puffer und Lösungen	21
Tabelle 8: Olegonukleotid-Primer	21
Tabelle 9: Ansatz der Neomycin-PCR	25
Tabelle 10: Programm der Neomycin-PCR	25
Tabelle 11: Ansatz der ASB10-Wildtyp-PCR	25
Tabelle 12: Programm der ASB10-Wildtyp-PCR	26
Tabelle 13: Ansatz der PV-1-KO/TIE2-GFP-PCR	26
Tabelle 14: Programm der PV-1-KO/TIE2-GFP-PCR	26

VI.4 Abkürzungsverzeichnis

µ	mikro (10^{-6})
°C	Grad Celsius
A	Ampere; Adenin
Abb.	Abbildung
ad	zu
A. d.	Aqua destillata
Al ₂ (SO ₄) ₃	Aluminiumsulfat
ANK	Ankyrin
ASB-X	<i>Ankyrin repeat and suppressor of cytokine signaling (SOCS) box containing protein-X</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
c	centi (10^{-2})
C	Cytosin
ca.	circa
DAPI	4',6-Diamidin-2'phenylindol-dihydrochlorid
d.h.	das heißt
dH ₂ O /ddH ₂ O	einfach/doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
ds	Doppelstrang
E	embryonaler Tag; Extinktion
EDTA	Ethyldiamintereessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
et al.	und andere (et alia)
fwd	vorwärts (forward)
g	Gramm; Erdbeschleunigung
ggf.	gegebenenfalls
G	Guanin
GLC-X	<i>glaucoma-X</i>

h	Stunde
HCl	Hydrogenchlorid, Salzsäure
HGNC	<i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>
i.d.R.	in der Regel
in vitro	außerhalb des lebenden Organismus, im "Reagenzglas"
in vivo	im lebenden Organismus
IOD	intraokulärer Druck
JOWG	Juveniles Offenwinkelglaukom
k	Kilo
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
$K_4[Fe(CN)_6] \times 3 H_2O$	Kaliumhexacyanoferrat(II)-Trihydrat
$K_3[Fe(CN)_6]$	Kaliumhexacyanoferrat(III)
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
KO	Knock out
l	Liter
LacZ	β -Galaktosidase
m	milli (10^{-3}); Meter
M	molar (mol/l); Mega (10^6)
M. / Mm.	Musculus (Muskel) / Musculi (Muskeln)
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mind.	mindestens
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	messenger RNA
MYOC	Myocilin
n	nano (10^{-9}); Fallzahl
N. / Nn.	Nervus (Nerv) / Nervi (Nerven)
NaCl	Natriumchlorid
NaDC	Natriumdesoxycholat
$NaH_2PO_4 \times H_2O$	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
$Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$	Natriummonohydrogenphosphat-Dihydrat
NDG	Normaldruckglaukom
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

NTF4	Neurotrophin 4
OPTN	Optineurin
P	postnataler Tag
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
PLVAP	<i>plasmalemma vesicle-associated protein</i>
POAG/POWG	<i>primary open angle glaucoma</i> , primäres Offenwinkelglaukom
PWBG	Primäres Winkelblockglaukom
rev	rückwärts (reverse)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase; Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
Sec	Sekunde(n)
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
s.u.	siehe unten
T	Thymin
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
U	Unit; Uracil
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
vgl.	vergleiche
WDR36	<i>WD repeat domain 36</i>
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit

x	-fach/mal
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
∞	unendlich

VI.5 Danksagung

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

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

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin und Helferin Dr. Leonie Herrnberger, die mir während der gesamten Zeit immer hilfsbereit zur Seite stand, und immer wusste, was zu tun war, wenn es einmal nicht weiterging.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Benjamin Junglas bedanken, der die Anfänge meiner Arbeit in Labor und Anatomiesaal begleitet und ein ganzes Stück leichter gemacht hat.

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

Allen weiteren Mitarbeitern des Lehrstuhls für Humananatomie und Embryologie danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und die gute Atmosphäre.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die mich während meines gesamten Medizinstudiums geduldig unterstützt hat.

VI.6 Erklärung

Die Anregung sowie die Überwachung der Ausarbeitung der vorliegenden Dissertation erfolgten durch Prof. Dr. Ernst R. Tamm, Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie der Universität Regensburg.

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 23.07.2020

Christopher Goßler