

AUS DEM LEHRSTUHL für Humananatomie und Embryologie

Prof. Dr. med. Ernst Tamm

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Der Beitrag von GFAP zur Pathogenese des Sehnervenschadens beim Glaukom -
Etablierung einer Methode zur Laserdissektion der murinen glialen Lamina

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin

der

Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Josef Strobl

JAHR 2023

AUS DEM LEHRSTUHL für Humananatomie und Embryologie

Prof. Dr. med. Ernst Tamm

DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Der Beitrag von GFAP zur Pathogenese des Sehnervenschadens beim Glaukom -
Etablierung einer Methode zur Laserdissektion der murinen glialen Lamina

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin

der

Fakultät für Biologie und vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Josef Strobl

JAHR 2023

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

26.04.2023

Dekan:

Prof. Dr. med. Ralph Witzgall

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Ernst Tamm (Doktorvater)

2. Berichterstatterin:

Prof. Dr. rer. nat. Silke Härteis

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung
 - 1.1 Funktionen und Abflusswege des Kammerwassers
 - 1.2 Struktur des Nervus opticus und der Lamina cribrosa
 - 1.3 Intermediärfilamente und deren Proteine
 - 1.4 Pathogenese des primären Offenwinkelglaukoms
 - 1.5 Reaktive Gliose und GFAP-Ausschüttung im Bereich des Sehnervenkopfes
 - 1.6 Lasermikroskopische Dissektion (LCM) und Druckkatapultierung (LMPC)
 - 1.7 Zielsetzung
2. Material und Methoden
 - 2.1 Verwendete Materialien
 - 2.1.1 Reagenzien
 - 2.1.2 Puffer
 - 2.1.3 Enzyme
 - 2.1.4 Primer
 - 2.1.5 Geräte
 - 2.1.6 Verbrauchsmaterialien
 - 2.1.7 Größenstandards
 - 2.2 Mauslinie
 - 2.3 Molekularbiologische Arbeitstechniken
 - 2.3.1 Gewinnung genomischer DNA
 - 2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)
 - 2.3.3 Agarosegelelektrophorese
 - 2.4 Histologische Methoden
 - 2.4.1 Transkardiale Perfusion
 - 2.4.2 Einbettung und Anfertigung von Gefrierschnitten
 - 2.4.3 Färbung der PEN-Objektträger
 - 2.4.4 Dehydrierung der ungefärbten PEN-Objektträger
 - 2.5 Lasermikroskopische Dissektion und Katapultierung (LMPC)
 - 2.6 Kolorimetrische Proteinkonzentrationsbestimmung
 - 2.7 Massenspektrometrische Proteomanalyse (LC-MS/MS)
3. Ergebnisse
 - 3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)
 - 3.2 Färbung der PEN-Objektträger

- 3.3 Dehydrierung der ungefärbten PEN-Objektträger
- 3.4 Lasermikroskopische Dissektion und Katapultierung (LMPC)
- 3.5 Kolorimetrische Proteinkonzentrationsbestimmung
- 3.6 Massenspektrometrische Proteomanalyse (LC-MS/MS)
- 4. Diskussion
- 5. Zusammenfassung
- 6. Literaturverzeichnis
- 7. Tabellenverzeichnis
- 8. Abbildungsverzeichnis
- 9. Abkürzungsverzeichnis
- 10. Danksagung
- 11. Erklärung
- 12. Lebenslauf

*Für meine Eltern
In ewiger Liebe.*

1. Einleitung

Glaukome sind weltweit die zweithäufigste Ursache (Resnikoff et al., 2004) für irreversiblen Sehverlust. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Neuropathien des Nervus opticus (NO), die durch eine fortschreitende Degeneration retinaler Ganglienzellen (RGZ) gekennzeichnet sind (Weinreb et al., 2014). Als Folge leiden Patienten unter bogenförmigen Gesichtsfeldausfällen, den sogenannten Bjerrum-Skotomen (Ehlers, 2012), die sie meist erst im chronisch-progredienten Verlauf ihrer Erkrankung bemerken. Unbehandelt führt diese Kasuistik oftmals zur vollständigen Erblindung. Der Kammerwinkel ist das entscheidende Kriterium für die Klassifizierung von Glaukomen. Ist dieser geschlossen, spricht man von einem Engwinkelglaukom. Ein Offenwinkelglaukom liegt bei nicht verlegtem Kammerwinkel vor. Diese können ferner anhand ihrer Kausa in primäre oder sekundäre Formen unterteilt werden.

Der wichtigste modifizierbare Risikofaktor für das Auftreten und Voranschreiten von Glaukomen ist ein Augeninnendruck (IOD), der zu hoch für das individuelle Auge ist und zu einer dauerhaften Schädigung des NO führen kann. Dies wurde bereits für verschiedene Glaukomstadien und -untertypen anhand von prospektiven, randomisierten, multizentrischen und Doppel-Blind-Studien geprüft, wie z.B. die „Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study“ (Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group, 1998), „Advanced Glaucoma Intervention Study“ (The AGIS Investigators, 2000), „Early Manifest Glaucoma Trial“ (Leske et al., 2003) und „Ocular Hypertension Treatment Study“ (Gordon, 2002).

Daher ist aktuell eine Senkung des IOD, sei es operativ oder medikamentös, der einzige erfolgversprechende Therapieansatz dieser Neuropathien.

1.1 Funktionen und Abflusswege des Kammerwassers

Der IOD wird bestimmt durch Produktion, Zirkulation und Drainage des Kammerwassers (Leber, 1873). Kammerwasserproduktion und -sekretion finden im Ziliarepithel des Ziliarkörpers in der hinteren Augenkammer statt. Dort sezerniert die nach innen gelegene Epithelschicht der Ziliarzotten (Pars ciliaris retinae) das eiweißarme, wasserklare Kammerwasser zur Ernährung von Kornea und Linse, welches zur Aufrechterhaltung des IOD dient. Von dort fließt es durch

die Iris Richtung vordere Augenkammer. Im Bereich wo Kornea und Iriswurzel einen Winkel bilden (Kammerwinkel; Angulus iridocornealis), wird das Kammerwasser hauptsächlich von einem Maschenwerk aus Trabekeln abgeleitet und fließt über den Schlemm-Kanal ab, der das Kammerwasser über intra- und episklerale Venennetze abführt (Welsch, 2014). Es ist mittlerweile bekannt, dass der Abfluss im gesunden Auge gleich der Produktionsrate ist, sodass sich ein Normwert 14.21 ± 2.78 mmHg für den Augeninnendruck ergeben (Höhn et al., 2015). Bei Patienten mit einem primären Offenwinkelglaukom (POWG), ist der IOD meist höher als normal. Dies resultiert aus einem verminderten Abfluss im Kammerwinkel und nicht aus einer erhöhten Kammerwasserproduktion (Johnson, 2006). Bislang ist die Pathophysiologie, die zu einer Erhöhung des Abflusswiderstands führt, noch nicht vollständig geklärt. Erwiesen ist, dass TGF β 2-beeinflusste Veränderungen am Zytoskelett bzw. an der extrazellulären Matrix eine Rolle spielen (Tamm & Fuchshofer, 2007).

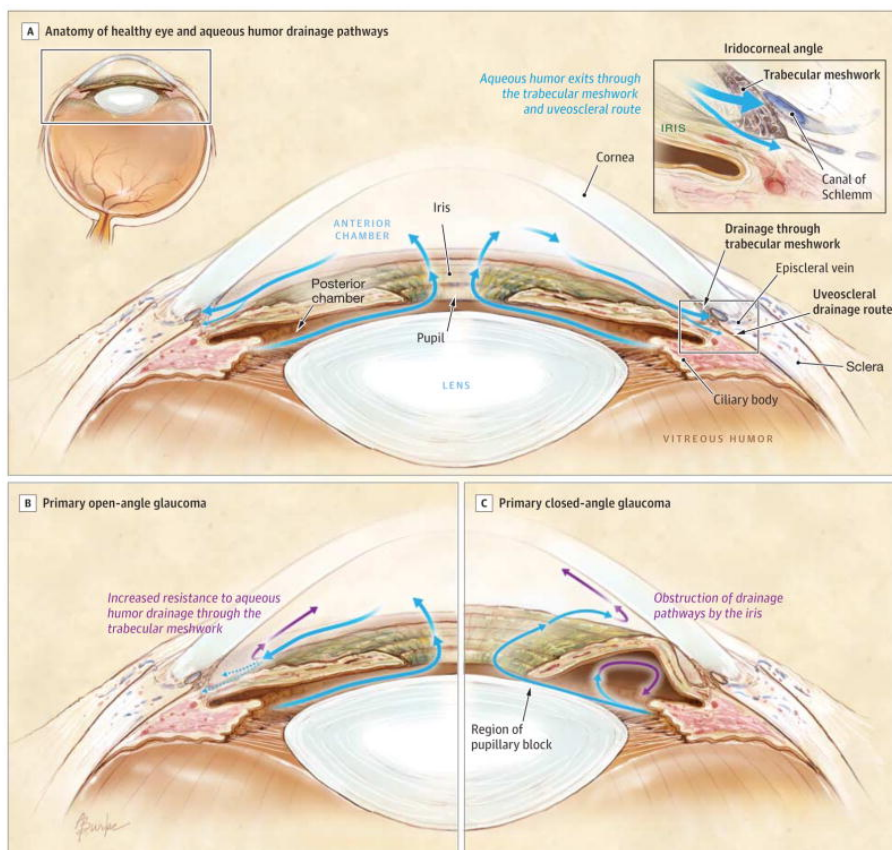


Abbildung 1: Kammerwasserdrainage eines gesunden (Abbildung A) und an einem Glaukom erkrankten Auges (Abbildung B: POWG und C: Winkelblockglaukom).

Das Kammerwasser wird vom Ziliarkörper sezerniert, fließt dann von der hinteren in die vordere Augenkammer und drainiert anschließend über den Schlemm-Kanal in episklerale Venen. Erhöht sich nun der Widerstand gegen den Kammerwasserabfluss (Abbildung B) oder ist dieser durch eine akute

Obstruktion blockiert (Abbildung C), so führt dies zu einem Sekretstau und einer konsekutiven Erhöhung des intraokulären Drucks im Bereich der hinteren Augenkammer (Weinreb et al., 2014).

1.2 Struktur des Nervus opticus und der Lamina cribrosa

Betrachtet man mikroskopisch das innere Blatt der Pars optica der Retina, so bildet beim Menschen der Sehnervenkopf den Ort, an dem die Axone der RGZ das Auge verlassen. Diese sind für die Signaltransduktion von visuellen Reizen ans Gehirn, aber auch für den antero- und retrograden Transport neurotropher Faktoren, verantwortlich. Ein- bzw. austretende Strukturen sollten immer als Prädilektionsstellen für eventuell spätere pathologische Veränderungen in Betracht gezogen werden. *Der Sehnerv bzw. dessen Kopf ist ein in die Peripherie verlagertes Hirnteil* (Welsch, 2014), der sich in der embryonalen Entwicklung aus einer Ausstülpung des Diencephalons gebildet hat. Somit dient er als Verbindung zwischen Augensbulbus und Gehirn. Die Nervenfasern des NO werden von Meningen umhüllt. Als Hirnteil wird der Sehnerv somit von allen drei Hirnhäuten (Dura, Arachnoidea und Pia mater) umgeben. Die Dura mater als äußerste der drei Hirnhäute geht im Bulbus anschließend in die Sklera über. Die Meningen dienen zum Schutz der Axone vor mechanischer Belastung bzw. als Stabilisierung. Die Axone sind im hinteren Bereich des Sehnervkopfs, aus diesem sie Richtung Sehnervbahn ziehen, nicht von Myelinscheiden umgeben. Zum Schutz dieser Schwachstelle befindet sich beim Menschen die so genannte Lamina cribrosa (LC). Dieses siebartige Geflecht aus spezialisierten LC Zellen und extrazellulärer Matrix (EZM) umgibt und stabilisiert die nicht myelinisierten Axone an dieser Prädilektionsstelle. Die LC besteht vorwiegend auf zellulärer Ebene aus Astrozyten und Fibroblasten-ähnlichen LC-Zellen. Diese synthetisieren extrazelluläre Matrix, besonders Kollagen III und IV, Elastin und Fibronektin (M R Hernandez et al., 1988). Mäuse besitzen, ähnlich dem Menschen, einen Ziliarmuskel, ein ausgebildetes trabekuläres Maschenwerk, ein uveosklerales Kammerwasser-Abflusssystem, und einen Schlemm-Kanal (Smith et al., 2001). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten werden Mausmodelle schon seit längerem in der ophthalmologischen Forschung zum besseren Verständnis über die Pathophysiologie von Glaukomen eingesetzt. Zudem bieten Mausmodelle den Vorteil einfacher Zuchtbedingungen und der gentechnischen Manipulierbarkeit (Shah et al., 2019). Jedoch weisen sie statt einer LC eine gliale Lamina (GL) auf, die ihren embryonalen Charakter beibehält (Tansley, 1956). Im Gegensatz zur humanen LC werden in der murinen GL die stützenden Funktionen nicht von den LC-Zellen übernommen (diese fehlen), sondern von Astrozyten, die mit ihren Endfüßen ein dichtes, maschenartiges Geflecht bilden.

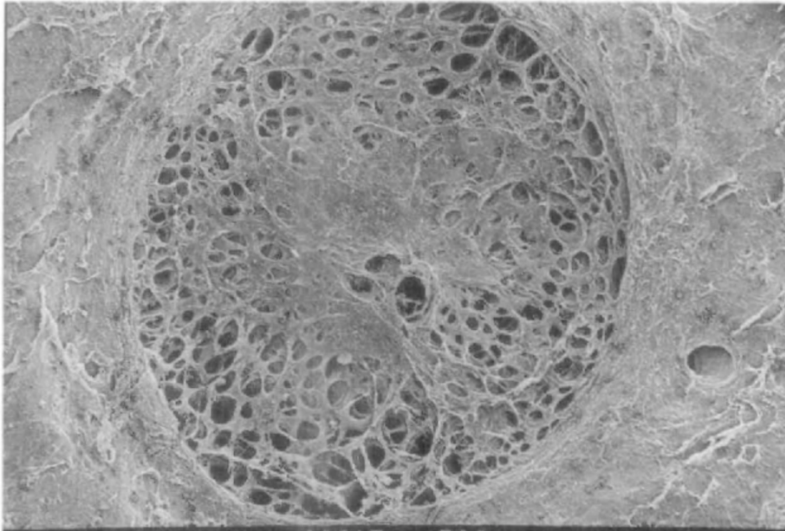


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer LC des rechten Auges (Jonas et al., 1991).

1.3 Intermediärfilamente und deren Proteine

Das Glial fibrillary acidic protein (GFAP), Vimentin und Nestin sind typische Markerproteine des zentralen Nervensystems (ZNS). Sie gehören zur Gruppe der Intermediärfilamente, im Cytoplasma gelegene Strukturen aus Proteinen, die für eine mechanische Stabilität der Zelle sorgen. Sie sind wichtige Bestandteile von Gliazellen, Astrozyten, Muskelzellen oder Zellen mesenchymalen Ursprungs. Diese sind untereinander durch Gap junctions (Nexus) verbunden und bilden somit eine funktionelle Einheit (funktionelles Synzytium), mit der sie für Gewebestabilisierung sorgen, eine Diffusionsbarriere aufbauen (Blut-Hirn-Schranke und Blut-Retina-Schranke) oder die Homöostase aufrechterhalten. Nach einer pathologischen ZNS-Schädigung weisen Gliazellen eine erhöhte Reaktivität aus und tragen zur Narbenbildung an der geschädigten Stelle bei (Welsch, 2014).

In Astrozyten finden sich die Intermediärfilamente besonders am Soma bzw. an den proximalen Fortsätzen und können dort eine Art Stützfunktion durch Versteifung übernehmen. Vimentin kommt nicht nur in Astrozyten vor, sondern findet sich hauptsächlich in Mesenchymzellen. Das 466 Aminosäuren lange Protein ist lokalisiert auf Chromosom 10 (Ferrari et al., 1986). Es besitzt, ähnlich wie GFAP (Masood et al., 1993), Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktor AP-1 (Moura-Neto et al., 1996; Sommers et al., 1994) bzw. weitere für Transkriptionsfaktoren der Jun- bzw. Fos-Familie (Sommers et al., 1994). Regulationsfaktoren wie ZBP-89 (Pieper et

al., 1992; Wieczorek et al., 2000; Zhang et al., 2003) oder Sp1 können an den Bindungsarmen von silencer-Elementen anbinden.

Nestin besteht aus 1618 Aminosäuren und ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert (Dahlstrand et al., 1992). Es kommt besonders häufig in der embryonalen Entwicklung im Nervensystem bzw. im Muskelgewebe vor (Kachinsky et al., 1994). In reaktiven Astrozyten bzw. neuronalen Stammzellen wird es neben GFAP vermehrt exprimiert.

GFAP wurde in den letzten Jahrzehnten seit seiner Entdeckung bei Multiple Sklerose-Patienten (1971) als das primäre Markerprotein bei ausgereiften Astrozyten des ZNS benutzt (Eng et al., 2000). Es besteht aus 432 Aminosäuren und ist im menschlichen Genom auf Chromosom 17 (Bongcam-Rudloff et al., 1991) lokalisiert. Bei Mäusen liegt es auf Chromosom 11 (Bernier et al., 1988).

An der Promotorregion von GFAP können Reportergene für Astrozyten bzw. andere GFAP-positive Zellen außerhalb des ZNS exprimiert werden (Y. Lee et al., 2008). Zusätzlich finden sich an den proximalen und distalen Regionen noch regulatorische Elemente für das GFAP-Gen (Masood et al., 1993; Miura et al., 1990; Sarkar & Cowan, 1991) bzw. der Transkriptionsfaktor AP-1, an den Transkriptionsfaktoren der Fos- oder Jun-Familie binden können. Durch Methylierung und Demethylierung von GFAP können Prozesse wie Zelldifferenzierung oder Chromatin-Remodellierung aktiviert oder inaktiviert werden.

1.4 Pathogenese des primären Offenwinkelglaukoms (POWG)

Die am häufigsten auftretende Form des Glaukoms ist das primäre Offenwinkelglaukom (Kwon et al., 2009). Hierbei entsteht die Erhöhung des Augeninnendruckes nicht durch einen, wie beim Engwinkelglaukom, obstruierten oder gar verschlossenen Kammerwinkels, sondern durch Veränderungen im Bereich des Trabekelmaschenwerks und des Schlemm-Kanals (Johnson, 2006)

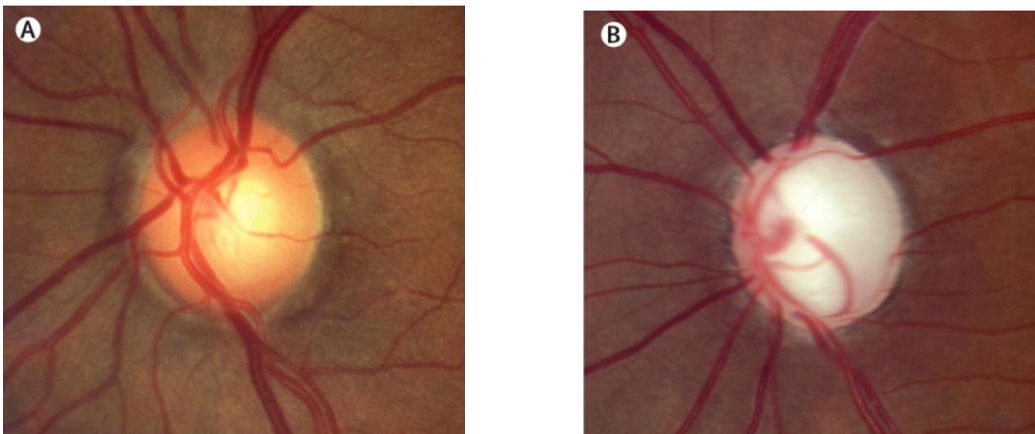


Abbildung 3: Ophthalmoskopische Aufnahme einer normalen (A) und einer glaukomatös veränderten (B) Papille.
(Quigley, 2011)

Patienten mit einem Offenwinkelglaukom weisen einen erhöhten Widerstand gegen die Drainage des Kammerwassers durch das Trabekelwerk auf. Aufgrund dieser Stenose des Kammerwasserabflusses resultiert eine Erhöhung des Augeninnendruckes (Leber, 1873). Ein erhöhter intraokulärer Druck kann zur mechanischen Belastung und Beanspruchung der hinteren Augenhälfte führen (Weinreb et al., 2014). Wie bereits oben erwähnt, manifestieren sich Zellschäden besonders an Prädilektionsstellen, wie zum Beispiel der LC, die als perforierte Austrittsstelle der RGZ aus der Sklera dient. Die LC als schwächste Stelle der ansonsten stabilen Sklera kann dadurch leichter mechanisch komprimiert, deformiert bzw. metaplastisch verändert werden. Bei einem Glaukomleiden führen neuropathische Veränderungen, wie in Grafik 2/B zu sehen, zu einer Ausdünnung von neuronalem Gewebe im Bereich der LC und zu einem Verlust retinaler Ganglienzellen. Aufgrund einer Erhöhung des Augeninnendruckes kommt es zu einer Verbreiterung und einem Verlust des Randsaums im Bereich des Sehnervenkopfes, sowie zu einer Verlagerung der LC nach distal („ON cupping“, Grafik 2B), was zu einer Degeneration und zum apoptotischen Verlust von RGZ führt. Aus dem erhöhten Druck resultierende Scherkräfte und eine Kompression der Axone kann zur Schädigung dieser führen, da die Reizweiterleitung

aber auch der Transport neurotropher Faktoren, beispielsweise des Wachstumsfaktors Brain derived neurotrophic factor (BDNF), eingeschränkt wird. So wiesen beispielsweise RGZ und deren Axone von Ratten einen deutlich reduzierten Transport von BDNF bei erhöhtem Augeninnendruck auf (Quigley et al., 2000).

Durch diese Schädigung der Axone kommt es im weiteren Verlauf zum Absterben der RGZ (Weinreb et al., 2014).

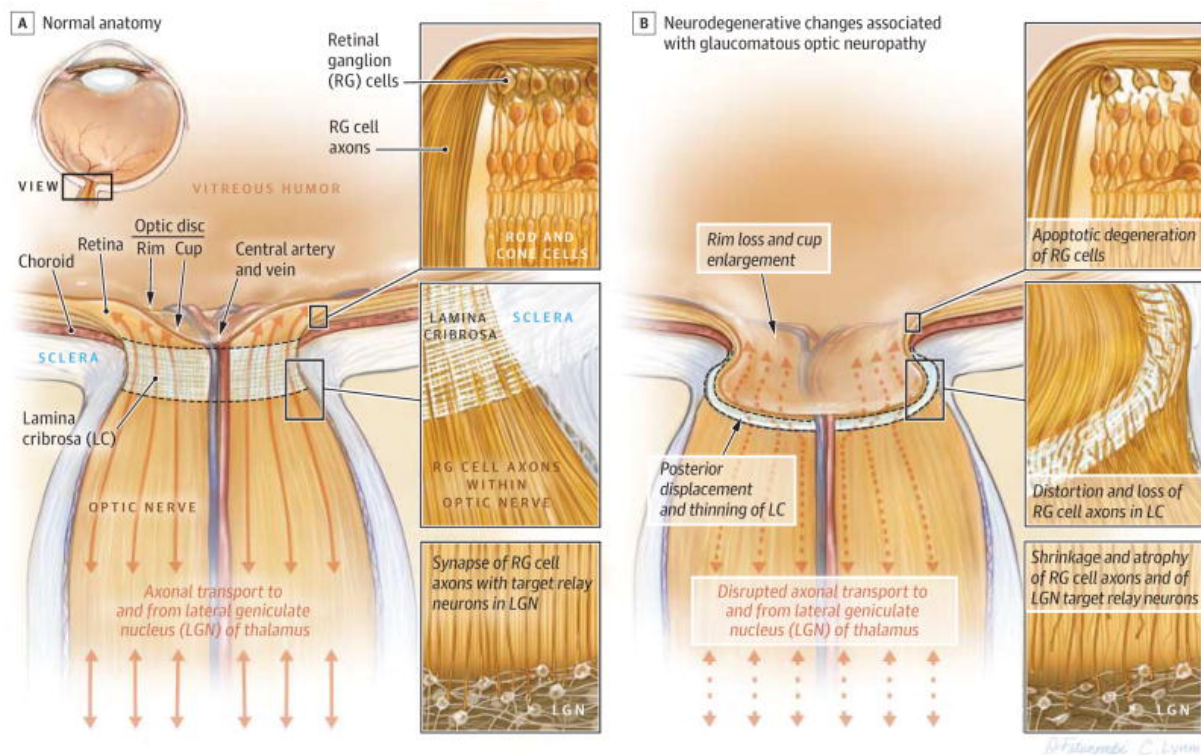


Abbildung 4: Schematische Illustration einer physiologischen Anordnung des NO und neurodegenerativen Veränderungen bei einem Glaukom mit resultierender ON (Weinreb et al., 2014).

Grafik 4/A soll veranschaulichen, wie Axone der retinalen Ganglienzellen den Bulbus an der Lamina cribrosa verlassen und danach den Nervus opticus formen. Diese ziehen dann weiter Richtung Ganglion geniculi laterale, an der Stelle sie Synapsen mit den Interneuronen bilden. Im Bereich des Sehnervenkopfs bildet sich aus dem Zusammenlaufen der retinalen Ganglienzellen ein neuroretinaler Randsaum, der diesen umschließt. Grafik 4/B veranschaulicht die Ausdünnung neuronalen Gewebes im Bereich des Randsaumes der LC und dem daraus resultierenden Verlust von RGZ.

1.5 Reaktive Gliose und GFAP-Ausschüttung im Bereich des Sehnervenkopfes

Kommt es zu einer pathologischen Situation im Bereich des zentralen Nervensystems, sei es traumatisch, ischämisch oder neurologisch bedingt, so weisen Astrozyten eine erhöhte Aktivität auf. Dies zeigt sich in einer Hyperplasie und einer vermehrten Ausschüttung von Markerproteinen, wie z.B. GFAP. Diesen Vorgang nennt man Astroglieose bzw. reaktive Gliose (Wilhelmsson et al., 2006). Einige Studien haben bereits die Bedeutung der Intermediärfilamente als Teilantwort auf pathologische Mechanismen, besonders in ihrer Funktion als Zytoskelett und die daraus resultierende Ausschüttung von Markerproteinen beschrieben (Milos Pekny, 2001; Wilhelmsson et al., 2006), doch gibt es nur wenige Studien, die sich explizit mit der Frage beschäftigen, welchen Teil GFAP explizit zur Astroglieose beiträgt (Brenner, 2014).

Wie bereits erwähnt, kommt es infolge des erhöhten Augeninnendruckes beim POWG zu einem vermehrten Gewebeverlust im Bereich des Sehnervenkopfs und der LC. Durch eine reaktive Gliose wird dort vermehrt extrazelluläre Matrix (EZM) gebildet. Es ist mittlerweile bekannt, dass reaktive Astrozyten besonders Proteine, wie z.B. Laminin, Kollagen Typ 4 oder GFAP bilden (M R Hernandez et al., 1988). Diese Prozesse führen zu einer Verdichtung bzw. Hypertrophie der Zellkörper am ONH (Lukas et al., 2008), was wiederum den pathologischen Prozess des Glaukoms beschleunigt. Weiterhin haben Studien gezeigt, dass betroffene Zellen an der LC verstärkt gegen GFAP angefärbt werden konnten (M R Hernandez et al., 1988).

Um den genauen Mechanismus und die Auswirkungen der GFAP-Erhöhung nach ZNS-Schäden bzw. bei Erkrankungen zu verstehen, beschäftigten sich einige Studien bereits mit der Frage, welche Funktion dieses in den Astrozyten vor einer Schädigung hat bzw. welche Veränderung nach einer Astroglieose eintritt (Brenner, 2014; Hatten et al., 1991; Sun et al., 2017). Hierzu wurden in verschiedenen Mausmodellen GFAP supprimiert bzw. überexprimiert. Eine vermehrte Expression von GFAP nach Verletzungen des ZNS konnte bereits in früheren Studien beobachtet werden (Aquino et al., 1988; Dahl & Bignami, 1976). Sowohl bei GFAP-positiven, als auch bei GFAP-supprimierten Mäusen kam es zu einer inflammatorischen Reaktion und zur Narbenbildung (Brenner, 2014; Milos Pekny et al., 1999). Obwohl GFAP ein wichtiger Bestandteil in der glialen Narbenbildung ist, konnte sich diese in Abwesenheit dessen formen (M. Pekny et al., 1995; Milos Pekny et al., 1999). Trotz alledem verbleiben die genauen molekularen Ursachen weiterhin im Unklaren. Neuere Studien belegen, dass Astrozyten eine typische Reaktion auf glaukomatöse Schäden zeigen (Brenner, 2014; Wang et al., 2017). Noch bevor es zu einem Verlust von RGZ kommt, weisen diese eine erhöhte Aktivität auf (Sofroniew & Vinters, 2010), verlieren ihre ursprüngliche Anordnung und bilden neue Längsfortsätze aus.

Nach traumatisch bedingten Schäden konnte im Gegensatz dazu keine Neubildung von Längsfortsätzen beobachtet werden (Brenner, 2014; Wang et al., 2017). Ein sogenanntes reaktives Remodeling (Astrozytenhypertrophie, GFAP-Erhöhung, Proliferation, EZM-Ausschüttung) konnte bei Glaukomen und Sehnervverletzungen beobachtet werden (M. Rosario Hernandez, 2000; Lye-Barthel et al., 2013; Sun & Jakobs, 2012; Sun et al., 2010). Es ist noch unklar, ob diese Reaktion für den Erhalt der Sehfunktion von Vorteil ist oder zu einer progredienten Schädigung beiträgt. Anhand von Versuchen mit Mäusen, die den Signaltransduktionsweg von STAT3 (Regulator der Astrozytenaktivität und glialen Narbenbildung) untersuchten, wurde herausgefunden, dass die Aktivität der Astrozyten eine wichtige Rolle in Schutz und Erhalt der Funktion des NO spielen (Brenner, 2014; Sun et al., 2017). Hierbei wurde durch Injektion kleiner magnetischer Mikrokügelchen (Microbeads) in die vordere Augenkammer der Kammerwinkel und somit der Kammerwasserabfluss blockiert. Dies führte zu einer chronischen intraokulären Druckerhöhung, welches die frühen Anfangsstadien eines Glaukoms nachahmen sollten. Bei den Wildtypmäusen führte dies zu einer Hochregulation des STAT3-Kaskadeweges und somit zu einer gesteigerten Aktivität der Astrozyten und Narbenbildung. Im GFAP-defizienten Modell resultierte eine abgeschwächten Astrozytenreaktivität nach Erhöhung des IOD (Sun et al., 2017). Ein abgeschwächtes Remodeling am Sehnervkopf war laut Studie mit einem größeren Verlust der Nervenfunktion verbunden (Brenner, 2014; Sun et al., 2017). Somit ist laut Studie eine erhöhte Astrozytenaktivität und einer daraus resultierenden GFAP-Erhöhung bei Glaukomen zur Aufrechterhaltung der Sehfunktion von Vorteil (Brenner, 2014; Sun et al., 2017). GFAP, als Bestandteil der Intermediärfilamente der Astrozyten, trägt anscheinend einen erheblichen Teil in der Funktionalität des zentralen Nervensystems bei. Die Diskrepanz einiger Studien zeigt jedoch, dass die Funktionalität der Markerproteine, besonders von GFAP, in ihrer Komplexität bei Weitem noch nicht verstanden wurde und bietet weiterhin zahlreiche Ansatzpunkte für noch folgende Forschungen.

1.6 Lasermikroskopische Dissektion (LCM) und lasermikroskopische Dissektion mit Druckkatapultierung (LMPC)

Die Forschung, gerade im Bereich mikrobiologischer Analysen, ist gerade in den letzten zwei Jahrzehnten massiv vorangeschritten. Methoden, wie Proteomik oder DNA-Chip-Technologie, haben ein enormes Potential, die Physiologie und Pathologie auf mikrozellulärer Ebene zu verstehen bzw. zu revolutionieren. Es hat sich aber auch gezeigt, dass es für die Aussagekraft dieser Studien von großer Bedeutung ist, an allererster Stelle passendes Gewebe für die weitere

Probenuntersuchung zu generieren (Curran et al., 2000). Die schon oft diskutierte Gewebheterogenität, sprich die Beeinträchtigung von erhobenen Resultaten aufgrund von Zellen, die nicht ursprünglich aus dem Zielgewebe stammen, ist gerade auf mikrozellulärer Ebene ein limitierender Faktor. Somit ist es wichtig, homogenes und ausreichendes Zellmaterial präzise zu gewinnen. In der Vergangenheit wurden bereits einige Versuche unternommen, diesen limitierenden Faktor zu optimieren (Going & Lamb, 1996). So wurden für diese histologischen Dissektionen Paraffinschnitte bzw. in Formalin fixierte Präparate verwendet. Es wurden davon 6µm dicke Schnitte mit Toluidinblau gefärbt und auf einem Glasobjektträger vorbereitet. Danach wurde mit einer elektrischen Nadel ein gewisses Areal herausgeschnitten (Going & Lamb, 1996). Es zeigte sich aber, dass diese Methoden einerseits zeitaufwendig, andererseits deren Qualität abhängig von der individuellen Erfahrung des Durchführenden waren (Curran et al., 2000; Going & Lamb, 1996). Eine vielversprechende Möglichkeit die Gewebheterogenität zu reduzieren ist die lasermikroskopische Dissektion (LCM).

Die LCM ist ein Verfahren, welches es in einem Schritt ermöglicht, unter mikroskopischer Sicht, spezielle Zellen aus einem Gewebepreparat zu isolieren und somit homogenes Material zu sammeln. Diese Methode wurde 1996 von Mitarbeitern des National Cancer Institute (NCI) speziell für die Untersuchung von Tumorzellen entwickelt. Das Prinzip besteht darin, dass selektiv Zellen bzw. Gewebe auf einer Polyurethanmembran (PEN-Membran) anhaften (Fend & Raffeld, 2000), die durch einen Niedrigpuls-Laserstrahl zuvor geschmolzen wird. Das System besteht aus einem Inversmikroskop, einem Infrarotlaser, einer Kamera und einer Steuereinheit, mit der sich das Mikroskop bewegen lässt (Fend & Raffeld, 2000). Eine Halterung ist zusätzlich für die Sammelröhrchen angebracht. Üblicherweise ist das System mit einer PC-Steuereinheit verbunden, mit der sich die Eigenschaften des Lasers und das Selektionsareal einstellen lassen. Die Polyurethanmembran wird an den Deckel eines Standard-PCR-Röhrchens angebracht. Nun wird das Sammelröhrchen mit Hilfe der Halterung in Richtung des selektierten Gewebeareals bewegt und mit sanftem Druck dort positioniert. (Fend & Raffeld, 2000). Die Zellen, die gesammelt werden sollen, werden über die PC-Steuereinheit markiert und der Infrarotlaser aktiviert. Da die Membran ihren Absorptionspunkt ca. bei der Wellenlänge des Lasers besitzt, beginnt sie zu schmelzen und verbindet sich mit dem ausgeschnittenen Gewebe (Fend & Raffeld, 2000). Das nun entstandene Gewebe-Polyurethan-Gemisch hebt sich von dem Glasobjektträger ab und kann nun durch Bewegen der Halterung vom Gewebeareal weg gesammelt werden (Fend & Raffeld, 2000). Die Stärke, Pulszahl und -dauer kann individuell an der Steuereinheit eingestellt werden.

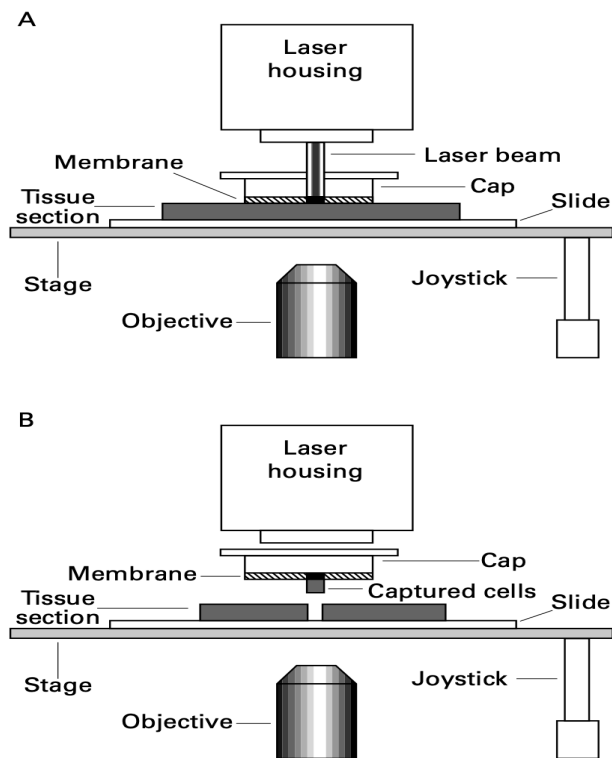


Abbildung 5: Grundlegender Vorgang bei der LCM.

Bild A zeigt den Schmelzvorgang der Polyurethanmembran nach Laseraktivierung. Bild B zeigt die Aufnahme der selektierten Zellen durch Abheben der Membran in das Sammelröhrchen (Fend & Raffeld, 2000).

Ein weiteres, ähnliches Verfahren der lasermikroskopischen Dissektion ist das kontaktlose Katapultieren von Gewebe in das Sammelröhrchen, die sogenannte "Laser Micro-Dissection Pressure Catapulting" (LMPC)-Technologie von Carl Zeiss Palm. Hierbei wird mithilfe eines durch den Laserstrahl erzeugten Druckes die selektierten Zellen in den Deckel des Sammelröhrchens katapultiert. Die Membran ist hier im Unterschied zur LCM mit dem Objektträger verbunden und wird mit dem Areal gleichzeitig ausgeschnitten (Grafik 6). Beide Verfahren bedienen sich der gleichen Grundidee und können unterschiedlich eingesetzt werden.

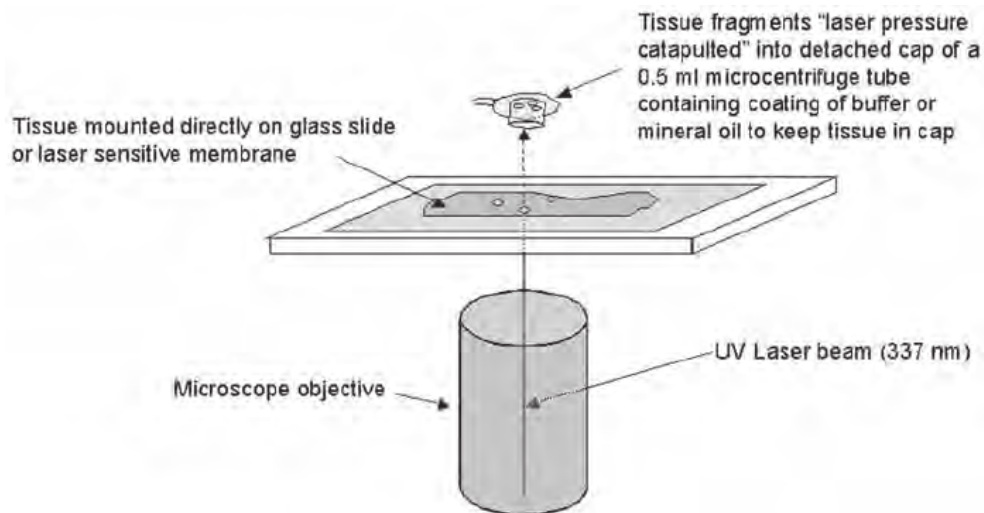


Abbildung 6: : Schematische Darstellung der lasermikroskopischen Dissektion und Katapultierung des Gewebes in das Sammelröhrchen (*Zeiss/PALM Micro Beam Laser Microdissection System*. | *Download Scientific Diagram*, n.d.).

1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung einer Methode, die eine Möglichkeit bietet, die molekularbiologischen Veränderungen auf Proteinebene im Bereich der LC bzw. der GL zu bestimmen. Dabei ist es essentiell, dass nur die zu untersuchenden Bereich gesammelt werden, da es sonst zu einer Verfälschung des Messergebnisses kommen könnte. Es wurde sich für das Verfahren der lasermikroskopischen Dissektion und Katapultierung (LMCP) entschieden, da diese eine Möglichkeit bietet, kleinste Areale selektiv und präzise auszuschneiden und zu sammeln. Anschließend soll die gesammelte Menge an zellulärem Gewebe massenspektroskopisch bestimmt und eine Proteom-Analyse durchgeführt werden. Durch Proteom-Analysen der GL von GFAP defizienten Mäusen, können Rückschlüsse darauf gezogen werden, wie GFAP die Synthese anderer Proteine in diesem Gewebe beeinflusst. Dazu soll die Etablierung in dieser Arbeit beitragen.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendet Materialien

2.1.1 Reagenzien

| Bezeichnung | Bezugsquelle |
|---|---|
| 0,89% NaCl | Selbst hergestellt |
| Albumin Fraktion V (BSA) | Roth, Karlsruhe |
| Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) | Thermo Fisher Scientific, Pennsylvania, USA |
| Essigsäure C ₂ H ₄ O ₂ | VWR, Pennsylvania, USA |
| Ethanol C ₂ H ₆ O | Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg |
| Fluorescent Mounting Medium Mowiol | Vector Laboratories Inc., Kalifornien, USA |
| Glycerol 87% p.A. | AppliChem, Darmstadt |
| Isofluran | Abbott Laboratories Ltd, Berkshire, UK |
| Luminata | Millipore Corporation, Massachusetts, USA |
| Magnesiumdichlorid MgCl ₂ (25 und 50 mM) | New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main |
| Methanol CH ₃ OH | Thermo Fisher Scientific, Pennsylvania, USA |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid NaCl | VWR, Leuven, BEL |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Roth, Karlsruhe |
| Paraformaldehyd (PFA) | Merck, Darmstadt |
| ROTIQuant univ. Reagenz 1 | Roth, Karlsruhe |
| ROTIQuant univ. Reagenz 2 | Roth, Karlsruhe |
| Tissue-Tek® | Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, NLD |
| Tween 20 | Roth, Karlsruhe |
| Wasser H ₂ O (Rnase-frei) | Roth, Karlsruhe |

Tabelle 1: Verwendete Reagenzien

2.1.2 Puffer

| Lösung/ Puffer | Zusammensetzung |
|------------------------------|--|
| 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 | 100 ml 0,2 M Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O mit 0,2 M NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O auf pH 7,4 auf 0,1 M mit dH ₂ O verdünnen |
| 10 x Elektrodenpuffer | 250mM Tris/HCl 400mM Glycin 1% (w/v) SDS in dH ₂ O lösen; ad 1 l |
| Mango-Taq-Reaktionspuffer | Siehe Herstellerangabe |
| DNA-Extraktionspuffer | 3,74 g KCl 0,51 g MgCl ₂ -6H ₂ O 0,1 g Gelantine 4,5 ml Nonidet P-40 (Tergitol) 4,5 ml Tween 20 10 ml Tris-HCl 1 M ad 1 l dH ₂ O |
| Paraformaldehyd (PFA) 4% | 4 g PFA ad 50 ml Phosphatpuffer 0,1 M |
| Q-Puffer | 1 ml Tris 1 M 1 ml (NH ₄) ₂ SO ₄ 1 M 0,075 ml MgCl ₂ 2 M 2 ml KCl 1 M ad 50 ml dH ₂ O |
| SDS-Lösung, 10 % (w/v) | 10 g SDS in dH ₂ O lösen; ad 100 ml |
| TBE pH 7,0 | 108 g Tris 55 g Borsäure 40 ml EDTA 0,5 M ad 1 l dH ₂ O |
| TBS, 10x, pH 7,4 | 30 g Tris 80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid |

| | |
|-------------------------|--|
| | mit dH2O ad 1 l, autoklavieren |
| TBST, 1x | 100 ml 10x TBS 0,05% (v/v) Tween 20 mit dH2O ad 1 l |
| Tissue-Tek® | Sakura, Zoeterwoude, NL |
| Transferpuffer, 10x | 5,8 g Tris 2,9 g Glycin 200 ml Methanol 3,7 ml 10% (w/v) SDS in dH2O lösen, ad 1 l |
| Tris/HCl, 1,0 M, pH 6,8 | 121,14 g Tris in dH2O lösen; ad 1 l |
| Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8 | 181,71 g Tris in dH2O lösen; ad 1 l |

Tabelle 2: Verwendete Pufferlösungen

2.1.3 Enzyme

| Enzym | Bezugsquelle |
|--------------------------|------------------|
| Mango Taq DNA Polymerase | Bioline Meridian |
| Taq DNA Polymerase | Selbtherstellung |

Tabelle 3: Verwendete Enzyme

2.1.4 Primer

| Primer | Sequenz 5' - 3' |
|------------------------|--------------------------|
| Wildtyp GFAP forward | GATGGAGCGGAGACGCATCACC |
| Wildtyp GFAP reverse | TTGTCCCTCTCCACCTCCAGCC |
| GFAP-defizient forward | GATGGAGCGGAGACGCATCACC |
| GFAP-defizient reverse | GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGG |

Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotidprimer

2.1.5 Geräte

| Gerät | Bezugsquelle |
|---|---|
| Apparaturen zur Gelelektrophorese | peqlab, Erlangen |
| Axiovert 40 CFL | Zeiss, Göttingen |
| Binokular | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Berlin |
| Hamilton-Spritze | Hamilton, Bonaduz, CHE |
| Heizplatte mit Magnetrührer IKA RCT basic | IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen |
| Julabo SW20 Wasserbad | Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach |
| Kern PJI 2100-2M Analysewaage | Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern |
| Kryostat CM1850 | Leica BioSystems, Illinois, USA |
| LAS 3000 Intelligent Dark Box | Fujifilm, Düsseldorf |
| Mastercycler gradient, personal | Eppendorf, Hamburg |
| Mettler AE 163 Feinwaage | Mettler Toledo, Giessen |
| Microm HM 500 OM Kryostats | Microm International, Walldorf |
| Mikroskop Axio Imager. Z1 | Zeiss, Göttingen |
| MilliQ Plus PF Reinwasseranlage | Millipore Corporation, Billerica, USA |
| Model 45-101-i ClassII Electrophoresis System | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Palm Microbeam LCM | Carl Zeiss Microscopy GmbH, Berlin |
| Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg |
| UV-Durchlichtschirm | Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen |
| Vortex Genie 2 | Scientific Industries Inc., New York, USA |
| Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R | Eppendorf, Hamburg |

Tabelle 5: Verwendete Geräte

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

| Bezeichnung | Hersteller |
|--|-------------------------------|
| Deckgläser, 24 x 60mm | Menzel-Gläser, Braunschweig |
| Ecoflo Präparierbesteck | Dispomed Witt oHG, Geinhausen |
| Edding 400 Permanent Marker | Edding |
| „Falcon“ Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml | Sarstedt, Nürnberg |
| Glaswaren | Schott, Roth, VWR |
| Green Nitrile Gloves | KIMTECH |
| MembraneSlide 1.0 PEN | Zeiss, Göttingen |
| PCR-Tubes 0.2 ml | Roth, Karlsruhe |
| MMI Isolation Caps Silicon Plug with Diffuser 0.2 ml | MMI, Eching |
| Omnifix sterile Einmalspritzen | B. Braun, Wertheim |
| Pasteurpipetten | Brand, Wertheim |
| Pipettenspitzen | Sarstedt Inc., NC, USA |
| Sterican Einmal-Injektions-Kanüle | B. Braun, Wertheim |
| SuperFrost®Plus Objektträger | Menzel-Gläser, Braunschweig |

Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.1.7 Größenstandards

Die DNA-Gelelektrophorese wurde mit dem Größenstandard GeneRuler 100bp DNA Leiter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt.

2.2 Mauslinie

Die in dieser Arbeit verwendete Mauslinie B6.129S7-*Gfap*^{tm1Mes/J} (GFAP^{tm1Mes}) (Jackson Laboratory, Main, USA) wurde 1996 (McCall et al., 1996) generiert. Die Tiere wurden in den Zentralen Tierlaboratorien der Universitätsklinik Regensburg gezüchtet und den Richtlinien der Europäischen Union für Versuchstiere entsprechend behandelt. Für die Versuche wurden die Tiere im Tierstall des Institutes für Humananatomie und Embryologie, Regensburg, mit einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Den Tieren stand im klimatisierten Stall Wasser und Futter zur freien Verfügung.

Folgende Mauslinie wurde verwendet: GFAP^{tm1Mes}. Die Mäuse waren bei der Durchführung der Experimente 6-18 Wochen alt. Für die Versuche wurden heterozygote, Wildtyp-(WT) und GFAP-defiziente Tiere beiderlei Geschlechts verwendet.

2.3 Molekularbiologische Arbeitstechniken

2.3.1 Gewinnung genomischer DNA

Für die Genotypisierung der verwendeten Versuchstiere, wurde unter Isofluran- Betäubung eine Biopsie des Ohrs entnommen. Diese Markierungen dienten ebenso zur Identifikation der Tiere. Die Biopsien wurden über Nacht (ÜN) bei 55° C in 200 µl DNA-Extraktionspuffer mit 5 µl Proteinase K im Schüttler lysiert. Am folgenden Tag wurde die Proteinase K für 10 min bei 95° C inaktiviert und das Lysat für weitere 10 min bei 16.000 rpm zentrifugiert, um nicht-lysierte Reste zu pelletieren. Die DNA befand sich im Überstand und wurde bei 4° C gelagert.

2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglicht den spezifischen Nachweis und die Vervielfältigung größerer DNA-Mengen (Garibyan & Avashia, 2013). Mit diesem Assay ist es möglich, bestimmte Fragmente aus einem größeren DNA-Pool in größeren Mengen zu generieren.

Das Verfahren läuft in drei sich wiederholenden Schritten nacheinander ab: Denaturierung, Annealing und Extension. In der Phase der Denaturierung wird die Probe auf 94 °C erhitzt, um die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufzutrennen. An diese binden die spezifischen Primer in der Annealingphase. Danach verlängert die Polymerase in 5' → 3' Richtung das zu amplifizierende DNA-Produkt. Die Temperatur für die Extension ist individuell abhängig von der eingesetzten thermostabilen DNA-Polymerase und liegt in den meisten Fällen bei 72 °C.

Zur Genotypisierung der Tiere (GFAP^{tm1Mes}) wurden zwei Fragmente der DNA mittels PCR vervielfältigt. Das eine Fragment ist spezifisch in der DNA von GFAP-defizienten Mäusen vorhanden, das andere in der DNA von GFAP-WT Mäusen (McCall et al., 1996). Die zu erwartenden Banden sind für die Tiere vom WT bei 400 Basenpaaren (bp) und für die Tiere, vom GFAP-defizienten Typ, bei 180 bp. DNA-Proben heterozygoter Tiere zeigen beide Banden. Zur Kontrolle wurde eine Positivkontrolle angefertigt mit der DNA eines schon genotypisierten Tieres und eine Negativkontrolle ohne Zugabe von DNA. Anschließend wurden die Proben im Mastercycler gradient personal (Eppendorf, Hamburg) vervielfältigt.

Es wurden für die Etablierung verschiedene Zusammensetzungen von Reaktionsansätzen aus unterschiedlichen PCR-Protokollen zur Genotypisierung der GFAP^{tm1Mes} -Mäuse getestet.

Tabelle 7: Standard-PCR-Reaktionsansatz für 35 µl

| Bestandteile | Menge (in µl) |
|---|----------------------|
| ddH ₂ O | 17,00 |
| 5x Buffer | 5,00 |
| MgCl ₂ | 3,00 |
| dNTP KAPA | 1,00 |
| Primer oIMR0356 (1:10) | 1,00 |
| Primer oIMR0357 (1:10) | 1,00 |
| Primer oIMR1786 (1:10) | 1,00 |
| Glycerol | 3,00 |
| Thermophilus-aquaticus-Polymerase(A-taq.) | 1,00 |
| DNA | 2,00 |
| | |
| Gesamt | 35,00 |

| Primer | Orientierung | 5'-3' Sequenz |
|----------------|---------------------|--------------------------|
| GFAP-Wildtyp | forward | GATGGAGCGGAGACGCATCACC |
| | reverse | TTGTCCCTCTCCACCTCCAGCC |
| GFAP-defizient | forward | GATGGAGCGGAGACGCATCACC |
| | reverse | GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGG |

| Schritt | Temperatur (in °C) | Zeit | Bemerkung |
|----------------|---------------------------|-------------|---|
| 1 | 94,0 | 2 min | |
| 2 | 94,0 | 20 sec | |
| 3 | 65,0 | 15 sec | -0,5°C pro Zyklus Abnahme |
| 4 | 68,0 | 10 sec | |
| 5 | | | Wiederholung der Schritte 2-4 für 10 Zyklen |
| 6 | 94,0 | 15 sec | |
| 7 | 60,0 | 30 sec | |
| 8 | 72,0 | 10 sec | |

| | | | |
|----|------|-------|---|
| 9 | | | Wiederholung der Schritte 6-8 für 28 Zyklen |
| 10 | 72,0 | 2 min | |
| 11 | 10,0 | hold | |

Tabelle 8: Fa. Jackson (*'Protocol 28529 - Gfap<tm1Mes>'*, n.d.)

| Bestandteile | Menge (in µl) |
|------------------------|---------------|
| ddH ₂ O | 11,45 |
| 5x Buffer | 6,50 |
| MgCl ₂ | 1,30 |
| dNTP KAPA | 0,65 |
| Primer oIMR0356 (1:10) | 1,25 |
| Primer oIMR0357 (1:10) | 1,25 |
| Primer oIMR1786 (1:10) | 1,00 |
| Glycerol | 1,63 |
| Mango-Taq | 0,15 |
| DNA | 1,00 |
| | |
| Gesamt | 25,00 |

| Primer | Orientierung | 5'-3' Sequenz |
|----------------|--------------|--------------------------|
| GFAP-Wildtyp | forward | GATGGAGCGGAGACGCATCACC |
| | reverse | TTGTCCCTCTCCACCTCCAGCC |
| GFAP-defizient | forward | GATGGAGCGGAGACGCATCACC |
| | reverse | GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGG |

| Schritt | Temperatur (in °C) | Zeit | Bemerkung |
|---------|--------------------|--------|---|
| 1 | 94,0 | 2 min | |
| 2 | 94,0 | 20 sec | |
| 3 | 65,0 | 15 sec | -0,5°C pro Zyklus Abnahme |
| 4 | 68,0 | 10 sec | |
| 5 | | | Wiederholung der Schritte 2-4 für 10 Zyklen |

| | | | |
|----|------|--------|---|
| 6 | 94,0 | 15 sec | |
| 7 | 60,0 | 30 sec | |
| 8 | 72,0 | 10 sec | |
| 9 | | | Wiederholung der Schritte 6-8 für 28 Zyklen |
| 10 | 72,0 | 2 min | |
| 11 | 10,0 | hold | |

Tabelle 9: Modifiziertes Protokoll Fa. Jackson

| Bestandteile | Menge (in µl) |
|------------------------|----------------------|
| ddH ₂ O | 10,20 |
| 5x Buffer | 6,60 |
| MgCl ₂ | 1,30 |
| dNTP KAPA | 0,65 |
| Primer oIMR0356 (1:10) | 1,50 |
| Primer oIMR0357 (1:10) | 1,25 |
| Primer oIMR1786 (1:10) | 1,00 |
| Glycerol | 1,63 |
| Mango taq Polymerase | 0,15 |
| DNA | 1,00 |
| | |
| Gesamt | 25,18 |

| Primer | Orientierung | 5'-3' Sequenz |
|----------------|---------------------|--------------------------|
| GFAP-Wildtyp | forward | GATGGAGCGGAGACGCATCACC |
| | reverse | TTGTCCCTCTCCACCTCCAGCC |
| GFAP-defizient | forward | GATGGAGCGGAGACGCATCACC |
| | reverse | GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGG |

| Schritt | Temperatur (in °C) | Zeit | Bemerkung |
|---------|--------------------|------|-----------|
|---------|--------------------|------|-----------|

| | | | |
|----|------|--------|---|
| | | | |
| 1 | 94,0 | 2 min | |
| 2 | 94,0 | 20 sec | |
| 3 | 65,0 | 15 sec | -0,5°C pro Zyklus Abnahme |
| 4 | 68,0 | 10 sec | |
| 5 | | | Wiederholung der Schritte 2-4 für 10 Zyklen |
| 6 | 94,0 | 15 sec | |
| 7 | 60,0 | 30 sec | |
| 8 | 72,0 | 10 sec | |
| 9 | | | Wiederholung der Schritte 6-8 für 28 Zyklen |
| 10 | 72,0 | 2 min | |
| 11 | 10,0 | hold | |

2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe im Bereich von 100bp bis zu 25kbp (P. Y. Lee et al., 2012). Hierzu wird ein Gel aus Agarose, das aus wiederholt aneinander gereihten L- und D-Galactose-Untereinheiten besteht, gegossen. Dabei bildet die Agarose ein Netzwerk aus Bündeln, deren Porengrößen die Siebeigenschaften eines Gels auf molekularer Ebene bestimmen. Da das Rückgrat der DNA aus Phosphateinheiten besteht und diese negativ geladen sind, wandern nun die Fragmente Richtung einer positiv geladenen Spannungsquelle, der sogenannten Anode. Hierbei wird die DNA anfänglich in vorher eingekerbte Vertiefungen pipettiert und Strom angelegt. Je nach Größe oder Ladung wandern die Fragmente unterschiedlich schnell entlang des Gradienten. Die nach Größe aufgetrennten Produkte werden durch einen geeigneten interkalierenden Farbstoff (Ethidiumbromid), der dem Agarose Gel zugesetzt wird, unter UV-Fluoreszenz (Ultraviolett-Fluoreszenz) sichtbar gemacht. Es wurde ein Agarosegel mit einer Konzentration von 2 % gegossen. Dafür wurden 2 g Agarose in 100 ml (Milliliter) TBE-Puffer (90mM) gelöst und in der Mikrowelle ca. 3min erhitzt, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hat. Das noch flüssige Gel wurde unter fließend kaltem Wasser etwas abgekühlt und es wurden 4 µl (Mikroliter) Ethidiumbromid hinzugegeben. Anschließend wurde das Gel in einen Schlitten gegossen und ca. 0,5 cm (Zentimeter) vom oberen Rand entfernt ein „Kamm“ eingesetzt, um

Probentaschen zu generieren. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde es in eine Elektrophoresekammer gelegt und mit TBE-Puffer bedeckt. In die Taschen wurden jeweils 12µl des PCR Produkts gegeben und in die erste Tasche 3µl eines Standard-DNA-Markers zur Bandenkontrolle. Für die Auftrennung wurde eine konstante Spannung von 120 V (Volt) für 25 Minuten angelegt. Die Aufnahme erfolgte unter UV-Licht der Wellenlänge 320 nm (Nanometer).

2.3.4 Transkardiale Perfusion

Für die Präparation des Auges wurden Gfap^{tm1Mes}-Mäuse im Alter von 6-18 Wochen gewählt. Hierbei war anfänglich nicht entscheidend, ob es sich um Wildtyp- oder GFAP-defiziente Tiere handelt, da die Methodenetablierung zunächst im Vordergrund stand. Nach dem Erreichen einer gewissen Methodenroutine wurden dann auf eine genaue Verteilung der Genotypen geachtet. Die Tiere wurden tierschutzgerecht mit Isofluran betäubt, durch Exartikulation des Atlanto-Occipitalgelenks getötet und mit 0,89% NaCl (Natriumchlorid)-Lösung perfundiert. Beide Augen wurden für die anschließende Proteingewinnung und Proteomanalyse verwendet. Nach der Tötung wurden die Mäuse auf der Arbeitsplatte fixiert und die Haut ventral entlang der thorakalen Mittellinie mit einer chirurgischen Schere eröffnet. Zwei zusätzliche Inzisionen wurden kaudal des Xiphoidfortsatzes entlang des Brustkorbes beidseits getätigt. Die Haut wurde zur besseren Sicht auf die darunter liegenden Organe zur Seite geklappt und auf der Arbeitsplatte fixiert. Anschließend eröffnete man das Diaphragma durch leichtes Anheben des Xiphoidfortsatzes nach kranial. Danach wurde die Thorakalmuskulatur und der Brustkorb lateral bis zur Wirbelsäule mit einer kräftigen Schere präpariert, Richtung Xiphoid angehoben und mit feinen Klemmen dort fixiert. Nach Eröffnung des Perikards im Mediastinum, wurde ein Entlastungsschnitt im rechten Vorhof am noch schlagenden Herzen durchgeführt. Anschließend punktierte man mit einer feinen Injektionskanüle die linke Kammer nahe der Herzspitze und verband diese mit einer Perfusionspritze, die 0,89% NaCl-Lösung enthielt. Daraufhin wurde vorsichtig perfundiert (ca. 5-10ml) bis die Organe, besonders die Leber, sich weißlich-grau verfärbten.

2.4 Histologische Verfahren

2.4.1. Einbettung und Anfertigung von Gefrierschnitten

Nach der transkardialen Perfusion wurden beide Augen sorgfältig enukleiert und in ein wasserlösliches Medium auf Glycerinbasis (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, Fa. Sakura) eingebettet. Hierbei war es wichtig, dass der Sehnerv im Ganzen erhalten blieb und zur Erleichterung für die spätere Gefrierschnittpräparation etwas gekürzt wurde. Nach der Einbettung wurden die Blöcke mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert. Für die Gefrierschnitte wurde der Microm HM 500 OM Kryostat (Microm International, Walldorf) verwendet. Die Blöcke mit den Augen wurden auf eine Halterung aufgefroren. Die Augen lagen anfänglich in den Blöcken mit Blickrichtung nach unten, der NO zeigte nach oben. Es wurden 12 µm dicke Schnitte der nativen Augen angefertigt. Hierbei zeigte sich, dass zwar der NO im Verlauf gut dargestellt werden konnte, es aber einerseits sehr zeitaufwendig ist, bis die gesuchte Stelle aufgefunden werden konnte und andererseits oftmals schwierig war, den korrekten Anfang der Eintrittsstelle zu detektieren. Daraufhin wurden die Blöcke so ausgerichtet, dass die Augen mit Blickrichtung nach oben und der NO nach unten zeigte. Die anfänglich eingestellte Schnitttiefe von 12 µm wurde beibehalten. Der Eintritt des NO in das Auge und somit der Bereich der GL, wurde schrittweise durch Überprüfung in einem Lichtmikroskop aufgesucht. Mit einem herkömmlichen Objektträger wurde Anfangs- und Endpunkt des zu detektierenden Abschnittes dokumentiert. Diese beiden Schnitte fielen somit aus der Sammlung hinaus. Im Durchschnitt wurden während der gesamten Untersuchung meistens 10-15 verwertbare Schnitte gesammelt, die den Verlauf des NO in der GL darstellen konnten. Diese sammelte man dann auf speziellen Objektträgern, den s.g. PEN-Membrane Objektträgern ((Fa.Zeiss)). Die Schnitte wurden auf der Fläche in gleicher Ausrichtung platziert, um den ONH später leichter auffindig machen zu können. Pro Objektträgerfläche fanden ca. 8-10 Schnitte Platz. Diese wurden mit einem Finger rückseitig auf der Glasfläche angetaut, sodass das überflüssige Tissue-Tek® geschmolzen wurde. Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die Schnitte sich nicht zusammenrollen, da es sonst zu verfälschten bzw. zerquetschten Gewebeproben kommen kann. Die Objektträger wurden übereinandergelegt und bei -20°C gelagert.

2.4.2 Färbung der PEN-Objektträger

Protokoll: PET-Objektträger-Färbung in Kresylviolett-Eosin-Lösung (Sutherland et al., 2018)

Reagenzien:

- Kresylviolett-Stammlösung
- Eosin Y-Lösung
- 75 % Ethanol, 95% Ethanol, 100 % Ethanol
- RNase-Inhibitor
- Nuklease-freies H₂O

Zur Fixierung und Anfärbung wurde zuerst eine Kresylviolett-Stammlösung vorbereitet. Hierbei wurde 0,3g Kresylviolettessig in 20ml 75% Ethanol aufgelöst und für 2h durchgerüttelt. Danach wurde die Lösung mit 0.22 µm feinen Filterpapier aufgetrennt und bei 4°C gelagert. Für die Eosin Y-Lösung wurde 75% Ethanol in einer 1:4 Verdünnung vorbereitet und ein RNAase-Inhibitor zugegeben. Zur Dehydrierung der Objektträger wurde 75%, 95% und 100% Ethanol und Nuklease-freies H₂O verwendet. RNase-Inhibitoren (Ribonucleic acid) wurden zu jeder Lösung beigemischt. Um ein Anfeuchten der Objektträger zu vermeiden, wurde sowohl Färbung als auch Dehydrierung in einem Behälter mit Trockeneis durchgeführt. Zuerst wurde der Objektträger für 30s in 75% Ethanol sanft ein- und ausgetaucht. Danach für 10-15s in H₂O getaucht. Dann wurden direkt 300µl 1,5% Kresylviolettessiglösung auf den Objektträger pipettiert und für 45s Raumtemperatur inkubiert. Der Träger wurde erneut in 75% Ethanol für 30s eingetaucht. Daraufhin wurden 200µl Eosin Y-Lösung pipettiert und für 3-5s belassen. Nacheinander wurde mit 75%, 95% und 100% Ethanol für 30s jeweils dehydriert. Unter dem Abzug trockneten die Objektträger für je fünf Minuten.

2.4.3 Dehydrierung der ungefärbten PEN-Objektträger

Für die Dehydrierung der ungefärbten Objektträger wurden mehrere Versuchsprotokolle verwendet:

1) Routine-Dehydrierung

- eiskaltes Aqua bidest: 10s eintauchen
- 70% Ethanol: 2-3s
- 75% Ethanol: 30s
- 80% Ethanol: 10s
- 96% Ethanol: 15s (danach in frisches 96% Ethanol)
- 96% Ethanol: 15s
- 100% Ethanol: 15s (danach in frisches 100% Ethanol)
- 100% Ethanol: 15s
- Trocknen in Silicat Exsikkator für 5min

2) Protokoll Craven (Craven et al., 2002)

- eiskaltes Aqua bidest: 10s eintauchen
- 70% Ethanol: 30s
- 100% Ethanol: 60s
- Xylene: 300s (danach frische Xylene-Lösung)
- Xylene: 300s

3) Protokoll Fa. Zeiss (*ZEISS-DNA-Handling.Pdf*, n.d.)

- eiskaltes Aqua bidest: 5-6x eintauchen
- 70% Ethanol: 5s
- 100% Ethanol: 5s
- Trocknen bei Raumtemperatur

4) Modifiziertes Protokoll der Fa. Zeiss

- eiskaltes Aqua bidest: 10-15x eintauchen
- 70% Ethanol: 10s
- 100% Ethanol: 10s
- Horizontale Trocknung bei Zimmerraumtemperatur: 2-3min
- Aufbewahrung bis Transport in Silikat-Exsikkator

2.5 Lasermikroskopische Dissektion und Katapultierung (LMPC)

Unter dem Mikroskop wurden nun die 12 µm dicken Schnitte betrachtet und das Areal der LC mit der PALM-Software am PC ausgewählt. Pro Objektträger befinden sich ca. 8-10 Gewebeschnitte eines NO. Diese wurden dann nacheinander präzise ausgeschnitten und gleichzeitig in den Deckel des Sammelröhrchens katapultiert. Die Voreinstellungen für den Laser wurden vorab in der Software am PC getroffen. Hierbei konnte man sowohl die Stärke der Dissektion (Cut) als auch des Katapultierens (LPC) wählen. Diese kann numerisch von 0 bis 100 bestimmt werden. Für die zu den Gewebeschnitten passende Voreinstellung wurden mehrere Variationen erprobt:

- 1) Cut: 50 ; LPC: 50
- 2) Cut: 100; LPC: 20
- 3) Cut: 80; LPC: 80
- 4) Cut: 50; LPC: 100
- 5) Cut: 100; LPC: 0
- 6) Cut: 75; LPC: 97

Für die Sammlung der Gewebeproben wurde anfangs der Deckel eines 0,2ml Standard-PCR-Sammelröhrchen der Firma Roth verwendet. Dieser war transparent und farblos. Der Deckelgrund wurde mit Ripa-Pufferlösung gefüllt, um eine Austrocknung der Proben zu verhindern. Im Verlauf der Dissektion wurde der Deckel durch ein 0.2ml PCR-Tube mit einem speziellen Isolationsdeckel mit adhäsiven Eigenschaften (MMI Isolation Cap/Silikon Diffusor) ersetzt. Das PCR-Sammelröhrchen wurde während der Dissektion in einer Aufbewahrungsbox auf Eis gelagert.

2.6 Kolorimetrische Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die spätere Massenspektroskopie wurde vorerst mittels kolorimetrischer Konzentrationsbestimmung überprüft, ob in den vorhandenen Gewebeproben lösliche Proteine detektiert und quantifiziert werden können.

Hierbei wurde das ROTI®Quant universal-Kit der Fa. Carl Roth verwendet, bestehend aus dem Reagenz 1 und 2. Es handelt sich hierbei um eine sogenannte Biuret-Reaktion, die mit einer hochspezifischen kolorimetrischen Enhancer-Reaktion gekoppelt wird ('ROTI®Quant Universal, 500 Assays (Küvetten) | Proteinquantifizierung | Biochemie | Life Science | Carl Roth - Deutschland', n.d.). Die Biuret-Methode dient in der analytischen Chemie zum Nachweis von Proteinen bzw. Peptidbindungen. Biuret bildet in alkalischer Lösung einen Komplex mit zweiwertigen Kupferionen, der sich dunkelviolett färbt und photometrisch bei 546nm nachgewiesen werden kann. Diese Eigenschaften macht sich der ROTI®Quant universal-Test zu Nutzen. Es findet ähnlich eine Komplexbildung mit Kupferionen statt, die aber zu einwertigen Ionen reduziert werden. Die Biuretkomplexe im Test weisen eine schwach bläuliche Färbung auf, deren Intensität proportional zur Anzahl an den beteiligten Peptidbindungen sind. Zur Verstärkung der kolorimetrischen Reaktion erfolgt die Chelatierung der Kupferionen mit PCA, einem Äquivalent der BCA (Bicinchoninsäure). Der resultierende Komplex weist eine grün-bläuliche Verfärbung auf. Diese entwickelt sich bei Raumtemperatur langsam und kann durch Erwärmung beschleunigt werden. Die Proteinmengen in den zu untersuchenden Proben wurden mit einer Verdünnungsreihe eines Proteinstandards bekannter Konzentration (Grafik 7) verglichen.

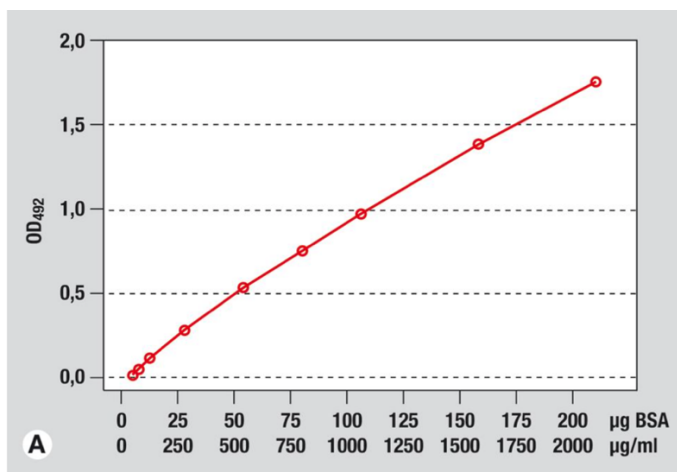


Abbildung 7: ROTI®Quant universal Standard-Kurve mit BSA (bovines Serumalbumin)
Leerwert korrigiert. Messung von je 100 µl Proteinlösung.

Als Stocklösung wurde BSA (bovines Serumalbumin; 2mg/dl) verwendet. Dieses kann in Aliquots eingefroren und bei -20 °C aufbewahrt werden. So wurde gewährleistet, wie vom Hersteller empfohlen, dass für die kolorimetrische Farbmessung ein frisch verdünnter Protein-Standard verwendet werden konnte.

| Verdünnungsreihe des BSA-Standards | | | |
|---|----------------------|---------------------|------------------------------|
| Lösung | Endkonz. BSA (µg/ml) | Vol. Verdünn.puffer | Vol. und Herkunft BSA |
| A | 2000 | 0 | 400µl Stocklösung(2.0 mg/ml) |
| B | 1500 | 125 | 375µl Stocklösung(2.0 mg/ml) |
| C | 1000 | 325 | 325µl Stocklösung(2.0 mg/ml) |
| D | 750 | 325 | 325µl Lösung B |
| E | 500 | 325 | 325µl Lösung C |
| F | 250 | 325 | 325µl Lösung E |
| G | 125 | 325 | 325µl Lösung F |
| H | 50 | 450 | 300µl Lösung G |
| I | 25 | 400 | 100µl Lösung G |
| K | 5 | 400 | 100µl Lösung I |
| Leerwert | 0 | 400 | 0 |

Tabelle 10: Verdünnungsreihe des BSA-Standards

Von den Proben wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt, um eine Messung im linear quantifizierbaren Bereich zu gewährleisten. Die benötigte Arbeitslösung wurde mit folgender Formel abgeschätzt: Anzahl der Proteinstandard-Verdünnungen, Leerwert, Anzahl zu messenden Proben. In den folgenden Untersuchungsreihen wurde folgendes Schema verwendet:

11 Standard-Verdünnungen+2 Leerwerte+2 Proben = 17

Reagenz 1: Reagenz 2 = 15: 1

Volumenverhältnis Probe: Arbeitslösung = 1: 10

Danach wurde jeweils 1,5µl der Standards, Proben und Leerwerte in saubere Teströhrchen pipettiert und 10µl der Arbeitslösung hinzugegeben. Anschließend wurde durch mehrmaliges Invertieren vermischt und bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abkühlen auf Raumtemperatur gestoppt. Hierbei sollte beachtet werden, dass die Farbentwicklung

weiterläuft. Die photometrische Messung wurde innerhalb von 15 Minuten in den Untersuchungsreihen durchgeführt. Der Photometer wurde bei 503nm Wellenlänge und Messung von reinem Wasser auf 0 eingestellt. Danach bestimmte man für je 2 μ l des Standards, der Proben und Leerwerte die Wellenlänge.

2.7 Massenspektrometrische Proteomanalyse (LC-MS/MS)

Durch die Erkenntnis des Proteoms, ist es möglich, einen Einblick in die Organisation, posttranslationale Modifikation und Expression von Proteinen zu erhalten. Dieses kann auf zellulärer Ebene variieren und von Faktoren, wie Stress oder Schädigung, abhängig sein (Liebler, 2002). Die Proteomanalyse und deren Techniken haben sich in den letzten Jahrzehnten immer weiterentwickelt und es stehen nun verschiedene Methoden für die Untersuchung der Gesamtheit aller Proteine in einer Zelle zur Verfügung (Pérez-Llarena & Bou, 2016). Bevor die Massenspektrometrie zum Einsatz kommt, müssen die zu untersuchenden Proteine in ihre Einzelbestandteile mittels Flüssigkeitschromatographie (LC) aufgetrennt werden. Die zu analysierende Probe liegt hierbei in gelöster Form vor und wird mittels Hochdrucks über eine mobile Phase zur Chromatographiesäule befördert und dann Richtung eines optischen Detektors. Dieser misst die fluoreszierende Strahlung der Proteinlösung. Die mobile Phase ist ein Gemisch aus verschiedenen organischen bzw. anorganischen Lösungsmitteln, die unterschiedlich mit der Probe bzw. der stationären Phase interagieren können. Je nach Beschaffenheit des Proteingemisches wandert dieses kontinuierlich schneller mit der mobilen Einheit durch die Säule hindurch, bzw. interagiert stärker mit dieser und fließt somit langsamer entlang des Konzentrationsgradienten. Der zeitliche Verlauf bzw. die Verweildauer auf der Säule wird gegen die Signalintensität des Detektors aufgetragen und ändert sich proportional zur Probenkonzentration ('HPLC', n.d.). Nach der chromatographischen Auftrennung werden die in Lösung vorliegenden Proteinkonzentrationen in Ionen mittels Massenspektrometers in Kationen bzw. Anionen überführt. Nach Überführung ins Hochvakuum, wird deren Masse und Ladungsverhältnis mittels eines Massenanalysators bestimmt. Durch Anlegen einer Spannung können die geladenen Proteine den Analysator passieren und an einem Detektor aufgezeichnet werden. Dadurch ist eine äußerst spezifische Bestimmung der Proben möglich, was wiederum die Sensibilität der Methode erhöht und eine niedrigere Nachweisgrenze erforderlich macht.

Nachdem sich in der kolorimetrischen Proteinkonzentrationsbestimmung eine angemessene Menge an Protein gezeigt hatte, wurden die Proben zur weiteren quantitativen und qualitativen Analyse (LC-MS/MS) im Institut für funktionelle Genomforschung massenspektrometrisch untersucht. Diese wurden für die spätere Proteomanalyse lysiert und die enthaltenen Proteine extrahiert. Hierbei wurde das Bioruptor®-System von Diagenode verwendet, welches sowohl Zersetzung als auch Homogenisierung in einem Schritt durchführt und somit qualitativ hochwertiges Protein zur weiteren Untersuchung liefert. Danach wurden die Proteine für die spätere

Analyse vorbereitet. Es wurde hierbei das Protokoll „GASP-gel assisted sample preparation“ (Fischer & Kessler, 2015) benutzt:

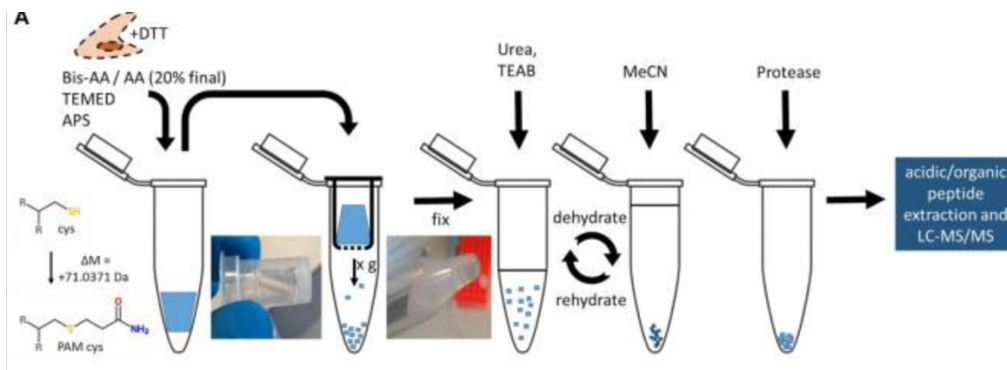


Abbildung 8: GASP (Fischer & Kessler, 2015):

Nach Zugabe von Dithiothreitol (DTT) zur Reduktion von Disulfidbrücken, werden die Analyte mit Bisacrylamid-Lösung versetzt, wobei es zur Umwandlung von Cysteinresten zu Propionamid kommt. Danach wird N-N-N-N-Tetramethylethylendiamen (TEMED) und Ammoniumperulfat zur Verstärkung der Polymerisation hinzugegeben. Die entstandenen Gele werden in kleine Stücke zerkleinert und fixiert. Nach Zugabe von Urea werden diese getrocknet und mit Proteaseinhibitoren zur Konservierung versetzt (Fischer & Kessler, 2015). Danach erfolgt die oben beschriebene Flüssigkeitschromatographie mit der darauffolgenden massenspektrometrischen Analyse (LC-MS).

3. Ergebnisse

3.1 PCR

Zur Bestimmung des Genotyps der verwendeten GFAP^{tm1Mes}-Mauslinie sollte ein PCR-Reaktionsansatz etabliert werden. Mit den verwendeten Primern wurden die Banden für den Wildtyp (WT) bei 400 Basenpaaren (Bp), den GFAP-defizienten Typ bei 180 Bp erwartet. Heterozygote Tiere sollten beide Banden aufweisen.

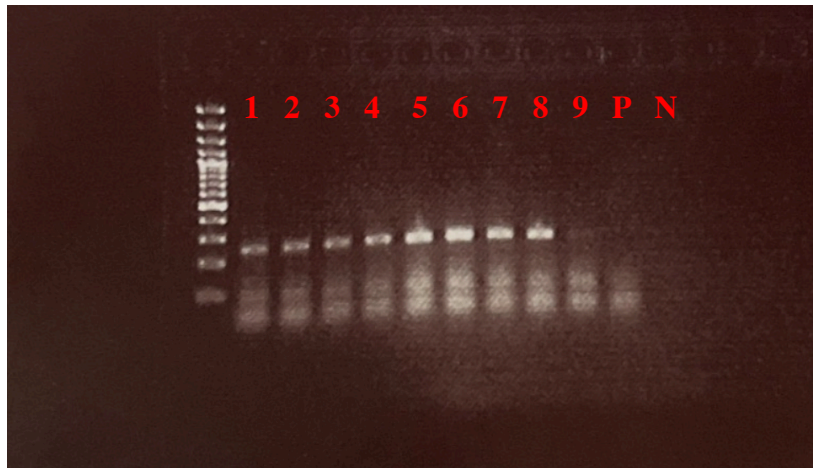


Abbildung 9: PCR (Standard) zum Nachweis des Genotyps mit kombinierten Primern
Von links nach rechts: Proben 1-8. Positivkontrolle: 9. Negativkontrolle: 10

Bei Verwendung des Standards (Tabelle 7) zeigte sich, dass das Primer-Annealing misslang (Abbildung 9). Man erkennt dies an den zusätzlichen Banden unterhalb der Skalierung, den so genannten „Primer Wölkchen“. Dies war auch bei wiederholten Versuchen der Fall, sodass ein Umstieg auf einen anderen Reaktionsansatz notwendig war.

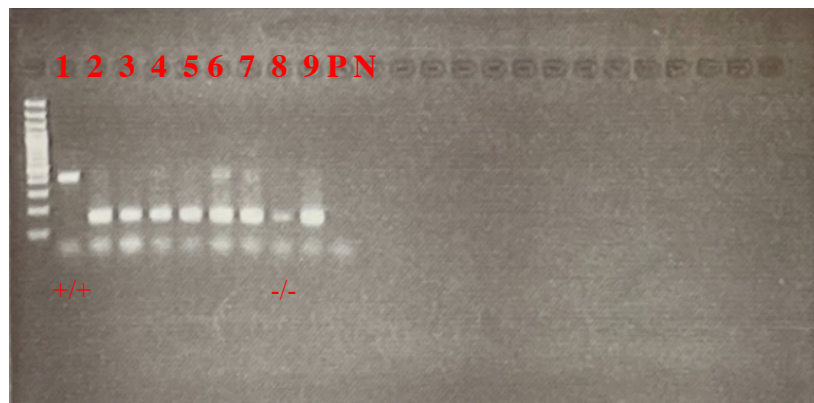


Abbildung 10: PCR (Jackson-Labs) zum Nachweis des Genotyps mit kombinierten Primern.
 Von links nach rechts: Proben 1-8. Positivkontrolle: 9. Negativkontrolle: 10

Als Alternative wurde der von der Firma Jackson-Labs für die Mauslinie GFAP^{tm1Mes}-Mauslinie empfohlene Ansatz (Tabelle 8) durchgeführt. Dieser lieferte ungenaue Ergebnisse, zeigt aber erste deutliche Besserungen in der Primerreaktion. Leichte Wechselwirkungen waren noch in den einzelnen Proben bzw. in der Positivkontrolle (Abbildung 10) zu erkennen, aber erste eindeutige Banden konnten detektiert werden. So war auf Position 1 ein Wildtyp (++) und auf 8 ein GFAP-defizienter Typ (--) zu erkennen. Die Positionen 2-5 waren noch nicht eindeutig zu verifizieren, da sie sowohl defizient für GFAP als auch heterozygot (+/-) sein könnten. Zudem war bei der Positivkontrolle keine Bande erkennbar.

Aufgrund noch vorhandener Probleme wurde das empfohlene Protokoll modifiziert (Tabelle 9). Die Menge des Primers oIMR0356, der sowohl Bestandteil des Primerpaares für den Wildtyp, als auch für den GFAP-defizienten Maustyp ist, wurde etwas erhöht, weil wir uns davon eine ausreichende Annealing-Reaktion versprochen.

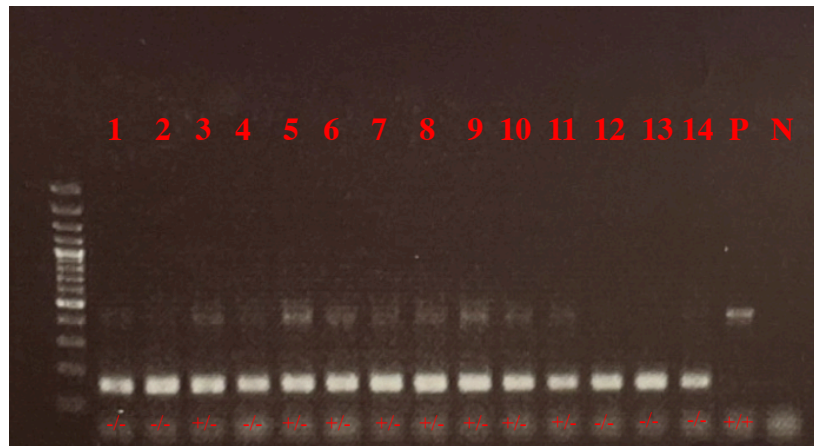


Abbildung 11: PCR modifiziert zum Genotypnachweis mit kombinierten Primern.
Von links nach rechts: Proben 1-14. Positivkontrolle: 15. Negativkontrolle: 16

Tatsächlich lieferte der modifizierte Reaktionsansatz (Tabelle 9) verwertbare Ergebnisse (Abbildung 11). Die Banden in den Proben waren separiert und wiesen keine Wechselwirkungen, wie in den Ansätzen zuvor, auf.

3.2 Färbung der PEN-Objektträger

Nun wurde als nächster Schritt ein Protokoll (2.4.2) zur Färbung der Objektträger entwickelt. Dazu wurde eine Anfärbung mit einer Kresylviolett-Eosin-Lösung durchgeführt. Dabei zeigte sich allerdings ein Gewebeverlust, der nach dem Trocknen noch deutlicher zu erkennen war. Die Schnittpräparate wiesen sowohl auf makroskopischer als auch unter dem Lichtmikroskop sichtbare Risse und Lücken auf. Bei einem erneuten Versuch wurde Eisessigsäure zur Kresylviolett-Färbung hinzugegeben, was den Gewebeverlust reduzierte. Trotz alledem waren nach der Dehydrierung mit dem bloßen Auge immer noch leichte Perforationen auf dem Objektträger zu erkennen.

3.3 Dehydrierung der ungefärbten PEN-Objektträger

Weitere Versuche der Anfärbung wurden unterlassen (3.2) und ein Protokoll ohne Färbemethoden entwickelt.

Dazu wurde zunächst die Routine-Dehydrierungsreihe (2.4.3.1) durchgeführt:

Während dem Eintauchen in Aqua bidest fiel auf, dass sich Gewebe vom Objektträger löste. Außerdem bildeten sich leichte Wassertropfen. Die Alkoholreihe verlief dann ohne besondere Auffälligkeiten. Der Wechsel in frische Ethanol Lösung gleichen Gehaltes reduzierte die Verunreinigung mit bereits gelösten Einbettmedium (OCT Compound). Die Wassertropfen, die sich vermutlich zwischen Glasträger und PEN-Membran befanden, waren auch am Ende der Versuchsreihe weiterhin vorhanden. Das abschließende Trocknen der Objektträger im Silikat-Exsikkator wies keine Restspuren von Flüssigkeit auf der Oberfläche auf. Bei erneuter Wiederholung zeigten sich wiederum nach dem Eintauchen in Aqua bidest leichte Wassertropfen. Nach Reduktion der Eintauchzeit waren diese zwar in geringerer Anzahl auf dem Objektträger vorhanden, jedoch ließ sich dadurch nicht das Einbettmedium vollständig auswaschen.

Als nächstes wurde die Dehydrierungsreihe aus einem LCM-spezifischen Paper von Craven et al. (2.4.3.2) durchgeführt, welches ursprünglich für gefärbte Objektträger seine Verwendung fand. Die Objektträger wurden diesmal für die angegebene Zeit unter leichter Auf- und Abwärtsbewegung in Aqua bidest getaucht. Es bildeten sich keine Wassertropfen. Das Einbettmedium ließ sich mit dieser Methode frei von Resten auswaschen. Die angegebene Zeit von 10s war jedoch etwas zu lange, da sich bei manchen Objektträgern minimal Material mit löste. Während der Verwendung von Xylol wurde bereits ein makroskopischer Gewebeverlust

vermutet. In der anschließenden mikroskopischen Kontrolle zeigten sich tatsächlich geschrumpfte bzw. zerstörte Sehnervareale. Auch in einer erneuten Wiederholung der Methode mit einer Reduzierung der Einlegezeit in Xylol, konnte der Gewebeverlust nicht reduziert bzw. aufgehoben werden.

Daher wurde das Protokoll der Fa. Zeiss (2.4.3.3) durchgeführt, das speziell für die von uns verwendeten PEN-Membranobjektträger empfohlen wurde. Unter Sichtkontrolle tauchte man die Träger in eiskaltes Aqua bidest, bis sämtliches Einbettmedium verschwunden war. Dies variierte je nach Gewebeareal zwischen 8-15-mal. Empfohlen wurde hier 5-6-mal, was bei Durchführung gezeigt hat, dass diese Anzahl eindeutig zu kurz war und Reste hinterließ. Es entstanden keine Wassertropfen. Die Dehydrierungszeit in Ethanol war etwas kurz. Die Objektträger waren nach der abschließenden horizontalen Trocknung und Aufbewahrung im Silikat-Exsikkator noch leicht feucht.

Aufgrund der positiven Ergebnisse in diesem Protokoll, modifizierte ich dieses (2.4.3.4) und führte es erneut durch:

Unter Sichtkontrolle wurden die Objektträger erneut in eiskaltem Aqua bidest eingetaucht und unter Auf- und Abwärtsbewegungen das Einbettmedium ausgewaschen. 10-15-maliges Eintauchen genügte in den meisten Fällen. Wurde die Anzahl überschritten, löste sich erneut wieder Gewebe. Die Tauchzeit in Ethanol wurde auf 10s verlängert, was hierbei bewirkte, dass die Objektträger trockener waren. Somit konnte auch bei einer erneuten Durchführung des Protokolls kein Gewebeverlust bzw. Wassertropfen unter der PEN-Membran detektiert werden.

3.4 Lasermikroskopische Dissektion und Katapultierung (LMCP)

Zusätzlich nach der Dehydrierung sollte die lasermikroskopische Dissektion rasch erfolgen, um einen Proteinverlust zu vermeiden.

Nun musste das Problem gelöst werden, homogenes Gewebe unter lichtmikroskopischer Sicht zu gewinnen und kontaktlos in ein Sammelröhrchen zu befördern. Dabei sollten die Parameter erfüllt werden, welche das Ziel ermöglichen, die selektierten Areale möglichst gewebeschonend und zeitsparend auszuschneiden. Somit sollte die Qualität des Lasers das Gewebe durchtrennen, ohne große Verdampfspuren zu hinterlassen. Diese wären ein Hinweis dafür, dass die Stärke des Lasers zu hoch und keine exakte Dissektion mehr möglich wäre. Das Katapultieren sollte das gesamte Material direkt in das Auffangröhrchen befördern. Somit musste hierbei auf eine Einstellung geachtet werden, welche die relativ schwere GL in den Sammelbehälter katapultieren könnte.

Letztlich sollte das Programm so modifiziert werden, dass die Areale möglichst exakt ausgeschnitten und in das Auffangröhrchen katapultiert werden könnten. Dies sollte zeitsparend erfolgen, um einen Proteinerhalt zu gewährleisten. Aus diesen Vorüberlegungen heraus, testete ich folgende Einstellungen:

1) Cut: 50; LPC: 50

Bei dieser Einstellung schnitt der Laser sehr gewebeschonend die Areale. Die Funktion musste mehrere Male wiederholt werden, damit das Gewebe von dem Objektträger gelöst werden konnte. Das Katapultieren misslang, da das Gewebe für die vorab gewählte Einstellung zu schwer war.

2) Cut: 100; LPC: 20

Diese Einstellung wählte ich zu hoch. Die Stärke des Lasers hinterließ leichte Verdampfspuren auf der PEN-Membran. Zwar musste der Cut nicht wiederholt werden, jedoch konnte ein gewebeschonendes Verfahren nicht mehr gewährleistet werden.

3) Cut: 80; LPC: 80

Bei dieser Einstellung wurde das selektierte Areal gewebeschonend ausgeschnitten. Dies musste in den meisten Fällen nicht wiederholt werden. Variierend nach Gewebedichte wurde zur Sicherheit dieser Schritt einmal wiederholt. Verdampfspuren waren nicht zu detektieren.

Das Katapultieren war noch nicht ganz zufriedenstellend, da oftmals das Gewebe nicht das Auffangröhrchen erreichte und an anderer Stelle des Objektträgers aufzufinden war.

4) Cut: 50; LPC: 100

Auch hier schnitt der Laser das Areal gewebeschonend unter mehrmaliger Wiederholung aus. Das Katapultieren war in allen Fällen aufs erste Mal möglich. Die Voreinstellung dafür war mit 100 die Maximaleinstellung.

5) Cut: 100; LPC: 0

Diese Einstellung diene zur Vergewisserung, ob das alleinige Ausschneiden ausreichen würde, um das Gewebe in das Röhrchen zu transportieren oder ob dazu tatsächlich ein Wert für das LPC gewählt werden muss. Es zeigte sich, dass das Gewebe zwar losgelöst werden konnte, aber kein Transport in das Auffangröhrchen möglich war.

6) Cut: 75; LPC: 97

Hierbei waren die Ergebnisse zufriedenstellend. Der Laser schnitt gewebeschonend die Areale aufs erste Mal aus und das Katapultieren gelang direkt in das Auffangröhrchen. Für die weiteren Methoden wurde diese Einstellung beibehalten.

Das Auffangröhrchen war anfänglich ein Deckel gefüllt mit einer Pufferlösung. Es zeigte sich nach den ersten Testreihen, dass trotz modifizierter Einstellung die dissektierten Gewebeprobe nicht mehr das Auffangröhrchen erreichten. Dies lag wahrscheinlich daran, dass der Deckel des Auffangröhrchens seine Kapazität überschritten hatte. Es musste der Deckel gewechselt werden. Dies war etwas umständlich und zeitaufwändig. Unter Sichtkontrolle war es teilweise schwer zu erkennen, ob jede Gewebeprobe im Deckel enthalten ist.

Aus diesen Gründen erfolgte der Wechsel auf einen Auffangdeckel mit adhäsiven Eigenschaften. Dieser bot den Vorteil, dass durch Näherung an das Objektiv kontrolliert werden konnte, ob die Gewebeprobe aufgefangen werden konnte. Außerdem konnten Proben, die trotz alledem auf den Objektträger versprengt wurden, durch die adhäsiven Eigenschaften wieder eingesammelt werden. Der Wechsel auf diesen Typ wurde für den weiteren Verlauf beibehalten.

3.5 Kolorimetrische Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die spätere Proteomanalyse musste nun überprüft werden, ob sich genügend Protein in den Proben befand. Um die Analyse durchführen zu können ist eine Proteinkonzentration von 8-10 µg/ml nötig.

Die Proben für die kolorimetrische Konzentrationsbestimmung bestanden einheitlich aus Wildtyp- und GFAP-defizienten-Material. Jede Probe beinhaltete Dissektionsmaterial aus vier Augen, somit mindestens 24 Gefrierschnitte.

Als Vergleichskurve eines Standards bekannter Konzentration wurde die Verdünnungsreihe von ROTI®Quant (Tabelle 10) mit BSA (bovines Serumalbumin) verwendet.

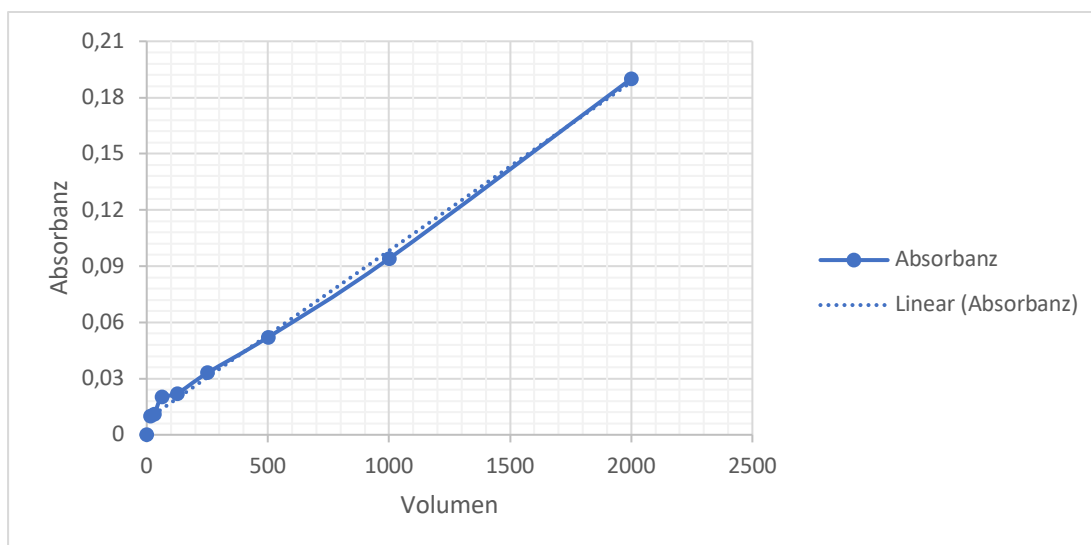


Abbildung 12: Vergleichskurve Verdünnungsreihe BSA

R-Quadrat Wert: 0.998

Die Vergleichskurve (Abbildung 12) verläuft linear und weist einen hohen R-Quadrat Wert auf. Somit liegen 99,8% der gemessenen Werte auf der Vergleichskurve.

| Nummer | Probe | Einheit | Konzentration |
|--------|------------------|---------|---------------|
| 1 | GFAPWT1 | µg/ml | 56,99 |
| 2 | GFAPWT2 | µg/ml | 31,34 |
| 3 | GFAPWT3 | µg/ml | 46,84 |
| 4 | GFAP-defizient 1 | µg/ml | 115,98 |
| 5 | GFAP-defizient 2 | µg/ml | 123,45 |

Tabelle 11: gemessene Proteinkonzentrationen in 0.1ml Pufferlösung

Nr. 1-3: GFAP-Wildtyp; Nr. 4-5: GFAP-defizient

Die gemessenen Werte (Tabelle 11) wirken auf den ersten Blick realistisch. Die Zielkonzentration von mindestens 8-10 µg/µl an Protein wurde sowohl für den Wildtyp als auch für den GFAP-defizienten Typ erreicht. In den Proben eins bis drei variiert die Konzentration in einem vertretbaren Bereich. Die Proben vier bis fünf weisen im Gegensatz zu den anderen Proben eine relativ hohe Menge an Protein auf.

Die Messreihe wurde noch einmal wiederholt:

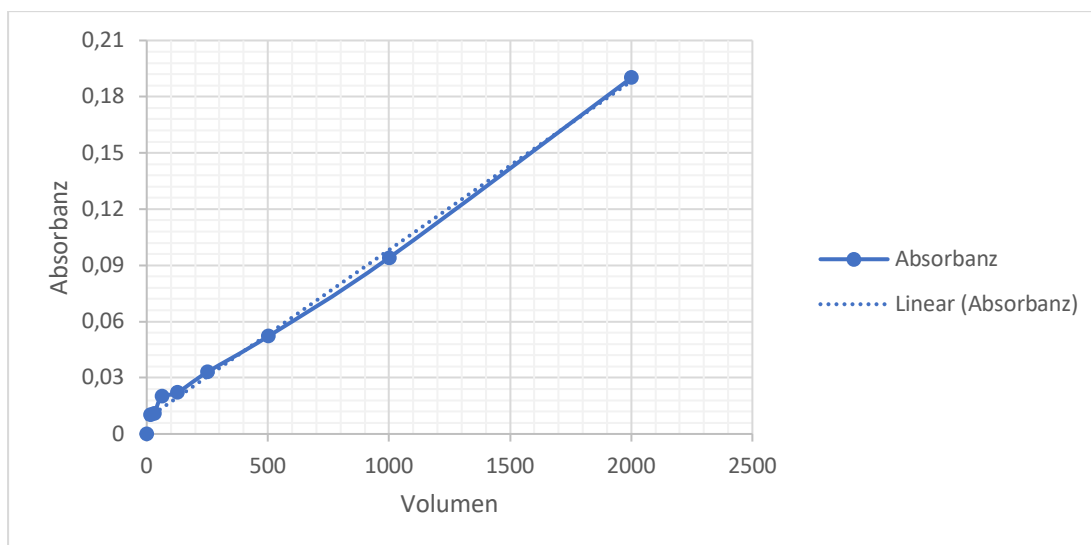


Abbildung 13: Vergleichskurve Verdünnungsreihe BSA

R-Quadrat Wert: 0.998

Bei Betrachtung zeigte sich, dass 99,8% der Werte erneut auf der Kurve liegen (Abbildung 13). Die Annäherung an 100% ist gelungen.

| Nummer | Probe | Einheit | Konzentration |
|--------|------------------|---------|---------------|
| 1 | GFAPWT1 | µg/ml | 41,99 |
| 2 | GFAPWT2 | µg/ml | 38,34 |
| 3 | GFAPWT3 | µg/ml | 46,84 |
| 4 | GFAP-defizient 1 | µg/ml | 55,98 |
| 5 | GFAP-defizient 2 | µg/ml | 48,45 |

Tabelle 12: gemessene Proteinkonzentrationen in 0.1ml Pufferlösung

Nr. 1-3: GFAP-Wildtyp; Nr. 4-5: GFAP-defizient

In den Proben (Tabelle 12) wurden nun Proteinkonzentrationen gemessen, die für die folgende Proteomanalyse ausreichend erschienen. Allerdings zeigte dieses Ergebnis, dass mindestens die Augen von je 4 Mäusen pro Genotyp benötigt werden, um die erforderliche Mindestkonzentration für die spätere Proteomikanalyse zu erhalten. Weitere durchgeführte Versuchsreihen lieferten ähnliche Ergebnisse. Somit konnte der nächste Schritt der Untersuchung begonnen werden.

3.6 Massenspektrometrische Proteomanalyse (LC-MS/MS)

Folgende Proben (Tabelle 13) wurden nun von Frau Dr. Katharina Limm, ehemalige wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Genomforschung (Biopark I, Universität Regensburg) für die weitere Proteomanalyse verwendet. Jede dieser bestand aus Dissektionsmaterial von 4 Augen, somit mindestens 24 Gewebeschnittpräparaten. Als Mindestkonzentration an Protein konnte eine Menge von 8-10 µg/ml gesammelt werden. Somit wurden die Proben der letzten kolorimetrischen Bestimmung verwendet:

| Nummer | Probe | Einheit | Konzentration | Gesamtproteinmenge/0.1ml |
|----------|-------------------------|--------------|---------------|--------------------------|
| 1 | GFAPWT1 | µg/ml | 41,99 | 4,19 |
| 2 | GFAPWT2 | µg/ml | 38,34 | 3,83 |
| 3 | GFAP-defizient 1 | µg/ml | 55,98 | 5,59 |
| 4 | GFAP-defizient 2 | µg/ml | 48,45 | 4,84 |

Tabelle 13: Verwendete Proben für die LC-MS

Nr. 1-2: GFAP-Wildtyp; Nr. 3-4: GFAP-defizient

Frau Dr. Limm führte noch einmal eine Konzentrationsbestimmung durch und kam auf ähnliche Messwerte.

Zuerst wurde die Wildtyp- (Nummer eins und zwei) und dann die GFAP-defiziente-Probe (Nummer drei und vier) analysiert. Für den Testlauf wurde ein Drittel der Probe untersucht. Hierbei konnten knapp 300 Proteine analysiert werden. Es zeigte sich, dass GFAP im WT, wie angenommen, nachweisbar ist und es im GFAP-defizienten Typ fehlt. Des Weiteren fanden sich eine vielfältige Mischung aus verschiedenen Proteinen. Auffällig war hierbei eine starke Veränderung in der Proteinmenge von Proteinen, die sich in folgende Gruppen einordnen lassen:

- Transportenzyme (z.B.: Na(+)/K(+) ATPase, ADP/ATP translocase 1)
- Strukturproteine (z.B.: Caveolin, Collagen, Claudin, Clathrin, Fibrillin, Vimentin, F-Actin)
- Stoffwechsellzyme (z.B.: Glutamat-Dehydrogenase, Dihydropyrimidinase, Hexokinase 1)

Dies sind typische Bestandteile bzw. Enzyme des Zellkerns und Cytoplasmas auf molekularer Ebene.

| Protein | Lokalisation | Xfold KN/WT |
|---|-----------------|-------------|
| Na(+)/K(+) ATPase alpha-1 Untereinheit | Sarkolemm | 1.6 |
| ADP/ATP-translocase 1 | Mitochondrien | 1.3 |
| Caveolin-1 | Golgi-Apparat | 2.2 |
| F-Actin-capping Protein Untereinheit beta | Zytoskelett | 917.0 |
| Claudin 11 | Tight junctions | 1.6 |
| Collagen-alpha-1(III) | EZM | 231.0 |
| Clathrin | Zytoplasma | 1.6 |
| Fibrillin-1 | EZM | 3.1 |
| Vimentin | Zytoplasma | 0.7 |
| Glutamat-Dehydrogenase-1 | Mitochondrien | 1.7 |
| Dihydropyrimidinase | Zytoplasma | 0.4 |
| Hexokinase-1 | Caveolae | 1.1 |
| GFAP | Astrozyten | 2295.0 |

Tabelle 14: Auszug der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) zu Wildtyp (WT)

Grün markiert: im GFAP-defizienten Typ vermehrt exprimiert; rot markiert: im GFAP-defizienten Typ verringert exprimiert; gelb markiert: an der Grenze zu nicht nachweisbar

In Tabelle 14 sind auszugsweise einige analysierte Proteine im Vergleich zwischen GFAP-defizienten (KN) und Wildtyp-Tieren, einschließlich dem Hauptaugenmerk auf GFAP, zu sehen. Einige davon zeigten für mich nennenswerte Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen, weswegen sie im Folgenden genauer miteinander verglichen werden. Die komplette Übersicht über alle analysierten Proteine findet sich am Ende dieses Abschnitts. Die Werte wurden jeweils aus zwei Proben jedes Typs gemittelt. Außerdem wurde hier noch die Lokalisation und die prozentuale Veränderung zwischen dem GFAP-defizienten (KN) und dem Wildtyp-Modell (WT) zum Logarithmus (,X-Fold‘) aufgelistet. X-Fold (log) ist ein typisches Messverfahren in der bioinformatischen Analyse, um einen Anstieg bzw. Abfall untersuchter Proteine darzustellen. Das Institut für Genomforschung markierte für mich die Proteine, welche im GFAP-defizienten Typ hoch- bzw. herunterreguliert waren (siehe Tabelle 14). X-Fold-Werte von 2 oder mehr bedeuteten demnach eine verringerte Expression des Proteins beim GFAP-defizienten Typ im Vergleich zum Wildtyp (siehe Tabelle 14, rot markiert). X-Fold Werte kleiner 1 (siehe Tabelle 14, grün markiert) bedeuten ein erhöhtes Vorhandensein des Proteins im GFAP-defizienten Tier. Die gelb markierten Fold-Change-Werte (siehe Tabelle 14) waren bei

den GFAP-defizienten Tieren an der Grenze der Nachweisbarkeit. Bei den Strukturproteinen des EZM ist eine Reduktion von Fibrillin-1 (siehe Tabelle 14, rot markiert) erkennbar, Collagen-alpha-1(III) ist im Vergleich zur Wildtyp-Probe in sehr geringen Mengen vorhanden (siehe Tabelle 14, rot markiert). Vimentin wurde im GFAP-defizienten Typ in erhöhten Mengen (siehe Tabelle 14, grün markiert) nachgewiesen. Caveolin-1 war beim GFAP-defizienten Typ in verringerten Mengen (siehe Tabelle 14, rot markiert) vorhanden, während die F-Actin-Untereinheit beta im Zytoskelett der GFAP-defizienten glialen Lamina nur in extrem geringen Mengen nachweisbar war (siehe Tabelle 14, rot markiert). GFAP war wie bereits vorher bei der Auswahl der Tiermodelle angenommen, beim GFAP-defizienten Typ nicht mehr nachweisbar (siehe Tabelle 14, gelb markiert).

Tabelle 15: Komplettübersicht der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) zu Wildtyp (WT)

| Protein names | Xfold KN/WT |
|--|-------------|
| 14-3-3 protein beta/alpha (Protein kinase C inhibitor protein 1) (KCIP-1) | 1,1 |
| 14-3-3 protein epsilon (14-3-3E) | 1,0 |
| 14-3-3 protein eta | 0,9 |
| 14-3-3 protein gamma [Cleaved into: 14-3-3 protein gamma, N-terminally processed] | 1,1 |
| 14-3-3 protein sigma (Stratifin) | 10,0 |
| 14-3-3 protein theta (14-3-3 protein tau) | 0,7 |
| 14-3-3 protein zeta/delta (Protein kinase C inhibitor protein 1) (KCIP-1) (SEZ-2) | 0,8 |
| 4F2 cell-surface antigen heavy chain (4F2hc) (Solute carrier family 3 member 2) (CD antigen CD98) | 0,4 |
| Aspartate aminotransferase, mitochondrial (mAspAT) (EC 2.6.1.1) (EC 2.6.1.7) (Fatty acid-binding protein) (FABP-1) | 1,6 |
| Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase) (EC 4.2.1.3) (Citrate hydro-lyase) | 1,2 |
| Alpha-actinin-1 (Alpha-actinin cytoskeletal isoform) (F-actin cross-linking protein) (Non-muscle alpha-actinin-1) | 0,6 |
| Alpha-actinin-4 (Non-muscle alpha-actinin 4) | 1,5 |
| Alpha-adducin (Erythrocyte adducin subunit alpha) | 0,7 |
| Beta-adducin (Add97) (Erythrocyte adducin subunit beta) | 0,6 |
| Gamma-adducin (Adducin-like protein 70) | 0,7 |
| ADP/ATP translocase 1 (ADP,ATP carrier protein 1) (ADP,ATP carrier protein, heart/skeletal muscle isoform T1) | 1,3 |
| ADP/ATP translocase 2 (ADP,ATP carrier protein 2) | 1,9 |
| Alpha-internexin (Alpha-Inx) (66 kDa neurofilament protein) (NF-66) (Neurofilament-66) | 1,8 |
| A-kinase anchor protein 12 (AKAP-12) (Germ cell lineage protein gercelin) (Src-suppressed C kinase substrate) (SSeCKS) | 0,9 |
| Albumin | 2,8 |
| Fructose-bisphosphate aldolase A (EC 4.1.2.13) (Aldolase 1) (Muscle-type aldolase) | 2,7 |
| Ankyrin-2 (ANK-2) (Ankyrin-B) (Brain ankyrin) | 0,5 |
| Annexin A11 (Annexin XI) (Annexin-11) (Calcyclin-associated annexin 50) (CAP-50) | 1,1 |
| Annexin A1 (Annexin I) (Annexin-1) (Calpactin II) (Calpactin-2) | 9,3 |
| Annexin A2 (Annexin II) (Annexin-2) (Calpactin I heavy chain) (Calpactin-I heavy chain) | 1,6 |
| Annexin A3 (35-alpha calcimedlin) (Annexin III) (Annexin-3) (Lipocortin III) (Placental anticoagulant protein III) (PAP-III) | 1,1 |
| Annexin A4 (Annexin IV) (Annexin-4) | 2,1 |

| | |
|--|-------|
| Annexin A5 (Anchoring CII) | 0,8 |
| Annexin A6 (67 kDa callectrin) (Annexin VI) (Annexin-6) (Calphobindin-II) (CPB-II) (Chromobindin-20) | 1,0 |
| Annexin A8 (Annexin VIII) (Annexin-8) | 9,2 |
| Arginase-1 (EC 3.5.3.1) (Liver-type arginase) (Type I arginase) | 0,4 |
| Arf-GAP with SH3 domain, ANK repeat and PH domain-containing protein 2 | 0,2 |
| Asporin (Periodontal ligament-associated protein 1) (PLAP-1) | 1,6 |
| Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 (Na(+)/K(+) ATPase alpha-1 subunit) | 1,6 |
| Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2 (Na(+)/K(+) ATPase alpha-2 subunit) | 1,4 |
| Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-3 (Na(+)/K(+) ATPase alpha-3 subunit) | 1,2 |
| Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-1 (Sodium/potassium-dependent ATPase subunit beta-1) | 1,4 |
| Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 (SERCA1) (SR Ca(2+)-ATPase 1) (EC 7.2.2.10) (Calcium pump 1) (Calcium-transporting ATPase sarcoplasmic reticulum type, fast twitch skeletal muscle isoform) (Endoplasmic reticulum class 1/2 Ca(2+) ATPase) | 17,1 |
| ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (ATP synthase F1 subunit alpha) | 1,3 |
| ATP synthase subunit beta, mitochondrial (EC 7.1.2.2) (ATP synthase F1 subunit beta) | 0,9 |
| ATP synthase subunit gamma, mitochondrial (ATP synthase F1 subunit gamma) (F-ATPase gamma subunit) | 1,5 |
| Basigin (Basic immunoglobulin superfamily) (HT7 antigen) (Membrane glycoprotein gp42) (CD antigen CD147) | 1,7 |
| Breast carcinoma-amplified sequence 1 homolog (Novel amplified in breast cancer 1 homolog) | 2,0 |
| Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 (Beta ig-h3) | 1,5 |
| Endoplasmic reticulum chaperone BiP (EC 3.6.4.10) (78 kDa glucose-regulated protein) (GRP-78) (Binding-immunoglobulin protein) (BiP) (Heat shock protein 70 family protein 5) (HSP70 family protein 5) (Heat shock protein family A member 5) (Immunoglobulin heavy chain-binding protein) | 1,4 |
| Cadherin-2 (Neural cadherin) (N-cadherin) (CD antigen CD325) | 0,6 |
| Carbonic anhydrase 2 (EC 4.2.1.1) (Carbonate dehydratase II) (Carbonic anhydrase II) (CA-II) | 0,7 |
| Calreticulin (CRP55) (Calregulin) (Endoplasmic reticulum resident protein 60) (ERp60) (HACBP) | 1,2 |
| Calnexin | 0,4 |
| F-actin-capping protein subunit beta (CapZ beta) | 917,0 |
| Calsequestrin-1 (Calmitine) (Calsequestrin, skeletal muscle isoform) | 2,8 |
| Caveolin-1 | 2,2 |
| Caveolae-associated protein 1 (Cav-p60) (Cavin-1) (Polymerase I and transcript release factor) | 0,9 |
| CD44 antigen (Extracellular matrix receptor III) (ECMR-III) (GP90 lymphocyte homing/adhesion receptor) (HUTCH-I) (Hermes antigen) (Hyaluronate receptor) (Lymphocyte antigen 24) (Ly-24) (Phagocytic glycoprotein 1) (PGP-1) (Phagocytic glycoprotein I) (PGP-I) (CD antigen CD44) | 0,8 |
| CD81 antigen (26 kDa cell surface protein TAPA-1) (Target of the antiproliferative antibody 1) (CD antigen CD81) | 0,6 |
| Corneodesmosin | 0,0 |
| Cell cycle exit and neuronal differentiation protein 1 (BM88 antigen) | 1,0 |
| 60 kDa heat shock protein, mitochondrial (EC 5.6.1.7) (60 kDa chaperonin) (Chaperonin 60) (CPN60) (HSP-65) (Heat shock protein 60) (HSP-60) (Hsp60) (Mitochondrial matrix protein P1) | 0,8 |
| Citrate synthase, mitochondrial (EC 2.3.3.1) (Citrate (Si)-synthase) | 1,2 |
| Claudin-11 (Oligodendrocyte transmembrane protein) (Oligodendrocyte-specific protein) | 1,6 |
| Clathrin heavy chain 1 | 1,0 |
| 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP) (CNPase) (EC 3.1.4.37) | 2,9 |
| Contactin-1 (Neural cell surface protein F3) | 1,3 |
| Contactin-associated protein 1 (Caspr) (Caspr1) (MHDNIV) (NCP1) (Neurexin IV) (Neurexin-4) (Paranodin) | 0,5 |
| Collagen alpha-1(I) chain (Alpha-1 type I collagen) | 4,1 |
| Collagen alpha-2(I) chain (Alpha-2 type I collagen) | 3,0 |

Tabelle 16: Komplettübersicht der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) zu Wildtyp (WT)

Grün markiert: im GFAP-defizienten Typ vermehrt exprimiert; rot markiert: im GFAP-defizienten Typ verringert exprimiert; gelb markiert: an der Grenze zu nicht nachweisbar

| | |
|---|--------|
| Collagen alpha-1(III) chain | 231,1 |
| Collagen alpha-1(VI) chain | 3,3 |
| Collagen alpha-2(VI) chain | 2,6 |
| Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 1, mitochondrial (Cytochrome c oxidase polypeptide IV) (Cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1) (COX IV-1) | 1,4 |
| Alpha-crystallin B chain (Alpha(B)-crystallin) (P23) | 4,4 |
| Cysteine and glycine-rich protein 1 (Cysteine-rich protein 1) (CRP) (CRP1) | 1,8 |
| Choline transporter-like protein 1 (Solute carrier family 44 member 1) (CD antigen CD92) | 2,3 |
| Choline transporter-like protein 2 (Solute carrier family 44 member 2) | 0,5 |
| Catenin beta-1 (Beta-catenin) | 0,9 |
| Gap junction alpha-1 protein (Connexin-43) (Cx43) (Gap junction 43 kDa heart protein) | 0,8 |
| Cytochrome c, somatic | 1,4 |
| Serine/threonine-protein kinase DCLK1 (EC 2.7.11.1) (Doublecortin-like and CAM kinase-like 1) (Doublecortin-like kinase 1) | 0,3 |
| Desmoplakin (DP) | 1,0 |
| Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial (GDH 1) (EC 1.4.1.3) | 1,7 |
| Dihydropteridine reductase (EC 1.5.1.34) (HDHPR) (Quinoid dihydropteridine reductase) | 3,3 |
| Dihydropyrimidinase-related protein 1 (DRP-1) (Collapsin response mediator protein 1) (CRMP-1) (Inactive dihydropyrimidinase) (Unc-33-like phosphoprotein 3) (ULIP-3) | 0,4 |
| Dihydropyrimidinase-related protein 2 (DRP-2) (Unc-33-like phosphoprotein 2) (ULIP-2) | 0,9 |
| Dihydropyrimidinase-related protein 3 (DRP-3) (Unc-33-like phosphoprotein 1) (ULIP-1) | 1,1 |
| Dihydropyrimidinase-related protein 5 (DRP-5) (Collapsin response mediator protein 5) (CRMP-5) | 0,5 |
| Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 (Cytoplasmic dynein heavy chain 1) (Dynein heavy chain, cytosolic) | 0,8 |
| Band 4.1-like protein 2 (Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 2) (Generally expressed protein 4.1) (4.1G) | 0,5 |
| Band 4.1-like protein 3 (4.1B) (Differentially expressed in adenocarcinoma of the lung protein 1) (DAL-1) (DAL1P) (mDAL-1) (Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3) [Cleaved into: Band 4.1-like protein 3, N-terminally processed] | 0,6 |
| Excitatory amino acid transporter 1 (Glial high affinity glutamate transporter) (High-affinity neuronal glutamate transporter) (GluT-1) (Sodium-dependent glutamate/aspartate transporter 1) (GLAST-1) (Solute carrier family 1 member 3) | 0,8 |
| Elongation factor 1-alpha 1 (EF-1-alpha-1) (Elongation factor Tu) (EF-Tu) (Eukaryotic elongation factor 1 A-1) (eEF1A-1) | 2,0 |
| Alpha-enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (Enolase 1) (Non-neural enolase) (NNE) | 0,9 |
| Endoplasmic reticulum glucose-regulated protein (GRP-94) (Endoplasmic reticulum resident protein 99) (ERp99) (Heat shock protein 90 kDa beta member 1) (Polymorphic tumor rejection antigen 1) (Tumor rejection antigen gp96) | 2,0 |
| Ermin (Juxtandodin) (JN) | 1,7 |
| Extended synaptotagmin-1 (E-Syt1) (Membrane-bound C2 domain-containing protein) | 0,6 |
| Hsc70-interacting protein (Hip) (Protein FAM10A1) (Protein ST13 homolog) | 3,4 |
| Fibulin-5 (FIBL-5) (Developmental arteries and neural crest EGF-like protein) (Dance) | 4,5 |
| Fibrillin-1 [Cleaved into: Asprosin] | 3,1 |
| F-box only protein 2 | 0,7 |
| Filamin-A (FLN-A) (Actin-binding protein 280) (ABP-280) (Alpha-filamin) (Endothelial actin-binding protein) (Filamin-1) (Non-muscle filamin) | 0,6 |
| Filamin-C (FLN-C) (ABP-280-like protein) (ABP-L) (Actin-binding-like protein) (Filamin-2) (Gamma-filamin) | 1,1 |
| Fibromodulin (FM) (Collagen-binding 59 kDa protein) (Keratan sulfate proteoglycan fibromodulin) (KSPG fibromodulin) | 1,0 |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12) (Peptidyl-cysteine S-nitrosylase GAPDH) (EC 2.6.99.-) | 1,8 |
| Glucose-6-phosphate isomerase (GPI) (EC 5.3.1.9) (Autocrine motility factor) (AMF) (Neuroleukin) (NLK) (Phosphoglucose isomerase) (PGI) (Phosphohexose isomerase) (PHI) | 2,2 |
| Rab GDP dissociation inhibitor beta (Rab GDI beta) (GDI-3) (Guanosine diphosphate dissociation inhibitor 2) (GDI-2) | 1,1 |
| Gelsolin (Actin-depolymerizing factor) (ADF) (Brevin) | 6,2 |
| Glial fibrillary acidic protein (GFAP) | 2295,8 |

Tabelle 17: Komplettübersicht der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) zu Wildtyp (WT)

Grün markiert: im GFAP-defizienten Typ vermehrt exprimiert; rot markiert: im GFAP-defizienten Typ verringert exprimiert; gelb markiert: an der Grenze zu nicht nachweisbar

| | |
|--|-----|
| Glutamine synthetase (GS) (EC 6.3.1.2) (Glutamate--ammonia ligase) (Palmitoyltransferase GLUL) (EC 2.3.1.225) | 1,6 |
| Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2 (Adenylate cyclase-inhibiting G alpha protein) | 1,8 |
| Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha | 1,4 |
| Neuronal membrane glycoprotein M6-b (M6b) | 1,0 |
| Stress-70 protein, mitochondrial | 0,4 |
| Gasdermin-A (Gasdermin-1) (Gasdermin-A1) | 1,7 |
| Glutathione S-transferase Mu 1 (EC 2.5.1.18) (GST 1-1) (GST class-mu 1) (Glutathione S-transferase GT8.7) (pmGT10) | 1,8 |
| Histone H1.0 (Histone H1') (Histone H1(0)) (MyD196) [Cleaved into: Histone H1.0, N-terminally processed] | 2,0 |
| Histone H1.4 (H1 VAR.2) (H1e) | 1,3 |
| Histone H1.5 (H1 VAR.5) (H1b) | 1,5 |
| Histone H4 | 1,5 |
| Hemoglobin subunit alpha (Alpha-globin) (Hemoglobin alpha chain) | 1,8 |
| Hemoglobin subunit beta-1 (Beta-1-globin) (Hemoglobin beta-1 chain) (Hemoglobin beta-major chain) | 1,6 |
| Hemoglobin subunit beta-2 (Beta-2-globin) (Hemoglobin beta-2 chain) (Hemoglobin beta-minor chain) | 7,8 |
| High mobility group protein B1 (High mobility group protein 1) (HMG-1) | 1,0 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (hnRNP C1/C2) | 1,6 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) | 1,0 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP U) (Scaffold-attachment factor A) (SAF-A) | 2,4 |
| Heat shock 70 kDa protein 12A | 0,9 |
| Heat shock 70 kDa protein 12B | 0,2 |
| Heat shock protein HSP 90-alpha (Heat shock 86 kDa) (HSP 86) (HSP86) (Tumor-specific transplantation 86 kDa antigen) (TSTA) | 1,3 |
| Heat shock protein HSP 90-beta (Heat shock 84 kDa) (HSP 84) (HSP84) (Tumor-specific transplantation 84 kDa antigen) (TSTA) | 1,3 |
| Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8) | 1,1 |
| Heat shock protein beta-1 (HspB1) (Growth-related 25 kDa protein) (Heat shock 25 kDa protein) (HSP 25) (Heat shock 27 kDa protein) (HSP 27) (p25) | 1,5 |
| Hexokinase-1 (EC 2.7.1.1) (Hexokinase type I) (HK I) (Hexokinase, tumor isozyme) | 1,1 |
| Keratin, type I cytoskeletal 10 (56 kDa cytokeratin) (Cytokeratin-10) (CK-10) (Keratin, type I cytoskeletal 59 kDa) (Keratin-10) (K10) | 0,5 |
| Keratin, type I cytoskeletal 14 (Cytokeratin-14) (CK-14) (Keratin-14) (K14) | 0,0 |
| Keratin, type I cytoskeletal 16 (Cytokeratin-16) (CK-16) (Keratin-16) (K16) | 0,4 |
| Keratin, type I cytoskeletal 17 (Cytokeratin-17) (CK-17) (Keratin-17) (K17) | 0,7 |
| Keratin, type I cytoskeletal 42 (Cytokeratin-42) (CK-42) (Keratin-17n) (Keratin-42) (K42) (Type I keratin Ka22) | 0,2 |
| Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (Cytokeratin-2e) (CK-2e) (Epithelial keratin-2e) (Keratin-2 epidermis) (Keratin-2e) (K2e) (Type-II keratin Kb2) | 0,3 |
| Keratin, type II cytoskeletal 2 oral (Keratin-76) (K76) (Type-II keratin Kb9) | 0,2 |
| Keratin, type II cytoskeletal 1 (67 kDa cytokeratin) (Cytokeratin-1) (CK-1) (Keratin-1) (K1) (Type-II keratin Kb1) | 0,3 |
| Keratin, type II cytoskeletal 1b (Cytokeratin-1B) (CK-1B) (Embryonic type II keratin-1) (Keratin-77) (K77) (Type-II keratin Kb39) | 1,3 |
| Keratin, type II cytoskeletal 5 (Cytokeratin-5) (CK-5) (Keratin-5) (K5) (Type-II keratin Kb5) | 0,3 |
| Keratin, type II cytoskeletal 6A (Cytokeratin-6A) (CK-6A) (Keratin-6-alpha) (mK6-alpha) (Keratin-6A) (K6A) | 0,8 |
| Keratin, type II cytoskeletal 72 (Cytokeratin-72) (CK-72) (Keratin-72) (K72) (Type II inner root sheath-specific keratin-K6irs2) (Type-II keratin Kb35) | 2,0 |
| Keratin, type II cytoskeletal 75 (Cytokeratin-75) (CK-75) (Keratin-6 hair follicle) (mK6hf) (Keratin-75) (K75) (Type II keratin-K6hf) (Type-II keratin Kb18) | 0,8 |
| Keratin, type II cytoskeletal 79 (Cytokeratin-79) (CK-79) (Keratin-79) (K79) (Type-II keratin Kb38) | 0,3 |
| Keratin, type II cytoskeletal 80 (Cytokeratin-80) (CK-80) (Keratin-80) (K80) (Type-II keratin Kb20) | 0,3 |

Tabelle 18: Komplettübersicht der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) zu Wildtyp (WT)

Grün markiert: im GFAP-defizienten Typ vermehrt exprimiert; rot markiert: im GFAP-defizienten Typ verringert exprimiert; gelb markiert: an der Grenze zu nicht nachweisbar

| | |
|---|--------|
| Creatine kinase B-type (EC 2.7.3.2) (B-CK) (Creatine kinase B chain) (Creatine phosphokinase B-type) (CPK-B) | 1,0 |
| Creatine kinase M-type (EC 2.7.3.2) (Creatine kinase M chain) (Creatine phosphokinase M-type) (CPK-M) (M-CK) | 4,3 |
| Pyruvate kinase PKM (EC 2.7.1.40) (Pyruvate kinase muscle isozyme) | 1,3 |
| Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 (LAMP-1) | 1,5 |
| L-lactate dehydrogenase A chain (LDH-A) (EC 1.1.1.27) (LDH muscle subunit) (LDH-M) | 2,5 |
| Galectin-1 (Gal-1) (14 kDa lectin) | 2,4 |
| Prelamin-A/C [Cleaved into: Lamin-A/C] | 2,5 |
| Lumican (Keratan sulfate proteoglycan lumican) (KSPG lumican) | 1,4 |
| Lysozyme C-1 (EC 3.2.1.17) (1,4-beta-N-acetylmuramidase C) (Lysozyme C type P) | 5,9 |
| Myelin-associated glycoprotein (Siglec-4a) | 1,8 |
| Microtubule-associated protein 1A (MAP-1A) [Cleaved into: MAP1A heavy chain; MAP1 light chain LC2] | 0,6 |
| Microtubule-associated protein 1B (MAP-1B) (MAP1(X)) (MAP1.2) [Cleaved into: MAP1B heavy chain; MAP1 light chain LC1] | 0,9 |
| Microtubule-associated protein 4 (MAP-4) | 1,0 |
| Microtubule-associated protein 6 (MAP-6) (Stable tubule-only polypeptide) | 0,5 |
| Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 (APC-binding protein EB1) (End-binding protein 1) (EB1) | 0,1 |
| Myelin basic protein (MBP) (Myelin A1 protein) | 3,1 |
| Malate dehydrogenase, cytoplasmic (EC 1.1.1.37) (Cytosolic malate dehydrogenase) | 2,4 |
| Malate dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.1.1.37) | 2,1 |
| Mimecan (Osteoglycin) | 2,8 |
| Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform (Fast skeletal myosin light chain 2) (MLC2F) | 785,2 |
| Myelin-associated oligodendrocyte basic protein | 6,2 |
| Moesin (Membrane-organizing extension spike protein) | 1,1 |
| Myelin-oligodendrocyte glycoprotein | 2,3 |
| Monocarboxylate transporter 1 (MCT 1) (Solute carrier family 16 member 1) | 0,7 |
| Phosphate carrier protein, mitochondrial (Phosphate transport protein) (PTP) (Solute carrier family 25 member 3) | 1,7 |
| Myosin-4 (Myosin heavy chain 2b) (MyHC-2b) (Myosin heavy chain 4) | 1688,3 |
| Myosin-9 (Cellular myosin heavy chain, type A) (Myosin heavy chain 9) (Myosin heavy chain, non-muscle IIa) (Non-muscle myosin heavy chain A) (NMMHC-A) (Non-muscle myosin heavy chain IIa) (NMMHC II-a) (NMMHC-IIA) | 3,1 |
| Myosin light chain 1/3, skeletal muscle isoform (MLC1/MLC3) (MLC1F/MLC3F) (Myosin light chain alkali 1/2) (Myosin light chain A1/A2) | 735,6 |
| Myelin protein P0 (Myelin peripheral protein) (MPP) (Myelin protein zero) | 1,4 |
| Myelin proteolipid protein (PLP) (Lipophilin) | 1,9 |
| NADH-cytochrome b5 reductase 3 (B5R) (Cytochrome b5 reductase) (EC 1.6.2.2) (Diaphorase-1) [Cleaved into: NADH-cytochrome b5 reductase 3 membrane-bound form; NADH-cytochrome b5 reductase 3 soluble form] | 1,4 |
| Neural cell adhesion molecule 1 (N-CAM-1) (NCAM-1) (CD antigen CD56) | 1,1 |
| Neural cell adhesion molecule L1-like protein (Cell adhesion molecule with homology to L1CAM) (Ch11-like protein) (Close homolog of L1) [Cleaved into: Processed neural cell adhesion molecule L1-like protein] | 0,2 |
| Protein NDRG1 (N-myc downstream-regulated gene 1 protein) (Protein Ndr1) | 1,4 |
| Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4 | 1,4 |
| NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial (EC 7.1.1.2) (Complex I-75kD) (CI-75kD) | 2,2 |
| Nestin | 1,3 |
| Neurofascin | 0,8 |
| Neurofilament heavy polypeptide (NF-H) (200 kDa neurofilament protein) (Neurofilament triplet H protein) | 1,6 |
| Neurofilament light polypeptide (NF-L) (68 kDa neurofilament protein) (Neurofilament triplet L protein) | 1,0 |
| Neurofilament medium polypeptide (NF-M) (160 kDa neurofilament protein) (Neurofilament 3) (Neurofilament triplet M protein) | 0,8 |

Tabelle 19: Komplettübersicht der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) zu Wildtyp (WT)

Grün markiert: im GFAP-defizienten Typ vermehrt exprimiert; rot markiert: im GFAP-defizienten Typ verringert exprimiert; gelb markiert: an der Grenze zu nicht nachweisbar

| | |
|---|-----|
| Nucleophosmin (NPM) (Nucleolar phosphoprotein B23) (Nucleolar protein NO38) (Numatrin) | 0,7 |
| Vesicle-fusing ATPase (EC 3.6.4.6) (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) (NEM-sensitive fusion protein) (Suppressor of K(+) transport growth defect 2) (Protein SKD2) (Vesicular-fusion protein NSF) | 0,7 |
| Nucleolin (Protein C23) | 1,3 |
| 2-oxoglutarate dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.2.4.2) (2-oxoglutarate dehydrogenase complex component E1) (OGDC-E1) (Alpha-ketoglutarate dehydrogenase) | 0,2 |
| Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial (EC 2.3.1.61) (2-oxoglutarate dehydrogenase complex component E2) (OGDC-E2) (Dihydrolipoamide succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex) (E2K) | 1,0 |
| Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha, somatic form, mitochondrial (EC 1.2.4.1) (PDHE1-A type I) | 1,8 |
| Palladin | 0,5 |
| Paralemmin-1 (Paralemmin) | 1,4 |
| Protein disulfide-isomerase (PDI) (EC 5.3.4.1) (Cellular thyroid hormone-binding protein) (Endoplasmic reticulum resident protein 59) (ER protein 59) (ERp59) (Prolyl 4-hydroxylase subunit beta) (p55) | 1,3 |
| Protein disulfide-isomerase A3 (EC 5.3.4.1) (58 kDa glucose-regulated protein) (58 kDa microsomal protein) (p58) (Disulfide isomerase ER-60) (Endoplasmic reticulum resident protein 57) (ER protein 57) (ERp57) (Endoplasmic reticulum resident protein 60) (ER protein 60) (ERp60) | 1,3 |
| Protein disulfide-isomerase A6 (EC 5.3.4.1) (Thioredoxin domain-containing protein 7) | 0,6 |
| PDZ and LIM domain protein 5 (Enigma homolog) (Enigma-like PDZ and LIM domains protein) | 0,5 |
| Phosphoglycerate mutase 1 (EC 5.4.2.11) (EC 5.4.2.4) (BPG-dependent PGAM 1) (Phosphoglycerate mutase isozyme B) (PGAM-B) | 5,9 |
| Phosphoglycerate kinase 1 (EC 2.7.2.3) | 1,1 |
| Membrane-associated progesterone receptor component 1 (mPR) | 1,2 |
| Biglycan (Bone/cartilage proteoglycan I) (PG-S1) | 1,1 |
| Decorin (Bone proteoglycan II) (PG-S2) (PG40) | 1,2 |
| Plakophilin-1 | 2,2 |
| Junction plakoglobin (Desmoplakin III) (Desmoplakin-3) | 0,7 |
| Plectin (PCN) (PLTN) (Plectin-1) (Plectin-6) | 1,6 |
| Phospholemman (FXYD domain-containing ion transport regulator 1) (Sodium/potassium-transporting ATPase subunit FXYD1) | 1,5 |
| Proteolipid protein 2 | 1,1 |
| Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIase A) (EC 5.2.1.8) (Cyclophilin A) (Cyclosporin A-binding protein) (Rotamase A) (SP18) [Cleaved into: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, N-terminally processed] | 1,8 |
| Peroxiredoxin-1 (EC 1.11.1.24) (Macrophage 23 kDa stress protein) (Osteoblast-specific factor 3) (OSF-3) (Thioredoxin peroxidase 2) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 2) (Thioredoxin-dependent peroxiredoxin 1) | 1,9 |
| Peroxiredoxin-2 (EC 1.11.1.24) (Thiol-specific antioxidant protein) (TSA) (Thioredoxin peroxidase 1) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase 1) (Thioredoxin-dependent peroxiredoxin 2) | 1,3 |
| Peroxiredoxin-4 (EC 1.11.1.24) (Antioxidant enzyme AOE372) (Peroxiredoxin IV) (Prx-IV) (Thioredoxin peroxidase AO372) (Thioredoxin-dependent peroxide reductase A0372) (Thioredoxin-dependent peroxiredoxin 4) | 2,4 |
| Peroxiredoxin-6 (EC 1.11.1.27) (1-Cys peroxiredoxin) (1-Cys PRX) (Acidic calcium-independent phospholipase A2) (aiPLA2) (EC 3.1.1.4) (Antioxidant protein 2) (Glutathione-dependent peroxiredoxin) (Non-selenium glutathione peroxidase) (NSGPx) | 0,9 |
| Transcriptional activator protein Pur-alpha (Purine-rich single-stranded DNA-binding protein alpha) | 1,2 |
| Ras-related protein Rab-15 | 1,4 |
| Ras-related protein Rab-1A (YPT1-related protein) | 1,3 |
| Ras-related protein Rab-35 | 1,8 |
| Ras-related protein Rab-7a | 1,6 |
| Ras-related protein Rab-33B | 1,4 |
| Receptor expression-enhancing protein 5 (GP106) (Polyposis locus protein 1 homolog) (Protein TB2 homolog) | 0,0 |
| 60S ribosomal protein L12 | 3,5 |

Tabelle 20: Komplettübersicht der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) zu Wildtyp (WT)

Grün markiert: im GFAP-defizienten Typ vermehrt exprimiert; rot markiert: im GFAP-defizienten Typ verringert exprimiert; gelb markiert: an der Grenze zu nicht nachweisbar

| | |
|---|-----|
| 60S ribosomal protein L18 | 0,9 |
| 60S ribosomal protein L22 (Heparin-binding protein HBp15) | 1,4 |
| 60S ribosomal protein L31 | 2,8 |
| 60S acidic ribosomal protein P0 (60S ribosomal protein L10E) | 1,4 |
| 60S acidic ribosomal protein P1 | 1,0 |
| 60S acidic ribosomal protein P2 | 0,9 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (hnRNP A2/B1) | 2,5 |
| Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B (hnRNP A/B) (CArG-binding factor-A) (CBF-A) | 1,5 |
| 40S ribosomal protein S9 | 1,1 |
| 40S ribosomal protein SA (37 kDa laminin receptor precursor) (37LRP) (37 kDa oncofetal antigen) (37/67 kDa laminin receptor) (LRP/LR) (67 kDa laminin receptor) (67LR) (Laminin receptor 1) (LamR) (Laminin-binding protein precursor p40) (LBP/p40) (OFA/iLRP) | 1,7 |
| Reticulon-1 (Neuroendocrine-specific protein) | 1,1 |
| Reticulon-3 | 1,0 |
| Reticulon-4 (Neurite outgrowth inhibitor) (Nogo protein) | 1,1 |
| Protein S100-A1 (S-100 protein alpha chain) (S-100 protein subunit alpha) (S100 calcium-binding protein A1) | 0,0 |
| Protein S100-A6 (5B10) (Calcyclin) (Prolactin receptor-associated protein) (S100 calcium-binding protein A6) | 1,3 |
| Protein S100-A16 (Protein S100F) (S100 calcium binding protein A16) | 3,7 |
| Electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1 (Sodium bicarbonate cotransporter) (Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ cotransporter) (Solute carrier family 4 member 4) | 0,9 |
| Septin-2 (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 5) (NEDD-5) | 0,6 |
| Septin-4 (Brain protein H5) (Peanut-like protein 2) | 1,7 |
| Septin-5 (Cell division control-related protein 1) (CDCrel-1) (Peanut-like protein 1) | 1,7 |
| Septin-9 (SL3-3 integration site 1 protein) | 0,7 |
| Protein SET (Phosphatase 2A inhibitor I2PP2A) (I-2PP2A) (Template-activating factor I) (TAF-I) | 2,5 |
| NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2 (EC 2.3.1.286) (Regulatory protein SIR2 homolog 2) (SIR2-like protein 2) (mSIR2L2) | 2,1 |
| Gamma-soluble NSF attachment protein (SNAP-gamma) (N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein gamma) | 0,4 |
| Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1 (Beta-II spectrin) (Embryonic liver fodrin) (Fodrin beta chain) | 0,8 |
| Spectrin alpha chain, non-erythrocytic 1 (Alpha-II spectrin) (Fodrin alpha chain) | 0,9 |
| Sorbin and SH3 domain-containing protein 1 (Ponsin) (SH3 domain protein 5) (SH3P12) (c-Cbl-associated protein) (CAP) | 0,6 |
| Sorbin and SH3 domain-containing protein 2 (Arg-binding protein 2) (ArgBP2) (Arg/Abl-interacting protein 2) | 0,9 |
| Serine/arginine-rich splicing factor 3 (Pre-mRNA-splicing factor SRP20) (Protein X16) (Splicing factor, arginine/serine-rich 3) | 2,4 |
| Syntaxin-1B | 2,2 |
| Syntaxin-binding protein 1 (Protein unc-18 homolog 1) (Unc18-1) (Protein unc-18 homolog A) (Unc-18A) | 1,5 |
| Synemin (Desmuslin) | 1,3 |
| Microtubule-associated protein tau (Neurofibrillary tangle protein) (Paired helical filament-tau) (PHF-tau) | 1,1 |
| Tubulin alpha-4A chain (Alpha-tubulin 4) (Alpha-tubulin isotype M-alpha-4) (Tubulin alpha-4 chain) | 0,8 |
| Tubulin beta-2A chain | 0,9 |
| Tubulin beta-2B chain | 1,0 |
| Tubulin beta-3 chain | 2,5 |
| Tubulin beta-4A chain (Tubulin beta-4 chain) | 0,7 |
| Tubulin beta-4B chain (Tubulin beta-2C chain) | 1,0 |
| Tubulin beta-5 chain | 0,7 |
| T-complex protein 1 subunit alpha (TCP-1-alpha) (CCT-alpha) (Tailless complex polypeptide 1A) (TCP-1-A) (Tailless complex polypeptide 1B) (TCP-1-B) | 1,2 |

Tabelle 21: Komplettübersicht der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) zu Wildtyp (WT)

Grün markiert: im GFAP-defizienten Typ vermehrt exprimiert; rot markiert: im GFAP-defizienten Typ verringert exprimiert; gelb markiert: an der Grenze zu nicht nachweisbar

| | |
|--|-------|
| Transitional endoplasmic reticulum ATPase (TER ATPase) (EC 3.6.4.6) (15S Mg(2+)-ATPase p97 subunit) (Valosin-containing protein) (VCP) | 1,6 |
| Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K (EC 2.3.2.13) (Epidermal TGase) (Transglutaminase K) (TG(K)) (TGK) (TGase K) (Transglutaminase-1) (TGase-1) | 3,4 |
| Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2 (EC 2.3.2.13) (Tissue transglutaminase) (Transglutaminase C) (TG(C)) (TGC) (TGase C) (Transglutaminase-2) (TGase-2) | 2,4 |
| Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E (EC 2.3.2.13) (Transglutaminase E) (TG(E)) (TGE) (TGase E) (Transglutaminase-3) (TGase-3) [Cleaved into: Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E 50 kDa catalytic chain; Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E 27 kDa non-catalytic chain] | 1,0 |
| Acetyl-CoA acetyltransferase, mitochondrial (EC 2.3.1.9) (Acetoacetyl-CoA thiolase) | 0,9 |
| Thiosulfate sulfurtransferase (EC 2.8.1.1) (Rhodanese) | 1,5 |
| Thy-1 membrane glycoprotein (Thy-1 antigen) (CD antigen CD90) | 1,2 |
| Transketolase (TK) (EC 2.2.1.1) (P68) | 2,3 |
| Troponin C, skeletal muscle (STNC) | 14,8 |
| Troponin T, fast skeletal muscle (TnTf) (Fast skeletal muscle troponin T) (fTnT) | 477,2 |
| Triosephosphate isomerase (TIM) (EC 5.3.1.1) (Methylglyoxal synthase) (EC 4.2.3.3) (Triose-phosphate isomerase) | 5,3 |
| Tropomyosin alpha-1 chain (Alpha-tropomyosin) (Tropomyosin-1) | 2,9 |
| Tropomyosin alpha-3 chain (Gamma-tropomyosin) (Tropomyosin-3) | 2,9 |
| Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP) (EC 3.6.5.-) (25 kDa brain-specific protein) (TPPP/p25) (p25-alpha) | 1,5 |
| Tubulin polymerization-promoting protein family member 3 | 1,7 |
| Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial (HSP 75) (TNFR-associated protein 1) (Tumor necrosis factor type 1 receptor-associated protein) (TRAP-1) | 1,0 |
| Serotransferrin (Transferrin) (Beta-1 metal-binding globulin) (Siderophilin) | 2,1 |
| Mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP 3) (Solute carrier family 25 member 9) | 3,5 |
| Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC-1) (mVDAC1) (Outer mitochondrial membrane protein porin 1) (Plasmalemmal porin) (Voltage-dependent anion-selective channel protein 5) (VDAC-5) (mVDAC5) | 1,3 |
| Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (VDAC-2) (mVDAC2) (Outer mitochondrial membrane protein porin 2) (Voltage-dependent anion-selective channel protein 6) (VDAC-6) (mVDAC6) | 1,4 |
| Voltage-dependent anion-selective channel protein 3 (VDAC-3) (mVDAC3) (Outer mitochondrial membrane protein porin 3) | 1,7 |
| Vimentin | 0,7 |
| Vinculin (Metavinculin) | 1,1 |
| Tight junction protein ZO-1 (Tight junction protein 1) (Zona occludens protein 1) (Zonula occludens protein 1) | 0,0 |

Tabelle 22: Komplettübersicht der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) zu

Wildtyp (WT)

Grün markiert: im GFAP-defizienten Typ vermehrt exprimiert; rot markiert: im GFAP-defizienten Typ verringert exprimiert; gelb markiert: an der Grenze zu nicht nachweisbar

4. Diskussion

Eine selektive Proteomanalyse im Bereich der glialen Lamina von GFAP-defizienten Mäusen ist möglich. Für die Durchführung sind folgende Methoden notwendig:

1. Für die Genotypisierung der verwendeten Mauslinien liefert das modifizierte PCR-Protokoll der Fa. Jackson-Labs (Tabelle 9) fehlerfreie Ergebnisse.
2. Pro Auge sollten für eine spätere lasermikroskopische Dissektion mindestens 6-10 Gewebeschnitte gesammelt werden.
3. Die anschließende Dehydrierung der ungefärbten Objektträger ist mit dem vom Hersteller empfohlenen modifizierten Protokoll (2.4.3.4) durchführbar.
4. Eine Dissektion der glialen Lamina und die anschließende Sammlung dieser ist mit dem LCMP möglich. Hierbei sollten passende Parameter (Cut: 75; LPC: 97) gewählt werden.
5. Für die folgende Proteomanalyse (Mindestkonzentration an Protein von 8-10 µg/ml) sind jeweils zwei Proben GFAP-defizienter Typ und Wildtyp notwendig. Jede Probe beinhaltet Dissektionsmaterial aus vier enukleierten Augen, somit mindestens 24 Gefrierschnitten.

Nach der massenspektrometrischen Proteomanalyse zeigte sich keine detektierbare Menge von GFAP in den in den Proben der defizienten Tiere bzw. war dieses nur in den Wildtyp-Mäusen messbar. Somit konnte die grundlegende Hypothese der GFAP-Defizienz in GFAP^{tm1mes} Mäusen bestätigt werden.

Bei den GFAP-defizienten Mäusen konnte eine Hochregulation von Vimentin (Tabelle 14) beobachtet werden. Vimentin ist neben GFAP eines der wichtigsten Intermediärfilamentproteine, wird aber im Gegensatz zu GFAP hauptsächlich in frühen Entwicklungsstadien von Astrozyten exprimiert (Chiu et al., 1981). In einer früheren Studie konnte keine kompensatorische Produktion von Vimentin im ZNS von GFAP-defizienten Mäusen festgestellt werden, jedoch wurde in dieser Studie eine andere GFAP-defiziente Mauslinie analysiert und das Auge nicht näher betrachtet (M. Pekny et al., 1995). Als Intermediärfilamentprotein ist Vimentin ebenso wie

GFAP an der Gewebestabilisierung, Homöostase und Aufrechterhaltung einer Diffusionsbarriere beteiligt, was folglich eine vermehrte Produktion erklären könnte.

Interessanterweise sind Fibrillin-1 verringert, F-Actin und Kollagen Typ I im GFAP-defizienten Typ kaum nachweisbar (Tabelle 14). An dieser Stelle hätte man vermuten können, dass diese Proteine als typische Vertreter im Bereich des Zytoplasmas und Bestandteile der EZM, ebenso wie Vimentin, kompensatorisch erhöht wären. Jedoch kommt Kollagen Typ I im Bereich der glialen Lamina hauptsächlich in der den Sehnerven umgebenden Dura und im Endothel von Blutgefäßen vor, somit ist nicht auszuschließen, dass die gemessene Veränderung auf unterschiedliche Mengen an Dura-Gewebe und/oder Blutgefäßen in den analysierten Proben zurückzuführen ist. Andere Kollagene, wie z.B. Kollagen Typ 4, welches in größeren Mengen von Astrozyten im Sehnervenkopf exprimiert wird (M. R. Hernandez et al., 1991; Morrison et al., 1989), waren in der GFAP-defizienten GL nicht reguliert.

Caveolin-1, welches unter anderem an Endozytose (Pang et al., 2022; Schubert et al., 2001), Signaltransduktion (Liu et al., 2002) beteiligt, zeigte sich in der Analyse in verminderten Mengen (Tabelle 14).

Ob dies ein Hinweis für eine strukturelle Kompensation z.B. durch einen verringerten Zelluntergang sein könnte, bleibt zu diskutieren.

Die massenspektrometrische Proteomanalyse steht natürlich noch am Anfang. Um abschließende Interpretationen statistisch signifikanter Veränderungen zuzulassen, bedarf es weiterer Durchläufe.

Diese ersten Erkenntnisse bzw. Vermutungen sollten auf jeden Fall durch weitere quantitative Nachweismethoden, wie zum Beispiel Western-Blotting, bestätigt werden.

Auch bietet diese erste Analyse Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen der erhöhten oder erniedrigten Zellbestandteile in diesem untersuchten Verlaufsabschnitt des Sehnervs.

5. Zusammenfassung

Beim primären Offenwinkelglaukom (POWG) führt ein zu hoher intraokulärer Druck (IOD) des Bulbus zur Schädigung der Axone der retinalen Ganglienzellen im Bereich der *Lamina cribrosa*, wo die Axone im *N. opticus* den Bulbus verlassen. Vermutlich erhöht der IOD die mechanische Belastung der Axone, was beim POWG dann nicht mehr kompensiert werden kann. In der *Lamina cribrosa* ordnen sich die Axone zu Bündeln an, die von Astrozyten umhüllt werden. Diese zeigen den Phänotyp von fibrillären Astrozyten mit einem umfangreichen Zytoskelett aus Intermediärfilamenten, die hauptsächlich aus Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) bestehen. Im Mausauge entspricht der *Lamina cribrosa* die gliale Lamina, ein Teil des *N. opticus* mit einem Durchmesser von in etwa 100 µm und eine Länge von 50 µm. Bisherige Befunde der Arbeitsgruppe zeigen, dass Mäuse mit einer gentechnisch induzierten Defizienz von GFAP auch unter normalen Bedingungen kontinuierlich Axone des Sehnervens verlieren. Um mehr Informationen über die molekularen Veränderungen des glialen Lamina bei GFAP-Defizienz der Maus zu erhalten, wäre eine Bestimmung der Gesamtheit der Proteine (Proteom) der glialen Lamina hilfreich. Dies ist aber auf Grund der geringen Größe des Gewebes am Mausauge technisch sehr anspruchsvoll. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, ob es technisch überhaupt möglich ist ein Protokoll zu entwickeln, das die spezifische Isolierung der glialen Lamina der Maus mit der Methode des Laser Micro-Dissection Pressure Catapulting (LMPC) erlaubt, und zwar mit einer Proteinmenge und -qualität, die eine massenspektroskopische Bestimmung des Proteoms ermöglicht.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dies möglich ist, wenn dazu die Parameter Cut: 75; LPC: 97 der LMPC zur Anwendung kommen. Für jeden Bulbus müssen dann mindestens 6-10 Gewebeschnitte gesammelt werden. Für die daran anschließende Proteomanalyse sind jeweils zwei Proben von GFAP-defizienten und Wildtyp-Mäusen notwendig. Jede Probe beinhaltet dann Dissektionsmaterial aus vier enukleierten Augen, somit mindestens 24 Gefrierschnitten. Erste vorläufige Daten der Proteomanalyse zeigen, dass das Intermediärfilament Vimentin, als weiteres Intermediärfilament, bei den GFAP-defizienten Mäusen vermehrt nachweisbar ist, um vermutlich den Verlust an GFAP zu kompensieren. Fibrillin-1, F- Actin, Caveolin-1 und Kollagen-alpha-1(III) sind dagegen verringert bzw. in kaum nachweisbaren Mengen vorhanden.

Insgesamt ermöglichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine umfassende Analyse des Proteoms der glialen Lamina der Maus.

6. Literaturverzeichnis

Aquino, D. A., Chiu, F.-C., Brosnan, C. F., & Norton, W. T. (1988). Glial Fibrillary Acidic Protein Increases in the Spinal Cord of Lewis Rats with Acute Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Neurochemistry*, *51*, 1085–1096.

Bernier, L., Colman, D. R., & D'Eustachio, P. (1988). Chromosomal locations of genes encoding 2',3' cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase and glial fibrillary acidic protein in the mouse. *Journal of Neuroscience Research*, *20*, 497–504.

Bongcam-Rudloff, E., Nistér, M., Betsholtz, C., Wang, J.-L., Stenman, G., Huebner, K., ... Westermark, B. (1991). Human Glial Fibrillary Acidic Protein: Complementary DNA Cloning, Chromosome Localization, and Messenger RNA Expression in Human Glioma Cell Lines of Various Phenotypes¹. *Cancer Research*, *51*, 1553–1560.

Brenner, M. (2014). Role of GFAP in CNS injuries. *Neuroscience Letters*, *565*, 7–13.

Chiu, F.-C., Norton, W. T., & Fields, K. L. (1981). The Cytoskeleton of Primary Astrocytes in Culture Contains Actin, Glial Fibrillary Acidic Protein, and the Fibroblast-Type Filament Protein, Vimentin. *Journal of Neurochemistry*, *37*, 147–155.

Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. (1998). The effectiveness of intraocular pressure reduction in the treatment of normal-tension glaucoma. Collaborative Normal-Tension Glaucoma Study Group. *American Journal of Ophthalmology*, *126*, 498–505.

Craven, R. A., Totty, N., Harnden, P., Selby, P. J., & Banks, R. E. (2002). Laser Capture Microdissection and Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *The American Journal of Pathology*, *160*, 815–822.

Curran, S., McKay, J. A., McLeod, H. L., & Murray, G. I. (2000). Laser capture microscopy. *Molecular Pathology*, *53*, 64–68.

Dahl, D., & Bignami, A. (1976). Isolation from peripheral nerve of a protein similar to the glial fibrillary acidic protein. *FEBS Letters*, *66*, 281–284.

- Dahlstrand, J., Zimmerman, L. B., McKay, R. D., & Lendahl, U. (1992). Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *Journal of Cell Science*, *103*, 589–597.
- Ehlers, N. (2012). Nordisk ophthalmologisk tidsskrift 1889–1892. *Acta Ophthalmologica*, *90*, 387–391.
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S., & Lee, Y. L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical Research*, *25*, 1439–1451.
- Fend, F., & Raffeld, M. (2000). Laser capture microdissection in pathology. *Journal of Clinical Pathology*, *53*, 666–672.
- Ferrari, S., Battini, R., Kaczmarek, L., Rittling, S., Calabretta, B., de Riel, J. K., ... Baserga, R. (1986). Coding sequence and growth regulation of the human vimentin gene. *Molecular and Cellular Biology*, *6*, 3614–3620.
- Fischer, R., & Kessler, B. M. (2015). Gel-aided sample preparation (GASP)—A simplified method for gel-assisted proteomic sample generation from protein extracts and intact cells. *Proteomics*, *15*, 1224–1229.
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of Investigative Dermatology*, *133*, e6.
- Going, J. J., & Lamb, R. F. (1996). Practical Histological Microdissection for Pcr Analysis. *The Journal of Pathology*, *179*, 121–124.
- Gordon, M. O. (2002). The Ocular Hypertension Treatment Study: Baseline Factors That Predict the Onset of Primary Open-Angle Glaucoma. *Archives of Ophthalmology*, *120*, 714.
- Hatten, M. E., Liem, R. K. H., Shelanski, M. L., & Mason, C. A. (1991). Astroglia in CNS injury. *Glia*, *4*, 233–243.

Hernandez, M R, Igoe, F., & Neufeld, A. H. (1988). Cell culture of the human lamina cribrosa. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 29, 78–89.

Hernandez, M. R., Wang, N., Hanley, N. M., & Neufeld, A. H. (1991). Localization of collagen types I and IV mRNAs in human optic nerve head by in situ hybridization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 32, 2169–2177.

Hernandez, M. Rosario. (2000). The optic nerve head in glaucoma: Role of astrocytes in tissue remodeling. *Progress in Retinal and Eye Research*, 19, 297–321.

Höhn, R., Kottler, U., Peto, T., Blettner, M., Münzel, T., Blankenberg, S., ... Pfeiffer, N. (2015). The Ophthalmic Branch of the Gutenberg Health Study: Study Design, Cohort Profile and Self-Reported Diseases. *PLoS ONE*, 10, e0120476.

HPLC. (n.d.). Retrieved 1 June 2022, from <https://www.medizinische-genetik.de/diagnostik/allgemeine-informationen/methoden/hplc>

Johnson, M. (2006). ‘What controls aqueous humour outflow resistance?’ *Experimental Eye Research*, 82, 545–557.

Jonas, J. B., Mardin, C. Y., Schlötzer-Schrehardt, U., & Naumann, G. O. (1991). Morphometry of the human lamina cribrosa surface. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 32, 401–405.

Kachinsky, A. M., Dominov, J. A., & Miller, J. B. (1994). Myogenesis and the Intermediate Filament Protein, Nestin. *Developmental Biology*, 165, 216–228.

Kwon, Y. H., Fingert, J. H., Kuehn, M. H., & Alward, W. L. M. (2009). Primary Open-Angle Glaucoma. *The New England Journal of Medicine*, 360, 1113–1124.

Leber, Th. (1873). Studien über den Flüssigkeitswechsel im Auge. *Albrecht von Graefes Archiv Für Ophthalmologie*, 19, 87–106.

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 3923.

Lee, Y., Messing, A., Su, M., & Brenner, M. (2008). GFAP promoter elements required for region-specific and astrocyte-specific expression. *Glia*, 56, 481–493.

Leske, M. C., Heijl, A., Hussein, M., Bengtsson, B., Hyman, L., Komaroff, E., & for the Early Manifest Glaucoma Trial Group. (2003). Factors for Glaucoma Progression and the Effect of Treatment: The Early Manifest Glaucoma Trial. *Archives of Ophthalmology*, 121, 48–56.

Liebler, D. C. (2002). Proteomic approaches to characterize protein modifications: New tools to study the effects of environmental exposures. *Environmental Health Perspectives*, 110, 3–9.

Liu, P., Rudick, M., & Anderson, R. G. W. (2002). Multiple Functions of Caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 41295–41298.

Lukas, T. J., Miao, H., Chen, L., Riordan, S. M., Li, W., Crabb, A. M., ... Hernandez, M. R. (2008). Susceptibility to glaucoma: Differential comparison of the astrocyte transcriptome from glaucomatous African American and Caucasian American donors. *Genome Biology*, 9, R111.

Lye-Barthel, M., Sun, D., & Jakobs, T. C. (2013). Morphology of Astrocytes in a Glaucomatous Optic Nerve. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54, 909–917.

Masood, K., Besnard, F., Su, Y., & Brenner, M. (1993). Analysis of a Segment of the Human Glial Fibrillary Acidic Protein Gene That Directs Astrocyte-Specific Transcription. *Journal of Neurochemistry*, 61, 160–166.

McCall, M. A., Gregg, R. G., Behringer, R. R., Brenner, M., Delaney, C. L., Galbreath, E. J., ... Messing, A. (1996). Targeted deletion in astrocyte intermediate filament (Gfap) alters neuronal physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 6361–6366.

Miura, M., Tamura, T., & Mikoshiba, K. (1990). Cell-Specific Expression of the Mouse Glial Fibrillary Acidic Protein Gene: Identification of the Cis- and Trans-Acting Promoter Elements for Astrocyte-Specific Expression. *Journal of Neurochemistry*, 55, 1180–1188.

Morrison, J. C., L'Hernault, N. L., Jerdan, J. A., & Quigley, H. A. (1989). Ultrastructural location of extracellular matrix components in the optic nerve head. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*, *107*, 123–129.

Moura-Neto, V., Kryszke, M.-H., Li, Z., Vicart, P., Lilienbaum, A., & Paulin, D. (1996). A 28-bp negative element with multiple factor-binding activity controls expression of the vimentin-encoding gene. *Gene*, *168*, 261–266.

Pang, L., Yang, S., Dai, W., Wu, S., & Kong, J. (2022). Role of caveolin-1 in human organ function and disease: Friend or foe? *Carcinogenesis*, *43*, 2–11.

Pekny, M., Levéen, P., Pekna, M., Eliasson, C., Berthold, C. H., Westermark, B., & Betsholtz, C. (1995). Mice lacking glial fibrillary acidic protein display astrocytes devoid of intermediate filaments but develop and reproduce normally. *The EMBO Journal*, *14*, 1590–1598.

Pekny, Milos. (2001). Astrocytic intermediate filaments: Lessons from GFAP and vimentin knock-out mice. In *Glial Cell Function: Vol. 132. Progress in Brain Research* (pp. 23–30). Elsevier.

Pekny, Milos, Johansson, C. B., Eliasson, C., Stakeberg, J., Wallén, Å., Perlmann, T., ... Frisén, J. (1999). Abnormal Reaction to Central Nervous System Injury in Mice Lacking Glial Fibrillary Acidic Protein and Vimentin. *Journal of Cell Biology*, *145*, 503–514.

Pérez-Llarena, F. J., & Bou, G. (2016). Proteomics As a Tool for Studying Bacterial Virulence and Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 410.

Pieper, F. R., Klundert, F. A. V. D., Raats, J. M., Henderik, J. B., Schaart, G., Ramaekers, F. C., & Bloemendal, H. (1992). Regulation of vimentin expression in cultured epithelial cells. *European Journal of Biochemistry*, *210*, 509–519.

Protocol 28529—Gfap<tm1Mes>. (n.d.). Retrieved 31 July 2022, from <https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=002642&protocolID=28529>

Quigley, H. A. (2011). Glaucoma. *The Lancet*, *377*, 1367–1377.

Quigley, H. A., McKinnon, S. J., Zack, D. J., Pease, M. E., Kerrigan–Baumrind, L. A., Kerrigan, D. F., & Mitchell, R. S. (2000). Retrograde Axonal Transport of BDNF in Retinal Ganglion Cells Is Blocked by Acute IOP Elevation in Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *41*, 3460–3466.

Resnikoff, S., Pascolini, D., Etya'ale, D., Kocur, I., Pararajasegaram, R., Pokharel, G. P., & Mariotti, S. P. (2004). Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization*, *82*, 844–851.

ROTI®Quant universal, 500 Assays (Küvetten) | Proteinquantifizierung | Biochemie | Life Science | Carl Roth—Deutschland. (n.d.). Retrieved 27 May 2022, from <https://www.carlroth.com/de/de/proteinquantifizierung/rotiquant-universal/p/0120.1>

Sarkar, S., & Cowan, N. J. . (1991). Regulation of expression of glial filament acidic protein. *Journal of Cell Science*, *1991*, 97–102.

Schubert, W., Frank, P. G., Razani, B., Park, D. S., Chow, C.-W., & Lisanti, M. P. (2001). Caveolae-deficient Endothelial Cells Show Defects in the Uptake and Transport of Albumin in Vivo. *Journal of Biological Chemistry*, *276*, 48619–48622.

Shah, M., Cabrera-Ghayouri, S., Christie, L.-A., Held, K. S., & Viswanath, V. (2019). Translational Preclinical Pharmacologic Disease Models for Ophthalmic Drug Development. *Pharmaceutical Research*, *36*, 58.

Smith, R. S., Zabaleta, A., Savinova, O. V., & John, S. W. (2001). The mouse anterior chamber angle and trabecular meshwork develop without cell death. *BMC Developmental Biology*, *1*, 3.

Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, *119*, 7–35.

Sommers, C. L., Skerker, J. M., Chrysogelos, S. A., Bosseler, M., & Gelmann, E. P. (1994). Regulation of vimentin gene transcription in human breast cancer cell lines. *Cell Growth &*

Differentiation, 5, 839.

Sun, D., & Jakobs, T. C. (2012). Structural Remodeling of Astrocytes in the Injured CNS. *The Neuroscientist*, 18, 567–588.

Sun, D., Lye-Barthel, M., Masland, R. H., & Jakobs, T. C. (2010). Structural Remodeling of Fibrous Astrocytes after Axonal Injury. *Journal of Neuroscience*, 30, 14008–14019.

Sun, D., Moore, S., & Jakobs, T. C. (2017). Optic nerve astrocyte reactivity protects function in experimental glaucoma and other nerve injuries. *The Journal of Experimental Medicine*, 214, 1411–1430.

Sutherland, C., Wang, Y., Brown, R. V., Foley, J., Mahler, B., Janardhan, K. S., ... Jetten, A. M. (2018). Laser Capture Microdissection of Highly Pure Trabecular Meshwork from Mouse Eyes for Gene Expression Analysis. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 57576.

Tamm, E. R., & Fuchshofer, R. (2007). What increases outflow resistance in primary open-angle glaucoma? *Survey of Ophthalmology*, 52 Suppl 2, S101-104.

Tansley, K. (1956). Comparison of the lamina cribrosa in mammalian species with good and with indifferent vision. *The British Journal of Ophthalmology*, 40, 178–182.

The AGIS Investigators. (2000). The advanced glaucoma intervention study (AGIS): 7. the relationship between control of intraocular pressure and visual field deterioration. *American Journal of Ophthalmology*, 130, 429–440.

Wang, R., Seifert, P., & Jakobs, T. C. (2017). Astrocytes in the Optic Nerve Head of Glaucomatous Mice Display a Characteristic Reactive Phenotype. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58, 924–932.

Weinreb, R. N., Aung, T., & Medeiros, F. A. (2014). The Pathophysiology and Treatment of Glaucoma. *JAMA*, 311, 1901–1911.

Welsch, U. (2014). *Lehrbuch Histologie: Mit 49 Tabellen* (4. Aufl.). Elsevier, Urban & Fischer.

Wieczorek, E., Lin, Z., Perkins, E. B., Law, D. J., Merchant, J. L., & Zehner, Z. E. (2000). The Zinc Finger Repressor, ZBP-89, Binds to the Silencer Element of the Human Vimentin Gene and Complexes with the Transcriptional Activator, Sp1. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 12879–12888.

Wilhelmsson, U., Bushong, E. A., Price, D. L., Smarr, B. L., Phung, V., Terada, M., ... Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 17513–17518.

ZEISS-DNA-handling.pdf. (n.d.). Retrieved from <https://nif.hms.harvard.edu/sites/nif.hms.harvard.edu/files/education-files/ZEISS-DNA-handling.pdf>

Zeiss/PALM Micro Beam laser microdissection system. | Download Scientific Diagram. (n.d.). Retrieved 24 April 2022, from ResearchGate website: https://www.researchgate.net/figure/Zeiss-PALM-Micro-Beam-laser-microdissection-system_fig4_8183906

Zhang, X., Diab, I. H., & Zehner, Z. E. (2003). ZBP-89 represses vimentin gene transcription by interacting with the transcriptional activator, Sp1. *Nucleic Acids Research*, 31, 2900–2914.

7. Tabellen

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Verwendete Reagenzien | 17 |
| Tabelle 2: Verwendete Pufferlösungen | 19 |
| Tabelle 3: Verwendete Enzyme | 19 |
| Tabelle 4: Verwendete Oligonukleotidprimer | 19 |
| Tabelle 5: Verwendete Geräte..... | 20 |
| Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien..... | 21 |
| Tabelle 7: Standard-PCR-Reaktionsansatz für 35 µl | 24 |
| Tabelle 8: Fa. Jackson ('Protocol 28529 - Gfap<tm1Mes>', n.d.) | 25 |
| Tabelle 9: Modifiziertes Protokoll Fa. Jackson | 26 |
| Tabelle 10: Verdünnungsreihe des BSA-Standards..... | 35 |
| Tabelle 11: gemessene Proteinkonzentrationen in 0.1ml Pufferlösung | 47 |
| Tabelle 12: gemessene Proteinkonzentrationen in 0.1ml Pufferlösung | 48 |
| Tabelle 13: Verwendete Proben für die LC-MS | 49 |
| Tabelle 14: Auszug der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) zu Wildtyp (WT) | 50 |
| Tabelle 15: Komplettübersicht der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) zu Wildtyp (WT)..... | 51 |
| Tabelle 16: Komplettübersicht der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) | 52 |
| Tabelle 17: Komplettübersicht der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) | 53 |
| Tabelle 18: Komplettübersicht der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) | 54 |
| Tabelle 19: Komplettübersicht der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) | 55 |
| Tabelle 20: Komplettübersicht der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) | 56 |
| Tabelle 21: Komplettübersicht der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) | 57 |
| Tabelle 22: Komplettübersicht der detektierbaren Proteine im Vergleich GFAP-defizient (KN) zu Wildtyp (WT)..... | 58 |

8. Abbildungen

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Kammerwasserdrainage eines gesunden (Abbildung A) und an einem Glaukom erkrankten Auges (Abbildung B: POWG und C: Winkelblockglaukom). | 5 |
| Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer LC des rechten Auges (Jonas et al., 1991). | 8 |
| Abbildung 3: Ophthalmoskopische Aufnahme einer normalen (A) und einer glaukomatös veränderten (B) Papille. | 10 |
| Abbildung 4: Schematische Illustration einer physiologischen Anordnung des NO und neurodegenerativen Veränderungen bei einem Glaukom mit resultierender ON (Weinreb et al., 2014). | 11 |
| Abbildung 5: Grundlegender Vorgang bei der LCM. | 15 |
| Abbildung 6: : Schematische Darstellung der lasermikroskopischen Dissektion und Katapultierung des Ge-webes in das Sammelröhrchen (Zeiss/PALM Micro Beam laser microdissection system. Download Scientific Diagram, no date)..... | 16 |
| Abbildung 7: ROTI®Quant universal Standard-Kurve mit BSA (bovines Serumalbumin).... | 34 |
| Abbildung 8: GASP (Fischer et al., 2015):..... | 38 |
| Abbildung 9: PCR (Standard) zum Nachweis des Genotyps mit kombinierten Primern..... | 39 |
| Abbildung 10: PCR (Jackson-Labs) zum Nachweis des Genotyps mit kombinierten Primern. | 40 |
| Abbildung 11: PCR modifiziert zum Genotypnachweis mit kombinierten Primern. | 41 |
| Abbildung 12: Vergleichskurve Verdünnungsreihe BSA | 46 |
| Abbildung 13: Vergleichskurve Verdünnungsreihe BSA | 47 |

9. Abkürzungen

| | |
|------|--|
| BCA | Bicinchoninsäure |
| BDNF | brain derived neurotrophic factor |
| bp | base pairs |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| cm | Zentimeter |
| DNA | desoxyribonucleic acid |
| EZM | extrazelluläre Matrix |
| GFAP | saures Gliafaserprotein |
| GL | gliale Lamina |
| IOD | intraokulärer Druck |
| kbp | kilobase pairs |
| KN | Knockout |
| LC | Lamina cribrosa |
| LCM | Laser capture microscopy |
| LMPC | Laser microdissection and pressure catapulting |
| ml | Milliliter |
| mmHG | Millimeter Hydrargyrum |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NCI | National Cancer Institute |
| nm | Nanometer |
| NO | Nervus opticus |
| ONH | optic nerve head |
| PCR | polymerase chain reaction |
| POWG | primäres Offenwinkelglaukom |
| RGZ | retinale Ganglienzellen |
| RNA | ribonucleic acid |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| WT | Wildtyp |
| ZNS | zentrales Nervensystem |
| μl | Mikroliter |

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionschrift niemals zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Ernst Tamm, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, sowie für die freundlichen Hilfe und Unterstützung, ohne die die Durchführung nicht möglich gewesen wäre. Unsere zahlreichen Gespräche auf intellektueller und persönlicher Ebene werden mir stets in positiver Erinnerung bleiben.

Ich danke Frau Prof. Dr. rer. nat. Silke Härteis für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachterin.

Besonderen Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Christoph Klein, den Inhaber des Lehrstuhls für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren des Universitätsklinikums Regensburg, der das Lasermikroskop für diese Arbeit zur Verfügung stellt.

Ich möchte mich bei Frau Dr. Katharina Limm vom Institut für Funktionelle Genomik des Universitätsklinikums Regensburg für die freundliche Unterstützung und der Durchführung der Proteomanalyse bedanken.

Mein außerordentlicher Dank gilt meiner Mentorin, Frau Dr. rer. nat. Magdalena Schneider, ohne ihr außerordentliches Verständnis und ihre unermüdliche Geduld wäre eine solche Arbeit nicht möglich gewesen. Ihre Unterstützung im Schreibprozess, ihre fundierten sowie kritischen Anregungen, aber besonders ihr moralischer und menschlicher Beistand haben mir die nötige Kraft zur Anfertigung und Vollendung dieser Arbeit gegeben. Aufgrund dieser Unterstützung gebührt an dieser Stelle hier besonderer Dank.

Frau Dr. rer. nat. Franziska Frömel danke ich besonders für die fundierte Hilfe bei der Eichkurvenanalyse und der herausragenden Anregung für einen alternativen Ansatz. Ohne diese kritische Anregung wäre die resultierende Arbeit wahrscheinlich nicht zustande gekommen.

Ebenso möchte ich mich bei Angelika Pach, Silvia Babl-Artman, Margit Schimmel und Eva Wirkert für die tatkräftige Unterstützung und Hilfe bei molekularbiologischen und histologischen Fragen bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rudolph Fuchshofer, Frau Dr. rer. nat. Andrea Dillinger, Frau Dr. rer. nat. Roswitha Seitz und Frau Dr. rer. nat. Leonie Herrnberger-Eimer, die mir stets bei Problemen und Fragen weiterhelfen konnten.

Großer Dank gebührt den wissenschaftlichen Mitarbeitern des Lehrstuhls, Kristina Elsner, Johanna Heimbuchner und Ramona Pawlak, die mir nicht nur durch ihre Hilfsbereitschaft, sondern auch durch ihre Menschlichkeit die nötige Energie für die Durchführung dieser Arbeit gegeben haben.

Abschließend möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern Renate und Josef Strobl bedanken. Ohne eure Unterstützung und bedingungslose Liebe wäre dies alles nicht möglich gewesen. Vielen herzlichen Dank.

11. Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen 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, 26.04.2023)

(Josef Strobl)

12. Lebenslauf

Name: Strobl

Vorname: Josef Ernst Albrecht

Geburtstag: 08.04.1989

Geburtsort: Nürnberg

Familienstand: ledig

Schulbesuch:

1995-1999 Grundschole Auerbach i. d. OPf.
1999-2009 Gymnasium Pegnitz
26.06.2009 Abschluss Abitur (Allgemeine Hochschulreife)

Praktikum:

27.07.-07.08.2009 Zahnarztpraxis Frank Träger, Kemnath
17.08.-28.08.2009 Zahntechnik Melchner GmbH,
Altentadt (Weiden)

Zivildienst:

01.09.2009-31.05.2010 Sana Klinik Pegnitz
- Hol- und Bringdienst
- Interdisziplinäre Wachstation

Praktikum:

01.06.-30.09.2010 Sana Klinik Pegnitz

- Pflegeabteilung (Bettenstation)
- OP (insbesondere Orthopädie, Unfallchirurgie)

Ausbildung:

01.10.2010-30.09.2013 dreijährige Ausbildung
zum Operationstechnischen Assistenten (OTA) an der
Universitätsklinik Erlangen mit Partnerklinik Sana Klinik
Pegnitz

Erwerbstätigkeit:

01.10.2013-30.09.2016 Operationstechnischer Assistent (Abteilungsleitung) im
St. Theresien-Krankenhaus Nürnberg

Studium:

01.10.2016 Beginn Studium Humanmedizin an der Universität Re-
gensburg

August 2018 Abschluss 1. Staatsexamen (Humanmedizin)

Oktober 2021 Abschluss 2. Staatsexamen (Humanmedizin)

15.11.2021-31.10.2022 Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Regensburg

18.11.2022 Ablegung des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
an der Universität Regensburg

29.11.2022 Erteilung der Approbation als Arzt durch die Regierung
von Oberbayern

seit 01.02.2023

Assistenzarzt im St. Theresien-Krankenhaus Nürnberg

Besondere Tätigkeiten:

Oktober 2017-Januar 2018

Hilfswissenschaftler Anatomie (Extremitätenkurs)

Februar-März 2018

Hilfswissenschaftler Anatomie (Extremitätenkurs)

Februar-März 2019

Hilfswissenschaftler Anatomie (Extremitätenkurs)

Februar-März 2020

Hilfswissenschaftler Anatomie (Extremitätenkurs)

Dezember 2018-April 2023

Doktorrand am Lehrstuhl für Humananatomie und Embryologie (Prof. Dr. med. Ernst Tamm)

Besondere Kenntnisse:

Sprachen

Englisch, Französisch, Latein

Pegnitz, 26.04.2023

Josef Strobl