

# **Aufklärung molekularer Pathogenesemechanismen des Norrie-Syndroms**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
ULRICH F. O. LUHMANN  
aus Lübeck

November 2004

Diese Dissertation wurde von Juni 2000 bis Ende Mai 2002 am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in der Abteilung für Molekulare Humangenetik von Prof. Dr. H.-Hilger Ropers in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Wolfgang Berger und von Juni 2002 bis Oktober 2004 am Institut für Medizinische Genetik der Universität Zürich in der Abteilung für Medizinische Molekulargenetik und Gendiagnostik, deren Leiter Herr Prof. Dr. Berger geworden war, angefertigt.

**1. Gutachter:** **Professor Dr. Wolfgang Berger**  
**Universität Zürich**

**2. Gutachter:** **Professor Dr. Volker A. Erdmann**  
**Freie Universität Berlin**

**Disputation am:** **10. Juni 2005**

**Für meine Eltern**

**Doris und  
Dr. Wolf-Dietrich Luhmann**

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. Wolfgang Berger und Professor Dr. Hans-Hilger Ropers für die Möglichkeit, an diesem spannenden und begeisternden Thema arbeiten zu dürfen. Zudem gilt mein Dank Professor Dr. Volker A. Erdmann, der sich bereit erklärt hat, diese Arbeit an der Freien Universität Berlin zu betreuen. Insbesondere bei Wolfgang Berger möchte ich mich ganz herzlich für die vielen lehrreichen und fruchtbaren Diskussionen bedanken, die wir im Laufe der letzten Jahre miteinander geführt haben. Die sehr guten experimentellen Möglichkeiten, die Freiheiten in der Planung und Durchführung der Experimente sowie die Erfahrungen, die ich nicht nur aber besonders nach und durch unseren gemeinsamen Umzug nach Zürich gemacht habe, waren sehr wertvoll und werden mir in der Zukunft sicher sehr nützlich sein. Auch möchte ich mich bei allen Kollegen aus dem Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin und aus dem Institut für medizinische Genetik der Universität Zürich für die gute und kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Laborkolleginnen Renate Kirschner und Christina Zeitz genauso wie Georg Wieczorek und Andreas Schröer aus zwei anderen Arbeitsgruppen des Max-Planck-Instituts in Berlin, die mir in vielen spannenden, wissenschaftlichen und privaten Diskussionen zu guten Freunden geworden sind und die mit dafür gesorgt haben, dass meine Zeit in Berlin zu einer sehr schönen geworden ist. Mit dafür gesorgt haben insbesondere auch meine Schwester Johanna und mein guter Schulfreund Philip Utesch und deren Freundeskreise. Neben Christina Zeitz, die hier in Zürich nicht nur eine sehr gute Diskussionspartnerin und Freundin geblieben ist, möchte ich von den neu hinzugewonnenen Kollegen und Freunden in Zürich besonders Barbara Kloeckener-Gruissem und John Neidhardt erwähnen, die beide mit ihren unterschiedlichen Erfahrungen, die sie mir in vielen Diskussionen weiter gegeben haben, ihren Anteil an dem Erfolg dieser Arbeit haben. Bei Silke Feil möchte ich mich für die vielen praktischen und organisatorischen Tipps und Tricks in der täglichen Laborarbeit bedanken, die ich während der letzten fünf Jahre als direkter Labornachbar von ihr gelernt habe. Gleichzeitig möchte ich mich für die Aufmunterung und ihre stets offene Art bedanken, die unsere sehr gute Zusammenarbeit während dieser Zeit immer wieder bereichert hat. Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen meinen Kooperationspartnern aus den verschiedenen Laboren in Berlin, Uppsala, Mannheim/Heidelberg, Tübingen, und Gießen bedanken, ohne deren Expertise und Diskussionsbereitschaft ich viele der Erkenntnisse in dieser Arbeit nicht gewonnen hätte. Auch bei Stefanie Lammel und Daniel Korr, die ihre Diplomarbeiten, und bei Jens Ruschmann und Ruth White, die Praktika unter meiner Anleitung im Labor durchgeführt haben, möchte ich mich ganz herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit bedanken. Ganz besonders gilt mein Dank meiner Freundin Carolyn Lunt, die mir in den letzten Monaten immer wieder geduldig zugehört hat und mir mit ihrer Liebe die Kraft und Ausdauer gegeben hat, diese Arbeit abzuschließen.

# I. Inhaltsverzeichnis

|  |            |
|--|------------|
| <b>I. INHALTSVERZEICHNIS .....</b>   | <b>IV</b>  |
| <b>II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>   | <b>VII</b> |
| <b>III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>  | <b>IX</b>  |
| <b>1 EINLEITUNG.....</b>   | <b>1</b>   |
| 1.1 Die Anatomie des menschlichen Auges .....  | 1          |
| 1.1.1 Der Aufbau der Retina und deren Blutgefäßversorgung.....   | 2          |
| 1.2 Klinik und Genetik des Norrie-Syndroms .....   | 5          |
| 1.2.1 Das klinische Erscheinungsbild des Norrie-Syndroms .....   | 5          |
| 1.2.2 Das <i>NDP</i> -Gen und sein Mutationsspektrum in Patienten .....  | 7          |
| 1.2.3 Klinische Gemeinsamkeiten der allelischen Erkrankungen und deren genetische Grundlagen.....                              | 9          |
| 1.3 Eigenschaften des vorhergesagten NDP-Proteins (Norrin).....  | 12         |
| 1.4 Das <i>Ndph</i> -knockout-Mausmodell.....  | 15         |
| 1.4.1 Die Herstellung eines Mausmodells für das Norrie-Syndrom und die Expression des Norrie-Gens in Mausgewebe .....          | 15         |
| 1.4.2 Phänotypische Charakterisierung des Mausmodells .....  | 15         |
| 1.5 Die retinale Blutgefäßentwicklung in Mensch und Maus .....   | 17         |
| 1.5.1 Die Entwicklung der retinalen Blutgefäße in Mensch und Maus.....   | 17         |
| 1.5.2 Die Rolle der an der retinalen Blutgefäßentwicklung beteiligten Zelltypen .....  | 20         |
| 1.5.3 Die koordinierte Wirkung molekularer Signalwege in der Angiogenese.....  | 22         |
| 1.6 Zielsetzung der Arbeit .....   | 25         |
| <b>2 MATERIAL / METHODEN.....</b>  | <b>26</b>  |
| 2.1 Tiere.....   | 26         |
| 2.2 Gewebepräparation und histologische Techniken.....   | 26         |
| 2.2.1 Entnahme und Verarbeitung von Geweben.....   | 27         |
| 2.2.2 Fixierung und Paraffineinbettung von Gewebe.....   | 27         |
| 2.2.3 Hämalaun/Eosin-Färbung .....   | 27         |
| 2.3 DNA-Techniken .....  | 28         |
| 2.3.1 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren.....  | 30         |
| 2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) .....   | 30         |
| 2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA .....  | 31         |
| 2.3.4 Manipulation von DNA und Transformation von Bakterien.....   | 31         |
| 2.3.5 Sequenzierung.....   | 32         |
| 2.3.6 Isolation von DNA aus Mausschwanzbiopsien.....   | 33         |
| 2.3.7 PCR zur Genotypisierung des <i>Ndph</i> -Wildtyp- oder Knockout-Allels und zur Geschlechtsbestimmung ( <i>Sry</i> )..... | 33         |
| 2.4 RNA-Techniken.....   | 34         |
| 2.4.1 RNA-Extraktion.....  | 36         |
| 2.4.2 Quantifizierung der RNA.....   | 37         |
| 2.4.3 DNase I-Behandlung von Total-RNA.....  | 37         |
| 2.4.4 DNase I-Behandlung von Total-RNA (20 µg) mit anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion.....                            | 38         |
| 2.4.5 cDNA-Synthese .....  | 38         |
| 2.4.6 TaqMan-Real Time-PCR .....   | 39         |
| 2.4.7 Nicht radioaktive RNA- <i>in situ</i> Hybridisierung (DIG) auf Gewebeschnitten .....                                     | 40         |
| 2.4.8 Genexpressionsstudien mit Northern Blots oder <i>virtuellen</i> Northern Blots .....                                     | 46         |
| 2.4.9 Herstellen radioaktiv markierter DNA-Sonden und Hybridisierung von Nukleinsäureblots.....                                | 48         |
| 2.5 Herstellen einer SMART-cDNA-Subtraktionsbank .....   | 51         |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 2.5.1    | Erststrang-SMART-cDNA-Synthese (Smart PCR cDNA Synthesis Kit).....  | 56        |
| 2.5.2    | <i>RsaI</i> -Restriktion der SMART-cDNAs .....  | 58        |
| 2.5.3    | Herstellung des Drivers.....  | 59        |
| 2.5.4    | Herstellen der Tester .....   | 60        |
| 2.5.5    | Subtraktive Hybridisierung .....  | 62        |
| 2.5.6    | „Suppression PCR“-Amplifikation der differentiellen Tester cDNA-Fragmente .....                                     | 63        |
| 2.5.7    | Herstellen der Forward- und der Reverse-SMART-cDNA- Subtraktions-banken.....  | 65        |
| 2.6      | cDNA-Mikroarray-Techniken .....   | 66        |
| 2.6.1    | Amplifikation der SMART-cDNA-Subtraktionsbanken zur Herstellung von Mikroarrays.....                                | 68        |
| 2.6.2    | Herstellen der cDNA-Mikroarrays.....  | 69        |
| 2.6.3    | In dieser Arbeit hergestellte bzw. verwendete cDNA-Mikroarrays .....  | 70        |
| 2.6.4    | Vorbehandlung der Mikroarrays für die Hybridisierung.....   | 71        |
| 2.6.5    | Vorbereitung der Targets für die Markierung .....   | 72        |
| 2.6.6    | Markierung der Targets.....   | 73        |
| 2.6.7    | Kohybridisierung verschiedener Targets auf cDNA-Mikroarrays .....   | 76        |
| 2.6.8    | Waschen der Mikroarrays nach der Hybridisierung.....  | 78        |
| 2.6.9    | Bildgewinnung und Analyse der Mikroarraydaten .....   | 78        |
| 2.7      | Proteinbiochemische Methoden .....  | 79        |
| 2.7.1    | Proteinpräparation aus Gewebe.....  | 82        |
| 2.7.2    | Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay; 560 nm) .....                            | 83        |
| 2.7.3    | Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....   | 83        |
| 2.7.4    | Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen .....  | 84        |
| 2.7.5    | Transfer von Proteinen auf eine PVDF-Membran (Western Blot).....  | 84        |
| 2.7.6    | Rekombinante Ndh („Norrin“)-Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i> .....                                      | 85        |
| 2.7.7    | Affinitätschromatographische Aufreinigung des rekombinanten Proteins mit Ni-NTA-Agarose über einen RGS-His-Tag..... | 88        |
| 2.7.8    | Immunisierung von Kaninchen mit rekombinatem Norrin zur Antikörpergewinnung .....                                   | 89        |
| 2.7.9    | Renaturierung des rekombinanten WND-Proteins für die Verwendung in einem Cornea-Vaskularisations-Assay .....        | 89        |
| 2.8      | Datenbankanalysen und Computerprogramme.....  | 90        |
| <b>3</b> | <b>ERGEBNISSE</b> .....   | <b>91</b> |
| 3.1      | Globale Genexpressionsstudien in Augen von <i>Ndph</i> -knockout-Mäusen (p21) .....                                 | 91        |
| 3.1.1    | Herstellung einer Forward- und einer Reverse-cDNA-Subtraktionsbank.....   | 91        |
| 3.1.2    | Herstellung von cDNA-Mikroarrays.....   | 97        |
| 3.2      | cDNA-Mikroarray-Hybridisierungsexperimente zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen.....            | 100       |
| 3.2.1    | Vergleichende Datenanalyse der cDNA-Mikroarraydaten.....  | 104       |
| 3.2.2    | Verifizierung der Arraydaten mit Hilfe virtueller Northern Blots .....  | 112       |
| 3.3      | Die postnatale Entwicklung der retinalen Blutgefäße in <i>Ndph</i> -knockout-Mäusen.....                            | 113       |
| 3.3.1    | Histologische Untersuchung der Retinaentwicklung in <i>Ndph</i> -knockout-Mäusen.....                               | 113       |
| 3.3.2    | Expression von Angiogenesefaktoren während der postnatalen Retinaentwicklung .....                                  | 115       |
| 3.4      | Histologische Untersuchungen und Genexpressionsanalysen im Gehirn von <i>Ndph</i> -knockout-Mäusen.....             | 120       |
| 3.4.1    | Histologische Untersuchungen im Gehirn .....  | 120       |
| 3.4.2    | Analyse der Genexpression im Gehirn mit Hilfe eines cDNA-Mikroarrays.....   | 122       |
| 3.4.3    | Entwicklungsabhängige Transkription des Wachstumshormon-Gens im Gehirn.....   | 125       |
| 3.4.4    | Expression des Wachstumshormons in der Hypophyse.....   | 126       |
| 3.4.5    | Expression zweier Markergene in der Leber für die Gh-Serum-Wirkung .....  | 127       |
| 3.4.6    | Korrelation zwischen der mRNA-Expression von <i>Ndph</i> und <i>Gh</i> in verschiedenen Hirnregionen.....           | 129       |
| 3.4.7    | Untersuchungen zur Transkription von Gh in Auge und Retina .....  | 132       |
| 3.5      | Identifizierung eines aberranten <i>Ndph</i> -Transkripts in hemizygoten <i>Ndph</i> <sup>Y/-</sup> -Mäusen....     | 133       |
| 3.6      | Die Ursache der Infertilität von homozygoten <i>Ndph</i> <sup>-/-</sup> -Weibchen.....                              | 136       |

|  |            |
|--|------------|
| 3.6.1 Die Transmission des <i>Ndph</i> -knockout-Allels in der Knockout-Mauslinie.....   | 136        |
| 3.6.2 Histologische Studien an den Implantationsstellen/ Deziduae im Uterus von <i>Ndph</i> <sup>-/-</sup> -Weibchen<br>nach der Einnistung.....   | 137        |
| 3.6.3 Die Expression von <i>NDP/Ndph</i> in Reproduktionsorganen .....   | 139        |
| 3.7 Expression eines rekombinanten <i>Ndph</i> -Proteins (Norrin) in <i>Escherichia coli</i> .....   | 140        |
| 3.8 Herstellung polyklonaler Antikörper für Norrin.....  | 142        |
| 3.9 Cornea-Vaskularisations-Assay mit rekombinantem Norrin.....  | 145        |
| <b>4 DISKUSSION.....</b>   | <b>147</b> |
| 4.1 Untersuchungen zur Funktion des <i>Ndph</i> -Gens im Auge .....  | 147        |
| 4.1.1 Herstellung von cDNA-Subtraktionsbanken und deren Charakterisierung mit Hilfe der<br>Mikroarray-Technik .....  | 147        |
| 4.1.2 Die postnatale Retinaentwicklung in Wildtyp und in <i>Ndph</i> -knockout-Mäusen und die Hypoxie<br>als wesentlicher Pathogenesemechanismus des Norrie-Syndroms. ....                       | 149        |
| 4.1.3 Die molekulare Wirkung des <i>Ndph</i> -Gens im Auge.....  | 155        |
| 4.2 Die Untersuchungen zur Funktion des <i>Ndph</i> -Gens im Gehirn - Die Dysregulation des<br>Wachstumshormons im Gehirn könnte dem Phänotyp der mentalen Retardierung zu<br>Grunde liegen..... | 158        |
| 4.2.1 Histologische Untersuchung des Gehirns.....  | 158        |
| 4.2.2 Globale Genexpressionsstudien im Gehirn von Wildtyp- und <i>Ndph</i> -knockout-Mäusen .....  | 158        |
| 4.2.3 Differentielle Genexpression in verschiedenen Hirnregionen als mögliche Ursache der geistigen<br>Behinderung in Norrie-Patienten. ....   | 160        |
| 4.2.4 Die Detektion eines artifiziellen <i>Ndph</i> -Fusionstranskripts in <i>Ndph</i> -knockout-Mäusen und die<br>Konsequenzen für das Mausmodell. ....   | 163        |
| 4.3 Untersuchungen zur Rolle des Norrins für die Fertilität .....  | 164        |
| 4.3.1 Genotypenverteilung.....   | 165        |
| 4.3.2 Die Rolle des Norrins während der Dezidua-Bildung.....   | 165        |
| 4.4 Rekombinante Expression des Norrins und die Herstellung von Antikörper.....  | 167        |
| 4.5 Cornea-Vaskularisations-Assay.....   | 168        |
| 4.6 Die Pathogenese des Norrie-Syndroms und die molekulare Wirkung des Norrie<br>disease pseudoglioma-Gens/Proteins („Norrins“) - Ein Ausblick.....  | 169        |
| <b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>173</b> |
| <b>6 SUMMARY .....</b>   | <b>174</b> |
| <b>7 REFERENZEN .....</b>  | <b>175</b> |
| <b>8 VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>  | <b>184</b> |
| 8.1 Wissenschaftliche Veröffentlichungen.....  | 184        |
| 8.2 Kongressbeiträge .....   | 184        |
| <b>9 LEBENSLAUF .....</b>  | <b>186</b> |
| <b>10 ANHANG.....</b>  | <b>187</b> |
| 10.1 Korrelation der Phänotypen mit Substitutionsmutationen im <i>NDP</i> -Gen .....   | 187        |
| 10.2 In dieser Arbeit verwendete Primer.....   | 190        |
| 10.3 Sequenz des <i>Ndph</i> -knockout-Transkripts .....   | 193        |

## II. Abbildungsverzeichnis

| Abbildung            | Titel  | Seite      |
|----------------------|--|------------|
| <b>Abbildung 1:</b>  | Schichtengliederung des Augapfels (Bulbus oculi).....  | <b>2</b>   |
| <b>Abbildung 2:</b>  | Schichtenaufbau und Blutversorgung der Retina durch die Aderhaut (Chorioidea) und retinale Blutgefäße.....   | <b>3</b>   |
| <b>Abbildung 3:</b>  | Der okuläre Phänotyp des Norrie-Syndroms.....  | <b>6</b>   |
| <b>Abbildung 4:</b>  | Phänotypische Variabilität von Punktmutationen im <i>NDP</i> -Gen....  | <b>8</b>   |
| <b>Abbildung 5:</b>  | Proteinstrukturvorhersage für Norrin. ....   | <b>14</b>  |
| <b>Abbildung 6:</b>  | Entwicklung der retinalen Blutgefäße zwischen p0 und p8 visualisiert durch Fluoreszenzimmunhistochemie.....  | <b>19</b>  |
| <b>Abbildung 7:</b>  | Blutgefäßentwicklung in der Retina induziert durch Astrozyten und Müllerzellen (VEGF-Modell).....  | <b>21</b>  |
| <b>Abbildung 8:</b>  | Modell für die Regulation der Blutgefäßentwicklung, die Reifung und Aufrechterhaltung sowie die Umgestaltung („Remodelling“) existierender Blutgefäßsysteme durch VEGF-, Angiopoietin (Agpt/Ang)- und PDGF-Signalwege..... | <b>23</b>  |
| <b>Abbildung 9:</b>  | Übersichtsschema für die PCR-basierte SMART-cDNA-Subtraktion ("suppression subtractive hybridization").....  | <b>53</b>  |
| <b>Abbildung 10:</b> | Kontrolle der Vergleichbarkeit der SMART-cDNA-Synthese mittels Virtueller Northern Blot-Hybridisierung.....  | <b>92</b>  |
| <b>Abbildung 11:</b> | Auftrennung der Subtraktionsprodukte auf einem 2%igen Agarosegel.....  | <b>93</b>  |
| <b>Abbildung 12:</b> | Hybridisierungsanalyse der Subtraktionseffizienz.....  | <b>95</b>  |
| <b>Abbildung 13:</b> | Analyse der Subtraktionseffizienz mittels <i>Gapd</i> -PCR.....  | <b>96</b>  |
| <b>Abbildung 14:</b> | Qualitätsbewertung der Amplifikation der Subtraktionsbanken....  | <b>98</b>  |
| <b>Abbildung 15:</b> | Kohybridisierung von Cy3- und Cy5-markierten SMART-cDNA-Subtraktionsprodukten.....   | <b>101</b> |
| <b>Abbildung 16:</b> | Arrayhybridisierungsexperimente für cDNA-Subtraktionsprodukte und Total-RNA.....   | <b>105</b> |
| <b>Abbildung 17:</b> | Arrayhybridisierungsexperimente - Farbtauschexperimente für SMART-cDNAs.....   | <b>107</b> |
| <b>Abbildung 18:</b> | <i>Virtuelle</i> Northern Blots als unabhängige Verifikationsmethode für die Mikroarrayexperimente.....  | <b>112</b> |
| <b>Abbildung 19:</b> | Hämalaun-Eosin-Färbungen von sagittalen Schnitten des Auges von Wildtyp- und <i>Ndph</i> -knockout-Mäusen der Stadien p5, p10, p15 und p21 (n = 2).....  | <b>114</b> |
| <b>Abbildung 20:</b> | Relative Expression von Angiogenesefaktoren in Retinae von <i>Ndph</i> -knockout-Tieren relativ zu den Wildtyp-Transkriptmengen in den Stadien p5 (A), p10 (B), p15 (C) und p21 (D).....                                   | <b>116</b> |
| <b>Abbildung 21:</b> | Entwicklungsabhängiger Verlauf der Expression in der Retina von Ligand- und Rezeptor-Paaren ausgewählter, angiogener Signalwege.....   | <b>117</b> |
| <b>Abbildung 22:</b> | Hämalaun-Eosin-Färbungen von Wildtyp- und <i>Ndph</i> <sup>+/+</sup> -Gehirnen verschiedener Altersstadien.....  | <b>121</b> |

|                      |  |            |
|----------------------|--|------------|
| <b>Abbildung 23:</b> | Expressionsuntersuchung der Kandidatengene mittels RT-PCR....  | <b>124</b> |
| <b>Abbildung 24:</b> | Entwicklungsabhängige Expression des Wachstumshormons ( <i>Gh</i> ) im Gehirn von <i>Ndph</i> <sup>y/+</sup> (Wt)- im Vergleich zu <i>Ndph</i> <sup>y/-</sup> (Ko)-Mäusen.....   | <b>125</b> |
| <b>Abbildung 25:</b> | Expression des Wachstumshormons in der Hypophyse.....  | <b>126</b> |
| <b>Abbildung 26:</b> | RNA- <i>in situ</i> Hybridisierung für Wachstumshormon ( <i>Gh</i> ) auf Schnitten der Hypophyse von Mäusen im Alter von 6 Monaten....   | <b>127</b> |
| <b>Abbildung 27:</b> | Expression zweier durch Serum-Wachstumshormonspiegel regulierter Gene in der Leber.....  | <b>128</b> |
| <b>Abbildung 28:</b> | Relative Expression von <i>Ndph</i> und <i>Gh</i> im Kleinhirn, Kortex, Hippokampus, olfaktorischer Bulbus, Hirnstamm und Hypophyse von Wildtyp- und Knockout-Mäusen.....  | <b>130</b> |
| <b>Abbildung 29:</b> | Expression der Wachstumshormon ( <i>Gh</i> )-RNA in Gehirn, Auge und Retina.....   | <b>132</b> |
| <b>Abbildung 30:</b> | Northern Blot mit PolyA <sup>+</sup> -RNA aus Gesamthirn, hybridisiert mit der Maus- <i>Ndph</i> -cDNA.....  | <b>133</b> |
| <b>Abbildung 31:</b> | Genstruktur, Transkription und Translation des <i>Ndph</i> -Locus in Wildtyp und <i>Ndph</i> <sup>y/-</sup> -knockout-Mäusen.....  | <b>135</b> |
| <b>Abbildung 32:</b> | Präparation eines <i>Ndph</i> <sup>y/-</sup> -Weibchen am Tag E12 der Schwangerschaft. ....  | <b>137</b> |
| <b>Abbildung 33:</b> | HE-Färbungen der Implantationsstellen an verschiedenen Tagen der Embryonalentwicklung in <i>Ndph</i> <sup>y/-</sup> -Weibchen im Vergleich zu Kontrollen ( <i>Ndph</i> <sup>y/+</sup> oder <i>Ndph</i> <sup>y/+</sup> )..... | <b>138</b> |
| <b>Abbildung 34:</b> | RT-PCR-Expressionsanalyse für <i>Ndph</i> in zwei Maus-Deziduae von Tag E7 und für <i>NDP</i> in humaner Plazenta.....   | <b>139</b> |
| <b>Abbildung 35:</b> | Expressionskonstrukte in pQE30 für die rekombinante Expression von Norrin in <i>Escherichia coli</i> .....   | <b>141</b> |
| <b>Abbildung 36:</b> | Nachweis der affinitätschromatographisch aufgereinigten Proteine WND und NND durch Silberfärbung von SDS Gelen und durch Western Blot.....   | <b>142</b> |
| <b>Abbildung 37:</b> | Nachweis der rekombinant exprimierten Proteine WND und NND in <i>E.coli</i> -Rohlysaten mit Hilfe der polyklonalen Immunsereen 1378 (NND), 1379 (NND), 1201 (WND) und 1202 (WND).....  | <b>143</b> |
| <b>Abbildung 38:</b> | Western Blot Analysen von Gewebehomogenaten aus Gehirn und Retina mit den Immunsereen 1378 (NND), 1379 (NND) und 1202 (WND).....   | <b>144</b> |
| <b>Abbildung 39:</b> | Reinheit und Spezifität des rekombinanten Norrins/WND und Cornea-Vaskularisations-Assay in Ratten.....   | <b>145</b> |

### III. Abkürzungsverzeichnis

|                    |   |
|--------------------|---|
| μ                  | mikro ( $10^{-6}$ )   |
| μCi                | Ci = Curie (Einheit der radioaktiven Aktivität<br>1 Ci = 37 GBq = $3,7 \times 10^{10}$ Bq (Zerfälle/sek)) |
| °C                 | Grad Celsius  |
| A                  | Adenin  |
| amp                | Ampicillin  |
| bp                 | Basenpaare  |
| BSA                | Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )   |
| C                  | Cytosin   |
| cDNA               | komplementäre DNA (complementary)   |
| ddH <sub>2</sub> O | Bidestilliertes Wasser  |
| DEPC               | Diethylpyrocarbonat   |
| dH <sub>2</sub> O  | Einfach destilliertes Wasser  |
| DIG                | Digoxygenin   |
| DNA                | Desoxyribonukleinsäure  |
| dNTP               | 2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat   |
| DTT                | Dithiotreitol   |
| EDTA               | Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz; Na <sub>2</sub> EDTA   |
| FA                 | Formaldehyd   |
| G                  | Guanin  |
| G                  | Giga ( $10^9$ )   |
| g                  | Gramm   |
| h                  | Stunde  |
| IPTG               | Isopropylthio-β-D-galactosid  |
| J                  | Joule   |
| k                  | kilo ( $10^3$ )   |
| kan                | Kanamycin   |
| l                  | Liter   |
| LB                 | Luria Bertani   |
| m                  | milli ( $10^{-3}$ )   |
| M                  | Molar (mol/l)   |
| min                | Minute(n)   |
| mind.              | Mindestens  |
| mRNA               | <i>Messenger</i> Ribonukleinsäure   |
| n                  | nano ( $10^{-9}$ )  |
| NH <sub>4</sub> OH | Ammoniumhydroxid  |
| OD                 | Optische Dichte   |
| p                  | pico ( $10^{-12}$ )   |
| p                  | Tag nach der Geburt ( <i>postnatal day</i> )  |
| PA                 | Polyacrylamid   |
| PBS                | Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)   |
| PCR                | Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )  |
| PE                 | Perkin Elmer  |
| PFA                | Paraformaldehyd   |
| RNA                | Ribonukleinsäure  |
| RT                 | Reverse Transkriptase   |
| rxn                | Reaktionen (reactions)  |
| SDS                | Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )  |
| sek                | Sekunde   |

---

|            |  |
|------------|--|
| T          | Thymin   |
| TAE-Puffer | Tris Acetat EDTA                                 |
| <i>Taq</i> | <i>Thermophilus aquaticus</i>                    |
| <i>Pfu</i> | <i>Pyrococcus furiosus</i>                       |
| TEMED      | N,N,N',N'-Tetramethylenmethyldiamin              |
| TE-Puffer  | Tris-EDTA-Puffer                                 |
| Tris       | Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan                  |
| U          | Unit = 1 Einheit (Angabe der Enzymaktivität)     |
| Upm        | Umdrehungen pro Minute                           |
| UV         | Ultraviolettes Licht                             |
| V          | Volt   |
| x g        | x-fache der Erdbeschleunigung g                  |
| X-Gal      | 5-Bromo-4-Chloro-3-indoyl- $\beta$ -D-galactosid |