

3 Ergebnisse

Die in dieser Doktorarbeit gewonnenen Ergebnisse zur Pathophysiologie der Norrie-Krankheit sind im Folgenden anhand der untersuchten Organe der *Ndph*^{-/-}-knockout-Mäuse gegliedert. Zunächst werden die Studien dargestellt, die sich mit den molekularen Grundlagen der Blindheit und so mit dem Phänotyp im Auge bzw. der Retina befassen. Anschließend folgen die Untersuchungen am Gehirn und spezifischen Hirnregionen sowie die Ergebnisse zur Infertilität der homozygoten *Ndph*^{-/-}-Weibchen. Zum Schluss werden die Ergebnisse der rekombinanten Expression des Norrie disease-Proteins (Norrin) in *Escherichia coli* geschildert sowie dessen Verwendung zur Antikörpergewinnung und in einem Cornea-Vaskularisations-Assay in Ratten.

3.1 Globale Genexpressionsstudien in Augen von *Ndph*-knockout-Mäusen (p21)

Zur Untersuchung von Veränderungen im Genexpressionsmuster in Augen von *Ndph*-knockout-Mäusen wurde die cDNA-Subtraktion in Kombination mit der cDNA-Mikroarray-Technologie angewandt.

3.1.1 Herstellung einer Forward- und einer Reverse-cDNA-Subtraktionsbank

Die cDNA-Subtraktion ermöglicht die Anreicherung differentiell exprimierter cDNA-Fragmente zweier zu vergleichender RNA-Populationen mittels subtraktiver Hybridisierung, die kombiniert ist mit einer „Suppression-PCR“ (2.5). Die Klonierung der Forward- und Reverse-Subtraktionsprodukte und die Herstellung eines cDNA-Mikroarrays mit den erhaltenen Klonen ermöglicht anschließend die effektive Identifizierung von differentiell exprimierten cDNAs aus den beiden Subtraktionsbanken und erleichterte somit deren Charakterisierung.

Hier wurden zwei RNA-Populationen verglichen, die jeweils aus den kompletten Augen von je drei Wildtyp- bzw. drei *Ndph*-knockout-Tieren erhalten wurden. Mit dem postnatalen Entwicklungsstadium p21 wurde ein vergleichbar frühes Altersstadium innerhalb des Pathogeneseprozesses gewählt, an dem die Entwicklung des Auges kurz vor dem Abschluss steht. Dies sollte ermöglichen, frühe Veränderungen in der Expression von Genen zu identifizieren und so Rückschlüsse auf primäre Pathogenesemechanismen zulassen. Da die *Ndph*-Expression in Tieren des Altersstadiums p14 ein im Vergleich zu den späten Embryonalstadien höheres Niveau zeigt (Berger et al., 1996), sollte ausgehend von diesem

Zeitpunkt die Entwicklung noch etwas fortschreiten, um eine Manifestation der Genexpressionsunterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Tieren zu ermöglichen und so die Chance zu erhöhen, diese zu identifizieren.

Die drei Total-RNA-Proben gleichen Genotyps (Wildtyp bzw. *Ndph*-Knockout) wurden je in gleichem Verhältnis vereinigt, DNase I-behandelt (2.4.4) und für die SMART-cDNA-Synthese (2.5.1. und 2.5.2) verwendet. Parallel zu diesen beiden präparierten RNAs wurde als Kontroll-RNA eine Total-RNA aus humaner Plazenta für die SMART-cDNA-Synthese verwendet. Je sechs einzelne cDNA-Synthese-PCRs (2.5.2) für die beiden experimentellen RNAs und zwei für die Plazenta-Kontroll-RNA wurden angesetzt. Für die experimentellen SMART-cDNAs wurde der Erfolg der Synthese mit Hilfe eines *virtuellen* Northern Blots (2.4.8.3) überprüft, der mit einer ^{32}P -markierten Sonde (2.4.9.1) aus der cDNA der cAMP-abhängigen Proteinkinase hybridisiert wurde, welche ein gleiches Expressionsniveau im Wildtyp und im Knockout aufweist (Abbildung 10).

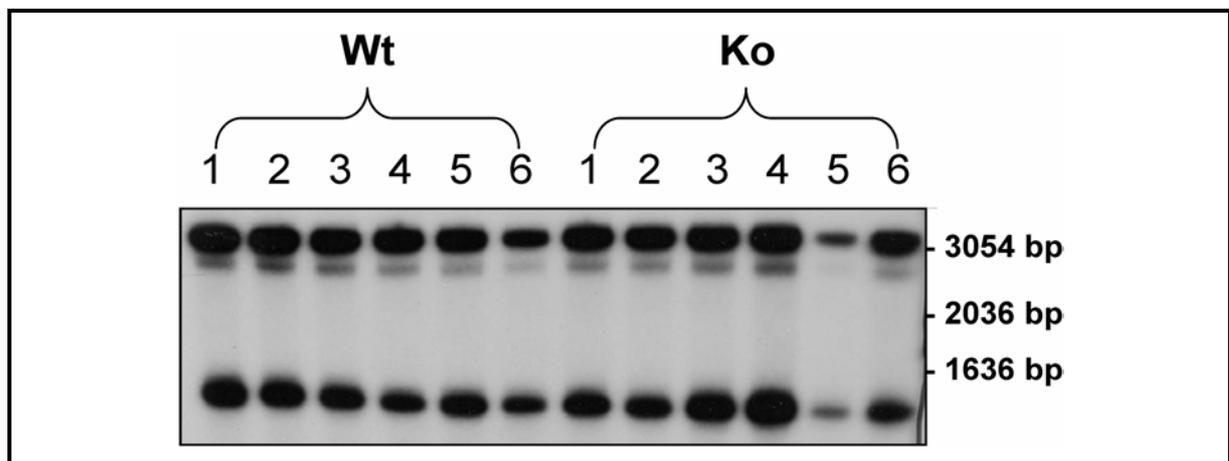


Abbildung 10: Kontrolle der Vergleichbarkeit der SMART-cDNA-Synthese mittels *Virtueller* Northern Blot-Hybridisierung. Dargestellt ist das Autoradiogramm des mit der Kontrollsonde (cAMP-abhängige Proteinkinase) hybridisierten *virtuellen* Northern Blots. Auf der Membran befanden sich jeweils 15 μl Aliquots der einzelnen sechs Wildtyp- bzw. der sechs Knockout-SMART-cDNA-Synthese-Ansätze, die nach 17 Zyklen beendet wurden. Die Sonde ergibt zwei Signale vergleichbarer Intensität. Da die Signalintensität in fast allen Proben etwa ein gleiches Niveau zeigte, kann von einem vergleichbaren Verlauf der PCR in den Einzelansätzen ausgegangen werden. Allein der Ansatz 5 der Knockout-SMART-cDNA-Synthese zeigt eine deutlich geringere Intensität. Daher wurde dieser Ansatz nicht für die Subtraktion verwendet und die Knockout-Ansätze 1, 2, 3, 4 und 6 vereinigt. Um eine vergleichbare Wildtyp-Probe zu verwenden, wurden die Ansätze 1, 2, 3, 4 und 5 gepoolt.

Anhand des Autoradiogramms (Abbildung 10) war zu erkennen, dass die Reaktionen in den einzelnen Reaktionsgefäßen vergleichbar verlaufen waren. Daher konnten die Ansätze, die Signale gleicher Intensität zeigten, vereinigt werden und für die weiteren experimentellen Schritte der cDNA-Subtraktion (2.5) verwendet werden.

In meinen Untersuchungen wurden die SMART-cDNA-Populationen aus Wildtyp- und Knockout-Tieren miteinander verglichen, wobei in der cDNA-Subtraktion beide Orientierungen (Forward: Wildtyp vs. Knockout und Reverse: Knockout vs. Wildtyp) untersucht werden sollten. Außerdem wurde die Plazenta-SMART-cDNA für die cDNA-Subtraktion eingesetzt, die als eine parallele Kontrolle für die Experimente diente. Nachdem für alle drei cDNA-Populationen die „Driver“ hergestellt worden waren (2.5.3), wurden dann auch für alle drei die „Tester“ generiert (2.5.4), um die Forward- und die Reverse-Subtraktion sowie die Kontroll-Subtraktion durchführen zu können. In der Forward-Subtraktion (Tester: Wildtyp) werden alle cDNA-Fragmente angereichert, die im Wildtyp ausschließlich oder sehr hoch exprimiert im Vergleich zum *Ndph*-Knockout auftreten. In der Reverse-Subtraktion (Tester: *Ndph*-Knockout) erfolgte eine Anreicherung aller Transkripte, die im Wildtyp fehlen oder im *Ndph*-Knockout stark reduziert verglichen zum Wildtyp exprimiert sind. Nach der Kontrollsubtraktion mit der Plazenta-cDNA als Tester und Driver sollten nur die zuvor dem Tester zugesetzten, viralen ϕ X174 *Hae*III-DNA-Fragmente nachzuweisen sein, da in den zwei subtraktiven Hybridisierungsschritten (2.5.5) und der folgenden Suppression-PCR (2.5.6) alle Plazenta-cDNA-Fragmente eliminiert werden sollten. Die erhaltenen drei Subtraktionsprodukte (Forward, Reverse und Kontrolle) wurden im Vergleich zu nicht subtrahierten Proben analysiert (Abbildung 11).

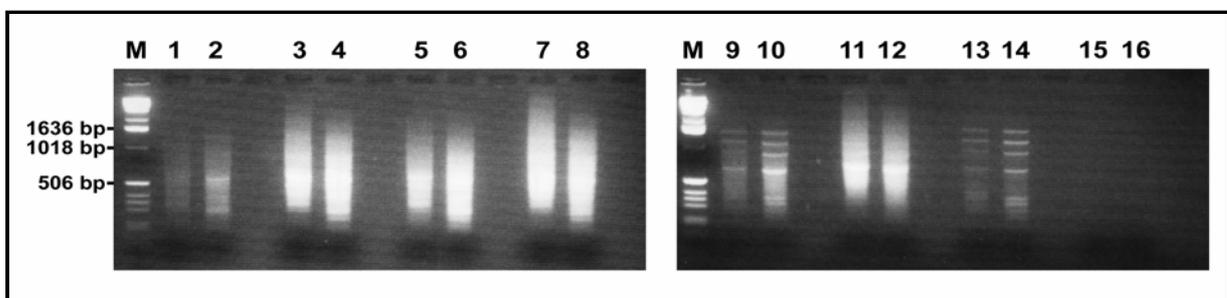


Abbildung 11: Auftrennung der Subtraktionsprodukte auf einem 2%igen Agarosegel. M: 500 ng 1 kb-DNA-Leiter; 1: 1. PCR der Forward-Subtraktion; 2: „nested PCR“ der Forward-Subtraktion; 3: 1. PCR der nicht subtrahierten Kontrolle (Forward); 4: „nested PCR“ der nicht subtrahierten Kontrolle (Forward); 5: 1. PCR der Reverse-Subtraktion; 6: „nested PCR“ der Reverse-Subtraktion; 7: 1. PCR der nicht subtrahierten Kontrolle (Reverse); 8: „nested PCR“ der nicht subtrahierten Kontrolle (Reverse); 9: 1. PCR der Subtraktion hPlazenta/ Φ X174*Hae*III-Kontrolle; 10: „nested PCR“ Subtraktion hPlazenta/ Φ X174*Hae*III-Kontrolle; 11: 1. PCR der nicht subtrahierte hPlazenta/ Φ X174*Hae*III-Kontrolle; 12: „nested PCR“ der nicht subtrahierte hPlazenta/ Φ X174*Hae*III-Kontrolle; 13: 1. PCR der Subtraktionskontrolle Φ X174*Hae*III-Mix aus dem Kit; 14: „nested PCR“ Subtraktionskontrolle Φ X174*Hae*III-Mix aus dem Kit; 15: 1. PCR Nullkontrolle; 16: „nested PCR“ Nullkontrolle.

Dieser Vergleich zeigte, dass die cDNA-Subtraktion erfolgreich war. Das wird besonders deutlich durch den Vergleich der nicht subtrahierten Kontroll-cDNAs (Bahnen 11 und 12) mit den entsprechenden subtrahierten Proben (Bahnen 9 und 10). Wie erwartet, waren vor der

Subtraktion die Banden der zugesetzten *HaeIII*-verdauten Φ X174-DNA in einem Hintergrund-„Schmier“ von humaner Plazenta-cDNA kaum zu erkennen, während sie nach der Subtraktion deutlich angereichert vorlagen. Auch der Vergleich mit den PCR-Produkten der Subtraktionskontrolle aus dem SMART-cDNA-Subtraktionskit (Bahnen 13 (1.PCR) und 14 („nested PCR“)) bestätigte eine erfolgreich verlaufene Anreicherung nach zwei PCR-Schritten. Sowohl für die Forward-Subtraktion (Bahnen 1 und 2) als auch für die Reverse-Subtraktion (Bahnen 5 und 6) konnten die erwarteten PCR-Produkte auf dem Agarosegel beobachtet werden, wobei die „nested PCR“-Produkte kleinere Fragmentgrößen aufwiesen. Für die Forward-Subtraktion ergab der Vergleich der nicht subtrahierten Kontrollen (Bahnen 3 und 4) mit den subtrahierten (Bahnen 1 und 2) zusätzlich eine Abnahme in der Intensität der subtrahierten gegenüber den nicht subtrahierten PCR-Produkten, was ebenfalls für einen erfolgreichen Verlauf der Subtraktion sprach, während dieser Intensitätsunterschied in der Reverse-Subtraktion nicht so eindeutig war.

Bevor die Subtraktionsprodukte („nested PCR“-Produkte) kloniert wurden, wurde die Effizienz der Subtraktion zusätzlich mit Hilfe von *virtuellen* Northern Blots und PCR (2.3.2) getestet. Die Subtraktionsprodukte wurden analog zur Herstellung der *virtuellen* Northern Blots auf Nylonmembranen transferiert (2.4.8.3) und diese dann mit drei verschiedenen, radioaktiv markierten Sonden hybridisiert. Dabei diente die *Ndph*-Sonde als Kontrolle für die Anreicherung der ausschließlich im Wildtyp vorhandenen Transkripte, während die Sonde K405 die Anreicherung von cDNA-Fragmenten nachwies, die im *Ndph*-knockout-Auge deutlich stärker vorhanden waren. *Gapd* diente beispielhaft als Sonde für ein Haushaltsgen, dessen Repräsentanz durch die Subtraktion deutlich verringert sein sollte, da es sowohl im Tester als auch im Driver gleichermaßen häufig auftrat und daher „subtrahiert“ werden sollte (Abbildung 12).

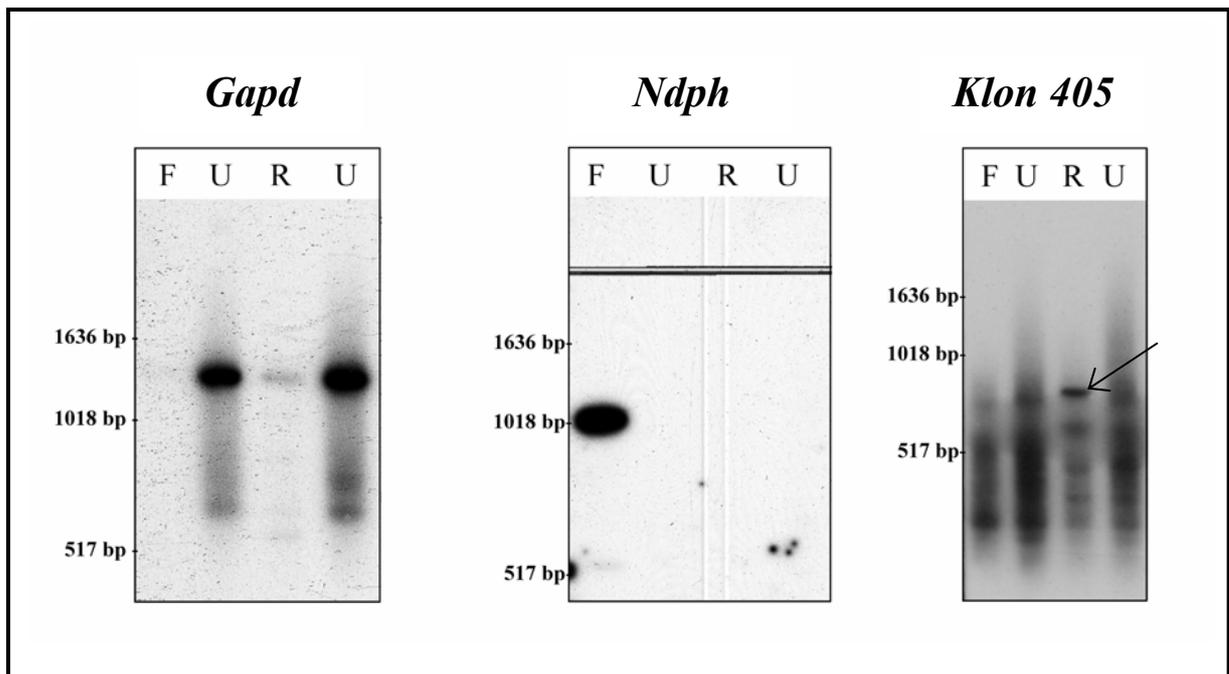


Abbildung 12: Hybridisierungsanalyse der Subtraktionseffizienz. Es sind drei Autoradiogramme von Southern Blots dargestellt, auf denen jeweils 5 μ l der Subtraktionsprodukte nach gelelektrophoretischer Auftrennung immobilisiert sind (2.4.8.3). Dabei wurde die gleichmäßige Beladung der Agarosegele und damit näherungsweise auch der Membranen durch eine Ethidiumbromid-Färbung der Gele nachgewiesen. F: Forward-Subtraktionsprodukt; U unsubtrahierte Tester-Kontrolle für das jeweilige Subtraktionsprodukt; R: Reverse-Subtraktionsprodukt. Die jeweils verwendete 32 P-markierte Sonde ist oberhalb des Blots angegeben. Für *Gapd*, als nicht reguliertem Haushaltsgen, zeigt sich, wie erwartet, eine verringerte Repräsentanz in beiden Subtraktionsprodukten. *Ndph* diente als Kontrolle für ein Transkript, welches in der Forward-Subtraktion angereichert werden sollte, da es nur im Wildtyp-Tester vorhanden ist. Der Klon 405 ist ein cDNA-Fragment, welches im *Ndph*-knockout-Tester in höherer Konzentration vorliegt (nicht publizierte Daten), so dass man eine Anreicherung im Reverse-Subtraktionsprodukt beobachten kann (\rightarrow). Die Signale entsprechen den Größen der *RsaI*-Fragmente der cDNA des jeweiligen Transkripts.

Die drei Southern Blots zeigten, dass sowohl die Forward- als auch die Reverse-Subtraktion zu einer Anreicherung differenziell exprimierter cDNA-Fragmente geführt hat (*Ndph* im Forward-Subtraktionsprodukt und Klon K405 im Reverse-Subtraktionsprodukt). Auch die erwartete Verringerung der Repräsentanz des nicht unterschiedlich exprimierten Gens *Gapd* konnte gezeigt werden. Daraus lässt sich folgern, dass die Subtraktion erfolgreich war.

Eine zusätzliche Bestätigung der Verringerung der relativen Menge der *Gapd*-cDNA in den Subtraktionsprodukten ergab sich durch eine Analyse der Subtraktionseffizienz mit Hilfe einer PCR. Dazu wurde eine PCR mit *Gapd*-Primern (G3PDH5' und G3PDH3') durchgeführt und nach 18, 23, 28 und 33 Zyklen jeweils ein 5 μ l Aliquot entnommen und auf einem 2%igen Agarosegel analysiert (Abbildung 13). Als Template für diese *Gapd*-PCR wurde jeweils das „nested PCR“-Produkt, d.h. sowohl die Subtraktionsprodukte als auch die

Produkte der nicht subtrahierten Kontrollen, verwendet. Dies wurde jeweils für die Forward- und die Reverse-Subtraktion sowie für die Kontroll-Subtraktion mit humaner Plazenta-cDNA durchgeführt.

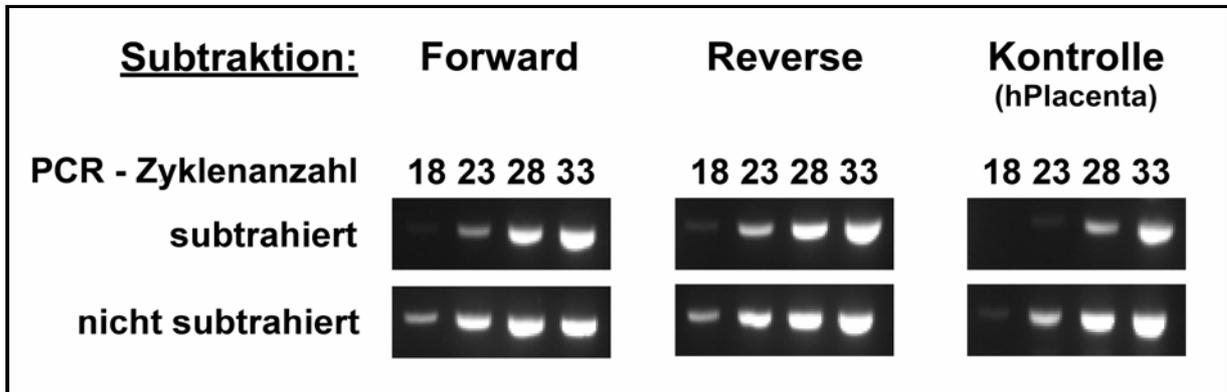


Abbildung 13: Analyse der Subtraktionseffizienz mittels *Gapd*-PCR. Dargestellt sind für die drei Subtraktionsexperimente (Forward, Reverse und Kontrolle) jeweils die *Gapd*-PCR-Produkte nach 18, 23, 28 und 33 PCR-Zyklen für die subtrahierten und die nicht subtrahierten Kontrollproben. Die verringerte Repräsentanz des *Gapd*-Transkripts in den Subtraktionsprodukten nach der subtraktiven Hybridisierung ist daran zu erkennen, dass erst etwa 5 Zyklen später, als in den nicht subtrahierten Proben, eine Bande vergleichbarer Intensität sichtbar wird. Die Menge des Transkripts wurde durch die Subtraktion etwa 32fach (2^5) reduziert. Diese Aussage ist nur möglich, wenn die PCR-Bedingungen optimal waren und so pro Zyklus eine Verdopplung des PCR-Produktes erfolgte.

Diese Analyse wies in allen drei Subtraktionsansätze die reduzierte Repräsentanz des *Gapd*-Transkripts durch die subtraktive Hybridisierung nach, so dass auch dieses Kontrollexperiment, genau wie die Hybridisierungskontrollen (Abbildung 12) und die internen Kontrollen während der Subtraktion (Abbildung 11) einen erfolgreichen Verlauf der Subtraktion nahe legte. Daher wurden die in der „nested PCR“ erhaltenen Subtraktionsprodukte der zwei Orientierungen der cDNA-Subtraktion (Forward und Reverse) für die Klonierung und Herstellung der cDNA-Subtraktionsbanken verwendet, die mit Hilfe der Mikroarray-Technologie charakterisiert werden sollten.

3.1.1.1 Klonierung des Subtraktionsproduktes

Diese Subtraktionsprodukte wurden mit Hilfe eines TA-Klonierungssystems direkt in den Vektor pGem- T Easy (pGEM-T Easy Vector Systems; Promega) kloniert (2.5.7). Nach der Ligation wurden die Forward- und die Reverse-Subtraktionsprodukte durch Elektroporation in XL1Blue elektrokompente Zellen transformiert und auf LB/amp-Platten ausplattiert. Durch die Verwendung des IPTG/X-Gal-Systems war es anschließend möglich, die Klone mit und ohne Insert auf den Platten zu unterscheiden. Es wurden pro Platte etwa 6000 Klone

ausplattiert, von denen etwa zwei Drittel keine Farbreaktion zeigten, d.h. sie trugen Inserts. Von diesen Klonen wurden anschließend 1056 (11 x 96) aus der Forward- und 1056 (11 x 96) aus der Reverse-Subtraktionsbank „gepickt“ und Glycerolkulturen angelegt.

Damit waren in dieser Arbeit zwei cDNA-Subtraktionsbanken (eine Forward- und eine Reverse-Subtraktionsbank) angelegt worden, die die differentiell exprimierten Gene aus den Wildtyp (Forward)- und den *Ndph*-knockout-Tieren (Reverse) enthalten sollten. Dabei lagen 16-17% dieser Klone physikalisch vor, womit ein repräsentativer Anteil der Klone für weitere Experimente zur Verfügung stand. Diese Experimente sollten zur Charakterisierung der Banken und zur Identifizierung der differentiell exprimierten Gene dienen und mit Hilfe der Mikroarray-Technologie durchgeführt werden.

3.1.2 Herstellung von cDNA-Mikroarrays

Die Inserts der einzelnen Klone wurden mit Hilfe von Kolonie-PCR mit Insert-flankierenden Vektorprimern (Forward: M13–20tg; Revers: M13-rev) amplifiziert (2.6.1) und anschließend je ein Aliquot eines jeden PCR-Ansatzes auf einem 1,2%igen Agarosegel analysiert. Die Qualität der PCR-Produkte wurde mit Hilfe des folgenden Zahlenkodes bewertet:

- 0 = „well“ leer
- 1 = PCR ist ok.
- 2 = Pickfehler
- 3 = Im Medium nicht angewachsen.
- 4 = PCR negativ
- 5 = PCR schwach
- 6 = Kontamination (2 oder mehr Banden)
- 7 = „Schmier“; unspezifische PCR
- 8 = leer, da bestimmte Klone von den Kontrollplatten nicht mit den verwendeten Primern amplifiziert werden konnten.

Beispielhaft sollen hier die Ergebnisse dieser Bewertung für die Klone „F1–73“ bis „F1–96“ dargestellt werden, wobei F für Forward-Subtraktionsbank und 1 für die Plattennummer stehen. Die Ziffern 73 bis 96 entsprechen den Plattenpositionen G1 bis G12 bzw. H1 bis H12 (Abbildung 14).

Klonbezeichnung	F1-73	F1-74	F1-75	F1-76	F1-77	F1-78	F1-79	F1-80	F1-81	F1-82	F1-83	F1-84	F1-85	F1-86	F1-87	F1-88	F1-89	F1-90	F1-91	F1-92	F1-93	F1-94	F1-95	F1-96
Plattenposition	G1	H1	G2	H2	G3	H3	G4	H4	G5	H5	G6	H6	G7	H7	G8	H8	G9	H9	G10	H10	G11	H11	G12	H12
Bewertungskode	1	1	1	1	1	5	5	1	5	1	1	1	1	1	6	1	1	1	5	6	5	6	1	1

Abbildung 14: Qualitätsbewertung der Amplifikation der Subtraktionsbanken. Kolonie-PCR-Produkte von den Klonen F1-73 bis F1-96 auf einem 1,2%igen Agarosegel. Oberhalb des Gels sind die jeweiligen Bewertungen der PCR mit Hilfe des PCR-Kodes zusammen mit der Plattenposition wiedergegeben. (0 = „well“ leer; 1 = PCR positiv; 2 = Pickfehler; 3 = Im Medium nicht angewachsen.; 4 = PCR negativ; 5 = PCR schwach; 6 = Kontamination (2 oder mehr Banden). Die Ziffern 0, 2, 3, und 4 des Bewertungskodes sind in diesem Beispiel nicht vergeben worden.

Vergleichbar zu dem Vorgehen mit diesen Klonen wurden alle anderen PCR-Produkte ebenfalls bewertet und diese Bewertung in der entsprechenden GIPO (**gene in plate order**)-Datei dokumentiert. Diese Datei diente insbesondere dazu, nach dem Spotten der DNA auf die Glasobjektträger (Mikroarrays, 2.6.2) darüber informiert zu sein, wo auf den Mikroarray die PCR-Produkte gespottet wurden und wie die Qualität eines jeden gespotteten PCR-Produktes war, so dass bei einem Signal überprüft werden konnte, ob die Hybridisierung mit dem PCR-Produkt spezifisch war oder nicht.

Die SMART-cDNA-Subtraktionsbanken und die PCR-Produkte der verwendeten Kontrollgene befanden sich in insgesamt 27 96-well-Mikrotiterkulturplatten (11 x Forward Subtraktionsbank; 11 x Reverse Subtraktionsbank; 5 x Kontrollen). Die Herkunft der einzelnen Klone und die Bewertung aller PCR-Produkte, die auf den *Ndph*-p21-cDNA-Subtraktionsbanken-Mikroarray (2.6.3) transferiert worden sind, sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 50) zusammengefasst.

Tabelle 50: Zusammenfassung der Bewertung der PCR-Produkte des *Ndph-p21*-cDNA-Subtraktionsbanken-Mikroarrays. Die Klone für die Pflanzenspezifischen Kontrollen wurden freundlicherweise von F. Thümmler, Ls. f. Pflanzenbau und -züchtung und H. Eickhoff, MPI für Molekulare Genetik zur Verfügung gestellt.

Herkunft der Klone	Klone	Anzahl der PCR – Produkte pro Bewertungskode
Forward-Subtraktionsbank	1056	1 (PCR positiv) 877 5 (PCR schwach) 84 4 (PCR negativ) 16 6 (Kontamination) 37 7 (PCR unspezifisch) 42
Reverse-Subtraktionsbank	1056	1 (PCR positiv) 921 5 (PCR schwach) 15 4 (PCR negativ) 5 6 (Kontamination) 110 7 (PCR unspezifisch) 5
IMAGE-cDNA-Klonsammlung (amp-resistant); RZPD-cDNA-Bibliothek 998	Haushalts-Gene/ Kontrollen	1 (PCR positiv) 172 5 (PCR schwach) 15 4 (PCR negativ) 6 6 (Kontamination) 33 7 (PCR unspezifisch) 4
	Klone mit FL3-Primer-Sequenzen	8 (PCR leer) 154
Pflanzenspezifische cDNA-Klone (Gerste und Mauerblümchen)	2 x 17 Kontrollen (15x Gerste; 2 x Arabidopsis)	1 (PCR positiv) 23 x Gerste 5 (PCR schwach) 7 x Gerste + 4 x Arabidopsis
Leere Positionen (in den Glycerolstocks)	62	0 („well“ leer) 62
Zusammenfassung	2592 Klone (27 x 96)	<u>Spezifische PCR – Produkte:</u> 1 (PCR positiv) 1993 5 (PCR schwach) 125 <u>Unspezifische PCR – Produkte:</u> 6 (Kontamination) 180 7 (PCR unspezifisch) 51 <u>Leere Positionen:</u> 0 („well“ leer) 62 4 (PCR negativ) 27 8 (PCR leer) 154 <u>Nicht vergebene Codes:</u> 2 (Pickfehler) 0 3 (Klon nicht angewachsen) 0

Insgesamt bestand der *Ndph*-p21-cDNA-Subtraktionsbanken-Mikroarray also aus 2592 DNA-Spots, wobei 2118 Spots mit spezifischen PCR-Produkten (PCR-Kode 1 und 5), 180 Spots mit einer Mischung von PCR-Produkten (PCR Kode 6), 51 Spots mit unspezifischen PCR-Produkten (PCR-Kode 7) und 243 leere Spots (PCR-Kode 0, 4 und 8) auf die Glasobjektträger aufgebracht wurden. Dieser Mikroarray enthielten sowohl die Klone aus den beiden Subtraktionsbanken als auch 187 Haushaltsgene aus der IMAGE-Klonsammlung (RZPD-cDNA-Bibliothek 998). Diese Kontrollgene galten als transkriptionell nicht reguliert und sollten bei der Kohybridisierung von Wildtyp- und Knockout-„Targets“ ein Intensitätsverhältnis der beiden Fluoreszenzfarbstoffe von 1 ergeben. Als „Target“ definiert man die auf den Mikroarray hybridisierten Proben, für deren Analyse man sich interessiert. Die 2 x 17 Pflanzen-cDNAs dienten als Kontrollen für eine unspezifische Hybridisierung der „Targets“ an Nukleinsäuren, da sie nicht in tierischen Geweben vorkommen und somit keine spezifische Hybridisierung mit dem tierischen „Target“ erfolgen konnte. Bei dem in dieser Arbeit hergestellten Mikroarray mit den beiden cDNA-Subtraktionsbanken und den Kontrollgenen handelte es sich um eine spezifische Sammlung von cDNA-Klonen, die der Identifizierung und Analyse von differentiell exprimierten Genen im *Ndph*-knockout-Mausmodell mittels cDNA-Mikroarray-Experimenten dienen sollte.

3.2 cDNA-Mikroarray-Hybridisierungsexperimente zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen.

Der *Ndph*-p21-Subtraktionsbanken-Mikroarray ermöglichte es, alle Klone (n = 2112) der aufgetragenen Subtraktionsbanken gleichzeitig zu analysieren und so eine effiziente Untersuchung der Subtraktionsbanken durchzuführen. Außerdem sollte dieser Mikroarray durch die Kohybridisierungen von Wildtyp- und Knockout-Total-RNA, SMART-cDNAs und deren Subtraktionsprodukten des Altersstadiums p21 eine Identifizierung differentiell exprimierter Gene ermöglichen, die im frühen Stadium der Pathogenese des Norrie-Syndroms eine Rolle spielen.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Kohybridisierungsexperimente mit dem Mikroarray durchgeführt. Dabei wurden jeweils die Forward mit den Reverse-SMART-cDNA-Subtraktionsprodukten bzw. die Wildtyp- mit den jeweiligen Knockout-Proben der SMART-cDNAs und RNAs als „Targets“ verwendet. Durch die unterschiedliche Markierung der Targets mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 (grün dargestellt) und Cy5 (rot dargestellt) konnte man nach deren Kohybridisierung durch die Analyse der Fluoreszenzintensitäten eines jeden einzelnen Klons auf dem Mikroarray ein relatives Expressionsprofil für die

entsprechende cDNA in den beiden Targets erstellen. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten eines nicht differentiell exprimierten Gens sollte generell 1 betragen, da sowohl in Wildtyp- wie auch in Knockout-Proben gleiche Mengen an Cy3- bzw. Cy5-markierte cDNAs vorhanden waren. Ein solches Verhältnis von 1 führte dann, nach Überlagerung der beiden Fluoreszenzfarbstoffe, zu einem „gelben“ Signal auf dem Mikroarray. Gene hingegen, die in der Cy3-markierten Probe überrepräsentiert waren, führten zu einem grünem Signal und Gene, die in der Cy5-markierten Probe überrepräsentiert waren, zu einem rotem Signal (Abbildung 15).



Abbildung 15: Kohybridisierung von Cy3- und Cy5-markierten SMART-cDNA-Subtraktionsprodukten.

Dargestellt ist das Ergebnis der Kohybridisierung des Forward- und des Reverse-Subtraktionsproduktes auf den Mikroarray Nr. 6. Die cDNA-Fragmente, die im Wildtyp überrepräsentiert waren, sollten im Forward-Subtraktionsprodukt enthalten sein und ein grünes Signal (Cy3) ergeben. Klone, die im Reverse-Subtraktionsprodukt überrepräsentiert waren, erschienen als rotes Signal (Cy5). Klone, die in vergleichbaren Häufigkeiten im Forward- und im Reverse-Subtraktionsprodukt vorkamen, waren als gelbe Spots (gleiche Intensität Cy5 und Cy3) zu erkennen.

Für einzelne Kohybridisierungen wurde, sofern genügend Ausgangsmaterial für die Markierung vorhanden war, eine zweite identische Markierungsreaktion mit vertauschten Cy3- bzw. Cy5-dUTPs durchgeführt und auf einen zweiten Mikroarray hybridisiert. Die durch die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Fluoreszenzfarbstoffe auftretenden Verschiebungen im Expressionsprofil sollten durch eine gemeinsame Auswertung beider Experimente ausgeschlossen werden (Farbtausch bei den Experimenten 7 und 8 bzw. 17 und 18). Die während dieser Arbeit durchgeführten Kohybridisierungsexperimente (2.6.7) sind mit dem jeweils verwendeten Vorbehandlungsprotokoll und der Markierungsmethode (2.6.5,

2.6.6) sowie den auf die einzelnen Mikroarrays hybridisierten, markierten „Targets“ in Tabelle 51 zusammengefasst. Die ersten fünf der insgesamt 20 Mikroarrays wurden routinemäßig aussortiert, da dort die DNA erfahrungsgemäß unregelmäßig „gespottet“ wurde.

Tabelle 51: Kohybridisierungsexperimente mit cDNA-Subtraktionsprodukten, SMART-cDNAs und Total-RNAs von Wildtyp- und *Ndph*-Knockout-Tieren des Stadiums p21. Die Vorbehandlung mit einer Bernsteinsäureanhydrid/ Natriumborat-Lösung wird hier als „Corning slide“-Protokoll bezeichnet. Sofern Proben einzelner Tiere verwendet wurden, sind die Tiernummern in Klammern angegeben.

Experiment/ Mikroarray – Nr.	Vorbehandlung der Mikroarrays / Blockierung	Markierungsmethode	Kohybridisierungsexperiment	
			Cy3-markiertes „Target“	Cy5-markiertes „Target“
6	„Corning slide“- Protokoll	Random Priming	Forward-Subtraktionsprodukt (Vermehrt im Wildtyp vorhandene cDNAs)	Reverse-Subtraktionsprodukt (Vermehrt im Knockout vorhandene cDNAs)
7	„Corning slide“- Protokoll	Random Priming	SMART-cDNA Wildtyp (Pool aus 3 Tieren)	SMART-cDNA Knockout (Pool aus 3 Tieren)
8	„Corning slide“- Protokoll	Random Priming	SMART-cDNA Knockout (Pool aus 3 Tieren)	SMART-cDNA Wildtyp (Pool aus 3 Tieren)
9	„Corning slide“- Protokoll	Genisphere	Total-RNA Auge (159/4) Wildtyp	Total-RNA Auge (159/8) Knockout
10	„Corning slide“- Protokoll	Genisphere	Total-RNA Auge (159/8) Knockout	Total-RNA Auge (159/4) Wildtyp
11	„Corning slide“- Protokoll	Genisphere	Total-RNA Auge (163/2) Wildtyp	Total-RNA Auge (163/3) Knockout
12	„Corning slide“- Protokoll	Genisphere	Total-RNA Auge (163/3) Knockout	Total-RNA Auge (163/2) Wildtyp
13	BSA-Blockierung	Genisphere	Total-RNA Auge (159/4) Wildtyp	Total-RNA Auge (159/8) Knockout
14	„Corning slide“- Protokoll	Genisphere	Total-RNA Auge (159/4) Wildtyp	Total-RNA Auge (159/8) Knockout
15	BSA-Blockierung	Genisphere	Total-RNA Auge (163/2) Wildtyp	Total-RNA Auge (163/3) Knockout
16	BSA-Blockierung	Genisphere	Total-RNA Auge (165/2) Wildtyp	Total-RNA Auge (165/4) Knockout
17	„Corning slide“- Protokoll	Random Priming	SMART-cDNA (159/4) Wildtyp	SMART-cDNA (159/8) Knockout
18	„Corning slide“- Protokoll	Random Priming	SMART-cDNA (159/8) Knockout	SMART-cDNA (159/4) Wildtyp

Zu den einzelnen Experimenten ist zu sagen, dass zu Beginn dieser Arbeit nur das „Random Priming“-Markierungsprotokoll und die Vorbehandlung der Mikroarrays mit der frischen Bernsteinsäureanhydrid/Natriumborat-Lösung (2.6.4) aufeinander abgestimmt waren. Mit diesem Protokoll wurden die Kohybridisierungen von cDNA-Proben (Subtraktionsprodukt und SMART-cDNAs, 2.6.6.1), die mit Hilfe des DecaLabel DNA labelling Kits markiert wurden, auf den Arrays 6, 7, 8, 17 und 18 erfolgreich durchgeführt.

Die Vorbehandlung der Mikroarrays mit Bernsteinsäureanhydrid/Natriumborat-Lösung („Corning slide“-Protokoll; Tabelle 51) hat sich bei der Kohybridisierung von RNA, die mit Hilfe der Genisphere Markierungs- und Nachweismethode (2.6.6.2) markiert wurden, als ungeeignet herausgestellt (Experimente 9,10,11 und 12). Hier waren auf den Arrays fleckenartig verteilte Regionen zu beobachten, in denen sich die fluoreszenzmarkierten Dendrimere unspezifisch an den Array angelagert hatten und somit die Auswertung der Fluoreszenzsignale unmöglich wurde. Um zu testen, ob die Änderung des Vorbehandlungsprotokolls mit BSA (2.6.4) ein geeigneter Schritt wäre, wurden die Kohybridisierungen 13 und 14 durchgeführt. Dabei hat sich herausgestellt, dass tatsächlich die BSA-Vorbehandlung der Mikroarrays und die Genisphere-Markierungsmethode kompatibel zu einander waren und somit für die Kohybridisierung von sehr geringen RNA-Mengen (2,5 µg Total-RNA) auf einen Mikroarray (Experimente 13, 15 und 16) genutzt werden konnten.

Die Auswertung der Kohybridisierungsexperimente erfolgte mit Hilfe der IPlab Spectrum software (Chen et al., 1997) und dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel, welches für die vergleichende Auswertung der einzelnen Kohybridisierungsexperimente genutzt wurde. Bei dieser Auswertung ergaben sich „Outlier-Listen“, in denen die Gene aufgeführt waren, die, normiert auf die auf dem Mikroarray vorhandenen Kontrollen, die Analysesoftware als differentiell exprimiert definierte. Diese wurden für die Kohybridisierungen mit Subtraktionsprodukten in Experiment 6, mit SMART-cDNAs in den Experimente 7, 8 (Farbtausch zu 7), 17 und 18 (Farbtausch zu 17) sowie für die RNA-Kohybridisierungsexperimente mit dem Genisphere Kit in den Experimente 13, 15 und 16 (Farbtausch zu 15) erstellt.

Eine intensive, vergleichende Analyse sowohl der einzelnen „Outlier-Listen“ mit den entsprechenden zugehörigen „Farbtauschexperimenten“ als auch die gemeinsame Analyse aller kompletten Datensätze anhand unterschiedlich stringenter Kriterien lieferten verschiedene Listen mit potentiell differentiell exprimierten Genen.

3.2.1 Vergleichende Datenanalyse der cDNA-Mikroarraydaten

Um die unterschiedlichen Hybridisierungsergebnisse der cDNA-Mikroarrays besser zu veranschaulichen, wurden die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der beiden Kanäle (Cy3 und Cy5) für die einzelnen Spots gegeneinander aufgetragen (Abbildung 16 und Abbildung 17). Dabei wurden nur die Spots berücksichtigt, die mit einem PCR-Kode von 1 oder 5 bewertet worden waren und somit auf dem Mikroarray als singuläre, homogene PCR-Produkte vorlagen. Dies ermöglichte eine bessere Einschätzung des Hybridisierungsverhaltens der jeweils verwendeten Targets.

Als eine anschauliche Bewertungshilfe kann man die Ausgleichsgerade für die einzelnen Targetpopulationen betrachten. Für den Idealfall, dass alle Gene gleich stark exprimiert wären und keine experimentellen Abweichungen, wie z.B. eine unterschiedliche Anregung oder ein schnelleres Ausbleichen eines der beiden Fluoreszenzfarbstoffe oder unterschiedliche Einbauraten bei der Markierungsreaktion existierten, würde sich für die Ausgleichsgerade eine Steigung von 1 ergeben. Differentiell exprimierte Gene liegen entweder oberhalb bzw. unterhalb einer solchen Ausgleichsgeraden, je nachdem ob sie im Wildtyp oder im Knockout höher exprimiert sind. Betrachtet man die Kohybridisierung der beiden cDNA-Subtraktionsprodukte auf den Mikroarray 6 (Abbildung 16 A), so erkennt man anhand des parallelen Verlaufs der Ausgleichsgeraden, dass die Hybridisierungen der Forward- (grün) und der Reverse- (rot) Subtraktionsprodukte in etwa vergleichbar abgelaufen waren. Das Reverse-Subtraktionsprodukt zeigte scheinbar stärkere Unterschiede. Es fällt zum Beispiel auf, dass eine ganze Gruppe von Genen eine hohe Signalintensität für Cy5 (~ 2000-4000 Einheiten) zeigte, während die entsprechende Intensität für Cy3 niedrig ist (~ 100-500 Einheiten). Dies lässt erwarten, dass in der Reverse-Subtraktionsbank differentiell exprimierte cDNAs repräsentiert sein sollten. Aber auch in der Forward-Subtraktionsbank wichen Gene von dem Verhältnis 1 ab, so dass wir auch in dieser Bank differentiell exprimierte Gene erwarteten.

Um diese Ergebnisse der Kohybridisierungen mit Subtraktionsprodukten auch auf RNA- und cDNA-Ebene zu verifizieren bzw. mit diesen zu vergleichen, wurde RNA aus den Augen dreier unabhängiger Wt/Ko-Tierpaare des Alters p21 isoliert, mit Hilfe des Genisphere Kits markiert und auf drei verschiedene Mikroarrays (13, 15 und 16) kohybridisiert (Abbildung 16 B).

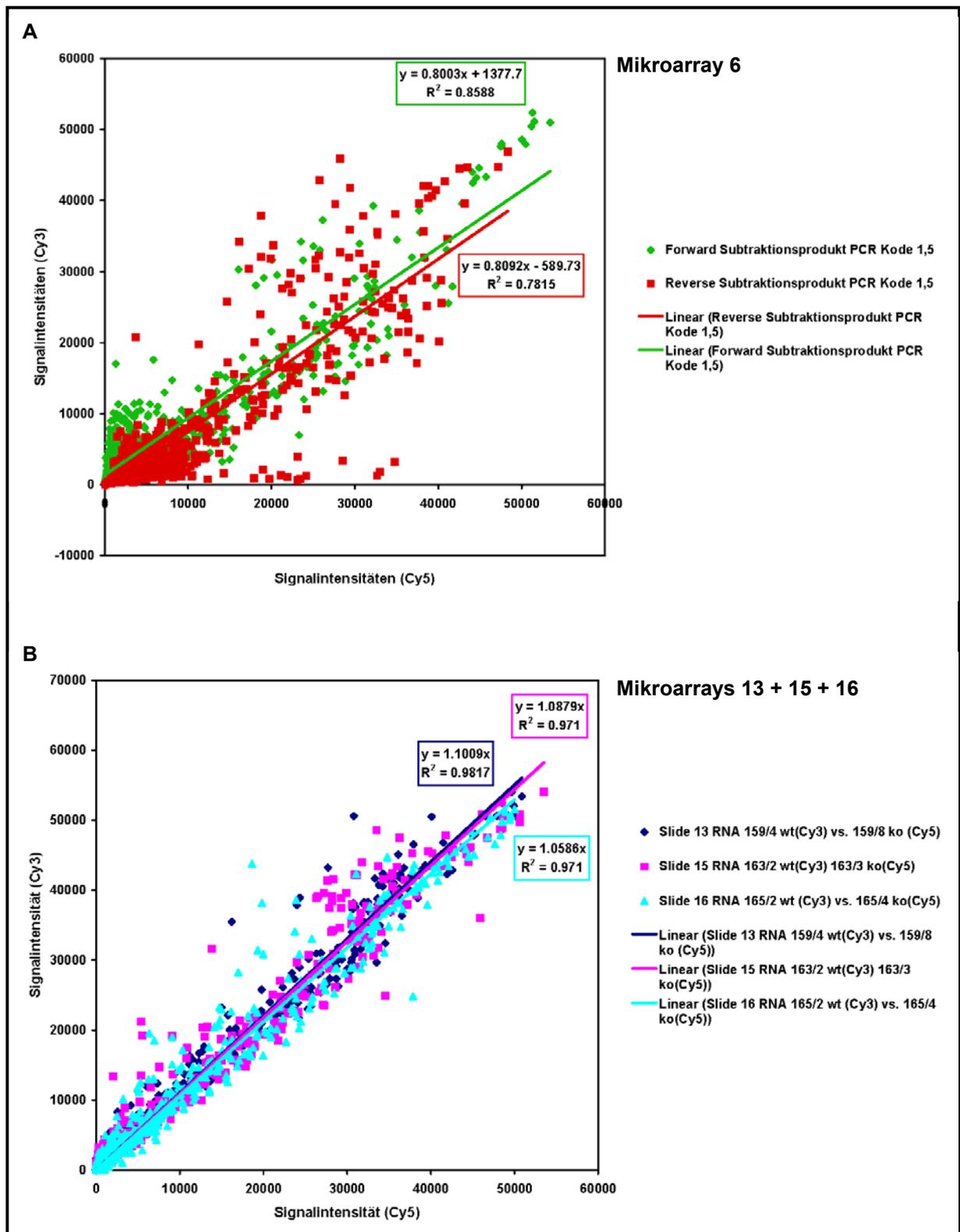


Abbildung 16: Arrayhybridisierungsexperimente für cDNA-Subtraktionsprodukte und Total-RNA. A: Kohybridisierung der Forward- und Reverse-Subtraktionsprodukte auf den Mikroarray Nr.6. **B:** Kohybridisierungen von Wildtyp- und Knockout-Total-RNA (Genisphere) auf die Mikroarrays Nr. 13, 15 und 16.

Diese drei RNA-Kohybridisierungen zeigten jeweils in etwa das gleiche Bild. Alle Ausgleichsgeraden hatten ähnliche Steigungen von ca. 1,05 bis 1,1. Daraus lies sich schließen, dass die Markierung mit dem Genisphere Kit eine gute Markierungsmethode war, da es scheinbar kaum Verschiebungen von der Steigung 1 durch die Markierung bzw. durch andere experimentelle Einflüsse gab. Gleichzeitig zeigte sich aber auch, dass die Unterschiede in der Expression auf RNA-Ebene sehr gering waren, da nur wenige Signale deutlich von dem Verhältnis $Cy5/Cy3 = 1$ abwichen. Verglich man die drei Einzelerperimente miteinander, so zeigte sich tatsächlich, dass keines der Gene in allen drei Experimenten konsistent als differentiell zu identifizieren war. Daher war aus den RNA-Experimenten der Schluss zu ziehen, dass auf RNA-Ebene kein differentiell exprimiertes Gen nachzuweisen war.

Betrachtet man die Ergebnisse der Experimente mit der SMART-cDNA und der entsprechenden „Random priming“-Markierungsmethode (Abbildung 17 A und B), zeigt sich, dass es nur sinnvoll war, die zwei Kohybridisierungen auf den Mikroarrays 7 und 8 auszuwerten, da hier die Ausgleichsgeraden der beiden Hybridisierungsergebnisse, die sich nur durch die inverse Markierung der SMART-cDNA-Populationen unterschieden, eine vergleichbare Steigung hatten. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Kohybridisierungen auf den Mikroarrays 17 und 18, die mit SMART-cDNA aus einzelnen Tieren und nicht, wie die Kohybridisierungen auf den Mikroarrays 7 und 8, mit SMART-cDNA aus einem RNA-Pool durchgeführt wurden, eine deutliche Verschiebung der Ausgleichsgeraden. Diese wurde allein durch die unterschiedliche Markierung mit den verschiedenen Farbstoffen hervorgerufen. Mögliche Ursachen dafür waren eine unterschiedliche Einbaurate der Cy3- bzw. der Cy5-Farbstoffe in die Target-Moleküle oder auch, trotz der vorgenommenen RNA-Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des Agilent Technologies 2100 Bioanalyzers, eine unterschiedliche RNA-Ausgangsmenge in den Markierungsreaktionen in diesen Experimenten.

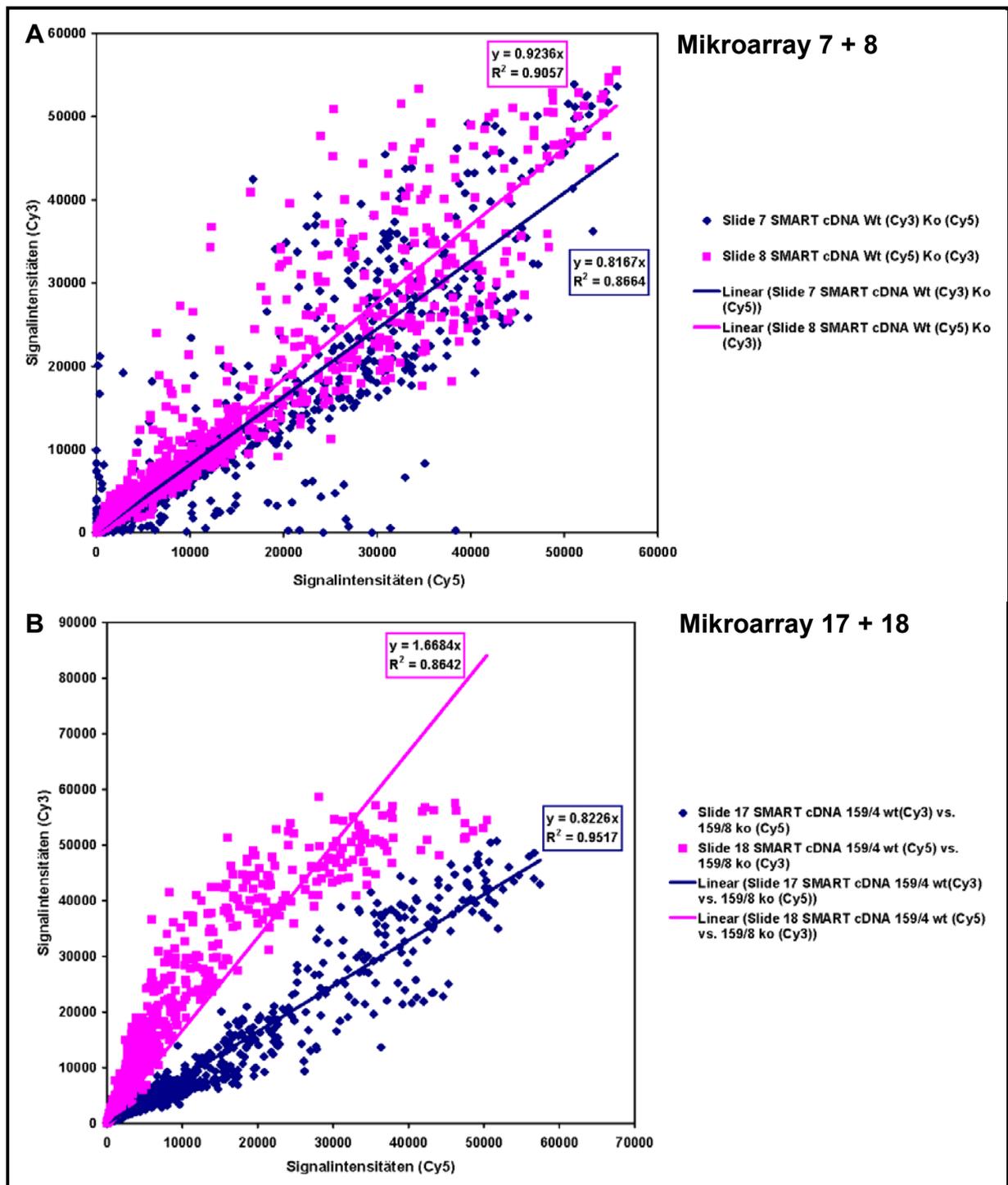


Abbildung 17: Arrayhybridisierungsexperimente - Farbtaschexperimente für SMART-cDNAs. Kohybridisierungen von Wildtyp- und Knockout-SMART-cDNAs **A:** Beide SMART-cDNAs stammen aus einem RNA-Pool von je drei Tieren. Kohybridisierung auf die Mikroarrays 7 und 8 (Farbtasch zu 7). **B:** Die SMART-cDNAs stammen aus RNAs einzelner Tiere. Kohybridisierung auf die Mikroarrays 17 und 18 (Farbtasch zu 17).

Die gemeinsame Auswertung der beiden SMART-cDNA-Kohybridisierungsexperimente der Mikroarrays 7 und 8 ergab mit den Kriterien kalibrierte Ratio (Ko/Wt) von ≥ 2 oder $\leq 0,5$ und

einer Spotfläche von ≥ 20 Einheiten für 21 Klone ein Signalverhältnis, welches für eine differentielle Expression sprach. Dabei handelte es sich um 21 Klone (gelb und hellgrün unterlegt in Tabelle 52), die in den beiden Farbauschexperimenten ein Signalverhältnis von größer als 2 hatten. 19 der Klone waren in der Reversen Subtraktionsbank vorhanden, so dass, wie erwartet, diese Klone eine höhere Expression im Knockout zeigten. Nur 1 Klon stammte aus der Forward-Subtraktionsbank, was gegen dessen differentielle Expression in dieser Orientierung sprach. Ein weiterer Klon war eine Kontrolle, die erwartungsgemäß nicht differentiell exprimiert sein sollte.

Um letztlich eine Liste mit potentiell differentiell exprimierten Kandidatengen zu generieren, die mit Hilfe von *virtuellen* Northern Blots überprüft werden sollten, wurden die Daten der Kohybridisierungen der Subtraktionsprodukte (Mikroarray 6) mit denen der SMART-cDNAs (Mikroarrays 7 und 8) kombiniert und ebenfalls die RNA-Kohybridisierungen hinzugezogen. Zusätzlich wurden nun noch für die Kohybridisierung mit den Subtraktionsprodukten die Kriterien kalibrierte Ratio $Ko/Wt \geq 3$ und $\leq 0,3$ bei ebenfalls einer Spotfläche von ≥ 20 Einheiten eingeführt und so 12 Kandidaten (gelb unterlegt in Tabelle 52) für eine differentielle Expression erhalten, die auch schon in der Auswertung der SMART-cDNA-Experimente alleine enthalten waren. Neben der Auswertung mit der IPLab Software wurde die Kohybridisierung der Subtraktionsprodukte zusätzlich mit einem weiteren Softwarepaket (ImaGene™; BioDiscovery) analysiert und die Ergebnisse mit denen der IPLab Software verglichen. Die Auswertung mit der IPLab Software erfolgte unter stringenten Kriterien (Kalibrierte Ratio ≥ 3 oder $\leq 0,3$, Spotfläche ≥ 70 , Signalintensitäten ≥ 3000 in beiden Kanälen (Cy3 und Cy5)). Die Auswertung mit ImaGene erfolgte mit den Kriterien einer kalibrierten Ratio von ≥ 3 oder $\leq 0,3$, wobei diese Werte auf eine Spotfläche von 100 Einheiten normiert waren. Ausgehend von diesen Kandidatengenlisten wurden nun die Ergebnisse der beiden Softwarepakete für die einzelnen Klone verglichen und nur solche Klone für nachfolgende Experimente ausgewählt, die von beiden Softwarepaketen gleichzeitig als hoch- bzw. runterreguliert exprimiert definiert wurden. Dadurch wurden 37 Klone (rote hervorgehoben in Tabelle 52) erhalten, von denen 12 in Augen von Knockout-Tieren niedriger exprimiert waren. Davon stammten 11, wie erwartet, aus der Forward-Subtraktionsbank und nur 1 Klon aus der Reverse-Subtraktionsbank. 25 weitere Klone zeigten eine höhere Expression im Knockout-Tier, von denen, erwartungsgemäß, 20 aus der Reverse-Subtraktionsbank, aber auch drei Klone aus der Forward-Subtraktionsbank stammten. Zusätzlich wurden zwei der Kontrollen identifiziert, die im Knockout-Tier höher exprimiert schienen.

Tabelle 52 A und B: Vergleich der Mikroarraydaten mit den Ergebnissen der SMART-cDNA-Blots (*virtuelle Northern Blots*). Tabelle A: Klone, die laut Mikroarraydaten als im Wildtyp höher exprimiert oder herunterreguliert wurden. **Tabelle B: Klone, die laut Mikroarraydaten als im Knockout höher exprimiert vorhergesagt wurden. Die aus den Mikroarray-Experimenten gewonnenen Daten (Mittlere Signalintensitäten #S1 und #S2 der beiden Fluoreszenzkanäle, die Spotfläche in relativen Einheiten und die kalibrierte Ratio) sind für alle ausgewerteten Experimente dargestellt. Sie sind sortiert nach der kalibrierten Ratio des Kohybridisierungs-experiments mit den cDNA-Subtraktionsprodukten. Für die SMART-cDNA-Kontrollblots ist dargestellt, ob ein Signal nachzuweisen war (Ja / Nein), nach welcher Expositionszeit (h: Stunden, d: Tage) dies der Fall war und welcher Film (Normal/ Biomax) dafür verwendet wurde. Für einige Hybridisierungen der Kontrollblots mit den Inserts der Klone konnte kein Insert präpariert werden (kein Insert), während andere Klone zwei Inserts enthielten (Doppelinsert), die dann getrennt hybridisiert wurden. Die letzte Spalte gibt an, ob die jeweiligen Blots für beide SMART-cDNA-Wt / Ko-Paare konsistent differenzielle Signale in der entsprechenden Orientierung (F-Klon: Signal im Wt > Ko; R-Klon: Ko > Wt) zeigten. Keiner der durch die Mikroarraydaten als differentiell identifizierten Klone lies sich mit Hilfe der *virtuellen Northern Blots* bestätigen. Farbkode: siehe Text.**

Klon	Mikroarray													SMART cDNA Blot																								
	SMART cDNA Subtraktionsprodukt (Mikroarray 6)						SMART cDNA Wt Cy3 Ko Cy5 (Mikroarray 7)						SMART cDNA Wt Cy5 Ko Cy3 (Mikroarray 8)						RNA Genisphere Wt Cy3 Ko Cy5 (Mikroarray 15)						RNA Genisphere Wt Cy3 Ko Cy5 (Mikroarray 16)						RNA Genisphere Wt Cy3 Ko Cy5 (Mikroarray 13)						Signal ja/nein/Exposition/ Film	differentiell ja/nein
	S#1	S#2	Kal.	S#1	S#2	Kal.	S#1	S#2	Kal.	S#1	S#2	Kal.	S#1	S#2	Kal.	S#1	S#2	Kal.	S#1	S#2	Kal.	S#1	S#2	Kal.	S#1	S#2	Kal.	S#1	S#2	Kal.								
R7-89	23109.23	75	611.47	61	37.36	6787.4	95	1285.5	80	4.74	9614.15	82	4271.54	84	2.15	5911.93	70	1101.76	76	1.26	584.72	42	922.92	82	1.12	1452.02	83	2456.22	68	1.74	nein							
R2-44	32960.24	77	1291.83	66	25	24002.56	83	4281.54	81	5.03	21418.87	86	9854.76	86	2.07	1294.50	75	1475.47	80	1.45	603.40	66	749.02	80	1.48	3870.61	82	4933.04	87	2.30	nein							
R1-83	19784	71	815.23	69	20.8	19311.21	86	3245.88	86	5.34	15132.5	81	7452.44	89	1.94	2236.91	74	1145.46	76	1.51	339.82	23	730.89	65	0.85	1792.50	78	2468.34	79	2.12	nein							
R8-83	2193.58	70	1041.78	66	20.8	17966.66	88	7697.99	88	2.22	1041.78	74	1145.46	76	1.51	339.82	23	730.89	65	0.85	1792.50	78	2468.34	79	2.12	nein												
445905	3472.7	58	1756.99	35	19.51	2277.83	53	790.51	53	2.59	2211.82	48	1163.99	58	1.81	208.41	6	391.04	20	1.22	346.22	11	753.16	12	0.96	1462.81	80	1580.23	85	1.76	nein							
R10-89	24182	79	1240.04	64	19.28	20893.26	79	3651.21	79	5.14	26254.84	84	10336.12	84	2.45	872.49	59	1281.42	66	1.13	717.57	35	1307.87	69	0.95	946.41	80	1580.23	85	1.76	nein							
R2-4	17910.08	49	922.81	51	19.19	26428.78	49	9754.64	48	4.32	24017.06	47	970.94	53	3.59	67	589.90	27	1.12	907.94	48	1181.33	46	1.55	1036.54	49	1413.82	42	2.15	nein								
R7-23	32867.56	72	1778.44	59	18.34	18333.85	77	3610.97	76	1.22	18333.85	77	3610.97	76	1.22	18333.85	77	3610.97	76	1.22	18333.85	77	3610.97	76	1.22	18333.85	77	3610.97	76	1.22	nein							
R7-86	12330.44	47	756.22	47	16.08	7413.34	51	5435.06	52	4.56	8014.95	54	8692.08	57	0.88	682.51	55	826.87	49	1.37	1511.09	56	1686.76	57	1.64	852.55	81	1293.81	57	2.02	nein							
R7-64	21147.82	57	1330.72	52	16.71	26490.95	61	4705.94	61	4.93	27293.95	47	9933.84	46	2.9	7544.16	15	14039.84	51	0.99	4708.41	103	1427.54	80	1.57	1691.65	80	3471.10	60	1.32	nein							
R11-75	35642.76	77	2250.4	73	15.66	39573.79	92	7760.47	92	2.48	27188.71	97	12001.33	92	1.15	3958.12	74	4006.21	73	1.84	2262.28	81	2581.76	82	1.69	1456.36	99	2266.72	100	1.89	nein							
445905	4886.17	46	327.33	33	14.70	2045.19	47	741.08	50	4.58	2265.07	46	1209.69	52	2.78	241.56	8	385.34	8	1.04	328.67	9	554.11	25	1.09	284.53	13	849.49	19	0.98	nein							
R7-16	6848.33	47	554.23	43	12.34	13868.33	56	2624.54	47	4.41	13868.33	56	2624.54	47	4.41	13868.33	56	2624.54	47	4.41	13868.33	56	2624.54	47	4.41	13868.33	56	2624.54	47	4.41	nein							
446077	1167.41	48	96.03	0	12.02	2511.88	53	2621.27	45	0.86	2190.75	55	1380.46	53	1.51	161.42	8	253.74	6	1.06	59.65	0	1261.42	12	0.09	65.92	4	761.66	22	0.25	nein							
R9-15	13480.93	71	2939.97	64	11.25	31222.13	82	9019.37	76	3.11	43988.92	69	18788.33	69	2.22	5946.38	45	6956.30	42	1.00	2995.60	46	4239.36	51	1.29	7956.58	55	8473.14	58	2.76	nein							
R13-88	34760.51	68	3230.62	76	11.61	36587.92	84	8312.85	80	3.79	36747.66	80	1218.35	79	2.84	1603.87	40	527.69	31	0.52	926.40	83	1044.30	95	1.62	1233.07	93	1719.20	95	2.11	nein							
141223	2236.49	57	211.65	35	10.46	3163.91	47	3188.25	48	0.9	3833.16	43	3853.13	48	0.95	257.91	4	1.00	0.25	1.00	1.00	4.06	21	0.81	183.06	8	574.15	16	0.84	nein								
463978	1610.14	51	1195.35	36	9.95	1496.85	46	514.84	47	0.21	1284.63	53	492.37	53	2.49	4	376.17	4	1.00	0.25	1.00	1.00	4.06	21	0.81	183.06	8	574.15	16	0.84	nein							
R7-3	10398.27	45	1078.63	51	9.45	16242.29	48	10269.67	47	1.42	14870.19	48	14653.15	49	0.95	500.99	36	574.87	38	1.44	450.29	18	802.29	29	1.64	712.35	40	953.63	38	2.19	nein							
R11-33	10415.72	52	1117.52	52	9.26	10415.72	52	1117.52	52	9.26	10415.72	52	1117.52	52	9.26	10415.72	52	1117.52	52	9.26	10415.72	52	1117.52	52	9.26	10415.72	52	1117.52	52	9.26	nein							
R6-70	14268.76	60	1578.02	54	8.94	16458.76	65	2384.62	75	1.83	14745.86	76	14653.15	75	1.67	3204.37	65	2881.45	66	1.18	2755.25	75	3620.21	71	1.39	1788.74	85	2607.75	87	2.17	nein							
R11-20	19017.17	60	2138.84	62	8.8	12219.73	70	3822.21	68	2.87	17072.69	84	7992.83	72	2.04	1220.28	55	1701.65	67	1.19	484.89	39	937.00	67	1.34	300.05	41	803.87	59	1.10	nein							
R2-15	3381.95	45	393.36	43	8.23	4273.13	45	1849.07	45	2.03	3008.33	50	2136.19	58	1.34	404.86	5	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	nein						
R4-18	28539.86	66	3409.05	67	8.28	32886.16	73	6641.51	70	4.46	34309.21	71	12179.14	69	2.69	1135.92	61	1388.23	62	1.36	1332.44	58	1958.52	59	1.62	1177.85	76	1723.09	77	2.01	nein							
R1-40	8183.71	72	973.30	66	8.27	3352.37	83	1829.25	85	2.16	3596.4	86	2944.74	87	1.16	1808.29	69	1901.70	68	1.58	652.28	73	831.75	85	1.47	1642.77	85	2.03	nein									
R11-70	1857.29	48	227.77	35	0.06	3852.83	60	105	1.05	5294.98	48	3439.34	45	1.47	316.88	14	273.88	14	1.92	303.86	14	1.92	303.86	14	1.92	303.86	14	1.92	303.86	14	1.92	nein						
R6-45	9186.5	51	1160.41	56	8.23	3962.96	73	1823.85	72	1.89	2282.78	76	735.2	77	2.87	656.80	67	908.23	68	1.20	1879.62	64	2933.12	68	1.14	896.86	84	1527.54	80	1.73	nein							
448131	2322.76	78	289.72	59	7.63	1860.87	87	1472.26	89	1.14	2754.83	78	2612.59	79	1.00	233.73	15	591.90	16	0.62	262.56	7	601.54	17	0.80	203.22	23	750.88	69	0.79	nein							
R11-9	16856.13	48	1386.9	49	3.62	7236.83	49	1636.46	50	3.57	14138.84	49	5762.4	49	2.34	2258.84	51	2368.91	53	1.46	5101.56	47	507.25	27	1.86	2776.86	54	2776.86	54	2.02	nein							
R10-19	8624.27	61	1173.96	52	7.26	10131.02	64	5472.19	62	1.66	10086.06	59	8055.36	59	1.19	535.03	39	725.92	38	1.45	758.86	35	1047.23	35	1.33	1057.23	35	97.9	nein									
336518	4139.38	83	571.4	64	7.16	6139.38	93	4841.89	92	1.07	5314.02	96	6178.12	100	0.82	417.46	8	498.71	9	1.39	391.33	16	362.28	13	1.97	79.68	0	665.56	16	0.35	nein							
R6-4	4997.51	44	70.01	43	7.02	6942.83	45	1890.99	47	3.3	4470.79	56	1462.98	56	2.87	832.15	46	1331.43	46	1.04	2636.45	47	2326.65	48	2.00	1679.90	53	22.1	nein									
R11-19	1773.68	54	260.67	49	6.73	2970.79	63	2452.12	57	0.99	2972.42	59	1908.49	62	1.29	223.97	12	344.66	15	1.08	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	0	1.00	nein						
R4-18	3890.14	68	572.81	56	6.72	1324.9	78	489.26	74	2.39	1516.7	79	812.92	80	1.78	646.18	59	829.33	59	1.29	318.62	36	404.33	27	1.44	559.57	73	1042.04	75	1.58	nein							
391674	3163.14	45	465.7	40	6.72	3712.01	62	1829.17	65	1.82	3271.22	57	2727.6	61	1.14	435.86	38	584.39	38	1.24	548.06	20	352.20	20	2.85	358.74	11	530.20	10	1.99	nein							
R1-45	3728.62	84	563.76	51	6.54	3875.66	86	2136.51	86	1.63	4198.46	86	4326.65	87	0.82	785.00	68	1155.37	67	0.82	720.54	82	44.8	82	1.45	377.48	87	828.52	49	1.34	nein							
R10-44	3606.02	76	544.81	59	6.54	1187.93	87	868.58	87	1.23	1420.99	84	1343.5	85	1.09	422.17	54	707.13	67	0.99	338.24	21	448.59	26	1.37	438.72	65	1033.18	75	1.25	nein							
R10-25	3821.89	52	592.48	59	6.38	2959.9	94	2030.56	83	1.31	3963.19	58	2923.81	57	1.5	546.97	50	628.75	31	0.72	1324.96	50	1437.63	43	1.80	1439.04	57	1965.29	62	2.16	nein							
23484	1673.77	49	259.53	33																																		

Je acht der Klone aus diesen beiden Listen wurden sequenziert (2.3.5) und die Sequenzdaten mittels BLAST-Algorithmus gegen die NCBI-Sequenz-Datenbank untersucht. Dadurch konnte verifiziert werden, dass die Subtraktionsbank wie erwartet Maus-cDNA-Klone enthielt. Die Ergebnisse der Datenbankanalysen für die einzelnen Klone sind in der Tabelle 53 aufgeführt.

Tabelle 53: Ergebnisse der Sequenz-Datenbankanalysen von je 8 Klonen aus den Forward- und Reverse-cDNA-Subtraktionsbanken. Angegeben sind die Klonbezeichnung der sequenzierten Klone und der durch eine Blastn-Suche mit der Insertsequenz erhaltene Datenbankeintrag.

Klonbezeichnung	Identität (BLAST - Ergebnis für die Insertsequenz (NCBI); 17.05.2001)
F2-63	Mouse muscle-specific enolase beta mRNA, 3' end. Accession Nr. M20745
F2-65	Mus musculus receptor activity modifying protein 2 mRNA Accession Nr. AF209906
F2-76	M.musculus mRNA for cyp2a isoform protein. Accession Nr. X89864
F2-78	EST011 GC-1 spg cDNA library Mus musculus cDNA clone 88, mRNA sequence Accession Nr. BE352829 Mus musculus adult male cecum cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone: 9130202O11 product: forkhead box P1, full insert sequence. Accession Nr. AK033622 (Blastergebnis des EST's)
F3-19	Mouse mSlo mRNA, complete cds. Accession Nr. L16912
F5-81	Kein Insert
F7-35	Mus musculus plenty-of-prolines-101 mRNA, complete cds. Accession Nr. AF062655
F7-60	Mus musculus selenocysteine tRNA gene transcription activating factor (m-Staf) mRNA, complete cds. Accession Nr. AF011758 oder AF145373
R2-21	Mus musculus alpha-globin mRNA, complete cds. Accession Nr. L75940
R2-92	Keine ausreichend gute Sequenz erhalten; nicht wiederholt
R4-51	Mus musculus phosphoglycerate kinase (Pgk1-ps1) processed pseudogene. Accession Nr. M23961
R4-56	Mus musculus CDC10 gene, exon 13. Accession Nr. AJ223794
R5-6	Mus musculus transfer RNA-Ser synthetase (SERS) mRNA, partial cds. Accession Nr. M74012
R5-88	Rattus norvegicus carnitine octanoyltransferase mRNA, complete cds. Accession Nr. U26033 (92% Identität)
R5-94	Mus musculus NAD(P)H: menadione oxidoreductase (Nmo1) mRNA, complete cds. Accession Nr. U12961
R6-75	Mouse spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT) mRNA, complete cds. Accession Nr. L10244

3.2.2 Verifizierung der Arraydaten mit Hilfe *virtueller* Northern Blots

Neben den zuvor erwähnten cDNA-Klonen (Farbkodierte Klone, Tabelle 52), die als Kandidaten für differentiell exprimierte Transkripte identifiziert wurden, wurden zusätzlich 171 Klone durch die Auswertung der Kohybridisierung der cDNA-Subtraktionsprodukte (Mikroarray 6) mit den Kriterien kalibrierte Ratio ≥ 5 oder $\leq 0,2$ und Spotfläche ≥ 20 als Kandidaten ausgewählt, um einen repräsentativen Anteil an Klonen der Subtraktionsbanken für Verifikationsexperimente zu verwenden. Diese Klone umfassten alle bis auf 26 Klone aus der vergleichenden Auswertung beider Softwarepakete. Die Inserts aller Klone (Tabelle 52 A und B) wurden aus den Plasmiden der Subtraktionsbanken isoliert und als Sonde für *virtuelle* Northern Blots (2.4.8/ 2.4.9) verwendet. Diese waren mit SMART-cDNAs aus den Augen zweier Wt/Ko-Tierpaare (p21) beladen. Dadurch sollte mit einer zweiten Methode die differentielle Expression eines jeden Kandidatengens verifiziert werden. Die Hybridisierungsergebnisse der *virtuellen* Northern Blots mit den Mikroarraydaten für die insgesamt 197 Klone sind in Tabelle 52 A und B dargestellt. Insgesamt wurden so 9,3% aller 2112 definierter Klone (PCR Kode 1 und 5), die in den cDNA-Subtraktionsbanken enthalten waren, auf *virtuellen* Northern Blots untersucht. Exemplarisch sind in Abbildung 18 drei

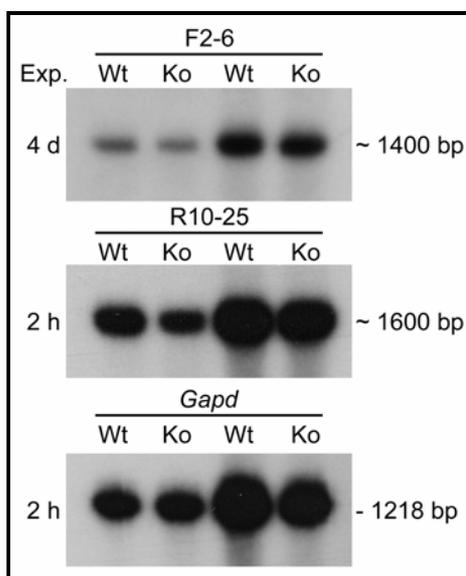


Abbildung 18: Virtuelle Northern Blots als unabhängige Verifikationsmethode für die Mikroarrayexperimente. Exemplarisch dargestellt sind 3 Blots beladen mit je 2 Wt/Ko-SMART-cDNA-Populationen (Auge; p21), die mit der über den Blots bezeichneten Sonde hybridisiert wurden.

schon nach 2 Stunden ein deutlich stärkeres Signal auf Standard-Autoradiographie-Filmen (Super RX) zu erkennen war.

virtuelle Northern Blots dargestellt, die mit einem Reverse-Klon, einem Forward-Klon oder mit *Gapd* als Sonde hybridisiert worden sind. Kein Insert eines Klons zeigte ein eindeutiges differentielles Signal, welches zugleich in beiden Tierpaaren konsistent war. Somit konnte keiner der aufgrund der Mikroarraydaten als differentiell vorhergesagten Klone als solcher bestätigt werden. Auffällig war, dass die Klone aus der Forward-Subtraktionsbank generell ein deutlich schwächeres Signal zeigten als Klone aus der Reverse-

Subtraktionsbank. Dies ist anhand der Expositionszeiten (Abbildung 18) abzulesen, wo für den Forward-Klon F2-6 eine Exposition von 4 Tagen (4d) benötigt wurde, um ein Signal nachzuweisen, während für den Klon R10-25 und auch für *Gapd*

3.3 Die postnatale Entwicklung der retinalen Blutgefäße in *Ndph*-knockout-Mäusen

Neben dem globalen Versuchsansatz mittels Genexpressionsanalyse, durch die Kombination von cDNA-Subtraktion und cDNA-Mikroarray-Technologie, differentiell exprimierte Gene zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit ein weiterer Ansatz gewählt, in dessen Fokus die postnatale Entwicklung der retinalen Blutgefäße stand. Dieser Ansatz beruhte auf den auffälligen phänotypischen Befunden bzw. Defekten im retinalen Blutgefäßsystem, die in den zuvor durchgeführten Untersuchungen der *Ndph*-knockout-Maus beschrieben worden sind. Aufgrund dieser Befunde sollte jetzt mit Hilfe histologischer HE (Hämalaun-Eosin)-Färbungen (2.2) und durch die quantitative Untersuchung der Transkription von Angiogenesefaktoren in Retinae von Wildtyp- und *Ndph*^{0/0}-Tieren (2.4.6) die postnatale Entwicklung der Blutgefäßsysteme in vier Stadien (p5, p10, p15 und p21) systematisch untersucht werden. Durch die Korrelation der gewonnenen histologischen Daten mit möglichen Unterschieden in der Transkription der Angiogenesefaktoren, erhofften wir uns Aufschlüsse über die molekularen Grundlagen des ursächlichen Entwicklungsdefekts. Von besonderem Interesse waren diese molekularen Prozesse auch deshalb, weil, wie in der Einleitung ausführlich dargestellt, nicht nur Norrie-Syndrom-Patienten sondern auch Patienten mit exsudativer Vitreoretinopathie (EVR), Frühgeborenenretinopathie (ROP) und Morbus Coats charakteristische Veränderungen in retinalen Blutgefäßen, insbesondere in der Peripherie der Retina, zeigen, die zu erheblichen Einschränkungen des Sehvermögens bei den Betroffenen führen können. So könnte möglicherweise ein gemeinsamer molekularer Pathogenesemechanismus allen vier Erkrankungen zu Grunde liegen, dessen Identifizierung wir mit den Experimenten näher kommen wollten.

3.3.1 Histologische Untersuchung der Retinaentwicklung in *Ndph*-knockout-Mäusen

Zur initialen Charakterisierung der postnatalen Retinaentwicklung wurden Augen unterschiedlicher Entwicklungsstadien (p5, p10, p15 und p21) in Paraffin eingebettet, sagittal geschnitten und mit Hämalaun-Eosin gefärbt (2.2). Die Aufnahmen der Präparate sind in Abbildung 19 dargestellt.

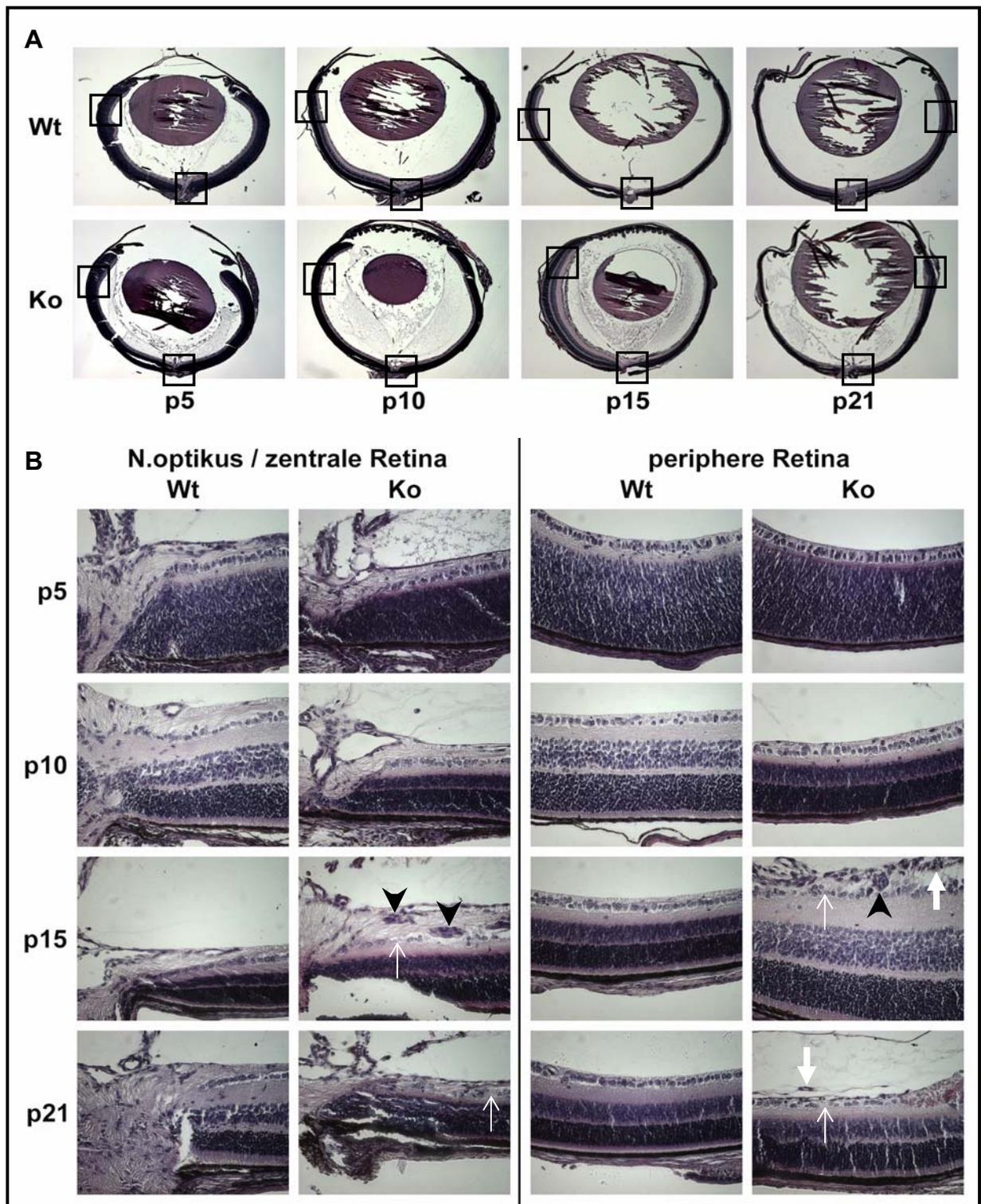


Abbildung 19: Hämalaun-Eosin-Färbungen von sagittalen Schnitten des Auges von Wildtyp- und *Ndph*-knockout-Mäusen der Stadien p5, p10, p15 und p21 (n = 2). A: Für jedes Stadium und jeden Genotyp ist jeweils ein Übersichtsbild eines Sagittalschnittes (7 μ m) des Auges dargestellt (Vergrößerung 5 x). Die Quadrate markieren die Ausschnitte, die jeweils in Abbildung B vergrößert abgebildet sind (40 x). Der zentrale Teil der Retina, neben dem Nervus opticus, und ein peripherer Teil der Retina wurden ausgewählt (schwarze Pfeilköpfe: Endothelzellhaufen in der Ganglienzellschicht; dünne weiße Pfeile: Desorganisation der Ganglienzellen; dicke weiße Pfeile: Blutgefäße zwischen Glaskörper und Retina).

Betrachtet man die Entwicklung der Augen im Überblick (Abbildung 19 A) so sind Einlagerungen im Glaskörper der *Ndph*^{v/-}-Tiere besonders auffällig, die bis zum postnatalen Tag 21 (p21) sichtbar blieben. Am Tag p5 waren auch im Wildtyp solche Einlagerungen zu erkennen, während im späteren Verlauf nur noch die zentrale hyaloide Arterie sichtbar war. Diese Einlagerungen bei Knockout-Tieren bis an p21 repräsentieren wahrscheinlich eine verminderte Regression der hyaloiden Blutgefäße im Glaskörper. Betrachtete man die Entwicklung der Schichtung von p5 bis p21 in der zentralen Retina (Abbildung 19 B; linke Seite) so gibt es keine offensichtlichen Defekte in der Ausbildung bzw. der Dicke dieser Schichten. Von dem frühen Stadium p5 bis zum Stadium p10 entwickelt sich die Schichtung der Retina in den Knockout-Tieren normal, während von p15 an die Desorganisation der retinalen Ganglienzellschicht (weiße Pfeile) sehr auffällig war. Die perlschnurartige Aufreihung der Ganglienzellkörper ist gestört und Zellanhäufungen in dieser Schicht waren sowohl in der zentralen als auch in der peripheren Retina zu sehen (schwarze Pfeilköpfe). Diese Zellhaufen scheinen von Blutgefäßen auszugehen, so dass es sich dabei vermutlich um Endothelzellen handelt. Außerdem sind von der Nervenfasern- bzw. Ganglienzellschicht abgelöste Blutgefäße zwischen Retina und Glaskörper zu beobachten (dicke weiße Pfeile), die scheinbar mit den retinalen Blutgefäßen in Verbindung stehen. Ganz ähnliche Beobachtungen, wie die hier für p15 beschriebenen, wurden auch an p21 gemacht. Zusammenfassend zeigen diese histologischen Analysen, dass in *Ndph*^{v/-}-Mäusen die Regression der hyaloiden Gefäße von Beginn an gestört ist und dass sich besonders in der Ganglienzellschicht zwischen p10 und p15 auffällige morphologische Unterschiede entwickeln.

3.3.2 Expression von Angiogenesefaktoren während der postnatalen Retinaentwicklung

Um die molekularen Prozesse besser zu verstehen, die während der Blutgefäßentwicklung ablaufen, wurde die Expression von Angiogenesefaktoren in den gleichen Entwicklungsstadien (p5, p10, p15 und p21) mit Hilfe quantitativer „Real Time PCR“ (2.4.6) untersucht und die Ergebnisse (Abbildung 20; Abbildung 21) mit den histologischen Daten verglichen. Bei den untersuchten Angiogenesefaktoren handelte es sich um Mitglieder der VEGF-Familie (*Vegfa*), deren Rezeptoren (*VegfR1 (Flt-1)*; *VegfR2 (Flk-1)*), um Mitglieder der Angiopoietin-1/Angiopoietin-2-Tie-Familie (*Agpt1*; *Agpt2*; *Tie1*; *Tie2*), um den Pdgfβ-Signalweg mit seinem Ligand- und Rezeptorpaar (*Pdgfβ*; *PdgfRβ*) und den Wnt-Frizzled-Signalweg sowie um die, die Blutgefäßentwicklung modulierenden, Faktoren

Insulin like growth factor *Igf1* und *Igf2*. Von besonderem Interesse war unter all diesen Faktoren der Vertreter der Wnt-Rezeptoren *Frizzled-4 (Fzd4)*, da auch in diesem Gen, wie in *Ndph*, Mutationen gefunden wurden, die zu familiärer exsudativer Vitreoretinopathie (FEVR) führen (Robitaille et al., 2002).

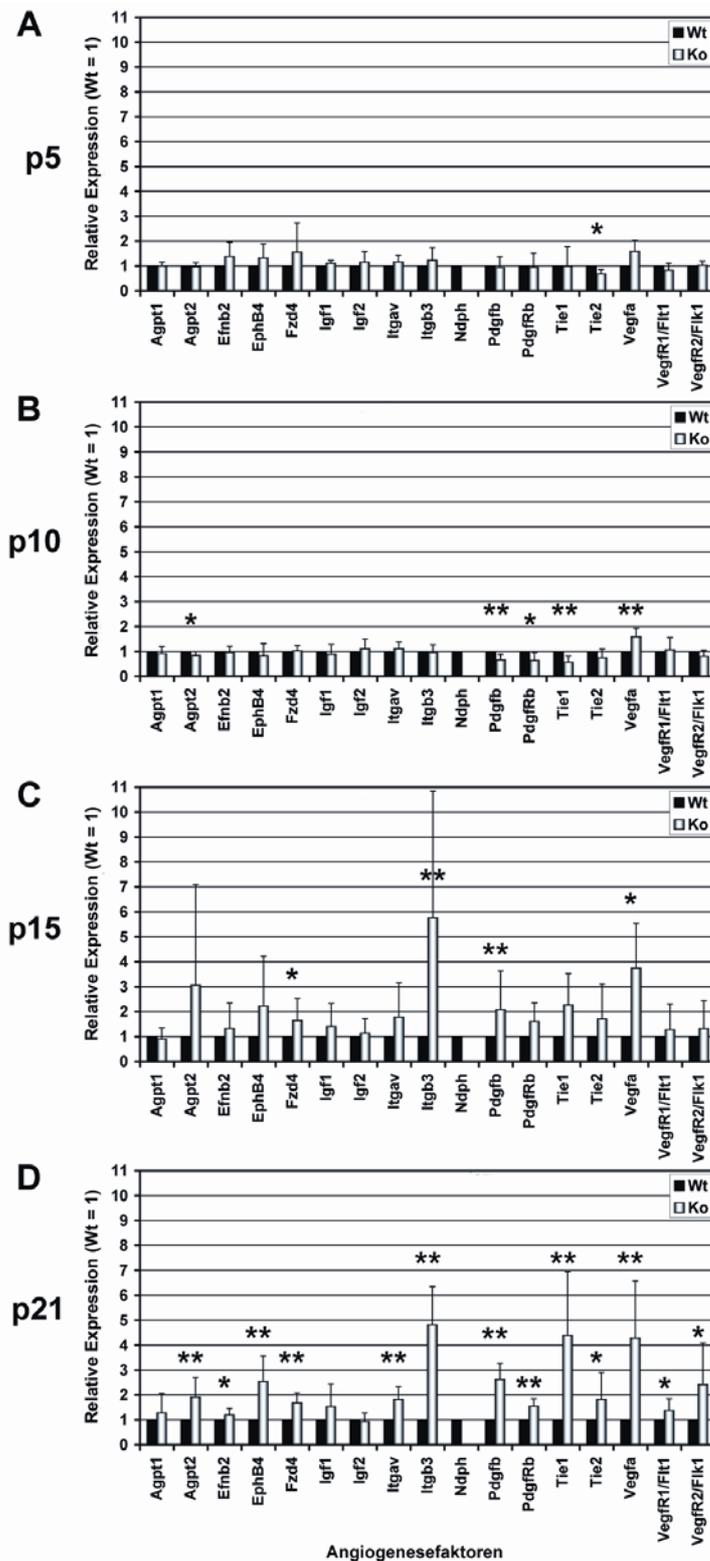


Abbildung 20: Relative Expression von Angiogenesefaktoren in Retinae von *Ndph*-knockout-Tieren relativ zu den Wildtyp-Transkriptmengen in den Stadien p5 (A), p10 (B), p15 (C) und p21 (D). Die relative mRNA-Transkriptmengen eines jeden Gens wurden mit Hilfe quantitativer RT-PCR (TaqMan) in jeweils 3–5 Geschwisterpaaren (Wildtyp (Wt) und *Ndph*-Knockout (Ko)) ermittelt. Die einzelnen Werte wurden jeweils auf die 18S rRNA-Menge normalisiert und dann die Ko-Expressionspegel relativ zum Wildtyp (Wt = 1 gesetzt, dargestellt in schwarz) bestimmt. Die Knockout-Expressionspegel sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (hellgraue Säulen). Statistisch signifikante Veränderungen sind mit einem Stern markiert (Student's test $p < 0.05$; *), während hochsignifikante Veränderungen mit zwei Sternen markiert sind (Student's test $p < 0.01$; **).

Die relative Expression der Angiogenesefaktoren in *Ndph*-knockout-Mäusen wurde entweder im Vergleich zu den Wildtyp-Transkriptmengen des jeweiligen Altersstadiums (Abbildung 20) oder im Vergleich zum Expressionsniveau des *Ndph*-Gens in Wildtyp-Retinae des Stadiums p5 (Abbildung 21) bestimmt. Dies ermöglichte es einerseits, die Unterschiede im Expressionsniveau der Angiogenesefaktoren zwischen Wildtyp- und Knockout-Retinae zu veranschaulichen (Abbildung 20), andererseits aber auch den Verlauf der Expression in der frühen postnatalen Entwicklung einzuschätzen sowie einen relativen Vergleich des Expressionsniveaus der einzelnen Faktoren während der normalen (Wt) und pathologischen (Ko) Entwicklung der Retina vorzunehmen (Abbildung 21).

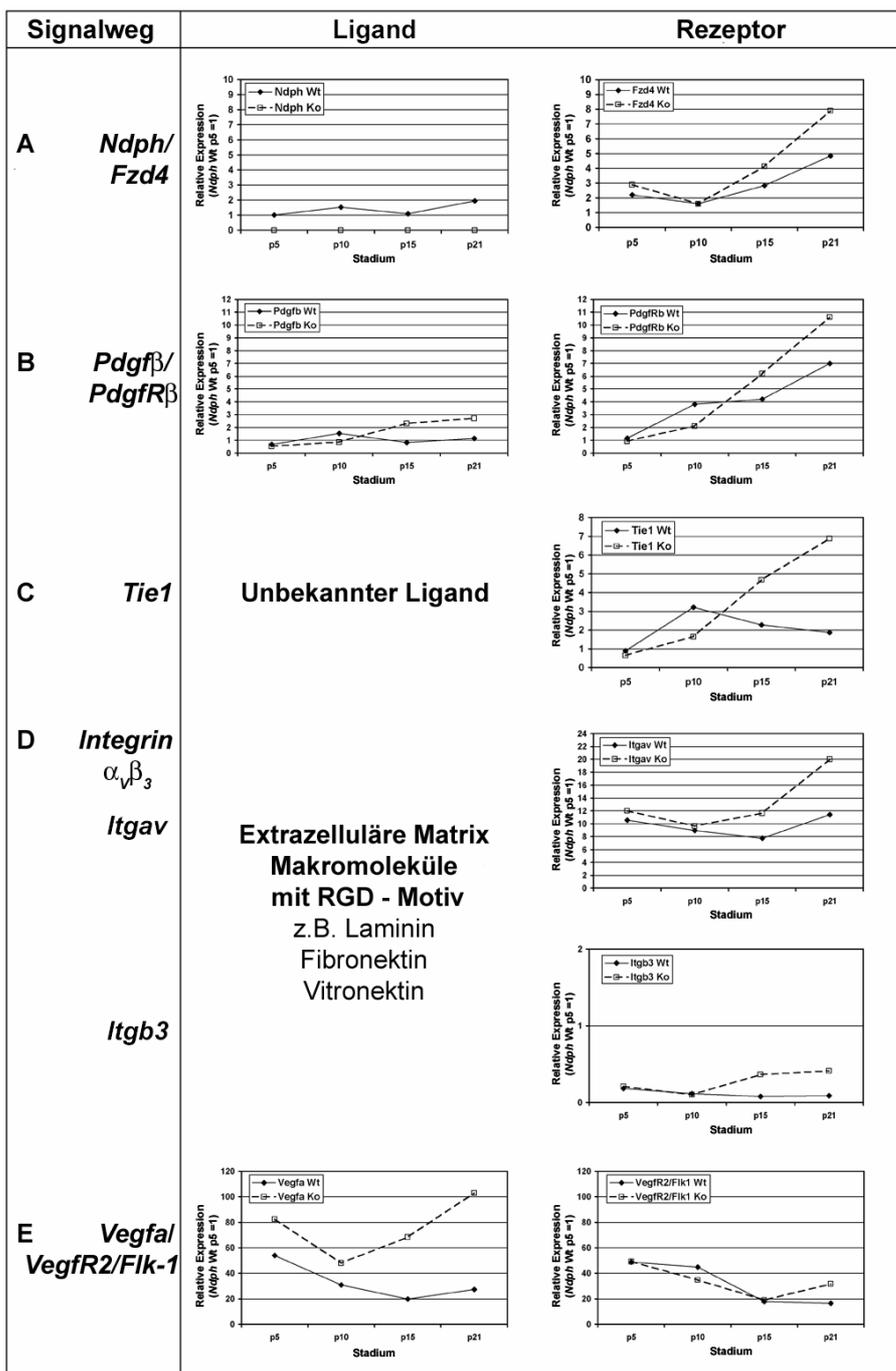


Abbildung 21:
Entwicklungsabhängiger Verlauf der Expression in der Retina von Ligand- und Rezeptor-Paaren ausgewählter, angiogener Signalwege.

Die gemittelte, relative Expression ausgewählter Gene an p5, p10, p15 und p21, jeweils bezogen auf den Mittelwert der Wildtyp Expressionsspiegel von *Ndph* des Stadiums p5 (gesetzt als 1) ist dargestellt. Die Daten ermöglichen den Vergleich des Zeitverlaufs der Expression dieser Faktoren unter normalen (Wildtyp; durchgezogene Linie) und pathologischen (*Ndph* - Ko; gestrichelte Linie) Bedingungen.

Verglich man die Expressionsunterschiede zwischen Retinae der Wildtyp- und *Ndph*^{y/-}-knockout-Tiere ganz generell, so konnte man in den Stadien p5 und p10 nur sehr wenige und eher milde Transkriptionsveränderungen beobachten, während, im Gegensatz dazu, an p15 und besonders an p21 viele der Angiogenesefaktoren in den *Ndph*-knockout-Mäusen aktiviert waren (Abbildung 20 A - D). Diese generell erhöhte transkriptionelle Aktivität in *Ndph*^{y/-}-Retinae der Stadien p15 und p21 stimmte zeitlich gut mit den beobachteten morphologischen Veränderungen gleicher Entwicklungsstadien überein (siehe 3.3.1).

Somit spielt also die über den zeitlichen Verlauf der normalen retinalen Entwicklung (Wt) von p5 bis p21 einen nur leicht ansteigenden, aber nicht signifikanten, Trend zeigende *Ndph*-Expression (Abbildung 21 A) eine wesentliche Rolle für die normale postnatale Entwicklung. Korrelierte man die transkriptionellen Veränderungen des Wnt-Rezeptors Frizzled-4 (*Fzd4/Fz4*) mit der *Ndph*-Expression, so zeigte sich, dass die relative Expression (RE) von *Fzd4* in den *Ndph*-knockout-Mäusen von RE = 1,65 ± 0,89 an p15 bis zu einer RE von 1,68 ± 0,41 an p21 eher mild anstieg (Abbildung 20 C und D) und dass die Transkriptmenge von *Fzd4* im Wildtyp von p10 stärker und schneller zunahm als die von *Ndph*. Dieser Anstieg war, im Vergleich zum Wildtyp, in den *Ndph*-knockout-Retinae von p15 bis p21 deutlich stärker ausgeprägt (Abbildung 21 A).

Eine noch früher, an p10, zu identifizierende Veränderung war eine signifikant reduzierte relative Expression von *Pdgfβ* (RE = 0,66 ± 0,22), die begleitet wurde von einer reduzierten Expression des zugehörigen Rezeptor *PdgfRβ* (RE = 0,64 ± 0,31) (Abbildung 20 B). Interessanterweise wurde dann aber an p15 ein erhöhter Expressionsspiegel für *Pdgfβ* (RE = 2,09 ± 1,55) in den *Ndph*-knockout-Mäusen beobachtet (Abbildung 20 C), der bis p21 weiter leicht zunahm (RE = 2,62 ± 0,65) (Abbildung 20 D). Einen sehr ähnlichen Verlauf zeigte auch die Expression von *PdgfRβ*, obwohl der Unterschied zwischen *Ndph*-Knockout und Wildtyp erst wieder an p21 signifikant wurde (RE = 1,55 ± 0,30; Abbildung 20 D). Vergleich man den zeitlichen Verlauf der Expression der beiden Gene miteinander, so zeigte sich, dass der Expressionsspiegel von *Pdgfβ* während der normalen postnatalen Retinaentwicklung (Wt) eher konstant blieb, die Expression des Rezeptors (*PdgfRβ*) aber von p5 bis p21 zunahm (Abbildung 21 B). Hingegen führte für beide Gene das Fehlen der *Ndph*-Expression in der Retina (Ko) zu einer geringeren Expression an p10, die dann später, vermutlich kompensatorisch, stärker im Knockout als im Wildtyp anstieg. Dies ließ einen frühen Effekt der fehlenden *Ndph*-Expression und damit der Abwesenheit des Proteins Norrin auf Endothelzellen und eventuell Perizyten vermuten. Zusätzlich wurde dies unterstützt durch die

Beobachtung, dass auch die Expression des endothelzellspezifischen Rezeptors *Tie-1* einen ähnlichen Verlauf wie die von *Pdgfr β* nahm, wobei hier der Anstieg im Knockout im Vergleich zu *Pdgfr β* deutlich stärker ausfiel (Abbildung 21 C). Die *Tie-1*-Expression war an p10 in den *Ndph*-knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp reduziert (RE = $0,57 \pm 0,25$) und nahm dann über p15 (RE = $2,26 \pm 1,26$) bis hin zu p21 (RE = $4,39 \pm 2,55$) deutlich zu (Abbildung 20 C und D).

Die auffälligste Veränderung unter allen Angiogenesefaktoren, mit einer etwa 5fach höheren Expression in Retinae von *Ndph*-knockout-Mäusen verglichen zum Wildtyp, wurde für Integrin β_3 (*Itgb3*) an p15 und p21 beobachtet (p15: RE = $5,76 \pm 5,07$; p21: RE = $4,81 \pm 1,53$, Abbildung 20 C und D). Dies legte ebenfalls eine gestörte Kommunikation von Endothelzellen mit ihrer Umgebung nahe. Auch die Expression des Vertreters der zweiten Integrin-Unterfamilie, Integrin α_V (*Itgav*), zeigte von p15 an einen Anstieg, der bis hin zum signifikanten Unterschied an p21 zunahm (RE = $1,82 \pm 0,53$; Abbildung 20 D).

Auch die Expression von *Vegfa*, eines der wichtigsten Faktoren in der Blutgefäßentwicklung, zeigte in Retinae von *Ndph*-knockout-Mäusen einen dramatischen Anstieg ab p10 (RE = $1,59 \pm 0,34$), über p15 (RE = $3,74 \pm 1,81$), bis hin zu p21 (RE = $4,28 \pm 2,30$; Abbildung 20 D und Abbildung 21 E). Dabei ist besonders interessant, dass das zeitliche Expressionsprofil während der normalen retinalen Entwicklung eine Abnahme der Expression zeigte, während in den *Ndph*-knockout-Retinae die Expression von p10 an stetig signifikant stieg (Abbildung 21 E). Die pathologisch angestiegene Expression von *Vegfa* ist ein wichtiger Nachweise für eine, während der Entwicklung entstehende und zunehmende Hypoxie in der Retina von *Ndph*-knockout-Mäusen. Diese scheint dann auch Auswirkungen auf andere Angiogenesefaktoren, wie z.B. den *Vegfr2*, zu haben, der an p21 signifikant in seiner Expression (RE = $2,42 \pm 1,67$) erhöht war.

Zusammenfassend zeigten die durchgeführten Expressionsanalysen eine transkriptionelle Aktivierung von Genen, die an der Blutgefäßentwicklung in der Retina, hauptsächlich am Prozess der Angiogenese, beteiligt sind. Diese transkriptionelle Aktivierung der Signalwege, insbesondere die Aktivierung von *Vegfa*, legte die Entwicklung einer zunehmenden Hypoxie während der postnatalen Retinaentwicklung nahe, welche wiederum zu einer im Vergleich zum Wildtyp hohen angiogenen Kapazität, angezeigt durch die vielen Veränderungen an p15 und p21, in den Retinae von *Ndph*-knockout-Mäusen führt.

3.4 Histologische Untersuchungen und Genexpressionsanalysen im Gehirn von *Ndph*-knockout-Mäusen

In diesem Abschnitt der Doktorarbeit sollte zum ersten Mal systematisch nach morphologischen oder molekularen Veränderungen im Gehirn von *Ndph*^{y/-}-Mäusen gesucht werden, die als Ursache für die geistige Behinderung bei Norrie-Patienten in Frage kommen.

3.4.1 Histologische Untersuchungen im Gehirn

Die Morphologie des Gehirns wurde zunächst histologisch untersucht (2.2), um mögliche Defekte in der Hirnstruktur zu identifizieren. Dabei wurden verschiedene Entwicklungsstadien (p14, p21, 6 Monate und 12 Monate) verwendet und die Übersichtsaufnahmen der Gehirne aus diesen Stadien in Abbildung 22 dargestellt. Bei der mikroskopischen Untersuchung mit höheren Vergrößerungen ergaben sich keine Hinweise auf besonders prominente Veränderungen in der Struktur der einzelnen Hirnregionen der *Ndph*^{y/-}- gegenüber den Wildtyp-Tieren, die mit Hilfe der hier verwendeten Hämalaun-Eosin-Färbung einfach erkannt worden wären. Für eine detaillierte Analyse der Morphologie des Gehirns, bedarf es aber weiterführender Studien, beispielsweise mit Hilfe von zellspezifischen Markern, die quantifiziert werden könnten.

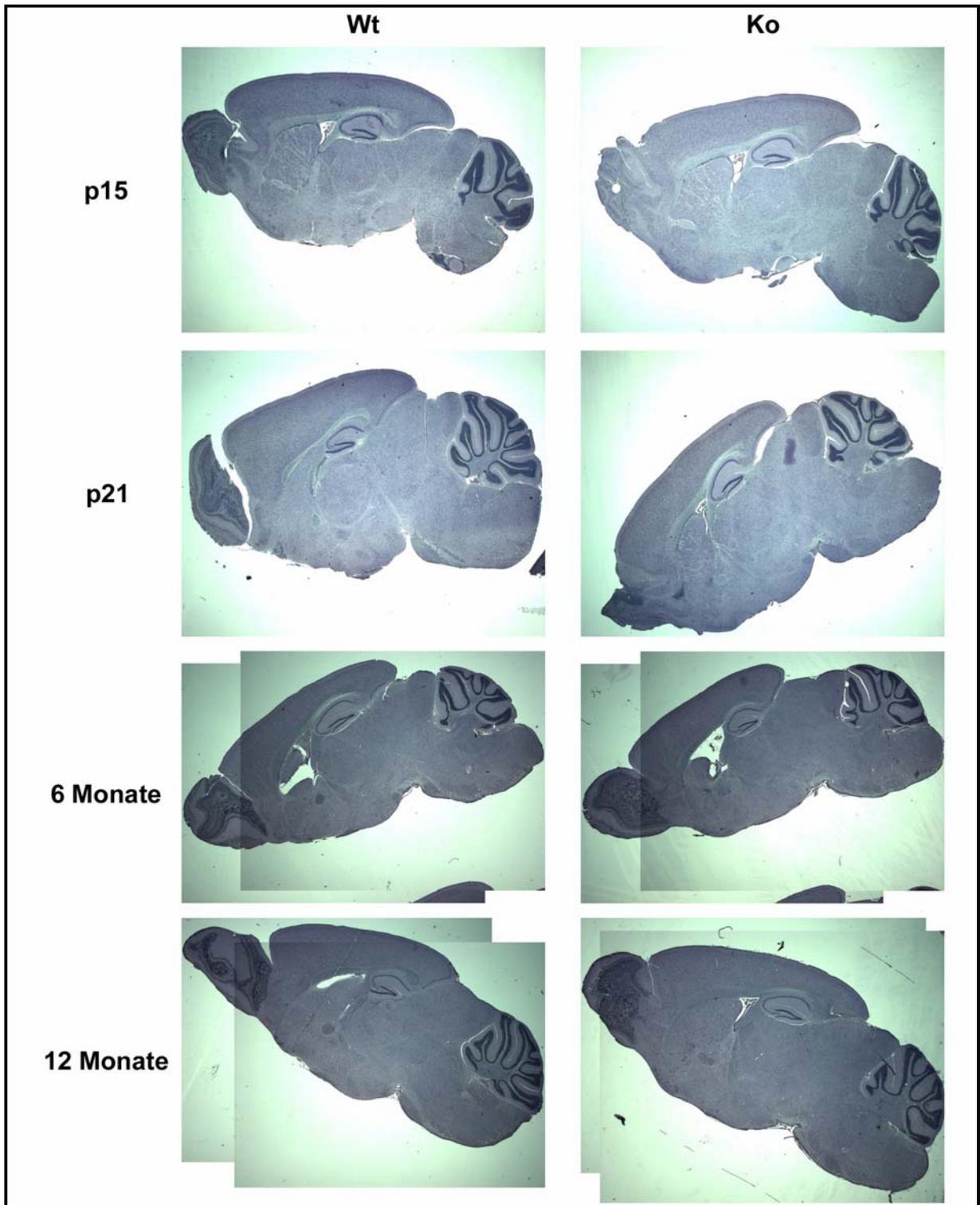


Abbildung 22: Hämalaun-Eosin-Färbungen von Wildtyp- und *NdpH*^{KO}-Gehirnen verschiedener Altersstadien. Dargestellt sind repräsentative Übersichtsaufnahmen sagittaler Paraffin-Gewebeschnitte der untersuchten Stadien p14, p21, 6 Monate und 12 Monate (Vergrößerung 1,25 x).

3.4.2 Analyse der Genexpression im Gehirn mit Hilfe eines cDNA-Mikroarrays

Da die morphologischen Studien keinen direkten Hinweis auf betroffene Regionen im Gehirn von männlichen *Ndph*-knockout-Mäusen (*Ndph*^{y/-}) geliefert haben, sollte die Erstellung eines globalen Genexpressionsprofils für dieses Gewebe helfen, Gene zu identifizieren, die Unterschiede in der Expression zwischen Wildtyp- und Knockout-Mäusen aufwiesen.

In vier unabhängig durchgeführten Kohybridisierungsexperimenten wurden fluoreszenzmarkierte cDNAs aus einem Wildtyp (Cy3) und einem Knockout (Cy5) RNA-Pool, bestehend aus der Total-RNA aus Gesamt-Gehirn jeweils dreier 12 Monate alter Tiere, auf einen cDNA-Mikroarray hybridisiert (2.6.6.2). Mit Hilfe dieses cDNA-Mikroarrays (2.6.3), auf dem sich gehirnspezifische ESTs (n = 3180) aus Maus befanden (Landgrebe et al., 2002), konnten wir 18 Gene identifizieren, deren Transkription im Gehirn von *Ndph*^{y/-}-knockout-Mäusen reduziert war (Tabelle 54).

Tabelle 54: Genexpressionsunterschiede im Gehirn von *Ndph*^{y/-}-knockout-Mäusen. Die Analyse von vier unabhängigen cDNA-Mikroarray-Experimenten ergab 18 Gene, deren Transkripte im Gehirn von *Ndph*-knockout-Mäusen (Ko) verglichen zum Wildtyp (Wt) reduziert waren. In der Tabelle aufgeführt sind nur die Gene, die in mindestens zwei der vier unabhängigen Experimenten als differentiell exprimiert auftraten. Zusätzlich erfüllten sie die folgenden Kriterien („Spotfläche“ ≥ 30 Einheiten; Ratio oder Kalibrierte Ratio ≤ 0.5) Die Annotierung der Klone basiert auf einer nBLAST-Datenbankanalyse der Sequenz des IMAGE-Klons (NCBI; 8.11.2003).

Klonbezeichnung	IMAGE Klon ID auf dem Mikroarray	Genname	Funktion	n-mal in den vier Experimenten	Mittelwert Ratio ± Standardabweichung	Mittelwert kalibrierte Ratio ± Standardabweichung
7A5	440712	Mus musculus insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r)	Membrangebundener Rezeptor	4	0,34 ± 0,00	0,51 ± 0,08
8A12	468005	Mus musculus paraoxonase 3 (Pon3)	Arylesterase	4	0,46 ± 0,13	0,51 ± 0,06
7E3	458398	M.musculus mRNA for CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	DNA bindendes Protein	3	0,40 ± 0,16	0,38 ± 0,01
12A9	575422	Mus musculus RIKEN cDNA 1300007C21 gene (1300007C21Rik), = Klon 10C8	Nicht zu klassifizieren Verwandtschaft zu viralen Genen	3	0,38 ± 0,19	0,42 ± 0,02
7E4	458627	Mus musculus factor 8-associated gene A (F8a)	Huntingtin assoziiertes Protein 40	3	0,44 ± 0,16	0,42 ± 0,06
11C8	560873	Mus musculus forkhead box A2 (Foxa2), mRNA	„winged helix“ Transkriptionsfaktor	3	0,46 ± 0,2	0,43 ± 0,08
10C8	536377	Mus musculus RIKEN cDNA 1300007C21 gene (1300007C21Rik), = Klon 12A9	Nicht zu klassifizieren Verwandtschaft zu viralen Genen	3	0,35 ± 0,09	0,45 ± 0,02

11A7	556638	Mus musculus GTL2, imprinted maternally expressed untranslated mRNA, mRNA (cDNA clone IMAGE:5365391)	Unbekannt	3	0,40 ± 0,19	0,45 ± 0,11
2A5	330360	Mus musculus growth hormone	Hormon	3	0,50 ± 0,18	0,48 ± 0,03
7A6	440797	Mus musculus RIKEN cDNA 1810013D10 gene, (cDNA clone IMAGE:1379146)	Unbekannt	3	0,47 ± 0,17	0,52 ± 0,03
12A7	575114	Mus musculus transcription factor B2, mitochondrial (Tfb2m), ORF1; house-keeping protein 1	Mitochondrialer Transkriptionsfaktor	3	0,47 ± 0,19	0,53 ± 0,02
17E4	762173	Mus musculus proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor (Pcsk1n)	Inhibiert Prohormon-Prozessierung	3	0,38 ± 0,04	0,57 ± 0,03
2A6	330213	Mus musculus brain protein 44-like (Brp44l)	Apoptoseregulation	2	0,36 ± 0,1	0,35 ± 0,05
8E3	476156	Mus musculus mitochondrial ribosomal protein L34 (Mrpl34)	Ribosomales Strukturprotein	2	0,53 ± 0,11	0,45 ± 0,01
12E9	577608	Mus musculus sphingosine-1-phosphate phosphatase 1 (cDNA clone MGC:46758 IMAGE: 5004335)	Sphingolipid-Metabolismus Apoptose	2	0,57 ± 0,14	0,48 ± 0,01
5A2	368564	Mus musculus paired-like homeodomain transcription factor 1 (Pitx1)	Transkriptionsfaktor Hypophyse	2	0,44 ± 0,04	0,51 ± 0,05
9E1	514907	Mus musculus myotubularin related protein 13 (cDNA clone IMAGE: 3668035)	Plextrinhomologie Domänen Protein, Signaltransduktion	2	0,35 ± 0,02	0,53 ± 0,11
11B11	558536	Mus musculus tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide (cDNA clone MGC:5765 IMAGE:3589806)	Intrazellulärer Proteintransport 14-3-3eta Signalprotein	2	0,39 ± 0,04	0,57 ± 0,03

Um die Ergebnisse aus den Array-Experimenten zu verifizieren, haben wir mit RT-PCR (2.4.5/ 2.3.2) auf cDNA aus Gehirnen 12 Monate alter Tiere (*Ndph*^{y/+}, *Ndph*^{y/-}) die differentielle Expression im Vergleich zu *Gapd* untersucht (Abbildung 23).

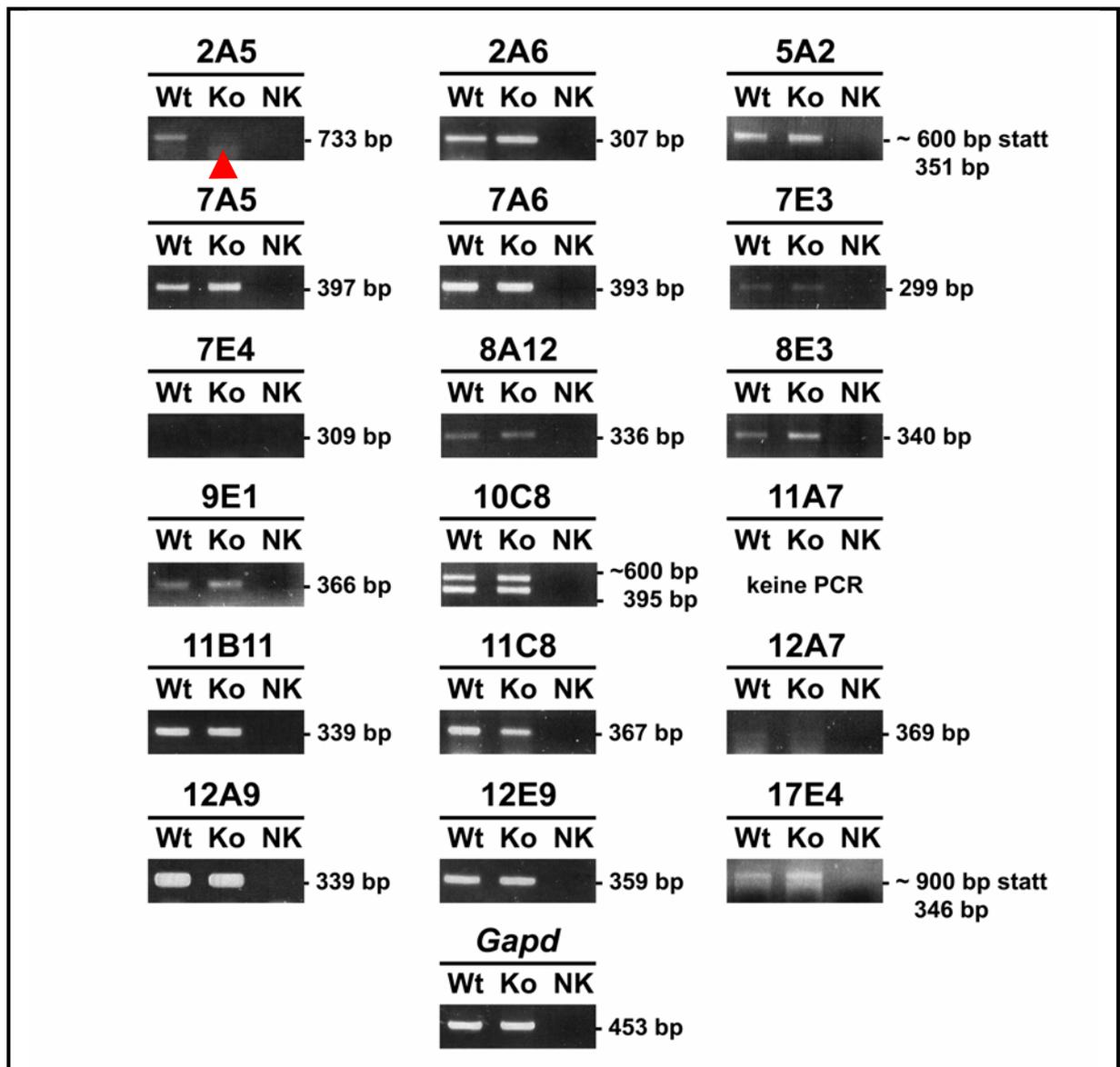


Abbildung 23: Expressionsuntersuchung der Kandidatengene mittels RT-PCR. Gezeigt sind jeweils die +RT-PCR-Ergebnisse der durch die cDNA-Mikroarray-Hybridisierungen identifizierten Kandidatengene und die Nullkontrolle (NK) auf cDNA aus dem gesamten Gehirn von Wildtyp (Wt) und *Ndph*^{-/-}-Mäusen (Ko) im Alter von 12 Monaten. Die -RT-Kontrollen waren leer und sind nicht gezeigt. Die Klonbezeichnungen entsprechen den Plattenpositionen aus den Mikroarrayexperimenten und sind in Tabelle 54 den einzelnen Genen zugeordnet. Der rote Pfeilkopf weist auf das Fehlen der Wachstumshormonexpression (Klon2A5) im Gehirn von 12 Monate alten *Ndph*^{-/-}-Mäusen hin.

Durch diese Untersuchungen konnten wir die differentielle Expression des Wachstumshormons (*Gh*; Klon 2A5; roter Pfeilkopf) bestätigen. Keines der anderen Gene wies dabei so deutliche Expressionsunterschiede wie das Wachstumshormon auf. Für die Klone 5A2, 7E4, 11A7 und 17E4 wurden nicht die PCR-Produkte der erwarteten Größe erhalten.

3.4.3 Entwicklungsabhängige Transkription des Wachstumshormon-Gens im Gehirn.

Nachdem die stark reduzierte Expression des Wachstumshormons (*Gh*) im Gehirn von 12 Monate alten Knockout-Tieren durch konventionelle RT-PCR bestätigt worden war, sollte die Transkription des Wachstumshormons im Gesamthirn auch in verschiedenen Entwicklungsstadien (p14; p21; p28; 3 Monate; 6 Monate; 12 Monate) durch Northern Blot Hybridisierungen und RT-PCR untersucht werden (Abbildung 24).

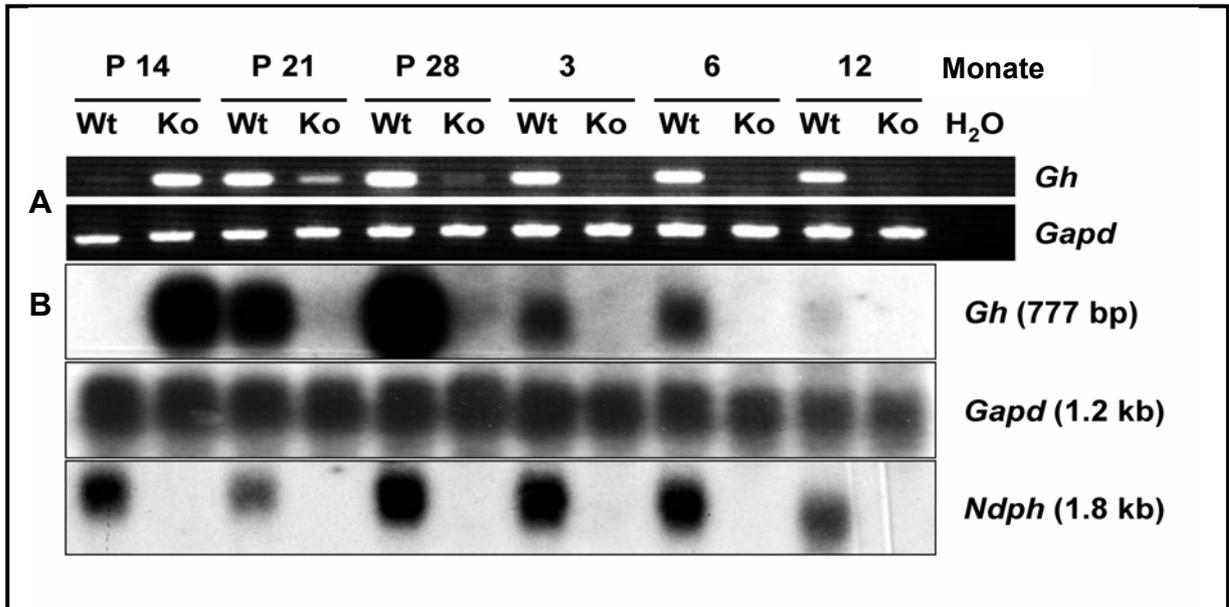


Abbildung 24: Entwicklungsabhängige Expression des Wachstumshormons (*Gh*) im Gehirn von *Ndph*^{+/+} (Wt)- im Vergleich zu *Ndph*^{-/-} (Ko)-Mäusen. A: RT-PCR, B: PolyA⁺-Northern Blot Hybridisierungen. H₂O: RT-PCR Wasser Kontrolle; *Gh*: growth hormone (Wachstumshormon); *Ndph*: Norrie disease pseudoglioma Homolog; *Gapd*: Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase).

Insgesamt haben wir einen Anstieg der Wachstumshormonexpression zwischen p14 und p28 in *Ndph*^{+/+}-Wildtyp-Mäusen beobachtet, während sie von p28 an abnimmt. An p14 war die mRNA-Menge im Gehirn von *Ndph*^{-/-}-knockout-Tieren in etwa vergleichbar mit den Mengen in p21 Wildtyp-Kontrolltieren und nahm dann bis zum Alter von 12 Monaten ab. In den *Ndph*-knockout-Mäusen wurde von p21 an eine dramatische Reduktion der Wachstumshormontranskripte beobachtet. Nur an p14 waren die Wachstumshormontranskriptmengen im Knockout-Tier höher als im Wildtyp, in dem das Wachstumshormon mit RT-PCR nicht detektiert werden konnte (Abbildung 24 A). Diese Daten, gewonnen von einem Tierpaar aus dem Stadium p14, sind ein erster Hinweis für einen abweichenden zeitlichen Verlauf der Wachstumshormonexpression in den jungen *Ndph*-knockout-Tieren im Vergleich zu den älteren. Unter Berücksichtigung dieser Daten haben wir eher eine entwicklungsabhängige Dysregulation als eine konsistente Verringerung der

Expression des Wachstumshormons im Gehirn von *Ndph*^{-/-}-knockout-Mäusen verglichen zu *Ndph*^{+/+}-Kontrollen beobachtet.

3.4.4 Expression des Wachstumshormons in der Hypophyse

Die Hypophyse ist die Hauptquelle für systemisches Wachstumshormon, dessen Serumspiegel das Körperwachstum durch eine endokrine Wirkung steuert (Lupu et al., 2001). Um zu untersuchen, ob in der Hypophyse Expressionsunterschiede für das Wachstumshormon entweder auf RNA- oder auf Proteinebene vorhanden sind, haben wir quantitative „Real Time“-RT-PCR (2.4.6) und Western Blot Analysen (2.7.5) für verschiedene Entwicklungsstadien (p15; p21; 6-7 Monate) durchgeführt (Abbildung 25).

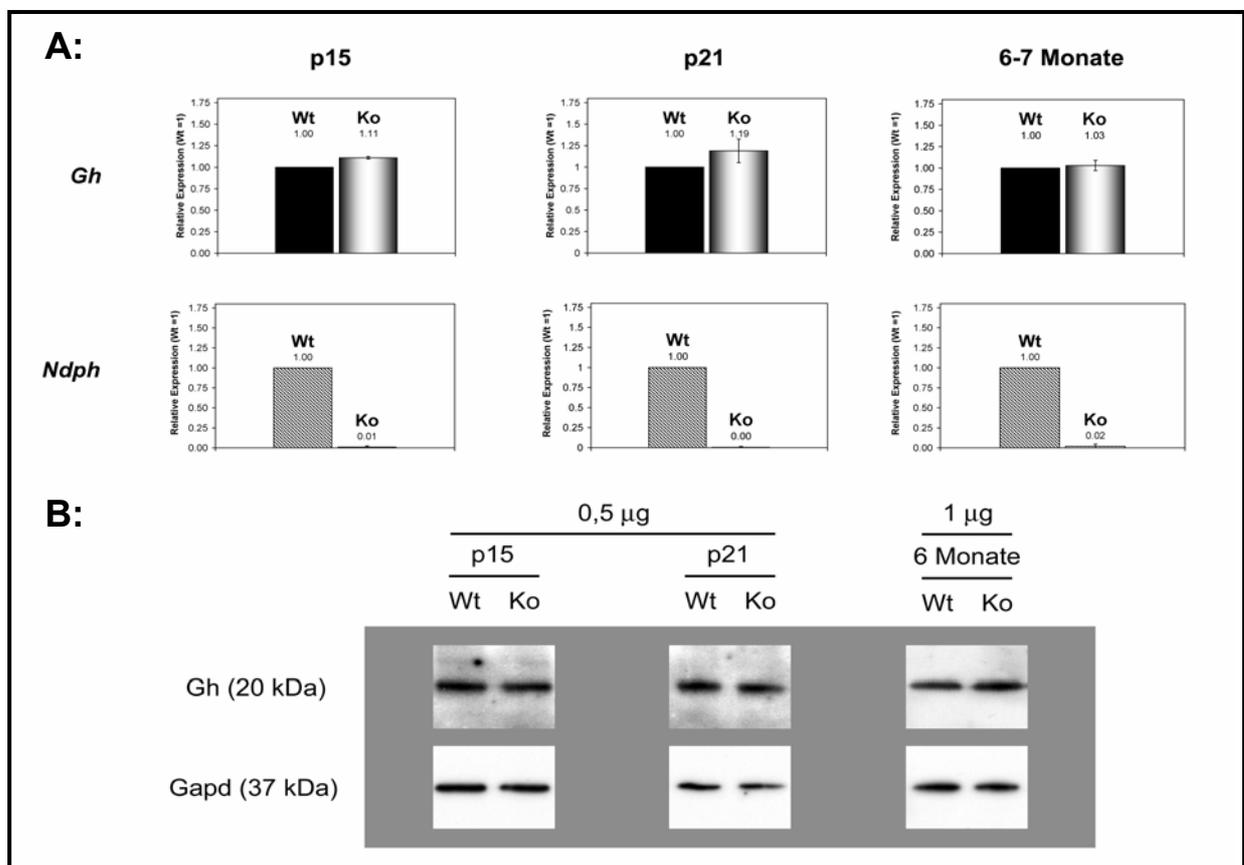


Abbildung 25: Expression des Wachstumshormons in der Hypophyse. **A:** Vergleich der *Gh* (Wachstumshormon)- und der *Ndph* (Norrie disease pseudoglioma homolog)-mRNA-Expression in der Hypophyse von *Ndph*^{-/-}- und *Ndph*^{+/+}-Mäusen mit relativer quantitativer RT-PCR (TaqMan). Es wurden verschiedene Stadien (p15; p21; 6-7 Monate) untersucht und die Wildtyp-Expressionsmengen jeweils gleich 1 gesetzt. **B:** Western Blot Analyse des Wachstumshormons (Gh) im Vergleich zur Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase in Proteinhomogenaten der Hypophyse von *Ndph*^{-/-}- und *Ndph*^{+/+}-Mäusen verschiedener Altersstadien (p15; p21; 6-7 Monate).

Sowohl der mRNA- (Abbildung 25 A) als auch der Proteinspiegel (Abbildung 25 B) für das Wachstumshormon sind in der Hypophyse von Wildtyp- und *Ndph*^{-/-}-Mäusen vergleichbar, so

dass die Knockout-Mutation die Wachstumshormonexpression in der Hypophyse nicht beeinflusst. Zusätzlich konnte die Expression des Wachstumshormons in Hypophysen beider Genotypen mit Hilfe der RNA-*in situ* Hybridisierung (2.4.7) nachgewiesen werden (Abbildung 26).

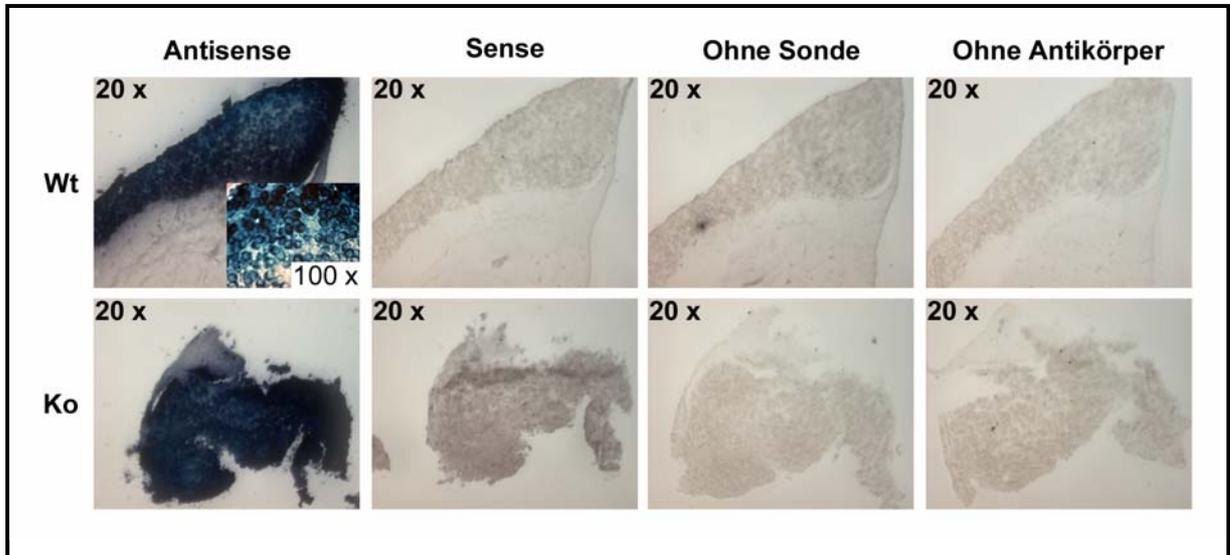


Abbildung 26: RNA-*in situ* Hybridisierung für Wachstumshormon (*Gh*) auf Schnitten der Hypophyse von Mäusen im Alter von 6 Monaten. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden auf in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitten (7µm). Es sind jeweils Aufnahmen für die Antisense-Sonde und die drei Kontrollen (Sense, ohne Sonde und ohne Antikörper) in einer 20fachen Vergrößerung gezeigt. Für die Antisense-Sonde wurde zusätzlich eine Aufnahme in 100facher Vergrößerung eingefügt, in der man die zelluläre Lokalisation der Färbung in der Hypophyse des Wildtyp-Tieres erkennen kann. Die unterschiedlich aussehenden Morphologien bei Wt und Ko lassen sich durch die unterschiedliche Orientierung der Gewebe beim Schneiden erklären.

Zusätzlich wurde versucht, die Wachstumshormonexpression mittels RNA-*in situ* Hybridisierung auf sagittalen Gehirnschnitten von Wildtyp- und *Ndph*^{+/−}-Mäusen nachzuweisen. Diese Analysen wurden parallel zu der gezeigten RNA-*in situ* Hybridisierung auf den Hypophysen durchgeführt. Allerdings konnte weder im Gehirn von Wildtyp- noch im Gehirn von *Ndph*^{+/−}-knockout-Mäusen eine Expression nachgewiesen werden. Da die *Gh*-Transkriptmenge in den Wildtyp-Tieren laut Northern Blot und RT-PCR-Daten (Abbildung 24 A und B) deutlich höher sein sollte, als in Knockout-Tieren, spricht dieser Befund, für eine deutlich niedrigere Expression des Wachstumshormons im Gehirn als in der Hypophyse.

3.4.5 Expression zweier Markergene in der Leber für die Gh-Serum-Wirkung

Gleiche Wachstumshormonmengen in der Hypophyse bedeuten nicht automatisch, dass man identische Spiegel des Hormons im Serum vorfindet, da zum Beispiel die Sekretion des

Hormons in die Blutbahn gestört sein könnte. Aus diesem Grund haben wir die mRNA-Expression zweier Gh-Ziel-Gene in der Leber untersucht, deren Transkription durch die Wachstumshormonspiegel im Serum gesteuert wird. Dabei handelte es sich um *Igf1* (Musculus insulin-like growth factor 1) und um *Igfals* (Musculus insulin-like growth factor binding protein, acid labile subunit). Der größte Anteil von *Igf1* zirkuliert im Serum als ein ternärer Proteinkomplex, der durch die Assoziation von Igfbp3 (Insulin-like growth factor binding protein 3)-*Igf1*-Komplexen mit *Igfals* gebildet wird (Boisclair et al., 2000). Das Gen *Igfals* wird in Hepatozyten exprimiert und seine Promotorregion enthält ein Transkriptionsregulierendes Element, welches durch Wachstumshormon im Serum gesteuert wird (Boisclair et al., 1996). Da diese Transkriptionskontrolle durch die Serum-Gh-Spiegel sehr stringent ist, können die Transkriptmengen dieser beiden Gene einen indirekten Hinweis auf die Serummengen des Wachstumshormons liefern. Für beide *Igf1*-Spleißvarianten (Abbildung 27 A) und für *Igfals* (Abbildung 27 B) konnten in der Leber von Wildtyp- und Knockout-Mäusen der Stadien p14 und p21 keine Expressionsunterschiede mittels RT-PCR festgestellt werden, die auf veränderte Wachstumshormon-Serummengen hindeuten würden. Als nicht reguliertes Kontrollgen wurde *Gapd* verwendet.

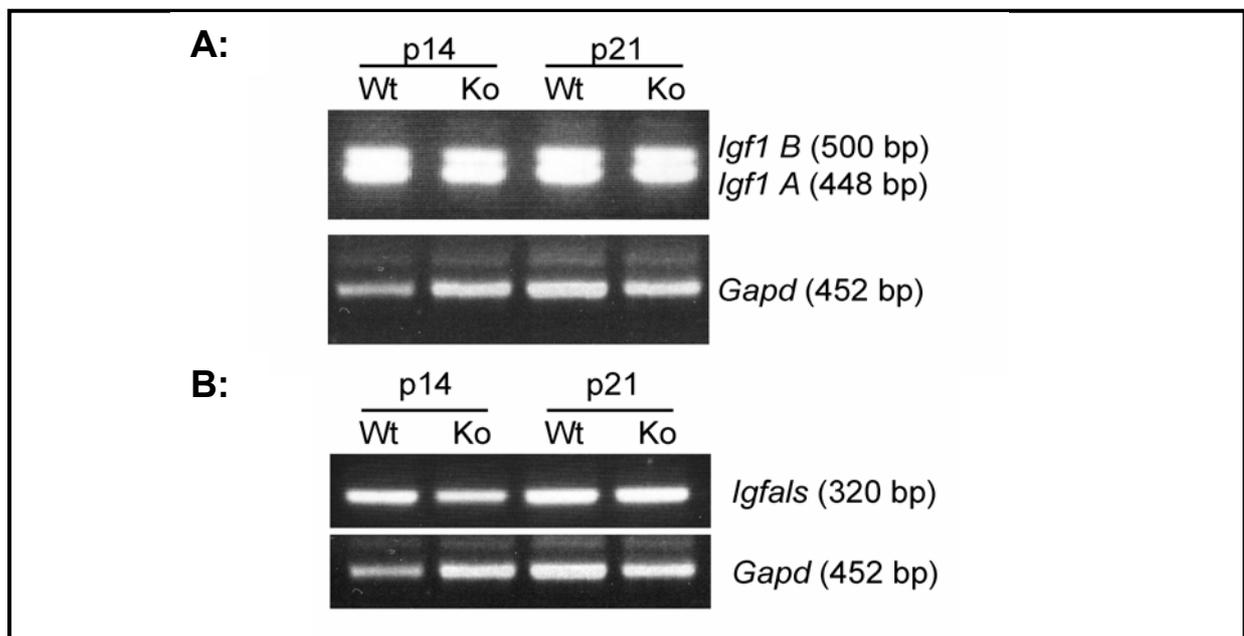


Abbildung 27: Expression zweier durch Serum-Wachstumshormonspiegel regulierter Gene in der Leber. **A:** RT-PCR-Ergebnisse für *Igf1* und *Gapd* auf Leber-cDNAs von Wildtyp (Wt)- und Knockout (Ko)-Mäusen zweier Stadien (p14; p21); je 10 µl Aliquots der PCR-Ansätze wurden auf ein 1,2%iges Agarosegel geladen. Das verwendete Primerpaar mmIgf1for1 mit mmIgf1rev1 für Insulin like growth factor 1 flankiert das alternativ gespleißte Exon 3. Die Spleißvariante *Igf1B* beinhaltet Exon 3, *Igf1A* nicht. **B:** RT-PCR Ergebnisse für *Igfals* und *Gapd* auf Leber-cDNAs von Wildtyp (Wt)- und Knockout (Ko)-Mäusen zweier Stadien (p14; p21); je 10 µl Aliquots der PCR-Ansätze wurden auf ein 1,2%ige Agarosegel geladen.

Aus unseren Expressionsdaten für das Wachstumshormon in den Hypophysen verschiedener Altersstadien und den Daten für die beiden Zielgene, *Igf1* und *Igfals*, in der Leber, die der Regulation durch die Wachstumshormonspiegel im Serum unterliegen, haben wir geschlossen, dass die endokrine Wirkung des Wachstumshormons durch die *Ndph*-knockout-Mutation nicht beeinflusst wird. Diese Beobachtung stimmt mit dem Phänotyp der *Ndph*-knockout-Mäuse überein, in denen keine typischen Anzeichen einer Wachstumshormondefizienz beobachtet wurden. Daher lässt sich schließen, dass die reduzierte Transkription des Wachstumshormons im Gehirn (3.4.3) ein gewebespezifischer Effekt der *Ndph*-knockout-Mutation ist.

3.4.6 Korrelation zwischen der mRNA-Expression von *Ndph* und *Gh* in verschiedenen Hirnregionen.

In früheren Studien wurde das *Ndph*-Transkript im Gehirn, im olfaktorischen Bulbus und in den Purkinjellen des Kleinhirns (Cerebellum) detektiert (Berger et al., 1996). Um die Auswirkungen der *Ndph*-knockout-Mutation auf die lokale Wachstumshormon (*Gh*)-Transkription in den verschiedenen Hirnregionen von *Ndph*-knockout-Mäusen zu untersuchen, haben wir die Total-RNA aus Hypophyse, olfaktorischem Bulbus, Kortex, Kleinhirn (Cerebellum), Hippokampus und dem Hirnstamm aus Wildtyp- und Knockout-Tieren isoliert und die mRNA-Expression von *Gh* und *Ndph* im Alter von 6-7 Monaten miteinander verglichen. Zusätzlich haben wir die relative Expression beider Gene zwischen den genannten Hirnregionen im Wildtyp bestimmt (Abbildung 28).

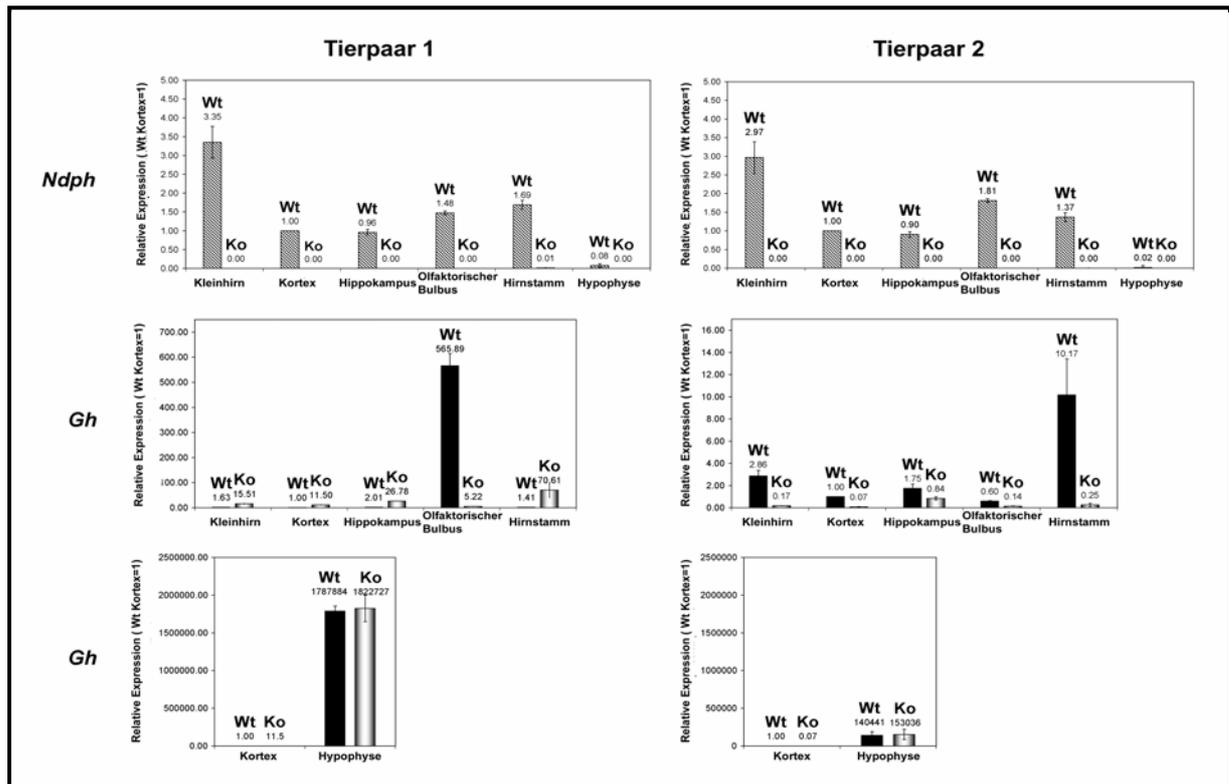


Abbildung 28: Relative Expression von *NdpH* und *Gh* im Kleinhirn, Kortex, Hippokampus, olfaktorischer Bulbus, Hirnstamm und Hypophyse von Wildtyp- und Knockout-Mäusen. Die Mittelwerte der relativen Expression von *NdpH* und *Gh* in der jeweiligen Hirnregion wurde normalisiert auf die 18S rRNA-Menge und mit der Transkriptmenge im Wildtyp-Kortex (gleich 1 gesetzt) verglichen. Verwendet wurden zwei Geschwisterpaare, wobei jeweils eine Wildtyp (Wt)- und eine *NdpH*-knockout (Ko)-Maus im Alter von 7 Monaten (Tierpaar 1) und 6 1/2 Monaten (Tierpaar 2) verwendet wurden. Für jede RNA-Präparation wurden 2 getrennte cDNA-Synthesen durchgeführt und die relative quantitative RT-PCR auf dem ABI Prism 7000 Sequence Detector in 3 Replikaten durchgeführt.

Die jeweiligen Transkriptmengen wurden auf die 18S rRNA normalisiert und für die individuellen Tierpaare mit den entsprechenden Transkriptmengen im Wildtyp-Kortex (gleich 1 gesetzt) verglichen. Für *NdpH* haben wir in beiden Wildtyp-Tieren konsistente relative Transkriptmengen in den einzelnen Hirnregionen beobachtet. Die höchsten relativen Expressionsunterschiede für *NdpH* haben wir im Kleinhirn gefunden, welches im Vergleich zum Wildtyp-Kortex ein etwa 3fach höheres *NdpH*-Expressionsniveau aufwies. Die zweithöchste Expression wiesen der Hirnstamm bzw. der olfaktorische Bulbus auf (ca. 1,5 fach), während der Hippokampus in etwa ein gleiches Expressionsniveau zeigte wie der Kortex. In der Hypophyse konnten nur Spuren des *NdpH*-Transkripts detektiert werden (Abbildung 28).

Im Gegensatz zu den relativ konsistenten Expressionsdaten für *NdpH*, sind die relativen Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Hirnregionen individueller Tierpaare für *Gh* sehr variabel. In einem Wildtypier (Tierpaar Nr. 1) haben wir eine mehr als 500fach höhere

Expression des Wachstumshormons im olfaktorischen Bulbus im Vergleich zum Kortex beobachtet, während die Transkriptmenge des Wachstumshormons im gleichen Gewebe des anderen Wildtyp-Tieres (Tierpaar Nr. 2) sogar eine Reduktion aufweist (0,6fach reduzierte Expression) (Abbildung 28 - Mitte). Eine ähnliche Feststellung lässt sich treffen, wenn man sich die relativen Unterschiede zwischen den Transkriptmengen des Wachstumshormons in der Hypophyse von Tierpaar 1 und Tierpaar 2 relativ zum Kortex anschaut. Es zeigt sich, dass der Unterschied in Tierpaar 1 ca. 10fach höher ist als in Tierpaar 2. Es lässt sich aber mit diesen Daten nicht beantworten, ob die absoluten Transkriptmengen in der Hypophyse in Tierpaar 2 nun 10fach niedriger oder ob die Transkriptmengen im Kortex 10fach höher sind (Abbildung 28 - unten).

Vergleicht man die *Gh*-Expression in Wildtyp- mit der in Knockout-Mäusen, so beobachtet man eine Reduktion von *Gh*-Transkripten in Hirnregionen mit normalerweise signifikanten Wachstumshormonspiegeln (Olfaktorischer Bulbus, Hirnstamm und Kleinhirn). In Tierpaar 1 beeinträchtigt die *Ndph*-knockout-Mutation die hohe Wachstumshormonexpression im olfaktorischen Bulbus dramatisch und führt zu einer etwa 100fachen Reduktion der *Gh*-Transkriptmenge. In Tierpaar 2 ist der Haupteffekt im Hirnstamm zu beobachten, wo der Wachstumshormonspiegel im Knockout etwa 40fach reduziert wird. Der Hirnstamm in Tierpaar Nr.1 ist ebenfalls betroffen, doch zeigt sich dort eine 50fache Steigerung der Wachstumshormon-Transkription, was den Befunden in Tierpaar 2 widerspricht. Andere Hirnregionen mit ansonsten niedrigeren Wachstumshormonspiegeln, sind nicht so stark betroffen. In diesen beobachteten wir sowohl bis zu 10fach ansteigende als auch 10fach niedrigere *Gh*-Spiegel. Betrachtet man aber die Transkriptmengen im gesamten Gehirn, übertrifft die Abnahme der Transkriptmengen von *Gh* immer den Anstieg in einzelnen Regionen um ein Vielfaches, so dass die Northern Blot-Hybridisierungs- und die RT-PCR-Daten (Abbildung 24) eine drastische Reduktion der Transkriptmengen des Wachstumshormons im Gesamt-Gehirn von Knockout (*Ndph*^{y/-})- versus Wildtyp (*Ndph*^{y/+})-Mäusen zeigten. Interessanterweise konnten in jeder der untersuchten Gehirnregionen Wachstumshormontranskripte detektiert werden (Olfaktorischer Bulbus; Kortex; Kleinhirn (Cerebellum), Hippokampus, Hirnstamm und in der Hypophyse), wodurch die publizierten Expressionsdaten ergänzt werden. Zusammenfassend legen unsere Daten eine hoch variable Wachstumshormonexpression in verschiedenen Hirnregionen sogar von Wildtyptieren nahe. Sie zeigen aber auch, dass das Fehlen der *Ndph*-Expression starke Auswirkungen auf die *Gh*-Transkriptmengen hat.

3.4.7 Untersuchungen zur Transkription von Gh in Auge und Retina

Mit Hilfe von RT-PCR haben wir überprüft, ob Wachstumshormontranskripte auch im Auge oder in der Retina von *Ndph*^{y/+}- oder *Ndph*^{y/-}- Mäusen nachweisbar sind. Dazu wurde Total-RNA aus Gehirn, Auge und Retina von Wildtyp- und Knockout-Mäusen des Stadiums p21 isoliert. Es wurden Primer verwendet, die alle bekannten Spleißstellen flankieren und es so ermöglichen sollten, auch aberrante oder alternative Spleißvarianten nachzuweisen. In der RNA aus Gehirn von Wildtyp-Tieren konnten wir die erwartete Spleißvariante für *Gh* nachweisen, allerdings nicht im Auge oder in der Retina (Abbildung 29).

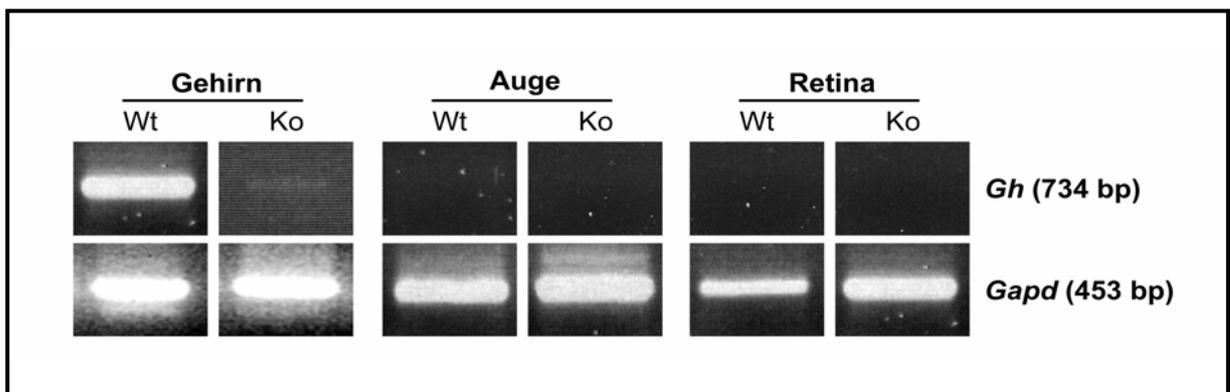


Abbildung 29: Expression der Wachstumshormon (*Gh*)-RNA in Gehirn, Auge und Retina. Jeweils 10 μ l eines RT-PCR-Reaktionsansatzes für entweder das Wachstumshormon (*Gh*) oder Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (*Gapd*) auf cDNAs der entsprechenden Gewebe (p21) wurden nach 35 Zyklen auf ein Agarosegel geladen. Das verwendete Primerpaar (mmGh5'ex1; mmGh3'ex5) flankiert alle bekannten Exon/Exon-Übergänge im Transkript des Wachstumshormons.

Im Gehirn von *Ndph*-knockout-Mäusen konnten wir, in Übereinstimmung mit den durch Northern Blot-Hybridisierung und RT-PCR (Abbildung 24) erhaltenen Daten, die erwartete Spleißvariante nur in sehr geringen Mengen detektieren. Weder im Auge noch in der Retina von Wildtyp- oder Knockout-Mäusen konnte ein *Gh*-Transkript nachgewiesen werden.

3.5 Identifizierung eines aberranten *Ndph*-Transkripts in hemizygoten *Ndph*^{y/-}-Mäusen.

Durch die Hybridisierung desselben PolyA⁺-Northern Blots (2.4.9), der auch für die Hybridisierungen mit der Wachstumshormon (*Gh*)- und der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (*Gapd*)-Sonde verwendet wurde, mit der vollständigen *Ndph*-Maus-cDNA sollte die Auswirkung der Knockout-Mutation auf Transkriptionsebene überprüft werden (Abbildung 30).

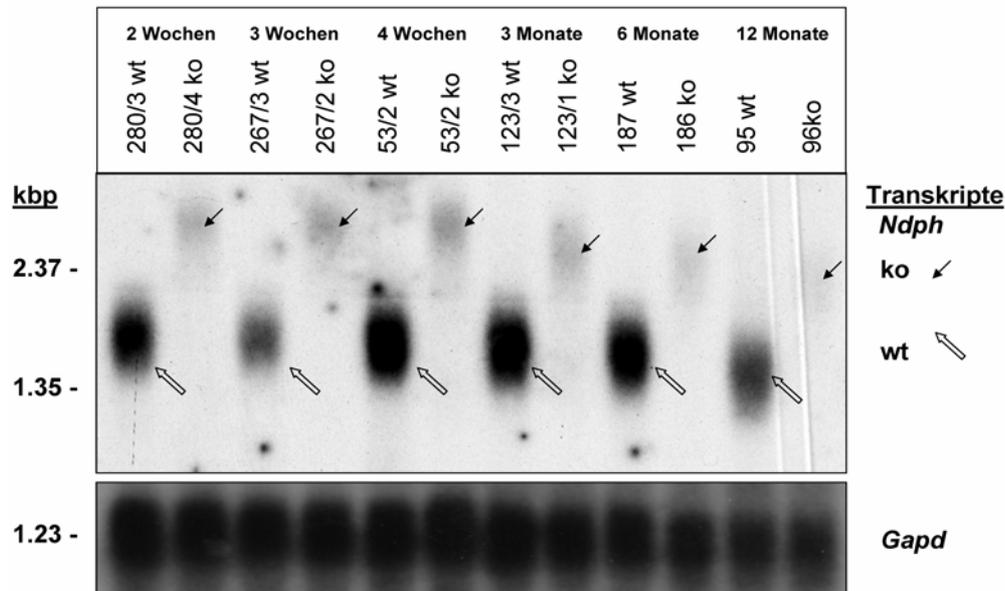


Abbildung 30: Northern Blot mit PolyA⁺-RNA aus Gesamthirn, hybridisiert mit der Maus-*Ndph*-cDNA. Es sind zwei Transkripte zu erkennen: Das normale 1,8 kb Transkript in den Wildtyp-Proben und ein neues aberrantes Transkript in den Knockout-Proben. Die Größe dieses neu identifizierten Transkripts beträgt ca. 2,8 kb. In den Bahnen für 2 Wochen bis 6 Monate war der Blot mit der PolyA⁺-RNA aus 250 µg Total-RNA und in den Bahnen für 12 Monate mit der PolyA⁺-RNA aus 175 µg Total-RNA beladen. Als Kontrolle für eine gleichmäßige RNA-Menge auf dem Blots diente die Hybridisierung mit einer *Gapd*-Sonde. Es zeigte sich, dass vergleichbare RNA-Mengen auf der Membran immobilisiert waren.

In den jeweiligen mit Wildtyp-PolyA⁺-RNA beladenen Bahnen in Abbildung 30 ist das erwartete Signal für *Ndph* bei einer Transkriptgröße von etwa 1,8 kb zu sehen (umrandete Pfeile). Erwartungsgemäß ist auf gleicher Höhe in den Bahnen für die Knockout-Proben kein Signal zu erkennen. Überraschenderweise zeigt sich aber bei einer Größe von ca. 2,8 kb ein schwaches Hybridisierungssignal (schwarze Pfeile). Dieses Signal hat eine deutlich geringere Intensität verglichen mit dem *Ndph*-Signal in Wildtyp-RNA. Es war in allen Knockout-Proben zu erkennen, so dass man davon ausgehen musste, dass es sich um ein spezifisches Signal für das *Ndph*-Transkript mit einem niedrigeren Expressionsniveau handelte. Das im unteren Teil der Abbildung dargestellte Autoradiogramm für die Hybridisierung des Northern

Blots mit einer *Gapd*-Sonde bestätigte die Beladung der einzelnen Bahnen mit vergleichbaren RNA-Mengen.

Wie könnte es zu der spezifischen Expression eines solchen größeren Transkripts in den Knockout-Mäusen kommen?

Betrachtet man die genomische Struktur des Wildtyp-Gens (Abbildung 31 A) im Vergleich mit der in *Ndph*-knockout-Mäusen (Abbildung 31 B), so könnte man das Entstehen dieses Transkripts wie folgt erklären. Bei der Transkription des Knockout-Allels könnte es, wie im Wildtyp, zum Spleißen von Exon 1 an Exon 2 kommen. Des Weiteren könnte dann Exon 2 zusammen mit der revers-orientierten Neomycinkassette abgelesen und anschließend unter Verwendung einer alternativen Spleißdonor-Stelle im Intron 2 an Exon 3 des *Ndph*-Gens gespleißt werden. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde durch RT-PCR mit anhand der genomischen Sequenz hergestellten Primern die cDNA-Fragmente dieses Transkripts in pCR II Topo-Vektoren kloniert und sequenziert (2.3.5). Die Sequenzdaten bestätigten die Hypothese zur Bildung eines aberranten Transkripts vom Knockout-Allel des *Ndph*-Gens.

Dabei wurde, wie vorhergesagt, in der Knockout-Maus ein artifizielles Transkript einer Länge von 2803 bp bestehend aus Exon 1, dem ersten Abschnitt von Exon 2 gefolgt von der revers-orientierten Neomycinkassette, dem Anfang von Intron 2 sowie Exon 3 exprimiert. Die cDNA-Sequenz des artifiziiellen *Ndph*-knockout-Transkripts ist im Anhang 10.3 aufgeführt. Dabei sind die Sequenzabschnitte in Fettdruck dargestellt, welche durch Klonierung der PCR-Produkte und Sequenzierung bestätigt worden sind. Außerdem erleichtert ein Farbkode die Zuordnung der Sequenzabschnitte zu den einzelnen genomischen Abschnitten. Zuletzt soll noch angemerkt werden, dass zwischen den eigenen und den in den Datenbank hinterlegten Sequenzen, aber auch zwischen den verschiedenen Datenbankeinträgen einzelne Sequenzvariationen gefunden wurden, die aber in keinem Fall den offenen Leserahmen betrafen. Diese können entweder auf stammspezifischen Unterschieden oder auf Sequenzierfehlern beruhen.

Ob das *Ndph*-knockout-Transkript wirklich translatiert wird, blieb unklar. Es besteht aber die Möglichkeit, dass ein verkürztes *Ndph*-Protein (Aminosäuren 57-131) abgelesen wird, da Exon 3 innerhalb des Leserahmens mit einem Methionin (ATG; Abbildung 31 B) beginnt. Die Bildung eines größeren Fusionsproteins mit diesem *Ndph*-Abschnitt am C-Terminus konnte ausgeschlossen werden, da nur 4 weitere Aminosäuren stromaufwärts im offenen Leserahmen des artifiziiellen Transkripts liegen, bevor ein Stoppkodon diesen unterbricht.

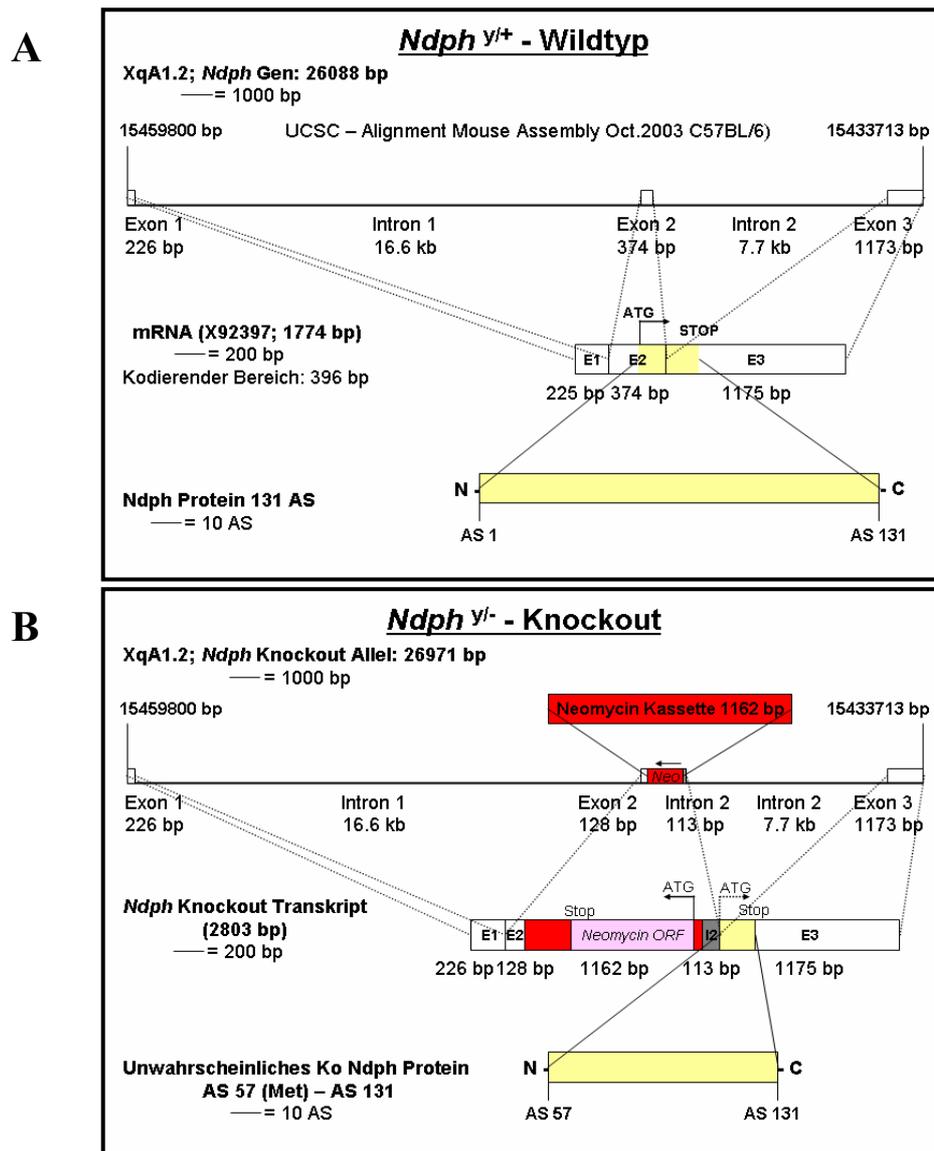


Abbildung 31: Genstruktur, Transkription und Translation des *Ndph*-Locus in Wildtyp und *Ndph*^{y/-}-knockout-Mäusen. A: Wildtyp-Allel: Die Abweichungen der Länge des Exons 1 auf genomischer und mRNA Ebene um 1 Nukleotid erklärt sich aufgrund unterschiedlicher Datenbankeinträge. Die wahrscheinlich korrekte Länge ist 226 bp anstatt 225 bp. Der gelb unterlegte Teil in der mRNA zeigt den offenen Leserahmen für *Ndph*. B: *Ndph*^{y/-}-knockout-Allel: rot: Neomycinkassette, dunkelgrau: Intron 2-Sequenz, die bis zu einer alternativen Spleißdonor-Stelle in *Ndph*^{y/-}-Mäusen transkribiert wird. Rosa: Offener Leserahmen der Neomycinresistenzkassette; gelb: verbliebener offene Leserahmen des *Ndph*-Gens.

Somit konnte die Herkunft des spezifischen Hybridisierungssignals von 2,8 kb im PolyA⁺-Northern Blot geklärt werden. Es handelte sich um ein aberrantes Transkript vom *Ndph*-knockout-Allel mit der Länge von 2803 Nukleotiden. Die Bildung eines funktionellen Proteins von dieser mRNA erscheint unwahrscheinlich, da erstens das Startkodon von *Ndph* und die ersten 56 Aminosäuren nicht vorhanden sind und zweitens, obwohl mit einem Methionin beginnend, die Aminosäuren 57-131 aus Exon 3 zwei für die Proteinstruktur essentielle Disulfidbrücken nicht ausbilden können, so dass kein funktionelles Teilprotein

entstehen kann. Daher sollte die Identifizierung dieses aberranten Transkripts keine Konsequenzen auf Proteinebene haben und die Knockout-Mutation ein funktionelles Null-Allel darstellen.

3.6 Die Ursache der Infertilität von homozygoten *Ndph*^{-/-}-Weibchen

3.6.1 Die Transmission des *Ndph*-knockout-Allels in der Knockout-Mauslinie

Im Vergleich zu den von unserer Gruppe zuvor veröffentlichten Daten zur Transmission der *Ndph*-Mutation innerhalb der Knockout-Mauslinie (Berger et al., 1996), die eine geringe, aber nicht signifikante Bevorzugung des *Ndph*^{+/-}- gegenüber dem *Ndph*^{+/+}-Genotyps aufwies ($\chi^2 = 3,267$; $p = 0,089$), haben wir nach der Rückkreuzung der Mauslinie über mindestens acht Generationen auf den Hintergrund C57BL/6 eine signifikante Genotypenverschiebung unter den Nachkommen beobachtet. Die beobachtete Verteilung der Genotypen aus den Kreuzungen heterozygoter Weibchen mit C57BL/6 Männchen ist in Tabelle 55 dargestellt.

Tabelle 55: Genotypenverteilung in der Nachkommenschaft der Verpaarung heterozygoter Weibchen (*Ndph*^{+/-}) mit C57BL/6 Männchen (*Ndph*^{+/+}). Die ausgewerten Verpaarungen stammten aus 4 verschiedenen Generationen der Mauslinie.

Geschlecht	Genotyp	Absolute Werte (Prozentangabe)
Männchen	y/+	120 (26,7%)
	y/-	88 (19,6%)
Weibchen	+/+	129 (28,7 %)
	+/-	112 (24,9%)
	Σ	449

Es zeigte sich eine statistisch signifikante Bevorzugung des *Ndph*^{y/+}- gegenüber dem *Ndph*^{y/-}-Genotyp ($\chi^2 = 4,923$; $p = 0,0265$). Die zuvor beschriebene leichte Bevorzugung des *Ndph*^{+/-}-Genotyps bei den weiblichen Nachkommen konnten wir nicht bestätigen ($\chi^2 = 1,199$, $p = 0,2735$). Neben dieser Ungleichverteilung der Transmission des mutierten Allels auf die männlichen Nachkommen, haben wir einen starken Einfluss des mütterlichen *Ndph*-Genotyps auf die Transmission gefunden. Während die mütterlichen Genotypen *Ndph*^{+/+} und *Ndph*^{+/-} keine Fertilitätsprobleme zeigten, beobachteten wir bei *Ndph*^{-/-}-Weibchen eine fast komplette Sterilität.

Im Zeitraum von 3 Jahren haben wir 32 verschiedene *Ndph*^{-/-}-Weibchen für Kreuzungen mit Männchen verschiedener Genotypen (9 x *Ndph*^{y/+}; 13 x *Ndph*^{y/-} (aus der Linie) und 7 reine C57BL/6-Wildtyp-Männchen) verwendet. Insgesamt wurden 66 Verpaarungen durchgeführt. Diese führten zu insgesamt 15 Nachkommen, wobei 5 Nachkommen aus 2 Würfen von Verpaarungen von *Ndph*^{y/+} mit *Ndph*^{-/-} stammten und 10 Nachkommen in 3 Würfen aus Verpaarungen von *Ndph*^{y/-} mit *Ndph*^{-/-}. In 7 Verpaarungen mit normalen C57BL/6-Männchen konnten wir keine lebenden Nachkommen erhalten. Zusammenfassend weisen diese Daten auf die auffällig reduzierte Fertilität der *Ndph*^{-/-}-Weibchen hin. Da alle möglichen Genotypen in den Kreuzungen lebensfähig sind (Berger et al., 1996) und die anderen Genotypen (*Ndph*^{+/-}, *Ndph*^{-/+}, *Ndph*^{y/-}) fertil sind, legt dies einen Reproduktionsdefekt durch den *Ndph*^{-/-}-Genotyp nahe.

3.6.2 Histologische Studien an den Implantationsstellen/ Deziduae im Uterus von *Ndph*^{-/-}-Weibchen nach der Einnistung.

Um zu untersuchen, ob die Sterilität der *Ndph*^{-/-}-Weibchen durch eine fehlerhafte Keimzellentwicklung oder aufgrund eines letalen Einflusses der mütterlichen Umgebung auf den Embryo zustande kommt, wurde ein *Ndph*^{-/-}-Weibchen nach einer Verpaarung mit einem C57BL/6-Männchen an Tag 12 der Schwangerschaft (E12) präpariert (Abbildung 32).

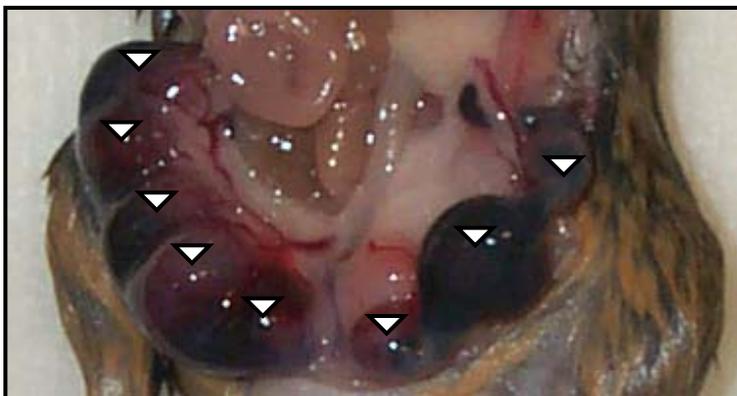


Abbildung 32: Präparation eines *Ndph*^{-/-}-Weibchen am Tag E12 der Schwangerschaft. Ansicht von ventral auf die defekten und mit Blut gefüllten Deziduae (weisse Pfeilköpfe).

Schon bei der Präparation waren die abnormalen, mit Blut gefüllten Deziduae im Uterus gut zu erkennen (weisse Pfeilköpfe). Nach ihrer Präparation und der Einbettung in Paraffin wurden Gewebeschnitte (7µm) hergestellt und mit Hilfe der HE-Färbung angefärbt. Zusätzlich wurden frühere Stadien der Embryonalentwicklung (E7; E9 und E10) untersucht, um einen möglichen Defekt in der Entwicklung zu identifizieren (Abbildung 33).

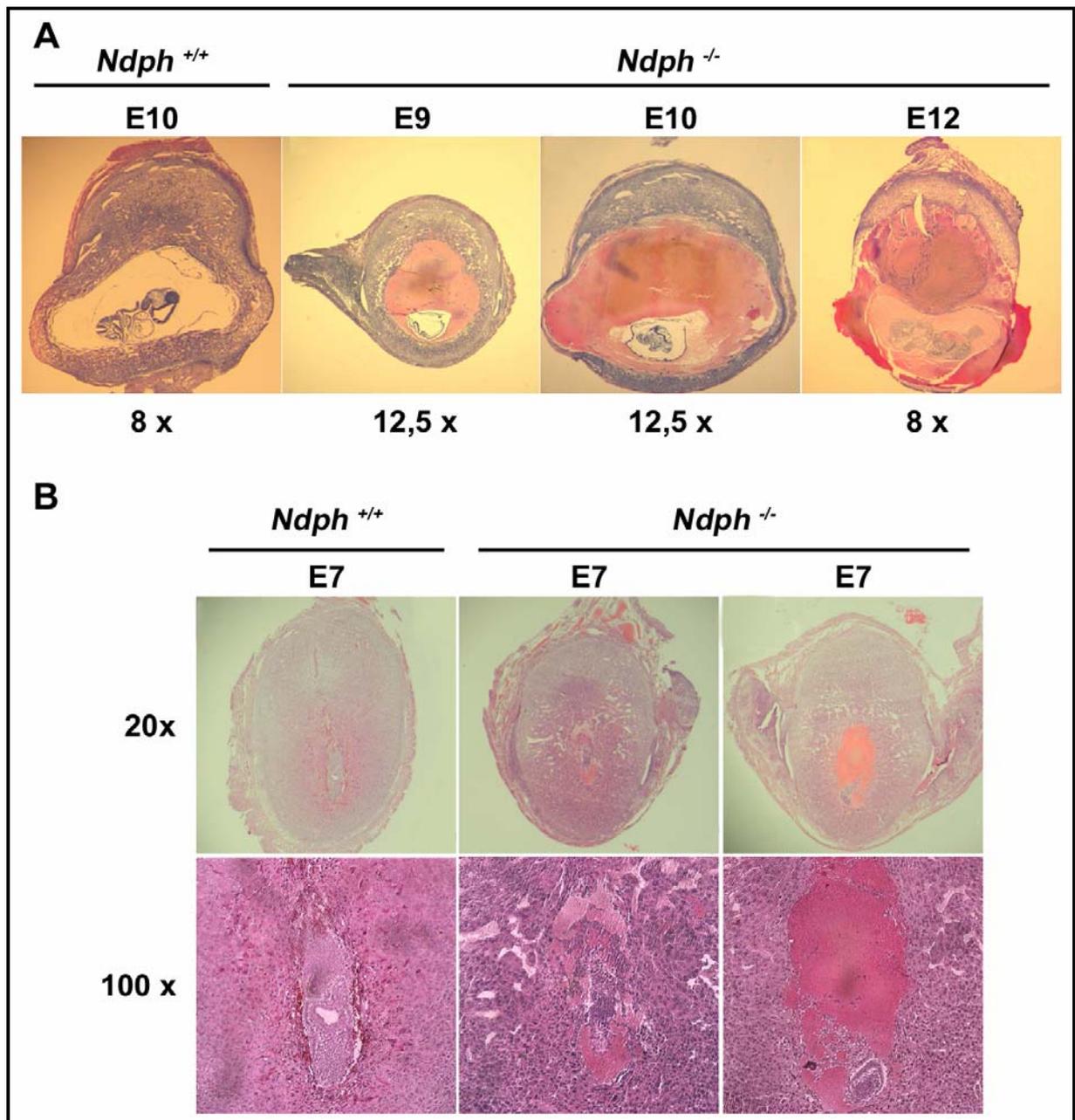


Abbildung 33: HE-Färbungen der Implantationsstellen an verschiedenen Tagen der Embryonalentwicklung in *Ndph*^{-/-}-Weibchen im Vergleich zu Kontrollen (*Ndph*^{+/-} oder *Ndph*^{+/+}). **A:** Schwangerschaftstage E9–12: Massive Einblutungen sind in allen Deziduae der *Ndph*^{-/-}-Weibchen deutlich zu erkennen, die im Wildtyp (E10) nicht zu sehen sind. **B:** E7: Im Vergleich zum Wildtyp (*Ndph*^{+/+}) (links) zeigen zu diesem Zeitpunkt verschiedene Implantationsstellen in *Ndph*^{-/-}-Tieren ein variables Ausmaß an Einblutungen. Blut ist als rot/orange Fläche in den Histologien auszumachen.

Die massiven Einblutungen in die Deziduae der *Ndph*^{-/-}-Tiere wurde in allen untersuchten Präparaten von E9 bis E12 beobachtet, während dies in den Kontrollen (*Ndph*^{+/-} oder *Ndph*^{+/+}) nicht gefunden wurde (Abbildung 33 A). Die Anlage des Fötus war vorhanden, wenn auch im zunehmenden Maße desorganisiert. Der Dottersack hat sich entwickelt, doch in keinem der untersuchten Präparate konnte eine Plazenta identifiziert werden, die am

Zeitpunkt E12 deutlich zu erkennen sein sollte. Die Untersuchung des frühen Entwicklungsstadiums E7 kurz nach der Einnistung (Abbildung 33 B) ergab, dass schon hier in einigen Konzeptus der *Ndph*^{-/-}-Weibchen massive Einblutungen (rechts) mit mütterlichem Blut vorhanden waren, während diese in anderen eher mild (Mitte) und in den Wildtyp-Konzeptus (links) nicht zu beobachten waren. Somit zeigte diese histologische Analyse, dass die Infertilität der *Ndph*^{-/-}-Weibchen durch den Verlust der Föten zustande kommt, was vermutlich durch massive, mütterlicher Einblutungen während des Prozesses der Dezidua-Bildung (engl.: „decidualization“) direkt nach der Einnistung verursacht wird.

3.6.3 Die Expression von *NDP/Ndph* in Reproduktionsorganen

Da die Expression von *Ndph* in der Plazenta bzw. in Deziduae von Mäusen und die von *NDP* in Reproduktionsorganen im Menschen bisher nicht beschrieben waren, wurde diese mit Hilfe von RT-PCR-Studien untersucht (Abbildung 34)

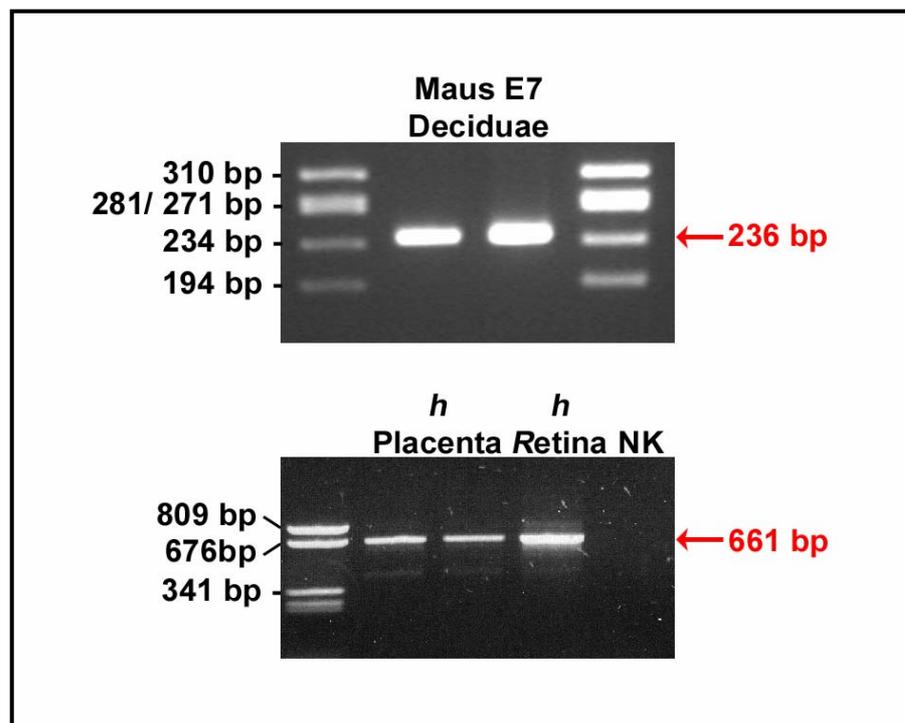


Abbildung 34: RT-PCR-Expressionsanalyse für *Ndph* in zwei Maus-Deziduae von Tag E7 und für *NDP* in humaner Plazenta. Sowohl in cDNA aus kompletten Maus-Deziduae des Tages E7, als auch in humaner Plazenta-cDNA konnte die Expression von *Ndph* bzw. *NDP* mit speziesspezifischen Primerpaaren (Maus: *Ndphex1for1* + *Ndphex2rev1*; Mensch: *WB 606* + *WB 608*) durch RT-PCR nachgewiesen werden. Die PCR-Produkte wiesen die erwarteten Größen auf (rote Pfeile und Schrift).

Sowohl in der Maus als auch im Menschen konnte die Expression von *Ndph* bzw. *NDP* mit genspezifischen Primern in den untersuchten Geweben nachgewiesen werden.

Die Expression von *Ndph/NDP* in Geweben, die für die Reproduktion und die Embryonalentwicklung verantwortlich sind und die Infertilität der *Ndph*^{-/-}-Mäuse wiesen auf eine neue, bisher unbekannte Funktion von Norrin in der Reproduktion hin. Die Gegenwart von Norrin ist demnach für die Fähigkeit der mütterlichen Fortpflanzungsorgane essentiell, die normale Entwicklung des Embryos zu ermöglichen.

3.7 Expression eines rekombinanten *Ndph*-Proteins (Norrin) in *Escherichia coli*

In dieser Arbeit sollte neben den molekularbiologischen und histologischen Untersuchungen im Auge, Gehirn und in den Reproduktionsorganen auch ein spezifischer Antikörper gegen Norrin hergestellt werden. Zu diesem Zweck wurde Norrin rekombinant in verschiedenen *E.coli*-Stämmen exprimiert und anschließend aus den Bakterienklonen mit den höchsten Expressionsspiegeln mittels Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Das dadurch erhaltene Protein wurde anschließend für die Immunisierung von Kaninchen benutzt. Außerdem wurde es im Rahmen eines Kollaborationsprojektes für einen Cornea-Vaskularisations-Assay verwendet, nachdem es in einen nativen Puffer umgepuffert worden war.

Für die Klonierung und die Aufreinigung wurde das QIAexpress System von Qiagen verwendet (2.7.6). Die Maus-*Ndph*-cDNA stand als cDNA-Klon zu Beginn dieser Untersuchungen zur Verfügung. Ausgehend von dieser Sequenz wurden drei verschiedene Expressionskonstrukte in drei verschiedenen *E.coli*-Stämmen (*XL1blue*, *M15* und *SG13009*) kloniert. In allen Konstrukten wurde der Teil der cDNA entfernt, der für das Signalpeptid kodierte, so dass keines der Konstrukte die ersten 24 Aminosäuren des murinen Norrins enthielten. Das erste Konstrukt enthielt die gesamte, verbliebene Sequenz der cDNA (WND: Aminosäuren 25-131; W = whole protein), während das zweite Konstrukt nur für den N-terminalen Teil (NND: Aminosäuren 25 -75) und das dritte Konstrukt nur für den C-terminalen Teil des Proteins (CND: Aminosäuren 76-131) kodierte (Abbildung 35).

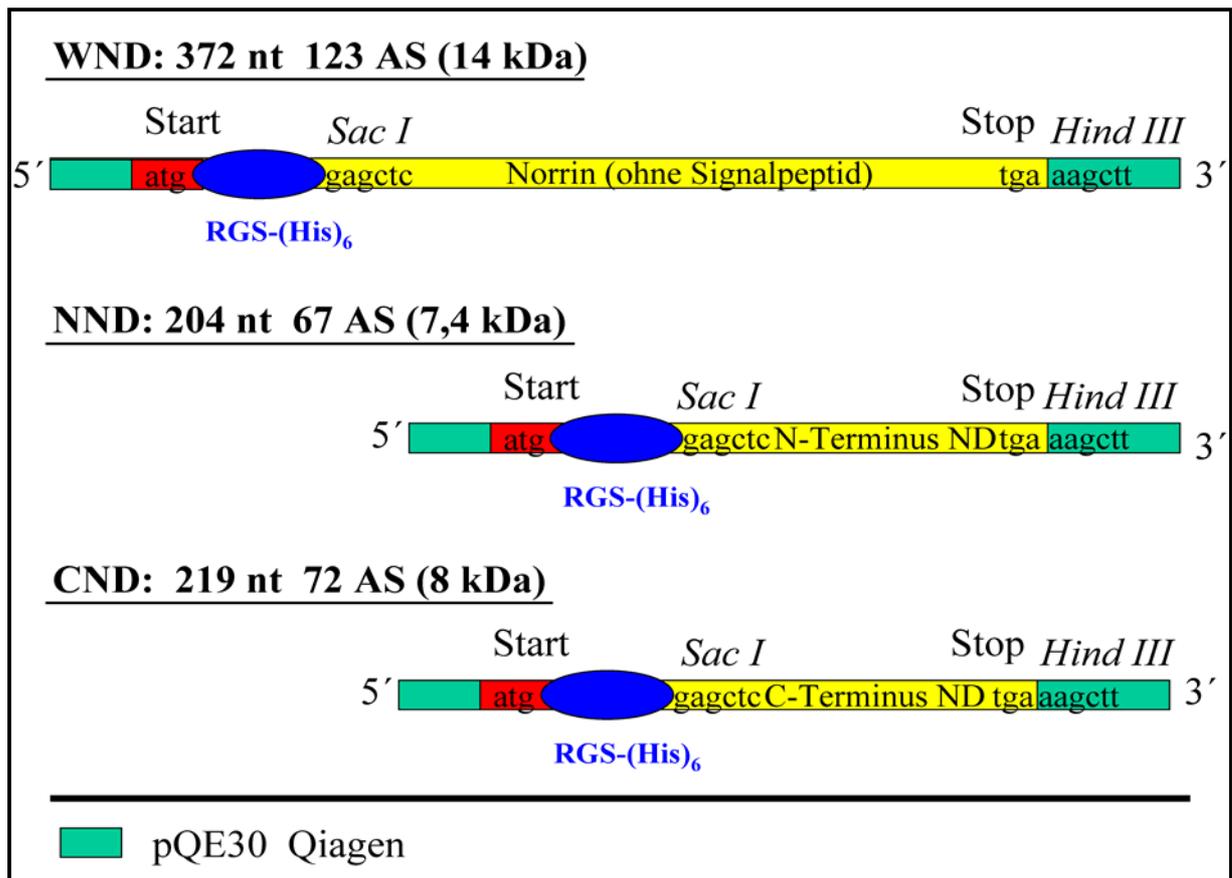


Abbildung 35: Expressionskonstrukte in pQE30 für die rekombinante Expression von Norrin in *Escherichia coli*. Schematisch dargestellt sind die drei verwendeten Expressionskonstrukte WND („whole“ Norrin), NND (N-Terminus) und CND (C-Terminus), alle ohne die kodierende Sequenz für das Signalpeptid (Aminosäuren (AS 1-24). Alle drei Konstrukte enthielten N-terminal ein artifizielles ATG (START) Kodon und eine RGS-(His)₆-Antikörper-Erkennungssequenz. Die Länge der Nukleotidsequenz des offenen Leserahmens und das daraus berechnete Molekulargewicht der Proteine sind angegeben.

Für die induzierbare und rekombinante Expression des Proteins (2.7.6.2) wurden nur die beiden *E.coli*-Stämme *M15* und *SG13009* verwendet. In analytischen Ansätzen wurde mit Hilfe von Western Blot Analysen (2.7.5) mit einem anti-RGS-His-Antikörper festgestellt, dass für die Konstrukte WND und NND nur unter denaturierenden Zellaufschlussbedingungen (8 M Harnstoff) die entsprechenden rekombinanten Proteine aus den Bakterienzellen isolieren werden konnten, während für das CND-Konstrukt weder unter nativen (Imidazol) noch unter den denaturierenden Bedingungen Protein nachweisbar war (2.7.6.3). Außerdem ergaben diese Versuche, dass die Klone **NM15-1** (Protein NND in *E.coli*-Stamm M15 Klon Nr.1) und **WM15-2** (Protein WND in *E.coli*-Stamm M15 Klon Nr.2) die größten Mengen der jeweiligen rekombinanten Proteine produzierten und somit am besten für die präparative Expression geeignet waren.

Durch diese präparative, affinitätschromatographische Aufreinigung mit Ni-NTA-Agarose konnten die Proteine WND und NND in den Eluaten sehr stark angereichert werden, was mit

silbergefärbten 15%igen SDS-Gelen und anhand der Western Blot Analysen mit RGS-His-Antikörpern nachgewiesen werden konnte (Abbildung 36).

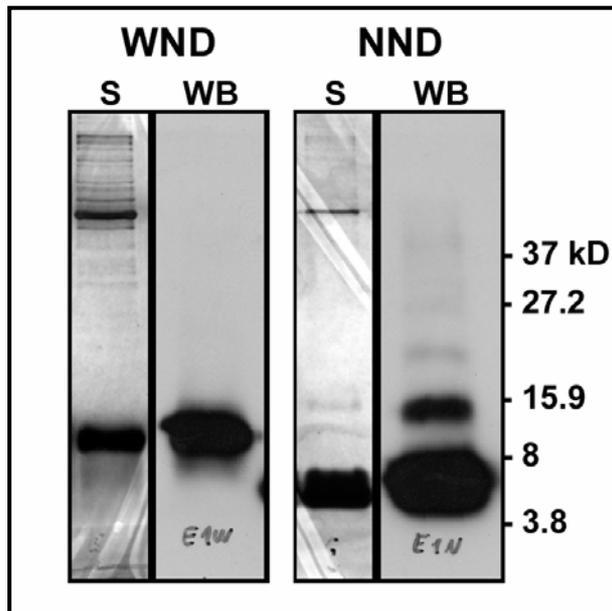


Abbildung 36: Nachweis der affinitätschromatographisch aufgereinigten Proteine WND und NND durch Silberfärbung von SDS Gelen und durch Western Blot. Die Silberfärbungen (S) zeigen die starke Anreicherung der rekombinanten Proteine, während die Western Blot (WB; anti RGS His) Daten die Spezifität der aufgereinigten Proteine nachweisen.

Diese Western Blot Analysen wiesen gleichzeitig die Spezifität der aufgereinigten Proteine WND und NND nach, die zusätzlich die erwarteten Molekulargewichte zeigten. Auffällig im Western Blot für das NND-Protein war eine „Leiter“ von Signalen. Die Ursache dieser Signale liegt wahrscheinlich in einer Oligomerisierung des rekombinanten N-terminalen Proteins (NND) begründet, welche durch eine so starke Interaktion erfolgen musste, dass diese selbst unter den verwendeten reduzierenden und denaturierenden Bedingungen nicht vollständig aufgebrochen werden konnte. Die Ausbeuten der präparativen Expression in 1,3 l *M15-E.coli*-Kulturen nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung und der Konzentrierung der vereinigten Eluatfraktionen lag für WND bei etwa 1,2-1,4 mg Protein und für NND bei etwa 4 mg.

3.8 Herstellung polyklonaler Antikörper für Norrin

Mit den rekombinanten Proteinen WND und NND wurden jeweils zwei Kaninchen immunisiert, um polyklonale Antikörper gegen das komplette Norrin (WND: AS 25-131) und gegen den N-terminalen Teil des Norrins (NND: AS 25-75) zu gewinnen. Die Immunsereen für WND stammten aus den Tieren SA 1201 und SA 1202, während die Immunsereen für NND aus den Tieren SA 1378 und SA 1379 gewonnen wurden. Die Immunsereen wurden in Western Blots auf ihre Antigen-Reaktion mit den *E.coli*-Rohlysaten und mit affinitätsgereinigten, rekombinanten Proteinen (WND; NND) getestet (Abbildung 37).

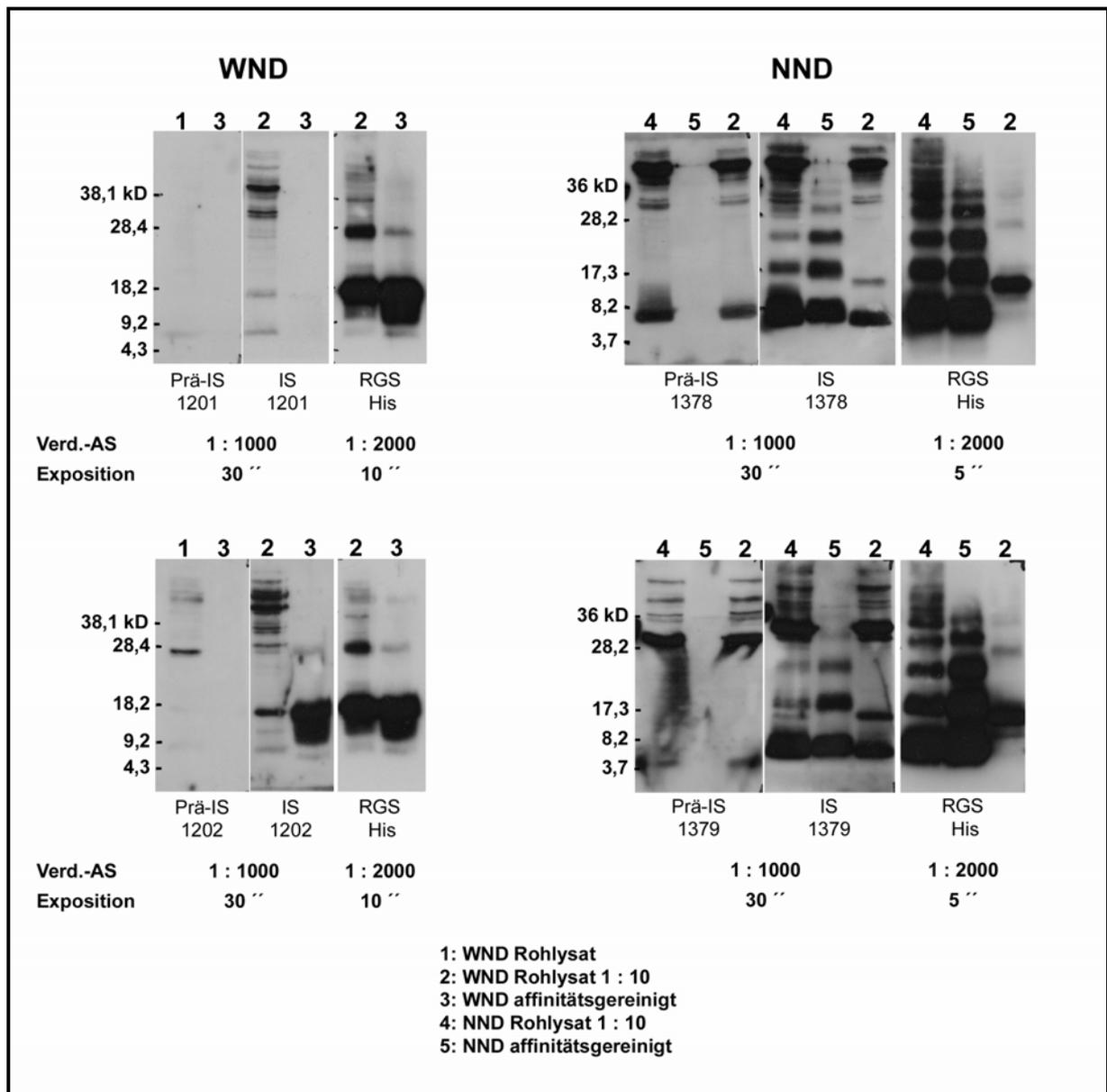


Abbildung 37: Nachweis der rekombinant exprimierten Proteine WND und NND in *E.coli*-Rohlysaten mit Hilfe der polyklonalen Immunsereen 1378 (NND), 1379 (NND), 1201 (WND) und 1202 (WND). Die Western Blot Analysen für die Präimmunsereen (Prä-IS), das untersuchte Immuserum (IS) und die Ergebnisse der Behandlung derselben Membranen mit einem RGS-His-Antikörper (RGS-His) sind für die vier verschiedenen Immunsereen nach insgesamt 4 Immunisierungen gezeigt. Der RGS-His-Antikörper wies die korrekte Beladung und das Vorhandensein der Antigene auf den Membranen nach. Jeweils unter den Abbildungen ist die Verdünnung der Antiseren bzw. des Antikörpers (Verd.-AS) und die Belichtungszeit des Films (Exposition) angegeben.

Das Immuserum aus dem Tier SA 1201 erkannte das rekombinante Protein WND bei Antiserumverdünnungen von 1:1000 nicht (Abbildung 37 – links oben). Dahingegen zeigen die drei anderen Seren bei dieser Verdünnung jeweils eine spezifische Reaktion, sowohl gegen das affinitätsgereinigte Antigen als auch gegen das entsprechende *E.coli*-Rohlysat mit dem rekombinanten Protein. Für die N-Terminalen-Antiseren 1378 und 1379 (NND; AS 25-

75; rechte Hälfte der Abbildung) wurden jeweils zusätzlich deren Reaktion gegen Rohlysate mit dem Protein voller Länge (WND; AS 25-131) getestet. Wie erwartet zeigten beide Antiseren (1378; 1379) auch eine Reaktion gegen dieses WND-Protein, wenn auch eine deutlich schwächere. Die Detektion des Antigens in aufgereinigter Form gegenüber der Detektion in den Rohlysaten der Bakterienzellen zeigte generell ein stärkeres Signal gegen das aufgereinigte Protein. Dies spricht für eine geringere Affinität der Antikörper gegen ihr Antigen in der Gegenwart anderer Proteine. Drei der vier untersuchten Seren zeigten aber eine spezifische Reaktion gegen das jeweilige rekombinante Antigen. Diese reaktiven Immunsereen 1378 (NND), 1379 (NND) und 1202 (WND) wurden auf Proteinhomogenaten aus Gehirn und Retina von Wildtyp- und *Ndph*^{-/-}-Tieren getestet (Abbildung 38).

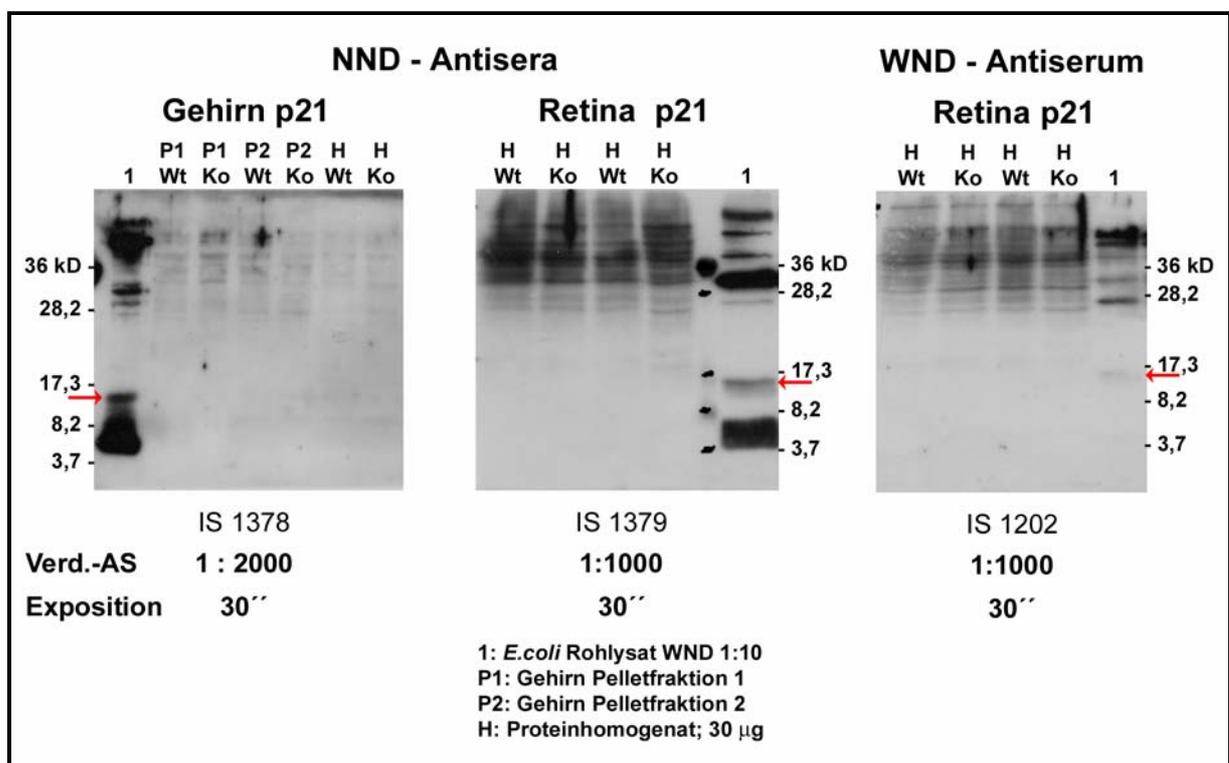


Abbildung 38: Western Blot-Analysen von Gewebekomogenaten aus Gehirn und Retina mit den Immunsereen 1378 (NND), 1379 (NND) und 1202 (WND). Je 30 µg der Proteinhomogenate (H) von Wildtyp- und *Ndph*^{-/-}-Tieren waren auf den Membranen immobilisiert. Die Verdünnung der Immunsereen (Verd.-AS) und die jeweilige Belichtungszeit des Films (Exposition) sind angegeben. Als Positivkontrolle dienten die *E.coli*-Rohlysate (1). Keines der untersuchten Immunsereen zeigte eine spezifische Reaktion für Norrin, welches nur in Wildtyp- und nicht in *Ndph*-knockout-Proben zu finden sein sollte. Auch bei längeren Belichtungszeiten der Filme zeigten sich keine zusätzlichen Signale. Der rote Pfeil markiert das Molekulargewicht, bei dem ein Signal für das Norrin-Monomer zu erwarten wäre.

Wir mussten allerdings feststellen, dass alle drei Seren keine spezifische Immunreaktion unter den verwendeten Bedingungen zeigten. Drei der vier Immunsereen erkennen zwar das jeweilige rekombinante Protein, konnten aber in Wildtyp-Gewebekomogenaten im Vergleich

zu den entsprechenden *Ndph*^{+/+}-Kontrollen kein Norrin durch eine spezifische Antikörperreaktion auf einem Western Blot nachweisen.

3.9 Cornea-Vaskularisations-Assay mit rekombinantem Norrin

Das in *E.coli* rekombinant exprimierte und unter denaturierenden Bedingungen affinitätschromatographisch aufgereinigte WND-Protein (AS: 25-131) wurde durch eine Dialyse in PBS umgepuffert und die Proteinkonzentration durch einen BCA-Assay bestimmt (2.7.9). Der Grad der Reinheit wurde durch eine Silberfärbung und die Spezifität des Proteins durch einen anti-RGS-His-Western Blot (Abbildung 39 A) nachgewiesen. Die erhaltenen 420 µg WND-Protein wurden anschließend lyophilisiert und in einem Kooperationsprojekt von Frau Dr. Meike Schellenbeck (Charité, Berlin, Deutschland) für einen Cornea-Vaskularisations-Assay verwendet (Abbildung 39 B).

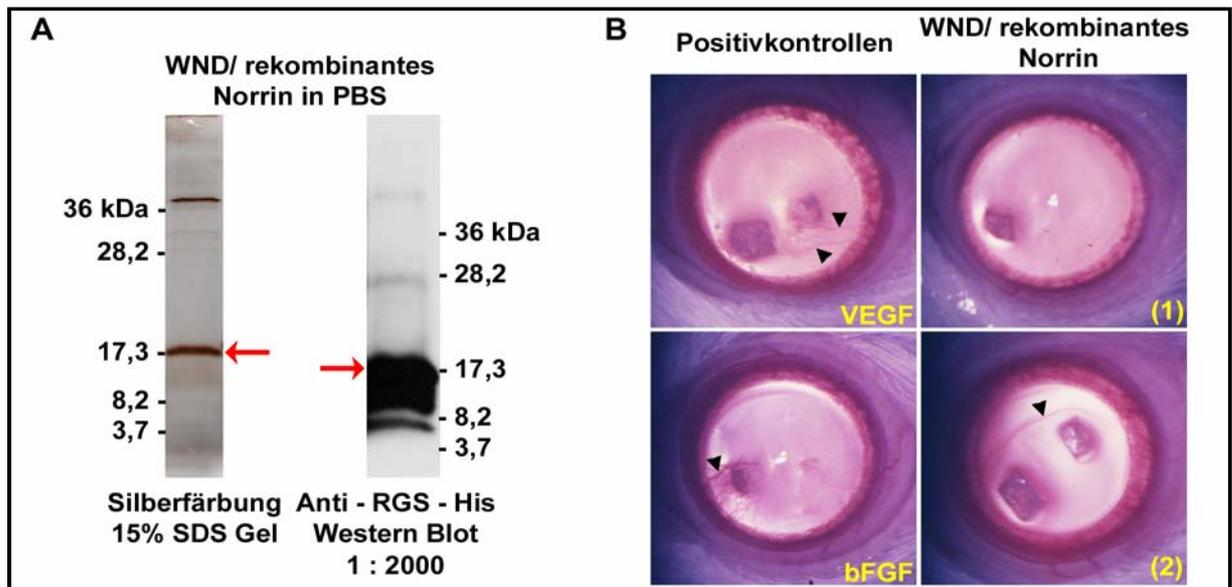


Abbildung 39: Reinheit und Spezifität des rekombinanten Norrins/WND und Cornea-Vaskularisations-Assay in Ratten. **A:** Die Silberfärbung und der anti-RGS-His-Western Blot wiesen die Reinheit und Identität des WND-Proteins (Rote Pfeile) nach. **B:** Exemplarische Aufnahmen von Augen der Ratten aus dem Cornea-Vaskularisations-Assay für die Positivkontrollen VEGF und bFGF sowie die Testsubstanz Norrin/ WND nach einem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen. Die Positivkontrollen zeigen die Entwicklung von Blutgefäßen (schwarze Pfeilköpfe), während für Norrin/ WND keine angiogene Wirkung nachgewiesen werden konnte. Nur in einem (2) von 20 Augen wurde die Entwicklung eines Blutgefäßes beobachtet (n (Tiere) = 5 für die Positivkontrollen; n = 10 für die Testsubstanz). Der Cornea-Vaskularisations-Assay wurde von Frau Dr. Meike Schellenbeck (Charité, Berlin, Deutschland) durchgeführt.

Dieser Test dient dem funktionellen Nachweis einer angiogenen Wirkung eines Proteins, wie sie z.B. VEGF (Vascular endothelial growth factor) hat. Proteine, die diese Wirkung haben, induzieren in diesem Assay eine Neubildung von Blutgefäßen ausgehend vom Limbus cornea,

dem 1-3 mm breitem mit Blutgefäßen versorgten Rand der Hornhaut. Die neu gebildeten Blutgefäße wachsen entlang eines Diffusionsgradienten der Testsubstanz zu den implantierten Kunststoffpellets, mit deren Hilfe die Testsubstanzen appliziert werden, und weisen somit eine angiogene Wirkung der Substanz nach. Dies ist hier bei den Positivkontrollen mit VEGF und bFGF (basic fibroblast growth factor) gut zu erkennen (Abbildung 39 B).

Dahingegen konnten in zwei unabhängigen Versuchen für das rekombinante Norrin, welches bis auf die RGS-His-Erkennungssequenz dem nativen Norrin (Ndph) gleichen sollte, keine angiogene Wirkung nachgewiesen werden. Ein einzelnes Blutgefäß konnte in einem Auge, dessen Foto in Abbildung 39 (2) gezeigt wird, beobachtet werden. Dieser Befund konnte aber in keinem weiteren Auge der 10 Tiere aus der mit WND/Norrin behandelten Gruppe bestätigt werden.