



Nicole Andrejewski (Autor)
**Molekulargenetische Prozesse in der
Augenentwicklung**

Nicole Andrejewski

**Molekulargenetische Prozesse in der
Augenentwicklung**



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3527>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1	Einleitung	1
1.1	Die Entwicklung des Auges als Teil des zentralen Nervensystems.....	1
1.2	Extrinsische und intrinsische Faktoren bestimmen die Musterbildung in der Augenentwicklung.....	3
1.2.1	Determination des Augenvesikels.....	4
1.2.2	Regionalisierung des Augenvesikels.....	7
1.3	Pax6 ist auf verschiedenen Ebenen essentiell für die Augenentwicklung.....	9
1.4	Die Augennerventwicklung ist von Pax2-Aktivität abhängig.....	13
2	Zielsetzung.....	15
3	Material und Methoden.....	16
3.1.1	Chemikalien.....	16
3.1.2	Stamm- und Standardlösungen.....	16
3.1.3	Molekularbiologisches Material.....	18
3.1.3.1	Vektorplasmide.....	18
3.1.3.2	Plasmidkonstrukte.....	19
3.1.3.3	Puffer für enzymatische Reaktion.....	21
3.1.3.4	Bakterienstämme	22
3.1.3.5	Nährmedien:.....	22
3.1.3.6	Marker.....	22
3.1.3.7	Radioaktive Substanzen.....	23
3.1.3.8	PCR-Material	23
3.1.3.9	“Kit’s”	23
3.1.4	Filme	23
3.1.5	Antikörper und Antiseren:.....	24

3.1.5.1	Primärantikörper.....	24
3.1.5.2	Sekundärantikörper.....	24
3.1.6	Zellkulturmedien, Lösungen und Puffer zum Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	25
3.1.7	Mäuse und Embryonen.....	25
3.2	Molekularbiologische Methoden	25
3.2.1	Enzymatische Manipulation von DNA.....	25
3.2.1.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	25
3.2.1.2	Auffüllen von 5'-Restriktionsüberhängen mit Klenow-Polymerase ..	26
3.2.1.3	Dephosphorylierung von DNA-Enden	26
3.2.1.4	Ligation von DNA-Enden.....	27
3.2.1.5	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
3.2.2	Isolierung, Aufreinigung und Charakterisierung von DNA-Fragmenten	28
3.2.2.1	Agarosegelelektrophorese.....	28
3.2.2.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen durch Elektroelution	28
3.2.2.3	Phenolextraktion.....	29
3.2.2.4	Ethanolpräzipitation.....	29
3.2.2.5	Entsalzen von DNA-Lösungen durch Dialyse	29
3.2.3	Präparation und Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	30
3.2.4	Blau/Weiß-Selektion zur Identifikation von Plasmidklonen	30
3.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
3.2.5.1	Minipräparation von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse.....	31
3.2.5.2	Minipräparation von Plasmid-DNA mit dem Qiagen-Mini-Kit	31

3.2.5.3	Maxi-und Midipräparation von Plasmid-DNA mit dem Qiafilter-Kit (Qiagen)	32
3.2.6	Konzentrationsbestimmung von DNA in Lösungen.....	32
3.2.6.1	Aufbereitung von linearen DNA-Konstrukten für die Injektion in Mausocyten.....	32
3.2.7	Genotypisierung von genomischer Maus-DNA.....	33
3.2.7.1	Isolierung genomischer DNA aus Mausgeweben	33
3.2.7.2	Genotypisierung auf Pax6-mt-Lokus mittels PCR.....	34
3.2.7.3	Genotypisierung bezüglich Pax2	35
3.2.7.4	Genotypisierung mittels Southern-Transfer.....	37
3.3	Elektrophoretische Gelretardationsexperimente mit radioaktiv-markierten doppelsträngigen Oligonukleotiden.....	40
3.3.1	In vitro-Translation zur Überexpression von Proteinen (TNT system, Promega).....	40
3.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Auftrennung von ³⁵ S-Methionin-markierten überexprimierten Proteinen.....	40
3.3.3	Radioaktive Markierung der Oligonukleotide	42
3.3.4	Bindungsreaktion	42
3.3.5	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide.....	43
3.4	Arbeiten mit eukaryontischen Zellen.....	43
3.4.1	Trypsinieren von Zellen	43
3.4.2	Einfrieren von Zellen.....	44
3.4.3	Auftauen und Revitalisieren von Zellen.....	44
3.4.4	Transfektion von COS7-, HeLa- und 3T3-Zellen.....	44
3.4.4.1	Herstellung von Zelllysaten nach der Transfektion.....	45

3.4.4.2	Bestimmung der Luciferase-Aktivität in Zellextrakten.....	45
3.4.4.3	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität in Zellextrakten.....	45
3.5	Embryologische Methoden.....	46
3.5.1	Erzeugung transgener Mäuse mittels Mikroinjektion.....	46
3.5.2	Mäuse und Embryonen.....	47
3.5.3	Injektionen	47
3.6	Histologie.....	47
3.6.1	Einbetten von Embryonen und Geweben in Paraffin.....	47
3.6.2	Anfertigen von Gefrierschnitten	48
3.6.3	Immunhistochemie.....	48
3.6.4	In-Situ-Hybridisierung (IHS) mit Digoxigenin-markierten cRNA-Sonden ..	49
3.6.4.1	Synthese der gegensträngigen RNA-Sonde.....	49
3.6.4.2	cRNA-Sonden für die In-Situ-Hybridisierung.....	51
3.6.5	Histochemischer Nachweis von β -Galactosidaseaktivität.....	51
3.6.6	Hämatoxylin-Eosin-Färbung histologische Schnitte	52
3.6.7	Dokumentation und Auswertung histologischer Präparate	53
3.7	Transfektion von Hühnerembryonen mittels In ovo-Elektroporation.....	53
4	Experimente und Ergebnisse	55
4.1	<i>Pax2</i> und <i>Pax6</i> sind im frühen Augenesikel und retinalen Pigmentepithel koexprimiert.....	55
4.2	<i>Pax6</i> -Mutanten bilden noch Domänen für Neuroretina, retinalem Pigmentepithel und Augensiel aus.....	57
4.3	<i>Pax2</i> -Mutanten haben erst nach E11.5 einen Augenphänotyp	61
4.4	<i>Pax2</i> ^{-/-} ; <i>Pax6</i> ^{+/-} -Embryonen zeigen zu Neuroretina transdifferenziertes Pigmentepithel	66

4.5	Die Expression von Mitf ist <i>Pax2</i> ^{-/-} ; <i>Pax6</i> ^{+/-} -Mutanten reduziert.....	70
4.6	Mitf wird in <i>Pax2</i> ^{-/-} ; <i>Pax6</i> ^{-/-} -Mutanten nicht exprimiert	72
4.7	Das Augenbläschen ist in <i>Pax2</i> ^{-/-} ; <i>Pax6</i> ^{-/-} -Mutanten nicht regionalisiert.....	75
4.8	Analyse des humanen Mitf-A-Promotors.....	77
4.8.1	<i>Pax2</i> und <i>Pax6</i> binden an den humanen Mitf-A-Promotor in vitro	78
4.8.2	<i>Pax2</i> und <i>Pax6</i> aktivieren den A-Promotor in Cos-Zellen	82
4.8.3	Expression des A-Promotors in Hühnerembryonen.....	84
4.9	Ektopisches RPE in den optischen Nerven von MS-Mäusen ist Mitf-positiv.....	85
4.10	<i>Pax2</i> ^{-/-} ; <i>Pax6</i> ^{+/-} -Mutanten differenzieren keine Linse aus.....	87
5	Diskussion	91
5.1	Das <i>Pax6</i> -defiziente Augenvesikel ist in invertierter Orientierung in NR- und RPE-Domäne regionalisiert.....	91
5.2	Kooperative Funktion von <i>Pax2</i> und <i>Pax6</i> führt zur Regionalisierung des Augenvesikels	94
5.3	Redundanz als allgemeines Prinzip bei den <i>Pax</i> -Transkriptionsfaktoren?	95
5.4	Mitf als direktes Target von <i>Pax2</i> - und <i>Pax6</i> -Aktivität.....	98
5.5	<i>Pax</i> -Gene als Regulatoren von bHLH-Faktoren: Eine evolutiv konservierte Kaskade?	103
5.6	<i>Pax2</i> agiert als intrinsischer linseninduzierender Faktor im Augenvesikel.....	106
6	Zusammenfassung.....	111
7	Literaturverzeichnis	112
8	Publikationen	132
	Danksagungen.....	133
	Lebenslauf	134