

Die Rolle des Schilddrüsenhormons bei der Ausprägung und Aufrechterhaltung der Zapfenopsin-Expressionsmuster in der Mausretina

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften (15)
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

von
Anika Glaschke
aus Hamm

Frankfurt 2008

D30

vom Fachbereich Biowissenschaften (15) der
Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Volker Müller

Gutachter: Prof. Dr. Leo Peichl und Prof. Dr. Manfred Kössl

Datum der Disputation: 16 Juli 2008

Meinen Eltern

**Das Höchste, wozu der Mensch gelangen kann, ist das Erstaunen.
Johann Wolfgang von Goethe**

Inhaltsverzeichnis

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildungsverzeichnis | 4 |
| Tabellenverzeichnis | 6 |
| Abkürzungsverzeichnis | 7 |
| 1. Einleitung | 10 |
| 1.1 Die Photorezeptoren der Retina | 10 |
| 1.2 Retinogenese | 12 |
| 1.3 Überblick über das Schilddrüsenhormonsystem | 13 |
| 1.4 Das Zapfenmuster der Maus | 16 |
| 1.5 Pax8-Knockout-Maus | 18 |
| 1.6 Ziel der Arbeit | 18 |
| 2. Material und Methoden | 20 |
| 2.1 Versuchstiere | 20 |
| 2.2 Genotypisierung | 20 |
| 2.3 Präparation der Augen und Dokumentation | 22 |
| 2.3.1 Organentnahme | 22 |
| 2.3.2 Bestimmung des Schilddrüsenhormongehalts im Serum | 22 |
| 2.3.3 Dokumentation des Körper- und Augengewichts und der Augenparameter | 23 |
| 2.4 Molekularbiologische Techniken | 24 |
| 2.4.1 Präparation der Retina für molekularbiologische Untersuchungen | 25 |
| 2.4.2 Nachweis der mRNA im Gewebe durch RT-PCR | 25 |
| 2.4.2.1 Isolation der gesamten RNA aus dem Gewebe | 25 |
| 2.4.2.2 Reverse Transkriptase Reaktion | 26 |
| 2.4.2.3 RT-PCR zum Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen | 26 |
| 2.5 Methoden zur histologischen Untersuchung und In-situ-Hybridisierung der Retina | 27 |
| 2.5.1 Fixierung | 28 |
| 2.5.2 Anfertigung und Färbung von transversalen Semidünnschnitten | 28 |
| 2.5.3 Herstellung von Vertikalgefrierschnitten am Kryostaten | 29 |
| 2.5.4 Präparation der Retina zur Anfertigung von Flachpräparaten | 30 |
| 2.5.5 In-situ-Hybridisierung | 30 |
| 2.5.5.1 Herstellung der Sonden | 30 |
| 2.5.5.2 In-situ-Hybridisierung | 31 |
| 2.5.6 Immunzytochemische Färbungen der Retina | 32 |
| 2.5.6.1 Immunzytochemische Färbungen von vertikalen Gefrierschnitten | 33 |
| 2.5.6.2 Immunzytochemische Färbungen der ganzen Retina | 34 |
| 2.6 Manipulationen des Schilddrüsenhormonhaushalts | 37 |
| 2.6.1 Manipulation des Schilddrüsenhormonhaushalts von Pax8 ^{-/-} | 37 |
| 2.6.1.1 Thyroxinsubstitution während der Entwicklung | 38 |
| 2.6.1.2 Thyroxinsubstitution adulter Pax8 ^{-/-} | 38 |
| 2.6.2 Erzeugung einer Hypothyreose in wildtypischen Mäusen | 39 |
| 2.6.2.1 Entfernung der Schilddrüse | 39 |
| 2.6.2.2 Applikation von Methimazol | 39 |
| 2.7 Mikroskopische Analyse der Retina | 40 |

Verzeichnisse

| | | |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 2.7.1 | Qualitative und quantitative Analyse | 40 |
| 2.8 | Lösungen | 41 |
| 2.9 | Geräte und sonstige Hilfsmittel | 43 |
| 2.10 | Chemikalien | 44 |
| 3. | Ergebnisse | 47 |
| 3.1 | Allgemeine Befunde bei der Pax8-Maus | 47 |
| 3.1.1 | Konzentration der Schilddrüsenhormone im Serum | 47 |
| 3.1.2 | Körpergewicht | 49 |
| 3.2 | Postnatale Entwicklung des Auges und der Retina bei Pax8 ^{-/-} | 50 |
| 3.2.1 | Augenvermessungen | 50 |
| 3.2.2 | Morphologie und Schichtung der Retina | 52 |
| 3.2.3 | Morphologie verschiedener Zelltypen in der Retina | 55 |
| 3.2.4 | Zapfensynapse | 68 |
| 3.2.5 | Nachweis von mRNA in der Retina | 69 |
| 3.3 | Entwicklung des S- und M-Zapfenmuster in der Maus | 70 |
| 3.4 | Vergleich des Zapfenmusters wildtypischer Mäuse verschiedener Stämme | 72 |
| 3.4.1 | Vergleich des Schilddrüsenhormongehalts im Serum von C57, Sv129 und Pax8 ^{+/+} | 72 |
| 3.4.2 | Schematische Darstellung der Retina und Definition der Positionen zur Dichtebestimmung der S- und M-Zapfen | 74 |
| 3.4.3 | Postnatale Entwicklung des S- und M-Zapfenmusters in den Wildtypen von drei Stämmen | 75 |
| 3.4.4 | Größe der Retinaflächen von C57, Sv129 und den drei Pax8-Genotypen | 79 |
| 3.4.5 | Technik zur Bestimmung der S- und M-Zapfendichten | 81 |
| 3.4.6 | S- und M-Zapfendichte bei C57, Sv129 und Pax8 ^{+/+} im Alter von PWo 3 und PWo 22 | 82 |
| 3.5 | Vergleich des S- und M-Zapfenmusters von Pax8 ^{-/-} mit Pax8 ^{+/-} und Pax8 ^{+/+} | 87 |
| 3.5.1 | S- und M-Zapfengradient | 88 |
| 3.5.2 | Postnatale Entwicklung des S- und M-Zapfenmusters bei Pax8 | 89 |
| 3.5.3 | Verteilung der mRNA von S- und M-Opisin im Alter PWo 3 | 95 |
| 3.5.4 | S- und M-Zapfendichte bei Pax8 im Alter von PWo3 und PWo 22 | 97 |
| 3.6 | Ermittlung der Gesamtzapfendichte an verschiedenen Positionen der Retina | 100 |
| 3.6.1 | Markierung der Zapfen durch PNA | 101 |
| 3.6.2 | Vergleich der postnatalen Entwicklung der Gesamtzapfendichten bei C57, Sv129 und den drei Pax8-Genotypen | 102 |
| 3.7 | Künstlich erzeugte Euthyreose während der postnatalen Entwicklung von Pax8 ^{-/-} | 106 |
| 3.7.1 | Körpergewicht von substituierten Pax8 ^{-/-} | 106 |
| 3.7.2 | Schilddrüsenhormongehalt im Serum von substituierten Pax8 ^{-/-} | 107 |
| 3.7.3 | Verteilung der S- und M-Zapfen von substituierten Pax8 ^{-/-} | 108 |
| 3.7.4 | S- und M-Zapfendichte von substituierten Pax8 ^{-/-} | 110 |
| 3.8 | Künstlich erzeugte Euthyreose bei adulten Pax8 ^{-/-} | 112 |
| 3.8.1 | Körpergewicht von adult-substituierten Pax8 ^{-/-} | 113 |
| 3.8.2 | Schilddrüsenhormongehalt im Serum von adult-substituierten Pax8 ^{-/-} | 114 |
| 3.8.3 | Verteilung der S- und M-Zapfen von adult-substituierten Pax8 ^{-/-} | 115 |
| 3.8.4 | S- und M-Zapfendichte bei adult-substituierten Pax8 ^{-/-} | 116 |
| 3.9 | Schilddrüsenhormongehalt von Pax8 ^{+/+} nach Entfernung der Schilddrüse | 118 |
| 3.10 | Pharmakologisch erzeugte Hypothyreose bei adulten C57-Mäusen | 119 |
| 3.10.1 | Körpergewicht hypothyreoter C57 | 120 |

Verzeichnisse

| | | |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.10.2 | Schilddrüsenhormongehalt von C57 nach Behandlung mit MMI | 120 |
| 3.10.3 | Verteilung der S- und M-Zapfen von hypothyreoten C57 | 121 |
| 3.10.4 | S- und M-Zapfendichten bei hypothyreoten C57 | 123 |
| 4. | Diskussion | 126 |
| 4.1 | Methodische Aspekte | 126 |
| 4.2 | Rolle des Schilddrüsenhormons auf die postnatale Entwicklung des Auges und der Retina | 128 |
| 4.3 | Entwicklung und Ausprägung des Zapfenmusters der wildtypischen Maus | 131 |
| 4.4 | Generierung und Aufrechterhaltung des Zapfenmusters in Abhängigkeit vom Schilddrüsenhormon | 135 |
| 4.5 | Klinische Relevanz | 142 |
| 4.6 | Anmerkungen zum Körpergewicht | 142 |
| 5. | Zusammenfassung | 144 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 146 |
| | Danksagung | 153 |
| | Eidesstattliche Erklärung | 154 |
| | Curriculum Vitae | 155 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 1 | Schema der retinalen Schichten und Neuronenklassen | 11 |
| Abbildung 2 | Schema des wildtypischen Zapfenmusters der Maus | 17 |
| Abbildung 3 | Genotypisierung von Pax8 | 22 |
| Abbildung 4 | Augenvermessung | 24 |
| Abbildung 5 | Schilddrüsenhormongehalt im Serum von Pax8 | 48 |
| Abbildung 6 | Entwicklung des Körpergewichts der Pax8-Genotypen bis Postnatalwoche 8 | 50 |
| Abbildung 7 | Entwicklung der Augendimensionen der Pax8-Genotypen bis Postnatalwoche 3 | 51 |
| Abbildung 8 | Retinaschichtung an P7 | 53 |
| Abbildung 9 | Retinaschichtung an P14 | 54 |
| Abbildung 10 | Retinaschichtung an P21 | 55 |
| Abbildung 11 | Zellkerne | 57 |
| Abbildung 12 | Müller-Gliazellen | 58 |
| Abbildung 13 | Stäbchenbipolarzellen | 59 |
| Abbildung 14 | OFF-Zapfenbipolarzellen | 60 |
| Abbildung 15 | Horizontal-, Amakrin- und Ganglienzellen | 61 |
| Abbildung 16 | Amakrin- und Ganglienzellen | 62 |
| Abbildung 17 | Cholinerge Amakrinzellen | 63 |
| Abbildung 18 | Dopaminerge Amakrinzellen | 64 |
| Abbildung 19 | Amakrinzellen Typ All | 64 |
| Abbildung 20 | GABA | 65 |
| Abbildung 21 | Glyzin | 66 |
| Abbildung 22 | Stäbchen | 67 |
| Abbildung 23 | Zapfen | 68 |
| Abbildung 24 | Zapfensynapse | 69 |
| Abbildung 25 | Nachweis von Transkripten in der Retina | 70 |
| Abbildung 26 | S-Zapfen an P7 | 71 |
| Abbildung 27 | S-Zapfen an P14 | 71 |
| Abbildung 28 | Schilddrüsenhormongehalt im Serum von Wildtypen in PWo 3 | 73 |
| Abbildung 29 | Schilddrüsenhormongehalt im Serum von Wildtypen in PWo 22 | 74 |
| Abbildung 30 | Schematische Darstellung der Retina | 75 |
| Abbildung 31 | S-Zapfen von drei Wildtypen bei PWo 3 | 76 |
| Abbildung 32 | M-Zapfen von drei Wildtypen bei PWo 3 | 77 |
| Abbildung 33 | S-Zapfen von drei Wildtypen bei PWo 22 | 78 |
| Abbildung 34 | M-Zapfen von drei Wildtypen bei PWo 22 | 79 |
| Abbildung 35 | Retinafläche in PWo 3 | 80 |
| Abbildung 36 | Retinafläche in PWo 12 | 80 |
| Abbildung 37 | Retinafläche in PWo 22 | 81 |
| Abbildung 38 | M-Zapfenmuster mit verschiedener Helligkeitsbearbeitung | 82 |
| Abbildung 39 | S- und M-Zapfendichte von Wildtypen in PWo 3 | 86 |
| Abbildung 40 | S- und M-Zapfendichte von Wildtypen in PWo 22 | 87 |
| Abbildung 41 | S-Zapfenverteilung über die Retina bei Pax8 | 89 |
| Abbildung 42 | M-Zapfenverteilung über die Retina bei Pax8 | 89 |
| Abbildung 43 | S-Zapfen von Pax8-Genotypen bei PWo 3 | 90 |
| Abbildung 44 | S-Zapfen von Pax8-Genotypen bei PWo 12 | 91 |
| Abbildung 45 | S-Zapfen von Pax8-Genotypen bei PWo 22 | 92 |
| Abbildung 46 | M-Zapfen von Pax8-Genotypen bei PWo 3 | 93 |
| Abbildung 47 | M-Zapfen von Pax8-Genotypen bei PWo 12 | 94 |
| Abbildung 48 | M-Zapfen von Pax8-Genotypen bei PWo 22 | 95 |
| Abbildung 49 | S-Opsin-Transkript von Pax8-Genotypen bei PWo 3 | 96 |
| Abbildung 50 | M-Opsin-Transkript von Pax8-Genotypen bei PWo 3 | 97 |
| Abbildung 51 | S- und M-Zapfendichte von Pax8 in PWo 3 | 99 |
| Abbildung 52 | S- und M-Zapfendichte von Pax8 in PWo 22 | 100 |

Verzeichnisse

| | | |
|--------------|--------------------------------------------------------|-----|
| Abbildung 53 | Opsindoppelfärbung | 101 |
| Abbildung 54 | Opsinexpression in Zapfen | 102 |
| Abbildung 55 | Vergleich der S-Zapfendichte | 104 |
| Abbildung 56 | Vergleich der M-Zapfendichte | 105 |
| Abbildung 57 | Vergleich der Gesamtzapfendichte | 105 |
| Abbildung 58 | Körpergewicht von V1 und V2 | 107 |
| Abbildung 59 | Schilddrüsenhormongehalt im Serum von V1 und V2 | 108 |
| Abbildung 60 | S-Zapfen bei V1 und V2 | 109 |
| Abbildung 61 | M-Zapfen bei V1 und V2 | 110 |
| Abbildung 62 | S- und M-Zapfendichten bei V1 und V2 | 112 |
| Abbildung 63 | Körpergewicht von V3 | 113 |
| Abbildung 64 | Schilddrüsenhormongehalt im Serum von V3 | 114 |
| Abbildung 65 | S-Zapfen bei V3 | 115 |
| Abbildung 66 | M-Zapfen bei V3 | 116 |
| Abbildung 67 | S- und M-Zapfendichte von V3 | 118 |
| Abbildung 68 | Schilddrüsenhormongehalt im Serum nach Thyreoidektomie | 119 |
| Abbildung 69 | Körpergewicht von V4 | 120 |
| Abbildung 70 | Schilddrüsenhormongehalt im Serum von V4 | 121 |
| Abbildung 71 | S-Zapfen bei V4 | 122 |
| Abbildung 72 | M-Zapfen bei V4 | 123 |
| Abbildung 73 | S- und M-Zapfendichten bei V4 | 124 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabelle 1 | Pax8-Primersequenzen | 22 |
| Tabelle 2 | Primersequenzen für RT-PCR | 27 |
| Tabelle 3 | In-situ-Hybridisierungssonden | 31 |
| Tabelle 4 | Primärantikörper | 36 |
| Tabelle 5 | Sekundärantikörper | 37 |
| Tabelle 6 | Versuchsansätze | 37 |
| Tabelle 7 | Lösungen | 43 |
| Tabelle 8 | Geräte und Hilfsmittel | 44 |
| Tabelle 9 | Chemikalien | 46 |
| Tabelle 10 | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Schilddrüsenhormongehalts im Serum bei Pax8 | 48 |
| Tabelle 11 | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Körpergewichts bei Pax8 | 49 |
| Tabelle 12 | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der Augenparameter | 51 |
| Tabelle 13 | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Schilddrüsenhormongehalts im Serum verschiedener Wildtypen | 73 |
| Tabelle 14 | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der Retinafläche | 80 |
| Tabelle 15 | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der S- und M-Zapfendichte | 83 |
| Tabelle 16 | S-Zapfendichte bei 75% dorsal | 83 |
| Tabelle 17 | S-Zapfendichte bei 50% dorsal | 84 |
| Tabelle 18 | S-Zapfendichte bei 50% ventral | 84 |
| Tabelle 19 | S-Zapfendichte bei 75% ventral | 84 |
| Tabelle 20 | M-Zapfendichte bei 75% dorsal | 85 |
| Tabelle 21 | M-Zapfendichte bei 50% dorsal | 85 |
| Tabelle 22 | M-Zapfendichte bei 50% ventral | 85 |
| Tabelle 23 | M-Zapfendichte bei 75% ventral | 86 |
| Tabelle 24 | Gesamtzapfendichte bei 75% dorsal | 103 |
| Tabelle 25 | Gesamtzapfendichte bei 50% dorsal | 103 |
| Tabelle 26 | Gesamtzapfendichte bei 50% ventral | 103 |
| Tabelle 27 | Gesamtzapfendichte bei 75% ventral | 104 |
| Tabelle 28 | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der Gesamtzapfendichte | 104 |
| Tabelle 29 | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Körpergewichts von V1 und V2 | 107 |
| Tabelle 30 | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Schilddrüsenhormongehalts im Serum von substituierten Pax8 | 108 |
| Tabelle 31 | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der S- und M-Zapfendichte von substituierten Pax8 | 111 |
| Tabelle 32 | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Körpergewichts von V3 | 113 |
| Tabelle 33 | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der Gesamtzapfendichte von V3 | 117 |
| Tabelle 34 | S-Zapfendichtewerte von V4 | 125 |
| Tabelle 35 | M-Zapfendichtewerte von V4 | 125 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--------------------------------------------------------|
| bp | Basenpaare |
| C57 | Mausstamm C57BL/6J |
| ChAT | Cholinacetyltransferase |
| d | engl. donkey, Esel |
| D | dorsal |
| DAB 1 | engl. Disabled 1 |
| Deio 2 | Deiodinase 2 |
| Deio 3 | Deiodinase 3 |
| DNA/DNS | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| ft3 | freies Triiodothyronin |
| ft4 | freies Thyroxin |
| GCL | engl. ganglion cell layer, Ganglienzellschicht |
| Glypho | Glykogenphosphorylase |
| gp | engl. guinea pig, Meerschweinchen |
| gt | engl. goat, Ziege |
| INL | engl. inner nuclear layer, innere Körnerschicht |
| IPL | engl. inner plexiform layer, innere plexiforme Schicht |
| IS | engl. inner segment, Innensegment |
| ISH | In-situ-Hybridisierung |
| M-Zapfen | Zapfen, die das M-Opisin exprimieren |
| MMI | Methimazol |
| ms | engl. mouse, Maus |

Verzeichnisse

| | |
|------------|-----------------------------------------------------------|
| N | nasal |
| NK3-R | Neurokinin Rezeptor 3 |
| ONL | engl. outer nuclear layer, äußere Körnerschicht |
| OPL | engl. outer plexiform layer, äußere plexiforme Schicht |
| OS | engl. outer segment, Außensegment |
| $p < 0,01$ | Signifikanzlevel $p < 0,01$ |
| P7 | Postnataltag 7 |
| Pax8 -/- | Mausstamm Pax8 Mutante |
| Pax8 +/- | Mausstamm Pax8 Heterozygote |
| Pax8 +/+ | Mausstamm Pax8 Wildtyp |
| PB | engl. phosphate buffer, Phosphatpuffer |
| PCR | engl. polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PKC | Proteinkinase C |
| PNA | engl. peanut agglutinin |
| PWo | Postnatalwoche |
| rb | engl. rabbit, Kaninchen |
| RNA/RNS | Ribonukleinsäure |
| rpm | engl. revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute |
| rt | engl. rat, Ratte |
| S-Zapfen | Zapfen, die das S-Opsin exprimieren |
| Sv129 | Mausstamm Sv |
| T | temporal |
| T3 | Triiodothyronin |
| T4 | Thyroxin |

Verzeichnisse

| | |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| TH | Thyrosinhydroxylase |
| TR β 2 | engl. thyroid hormone receptor β 2, Schilddrüsenhormonrezeptor β 2 |
| V | ventral |

1. Einleitung

Durch Sinnessysteme steht der tierische Organismus in Kontakt zu seiner physikalischen Umwelt. Die physikalischen Reize, z.B. Schallwellen oder Licht, werden von den Rezeptoren des Ohrs oder Auges aufgenommen. Die Funktion der Rezeptoren aller Sinnessysteme ist dieselbe. Die Rezeptoren wandeln den adäquaten Reiz in eine elektrochemische Information um. Diese Information wird im Gehirn verarbeitet und konstruiert eine Wahrnehmung, die eine Reaktion des Organismus ermöglicht (Kandel et al. 1996).

1.1 Die Photorezeptoren der Retina

Das Lichtsinnesorgan von Säugetieren ist das Auge. Das Licht trifft zunächst auf den dioptrischen Apparat, der aus Hornhaut und Linse besteht (Schmidt et al. 2000). Von ihm wird das Licht gebrochen und auf das Sinnesepithel, die Retina, gebündelt. Die Retina ist ein hoch organisiertes neuronales Gewebe. Die fünf verschiedenen Neuronenklassen sind in Schichten angeordnet (Abb. 1). Die Stäbchen und Zapfen sind die Rezeptoren dieses Sinnessystems. Das Lichtsignal wird durch eine photoelektrische Transduktion in eine elektrochemische Information umgewandelt (Müller & Kaupp 1998). Von den Photorezeptoren gelangt die Information über Bipolarzellen zu Ganglienzellen. Die Ganglienzellen transportieren die Information über Axone in den visuellen Kortex des Gehirns, wo die Wahrnehmung eines Bildes entsteht. Horizontalzellen und Amakrinzellen fungieren als modulatorische Interneurone und bedingen einen horizontalen, inhibitorischen Informationsfluss (Peichl 1992). Grundsätzlich sind die zwei Typen der Photorezeptoren gleich aufgebaut. Der lichtempfindliche Teil ist das Außensegment, in dem durch Membraneinschnürungen gestapelte Doppelmembranscheiben (Discs) entstanden sind (Wehner & Gehring 1995). Die Discs enthalten das Photopigment, welches aus Retinal und einem Opsin besteht. Das Außensegment ist über ein Innensegment mit dem Soma verbunden. Die Information verläuft über das Axon zum Endfüßchen des Photorezeptors, welches über eine Synapse Kontakt mit den nachgeschalteten Zellen herstellt. Dennoch gibt es auch Unterschiede in der Morphologie und Verschaltung, so dass die Photorezeptoren auf unterschiedliche Eigenschaften des Lichtes reagieren (Adler & Raymond 2007). Das Opsin der Stäbchen (Stäbchenopsin) ist maximal empfindlich für Lichtwellenlängen von etwa 500 nm. Durch die stärker konvergente Verschaltung und besondere strukturelle und biochemische Eigenschaften sind die Stäbchen lichtempfindlicher als die Zapfen (Masland 1996). Deshalb werden sie benutzt, um bei geringeren Lichtintensitäten zu sehen. Dieses wird als skotopisches Sehen bezeichnet (Kandel et al. 1996). Das Auflösungsvermögen des Stäbchensystems ist durch die höhere Konvergenz herabgesetzt.

Einleitung

Die Zapfen hingegen werden für das Sehen bei höheren Lichtintensitäten verwendet, welches auch photopisches Sehen genannt wird (Kandel et al. 1996). Des Weiteren sind die Zapfen für das Farbsehen zuständig. Farbsehen ist möglich, wenn es mindestens zwei spektral unterschiedliche Zapfentypen gibt. Unterschiedliche Zapfentypen enthalten unterschiedlichen Zapfenopsine, die verschiedene Wellenlängen des Lichtes absorbieren. Die meisten Säuger haben zwei spektrale Zapfentypen. Die so genannten L/M-Zapfen enthalten das L/M-Opsin (engl. long/middle wavelength sensitive opsin). Das L/M-Opsin ist für mittel- bis langwelliges Licht empfindlich. Die so genannte S-Zapfen enthalten das S-Opsin (engl. short wavelength sensitive opsin). Die Spektralempfindlichkeit des S-Opsins liegt im Bereich des ultravioletten bis kurzwelligen Lichtes (Jacobs 1993). Wenn ein Tier mindestens zwei spektral unterschiedliche Zapfentypen besitzt, kann durch Verrechnungen auf nachgeschalteten neuronalen Ebenen Farbwahrnehmung stattfinden.

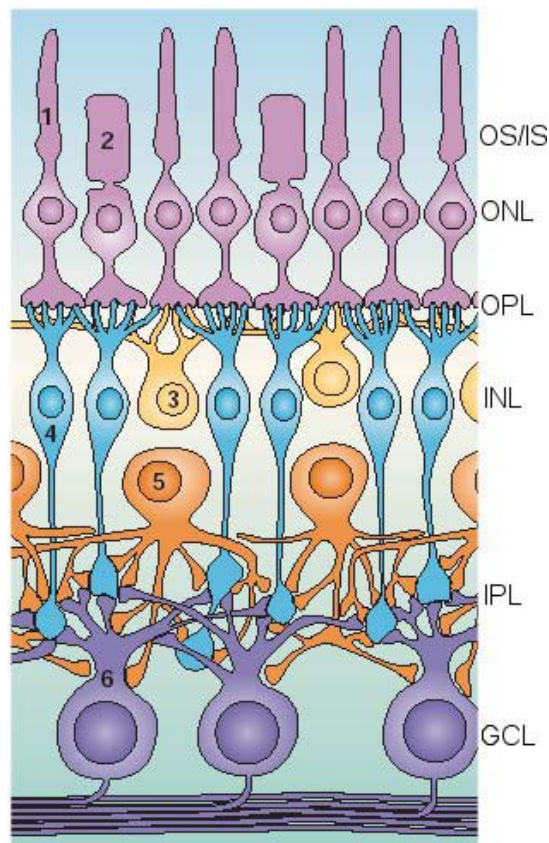


Abbildung 1 Schema der retinalen Schichten und Neuronenklassen

OS/IS Photorezeptoraußen- und -innensegmente (engl. outer segments and inner segments), ONL äußere Körnerschicht (engl. outer nuclear layer), OPL äußere plexiforme Schicht (engl. outer plexiform layer), INL innere Körnerschicht (engl. inner nuclear layer), IPL innere plexiforme Schicht (engl. inner plexiform layer), GCL Ganglienzellschicht (engl. ganglion cell layer). 1 Stäbchen, 2 Zapfen, 3 Horizontalzelle, 4 Bipolarzelle, 5 Amakrinzelle, 6 Ganglienzelle

[verändert nach Wässle 2004]

1.2 Retinogenese

Während der Embryogenese der Säugetiere wird aus dem Zwischenhirn (Diencephalon) das optische Bläschen geformt (Wehner & Gehring 1995, Dudel et al. 1996). Durch Einstülpung des optischen Bläschens entsteht der Augenbecher. Für die Entwicklung des Auges ist sowohl bei Invertebraten wie auch bei Vertebraten das Pax6-Gen verantwortlich (Gehring & Ikeo 1999, Alberts et al 1998). Zur Familie der Pax-Gene gehören neun unterschiedliche Gene. Die neun Pax-Gene enthalten eine spezifische Sequenz, die paired-box (Abk. Pax), die namensprägend für diese Familie ist. Die produzierten Proteine sind Transkriptionsfaktoren, die die zeitliche und räumliche Expression anderer Gene während der Embryogenese koordinieren (Karlson et al. 1994). Dabei gehören die Pax-Gene unterschiedlichen Gruppen an, die die Ausbildung verschiedener Organe steuern. Die Pax-Gene 2, 5 und 8 sind beispielsweise an der Bildung des Rückenmarks, der Nieren und der Schilddrüse beteiligt (Mansouri et al 1998). Wie bereits erwähnt ist das Pax6-Gen der Initiator für die Entwicklung des Auges.

Auch die Entwicklung des neuronalen Gewebes, die Retina, des Auges wird durch spezifische Faktoren gesteuert. Die Zellen der Retina werden aus einem Pool von Vorläuferzellen (engl. progenitor) gebildet. Diese Vorläuferzellen werden zu postmitotischen Vorläuferzellen (engl. precursor) und differenzieren sich zu den spezifischen Zellen der Retina (Adler & Raymond 2007). Die Differenzierung der Retinazellen ist zeitlich organisiert und verläuft vom retinalen Zentrum zur Peripherie (Peters 2002). Am Beispiel der Maus wurde gezeigt, daß die Differenzierung der Retinaneurone in zwei Wellen verläuft. Zunächst werden die Ganglienzellen und Horizontalzellen gebildet. Anschließend erfolgt die Produktion der Zapfen und Amakrinzellen. Diese vier Zellklassen werden in einer ersten Differenzierungswelle während der embryonalen Entwicklung gebildet. Die Differenzierung der Stäbchen, Bipolarzellen und Müller-Gliazellen findet in einer zweiten Differenzierungswelle größtenteils postnatal statt (Marquardt & Gruss 2002). Die Differenzierung der postmitotischen Vorläuferzellen zu spezifischen Zellen wird durch extrazelluläre Signalmoleküle und intrazelluläre Regulationsmechanismen gesteuert (Adler & Raymond 2007). Für die Differenzierung der postmitotischen Photorezeptorvorläuferzellen in Stäbchen und Zapfen sind verschiedene Faktoren verantwortlich, z.B. CRX, NRL, NR2E3. Der Faktor CRX ist in der Entwicklung von Stäbchen und Zapfen gleichermaßen wichtig, da er eine Reihe von photorezeptorspezifischen Genen reguliert (Chen et al. 1997, Freund et al 1997, Hennig et al. 2008). Der Faktor NRL ist für die Regulierung der Expression verschiedenster Gene in den Stäbchen zuständig. Fehlt dieser Faktor bei der Maus werden keine Stäbchen gebildet. Einhergehend mit dem Verlust der Stäbchen ist die Zahl der S-Zapfen erhöht. Beim Menschen ist dieses Krankheitsbild als Retinitis pigmentosa bekannt (Daniele et al. 2005). Eine Zunahme der S-Zapfen tritt auch auf, wenn NR2E3 fehlt. Im

Einleitung

menschlichen Organismus ist diese Krankheit als Enhanced S Cone Syndrome (ESCS) beschrieben (Milam et al. 2002, Corbo & Cepko 2005, Haider et al. 2006). Durch alle drei Faktoren wird die Entscheidung getroffen, ob sich die Vorläuferzelle zu einem Stäbchen oder Zapfen differenziert. Auch die Differenzierung der Zapfen in die verschiedenen spektralen Typen muss reguliert werden. Für die Differenzierung in S- oder L/M-Zapfen sind die Rezeptoren der Retinsäure und des Schilddrüsenhormons als Regulatoren bekannt (Adler & Raymond 2007).

1.3 Überblick über das Schilddrüsenhormonsystem

Die Schilddrüse (*Glandula thyroidea*) von Säugetieren ist eine endokrine Drüse (Pschyrembel 1986). Endokrine Drüsen produzieren Hormone, die als Signalmoleküle fungieren und mit dem Blut zu den Zielgeweben transportiert werden (Alberts et al. 1998). Die Schilddrüse ist ein paariges Organ und befindet sich links und rechts von der Trachea. Die beiden Lappen der Schilddrüse sind durch einen dünnen Isthmus miteinander verbunden (Zarrow et al. 1964). Die Schilddrüse ist aus Follikeln aufgebaut, in denen das Schilddrüsenhormon produziert wird (Glossmann).

Die Produktion des Schilddrüsenhormons wird durch die Hypophyse im Hypothalamus gesteuert. Das TRH (thyrotropin releasing hormone) wird im Hypothalamus gebildet. Von dort gelangt es in die Hypophyse und stimuliert die Sekretion des TSH (thyrotropin stimulating hormone) (Glossmann). Das TSH wird von den TSH-Rezeptoren (TSHR) erkannt. Die TSHR befinden sich in den Thyrozyten der Plasmamembran der Schilddrüsenfollikel. In den Thyrozyten findet die Produktion des Schilddrüsenhormons statt. Das Schilddrüsenhormon besteht aus der Aminosäure Tyrosin und essentiellen Iodatomen. Da das Hormon hydrophob ist, findet die Synthese auf einem hydrophilen Träger, dem Thyroglobulin statt. Das Thyroglobulin dient somit als Speicher für Schilddrüsenhormon und Iodatome (Glossmann, Karlson et al. 1994). Durch eine Peroxidase wird das Hormon auf dem Thyroglobulin über Iodierung von Thyrosinresten gebildet. Steigt die Konzentration des Schilddrüsenhormons an, wird die Sekretion des TSH in der Hypophyse gestoppt (negative Rückkopplung). Die Produktion des Schilddrüsenhormons ist somit autoregulatorisch.

In der Schilddrüse werden zwei Hormone produziert: Thyroxin (T₄), welchem vier Iodatome angelagert sind, und das Triiodothyronin (T₃), welches nur drei Iodatome hat. In den Follikeln der Schilddrüse ist das Verhältnis von T₄ zu T₃ 10:1. Ungefähr im selben Verhältnis werden die Hormone in die Blutbahn abgegeben. Mit dem Blut gelangen die Hormone zu den Zielgeweben. Die Hormone sind im Blut an Transportproteine gebunden. Als Transportproteine fungieren das thyroxine binding protein (TBG) und das Transthyretin. Liegen die Hormone in gebundener Form vor, werden sie als Thyroxin (T₄) und

Einleitung

Triiodothyronin (T3) bezeichnet. Sind sie hingegen nicht an Transportproteine gebunden werden sie als freies Thyroxin (fT4) und freies Triiodothyronin (fT3) bezeichnet. Um im Falle einer Schilddrüsenerkrankung eine konkrete Aussage treffen zu können, sollte die Konzentration der gebundenen und freien Formen der Schilddrüsenhormone bestimmt werden (Glossmann). Im Organismus liegen die Hormone zu 99,97% in gebundener Form vor (Glossmann). Zwischen den gebundenen Hormonen im Serum und den im Gewebe vorliegenden Hormonen besteht ein Gleichgewicht.

fT3 ist biologisch wirksamer als fT4 und fT4 dient hauptsächlich der Synthese von fT3. Dieser Vorgang wird als Aktivierung des Schilddrüsenhormons bezeichnet (Glossmann). Die Aktivierung von fT3 wird durch die Enzyme Deiodinase 1 und 2 katalysiert und geschieht lokal in den Geweben des Körpers (Köhrle 1999). Die Deiodinase 1 (D1) katalysiert die Umwandlung des fT4 zu fT3 in den meisten Organen des Körpers. Die Deiodinase 2 (D2) hingegen liegt ausschließlich in neuronalen Geweben vor und ist dort für die Aktivierung des Schilddrüsenhormons verantwortlich (Courtin et al. 2005). Es findet auch eine Inaktivierung beider Hormone statt, die durch die Deiodinase 3 (D3) katalysiert wird (Glossmann).

Das Schilddrüsenhormon ist im Körper für zahlreiche physiologische Prozesse zuständig. In der Hypophyse kontrolliert es die Expression von Wachstumshormonen. In der Leber steuert es über den Fettstoffwechsel die Thermogenese. Das Hormon erhöht die Tätigkeit des Herzmuskels und führt zu einer beschleunigten Resorption von Nährstoffen im Darm (Glossmann). Auch in der Entwicklung spielt das Schilddrüsenhormon eine große Rolle. Es ist mitverantwortlich für die Entwicklung des Gehirns und anderer neuronaler Gewebe, wie der Retina (Harpavat & Cepko 2003, Morreale de Escobar et al. 2004).

Die Wirkung des Schilddrüsenhormons wird in all diesen Prozessen über Rezeptoren entfaltet, die als Transkriptionsfaktoren wirken (Forrest et al. 2002). Die Schilddrüsenhormonrezeptoren (engl. thyroid hormone receptors, Abk. TRs) gehören zur Familie der ligandengesteuerten Transkriptionsfaktoren. Die Transkriptionsfaktoren sind über ihre DNA-Bindungsdomäne an die DNA im Zellkern gebunden (Yen 2001). Immer zwei Transkriptionsfaktoren sind als Dimer an das thyroxine responsive element (TRE) der DNA gebunden (Glossmann). Homodimere sind aus zwei TRs aufgebaut. Der TR kann aber auch mit dem Retinsäurerezeptor, der ebenfalls ein ligandengesteuerter Transkriptionsfaktor ist, Heterodimere bilden (Lazar 2003).

Das Schilddrüsenhormon fungiert als Ligand des TR und wird an die Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors gekoppelt (Yen 2001). Die höhere biologische Wirksamkeit des fT3 erklärt sich aus der Tatsache, daß es in höherem Maße als das fT4 an den Rezeptor gebunden wird (Glossmann). Ist der Rezeptor mit seinem Liganden besetzt, fungiert er als Transkriptionsfaktor, indem er die Expression von Genen reguliert. Die Regulierung kann positiv oder negativ sein (Munoz & Bernal 1997). Bei einer positiven

Einleitung

Regulierung kommt es zu einer Aktivierung der Genexpression, eine negative Regulierung führt zu einer Unterdrückung der Expression eines Gens (Lazar 2003).

Es existieren zwei Gene, die zwei TRs produzieren. Ein Gen produziert TR α und das zweite Gen TR β (Lazar 2003). Von beiden Rezeptoren existieren zwei Isoformen, die durch alternatives splicing der mRNA entstehen (Yen 2001). Die Isoformen werden als TR α 1 und 2 sowie TR β 1 und 2 bezeichnet. TR α 2 spielt in der Regulierung von Genexpressionen keine Rolle, da das Schilddrüsenhormon nicht gebunden wird (Forrest & Vennström 2000). Der TR α 1 kommt ubiquitär im Körper vor. Die Expression der TR β hingegen ist auf bestimmte Gewebe begrenzt. TR β 2 kommt in spezifische Regionen des Gehirns, der Hypophyse, den Haarsinneszellen des Innenohrs und den Zapfen der Retina vor (Forrest & Vennström 2000).

Das Schilddrüsenhormon ist mit seinen zahlreichen Funktionen ein wichtiger Faktor in der Aufrechterhaltung lebenswichtiger Prozesse. Ein Ungleichgewicht in diesem System kann zu schwerwiegenden Erkrankungen führen. Ist der Hormonspiegel im Gleichgewicht spricht man von Euthyreose (Pschyrembel 1986). Erst wenn es zu einer Über- (Hyper-) oder Unter- (Hypo-) Produktion des Schilddrüsenhormons kommt, ist das Gleichgewicht gestört (Pschyrembel 1986). Pauschal gesagt bewirkt eine Hyperthyreose eine Erhöhung des Stoffwechsels, während eine Hypothyreose zu einer Erniedrigung der Stoffwechselprozesse führt (Glossmann). Glossmann beschreibt in einem Übersichtsartikel die verschiedenen Formen von Hyper- und Hypothyreose: Eine iodinduzierte Hyperthyreose wird durch eine erhöhte Zufuhr von Iod verursacht. Eine Erkrankung mit Morbus Basedow hingegen wird durch eine übermäßige Produktion der Schilddrüsenhormone hervorgerufen. Eine Hyperthyreose kann durch eine Behandlung mit Thyreostatika behoben werden. Dabei werden zwei Typen unterschieden. Die inorganischen Thyreostatika hemmen den Transport des Iods, zu diesem Typ gehört Perchlorat. Die organischen Thyreostatika hemmen die Peroxidase der Schilddrüse irreversibel und unterbinden somit eine Produktion des Schilddrüsenhormons, Methimazol ist das am Besten untersuchte organische Thyreostatikum. Auch eine Hypothyreose kann verschiedene Ursachen haben. Sie kann ausgelöst werden durch Iodmangel oder durch eine Verminderung des Schilddrüsengewebes. Als eine immunogene Hypothyreose ist die Erkrankung Hashimoto Thyreoiditis bekannt. Bei dieser Erkrankung richten sich Antikörper gegen die Schilddrüsenperoxidase. Die Bildung der Hormone ist dadurch vermindert. Durch eine Behandlung mit pharmakologisch erzeugtem Schilddrüsenhormon kommt es zu einer Besserung der Erkrankung. Eine weitere gravierende Erkrankung ist die Neugeborenen-Hypothyreose (engl. congenital hypothyroidism) (Pschyrembel 1986). Sie wird durch eine Unterentwicklung der Schilddrüse während der Embryogenese hervorgerufen. Da der Embryo während der Entwicklung mit mütterlichem Schilddrüsenhormon versorgt wird,

äußern sich die Symptome dieser Erkrankung erst postnatal (Vulsma et al. 1989, Burrow et al. 1994). Die Neugeborenen-Hypothyreose führt zu Symptomen des Kretinismus, die sich unter anderem in einer körperlichen und geistigen Unterentwicklung äußern. Eine lebenslange Behandlung des Neugeborenen durch Substitution des Schilddrüsenhormons führt zur Genesung (Friedrichsen et al. 2004).

1.4 Das Zapfenmuster der Maus

Die meisten Säugetiere verfügen über zwei Zapfentypen. Die zwei Zapfentypen unterscheiden sich in der Expression verschiedener Opsine, die für unterschiedliche Wellenlängen sensitiv sind. Phylogenetisch existieren bei Vertebraten fünf unterschiedliche Opsinfamilien von denen bei Säugetieren nur drei vorkommen (Yokoyama 2000, Ebrey & Koutalos 2001, Jacobs & Rowe 2004, Nickle & Robinson 2007). Neben dem Opsin der Stäbchen, welches in die Familie RH1 gehört, gibt es bei Säugetieren Zapfenopsine zweier Familien. Das Opsin aus der Familie SWS 1 (shortwave sensitive 1) ist für kurze Wellenlängen sensitiv und wird S-Opisin genannt. Das L/M-Opisin stammt aus der Familie LWS/MWS (longwave to middlewave sensitive) und ist sensitiv für mittlere bis lange Wellenlängen (Adler & Raymond 2007). Da die spektrale Empfindlichkeit dieses Opsin in der Maus eher bei den mittleren Wellenlängen liegt, wird es im Weiteren als M-Opisin bezeichnet.

Die Zapfentypen werden nach der Expression ihrer Opsine entsprechend S- und M-Zapfen benannt. Beide Zapfentypen sind bei den meisten Säugetieren in einem zentro-peripheren Gradienten über die Retina verteilt mit höheren Dichten der einzelnen Zapfentypen im Zentrum (Szel et al. 1998, Ahnelt & Kolb 2000, Peichl 2005). Die Dichte der Zapfentypen ist jedoch unterschiedlich, die meisten Säugetiere haben etwa zehnmal mehr M-Zapfen als S-Zapfen (Szel et al. 1998).

Die Verteilung und Dichte der Zapfentypen bei der Maus weicht von diesem allgemeinen Muster ab, es gibt regionale Unterschiede in der Verteilung der Zapfentypen. Ein weiterer Unterschied ist die Koexpression beider Opsine in einem Zapfen, die bei der Maus in einem Großteil der Zapfen auftritt (Lukats et al. 2005). Diese Zapfen werden als Dualpigmentzapfen bezeichnet. Die meisten Zapfen in der ventralen Retina sind Dualpigmentzapfen. Auch in der dorsalen Retina existiert eine kleine Population von Dualpigmentzapfen. Zapfen, die ausschließlich das S-Opisin exprimieren werden als echte S-Zapfen bezeichnet (Haverkamp et al. 2005). Sie werden selektiv von Blauzapfen-Bipolarzellen kontaktiert.

Das mausspezifische Zapfenopsin-Expressionsmuster entwickelt sich postnatal. Zuerst wird das S-Opisin gebildet, es ist ab dem Tag der Geburt immunzytochemisch nachweisbar. Das M-Opisin wird erst später in der postnatalen Entwicklung gebildet und ist ab dem postnatalen

Einleitung

Tag 14 (P14) durch eine Antikörperreaktion nachweisbar. Da die Zahl der Zapfen embryonal festgelegt wird und kein Zapfen existiert, der kein Opsin exprimiert, enthalten alle Zapfen über die gesamte Retina zuerst das S-Opsin (Szel et al. 1998). Mit Beginn der M-Opsinexpression wird die Expression des S-Opsins in den meisten Zapfen der dorsalen Retina abgeschaltet (Szel et al. 1998). Das M-Opsin wird in allen Zapfen, mit Ausnahme der echten S-Zapfen, über die gesamte Retina exprimiert. Die Zapfen in der dorsalen Retina exprimieren das M-Opsin aber stärker als die Zapfen in der ventralen Retina. Das S-Opsin wird in allen Zapfen der ventralen Retina exprimiert (Szel et al. 1998). In der dorsalen Retina hingegen ist die Expression des S-Opsins auf ein paar wenige Zapfen beschränkt (Szel et al. 1993, Applebury et al. 2000) (Abb. 2). Dieses wildtypisch-adulte Zapfenmuster der Maus besteht somit aus S-Zapfen, M-Zapfen und Dualpigmentzapfen (Szel et al. 1993, Lukats et al 2005).

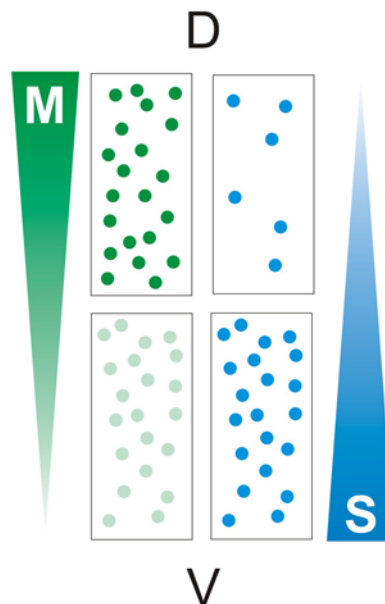


Abbildung 2 Schema des wildtypischen Zapfenmusters der Maus
Gegenläufiger dorso-ventraler Gradient der M-Zapfen (grün) und S-Zapfen (blau),
D dorsal, V ventral

In den vergangenen Jahren wurde intensiv an der Frage gearbeitet, welche Faktoren an der Regulierung der S- und M-Opsinexpression zur Generierung des Zapfenmusters beteiligt sind. Als ein wichtiger Faktor wurde TR β 2 gefunden (Jones et al. 2003). In der TR β 2-Knockout-Maus (TR β 2 -/-) exprimieren alle Zapfen über die gesamte Retina das S-Opsin. Das M-Opsin wird nicht exprimiert, was zu einer vollständigen Abwesenheit von M-Zapfen und Dualpigmentzapfen führt (Ng et al. 2001). TR β 2 wird während der embryonalen Entwicklung gleichmäßig in allen Zapfen der Retina exprimiert, in den adulten Zapfen ist TR β 2 hingegen nur schwach exprimiert (Applebury et al. 2007). Es wurden weitere Faktoren gefunden, die zusammen mit TR β 2 an der Bildung des Zapfenmusters beteiligt sind. Dazu

gehören der Retinsäurerezeptor RXR γ (Kelley et al. 1995, Roberts et al. 2005) und die Faktoren CRX und NeuroD1 (Yanagi et al. 2002, Liu et al. 2008).

1.5 Pax8-Knockout-Maus

Die Pax8-Knockout-Maus (Pax8 $-/-$) wurde im Labor von Peter Gruss hergestellt. Durch eine homologe Rekombination wurde das Pax8-Gen inaktiviert. Das Pax8-Gen exprimiert den Pax8-Transkriptionsfaktor. Durch die Inaktivierung des Gens kommt es zu einem Fehlen des Pax8-Transkriptionsfaktors und in Folge zu einer Missbildung der Schilddrüse. Die follikulären Zellen der Schilddrüse werden nicht gebildet und eine Produktion des Schilddrüsenhormons findet nicht statt, die Pax8 $-/-$ ist athyreot (Mansouri et al. 1998). Auch beim Menschen ist Pax8 für die Bildung der Schilddrüse während der Entwicklung mitverantwortlich (Pasca di Magliano et al. 2000, Bouchard et al. 2004). Bei Patienten mit einer Neugeborenen-Hypothyreose ist das Fehlen des Pax8-Transkriptionsfaktors festgestellt worden (Macchia et al. 1998, Lanzerath et al. 2006). Pax8 $-/-$ dient somit als ein Model für das Krankheitsbild der Neugeborenen-Hypothyreose (Friedrichsen et al. 2003).

Der Maus-Genotyp Pax8 $-/-$ ist postnatal lethal. Die Tiere können bis zu einem Alter von Postnataltag 21 überleben (Stillzeit). Im Vergleich zu gleichaltrigen Wurfgeschwistern sind Pax8 $-/-$ in ihrer Körpergröße reduziert. Das Schilddrüsenhormon im Serum ist reduziert (hypothyreot), was eine Verlangsamung des Stoffwechsels zur Folge hat. Auch das Reproduktionssystem ist soweit geschädigt, daß die Pax8 $-/-$ Männchen steril sind. Die Morphologie des Außenohrs kann soweit verändert sein, daß es zu einem kompletten Verlust des Außenohrs kommt. Die Pax8 $-/-$ Mäuse sind außerdem taub. Auch die Hypophyse ist in der Produktion von Hormonen beeinträchtigt. Eine tägliche Substitution mit 20 ng Thyroxin/g Körpergewicht führt zu einem Überleben der Pax8 $-/-$ und zu einer Verbesserung der Symptome. Eine vollständige Genesung kann allerdings nicht bewirkt werden (<http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=alleleDetail&key=5279>).

1.6 Ziel der Arbeit

Während die Rolle des Schilddrüsenhormonrezeptors TR β 2 bei der Zapfenopsinexpression von mehreren Forschergruppen untersucht wurde, ist die Rolle des Schilddrüsenhormons unklar. In der vorliegenden Arbeit soll die Rolle des Schilddrüsenhormons bei der Entstehung des Zapfenmusters untersucht werden. Zunächst soll durch Untersuchungen der Pax8 $-/-$ der Einfluß des fehlenden Schilddrüsenhormons auf die postnatale Entwicklung des Auges und der Retina geklärt werden. Anschließend wird die Rolle des Schilddrüsenhormons bei der

Einleitung

Ausbildung des Zapfenmusters während der postnatalen Entwicklung und dessen Aufrechterhaltung über das gesamte Leben genauer untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die verwendeten Tiere waren Hausmäuse (*Mus musculus*), Ordnung Nagetiere (Rodentia). Es wurden drei gezüchtete Stämme verwendet. Die in Versuchen verwendeten Tiere der Stämme C57BL/6J (http://www.criver.com/flex_content_area/documents/rm_rm_c_C57BL_6_mice.pdf) und 129 (im Folgenden Sv129 genannt) (http://www.criver.com/flex_content_area/documents/rm_rm_c_129_mice.pdf) wurden von Charles River Laboratories, Inc. (<http://www.criver.com>) im Alter zwischen der postnatalen Woche 3 (PWo 3, entspricht Postnataltag 21, Abk. P21) und PWo 10 bestellt. Die Tiere wurden entweder sofort für histologische Untersuchungen getötet oder, im Falle der 10 Wochen alten Tiere, bis zur Beendigung der pharmakologischen Versuche (PWo 24) in den Quarantäneräumen der Tierhaltung des Max-Planck-Instituts für Hirnforschung gehalten. Die Tiere beider Stämme galten als wildtypische Mäuse, weshalb sie als wildtypische Kontrolltiere verwendet wurden. Des Weiteren wurden Tiere des Stamms Pax8^{tm1Pgr} (im Folgenden Pax8 genannt) (<http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=alleleDetail&key=5279>) verwendet. Dieser Stamm wurde in der Arbeitsgruppe von Peter Gruss am Göttinger Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie hergestellt (Mansouri et al.1998). Heterozygote Pax8-Tiere zur Züchtung bekamen wir von Karl Bauer und Heike Heuer am Leibniz-Institut für Altersforschung, Jena. Die Tiere des Stamms Pax8 wurden in der Tierhaltung des Max-Planck-Instituts für Hirnforschung gezüchtet. Es wurden immer heterozygote weibliche und männliche Tiere miteinander verpaart. Die Tiere wurden mit Wasser und Mausfutter (Tabelle 8) ad libitum versorgt. Der Tag-Nacht-Rhythmus dauerte 12:12 Stunden und begann um 06:00 Uhr morgens. In den Versuchen wurden heterozygote (Pax8+/-) und wildtypische (Pax8+/+) Wurfgeschwister gleichen Alters zwischen postnatalen Tag 7 (P7) und P168 (PWo 24) als Vergleichstiere zu Pax8 homozygot mutierten Tieren (Pax8-/-) verwendet. Die Anzahl der in den jeweiligen Versuchsansätzen verwendeten Individuen ist im Ergebnisteil angegeben.

2.2 Genotypisierung

Die Pax8-Mäuse wurden nach der Geburt durch Tätowierung der Fußsohlen und/oder Lochung der Ohren nach einem festgelegten Codesystem markiert. Als Gewebeprobe zur Isolierung der genomischen DNA (Desoxyribonukleinsäure, Abk. DNS, engl. DNA). wurde ein Stück des Mausschwanzes abgetrennt. Diese Gewebestücke wurde für die reverse

Material und Methoden

Transkription (RT) in der Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, Abk. PCR) zur Ermittlung des Genotyps (wildtypisch Pax8+/, heterozygot Pax8+/- oder homozygot mutiert Pax8-/-) vorbereitet. In einem Lysierungspuffer (Lsg. 1, Tabelle 7) und Proteinase K (Tabelle 8) wurde das Gewebe in einem Eppendorfgefäß bei 55°C für mindestens 4 Stunden bis höchstens über Nacht auf einem Wärmeschüttler mit 1100 rpm gestellt und so die DNA aus den Zellen isoliert. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurde die so behandelte Probe für 10 Minuten auf 95°C erhitzt und gleichzeitig bei 300 rpm geschüttelt. Anschließend erfolgte die PCR. Dazu wurden folgende Komponenten des Taq DNA Polymerase Kits (Tabelle 8) in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben: 2 µl Reaktionspuffer, 2 µl MgCl₂, 4 µl Q-Solution, 1 µl dNTPs (Lsg. 2, Tabelle 7), je 1 µl Primer 1, Primer 2 und Primer 3 (Tabelle 1), 0,2 µl Taq-Polymerase, 1 µl Probe und 8,8 µl autoklaviertes Aqua bidest., so daß in Summe das Volumen 20 µl betrug. Das fertige Reaktionsgefäß wurde in eine PCR-Maschine gestellt und folgendes PCR-Programm (Flamant et al. 2002) wurde gestartet: 94°C für 5 Minuten, 10 mal folgender Zyklus mit 94°C für 15 Sekunden, 60°C für 15 Sekunden, 72°C für 30 Sekunden, anschließend 25 mal ein weiterer Zyklus mit 94°C für 15 Sekunden, 57°C für 15 Sekunden, 72°C für 30 Sekunden. Abschließend wurde die Probe für 5 Minuten auf 72°C erhitzt und dann auf 4°C zur Verwahrung abgekühlt. Zur Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente der Probe in Abhängigkeit ihrer Größe wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet. Die Konzentration des Agarosegels wurde so gewählt, daß die höchstmögliche Auftrennungseffizienz erreicht werden konnte. Das PCR-Produkt wurde im Verhältnis 5 zu 1 mit einem 6x Ladepuffer (Tabelle 8) gemischt, um die Probe sichtbar zu machen und die Probe wurde auf ein 1,5% Agarosegel (Lsg. 3, Tabelle 7, Tabelle 9) aufgetragen. Zur Auftrennung wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer mit 0,5x TBE-Puffer (Lsg. 4, Tabelle 7) gegeben. Bei 100-120 Volt wurde das PCR-Produkt in Fragmente unterschiedlicher Länge, sogenannte Banden, aufgetrennt. Da die DNA eine negative Ladung trug, wanderten die DNA-Fragmente zur Anode. Zur Sichtbarmachung wurden die Banden für 15 Minuten in einem Ethidiumbromidbad angefärbt. Das Ethidiumbromid lagerte sich an die DNA. Mittels UV-Lampe wurden die Banden sichtbar und konnten photographiert werden. Um die DNA-Größe der amplifizierten Banden bestimmen zu können, wurde ein DNA-Standard (Smart Ladder), ein sogenannter Marker (Tabelle 8), mit auf das Gel aufgetragen. Die amplifizierten Banden konnten den standardisierten Markerbanden zugeordnet werden. Die wildtypische DNA entsprach einem amplifizierten Fragment der Länge von 390 bp (Abk. Basenpaaren) und die mutierte DNA entsprach einem amplifizierten Fragment der Länge von 370 bp. Ein heterozygoten Tier konnte am Vorhandensein beider Banden in der Probe identifiziert werden.

Material und Methoden

| Gen | Primersequenz | Annealingtemperatur |
|--------|------------------------------|---------------------|
| Pax8 1 | 5'-GGATGTGGAATGTGTGCGAGG-3' | 61,8 °C |
| Pax8 2 | 5'-GCTAAGAGAAGGTGGATGAGAG-3' | 60,3 °C |
| Pax8 3 | 5'-GATGCTGCCAGTCTCGTAG-3' | 58,8 °C |

Tabelle 1 Pax8-Primersequenzen

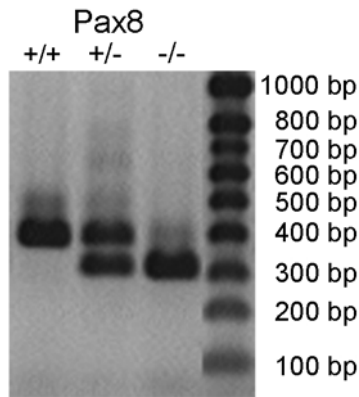


Abbildung 3 Genotypisierung von Pax8

Beispiel-Gel mit den nachgewiesenen Transkripten von Pax8 +/+, +/- und -/-. Die rechte Spur zeigt den mitgelaufenen DNA-Standard mit Angabe der Größe der Markerbanden in Basenpaaren (Abk. bp).

2.3 Präparation der Augen und Dokumentation

2.3.1 Organentnahme

Zunächst wurden die Tiere getötet. Dies erfolgte für alle Versuchstiere zwischen 9:30 und 11:00 Uhr morgens. Die Tiere wurden einzeln nacheinander in einen abgeschlossenen Behälter gesetzt und eine kleine Menge des Inhalationsnarkotikums Isofluran (Tabelle 9) wurde zugegeben. Nach Erreichen des Tiefschlafes, der durch Beobachtung und Reflexkontrolle an den Extremitäten verifiziert wurde, wurde das Tier durch Dekapitierung mit einer Schere getötet. Das ausfließende Blut wurde für die spätere Bestimmung des Schilddrüsenhormongehalts im Serum in einem Eppendorfgefäß gesammelt. Zur Augenentnahme wurden die Lider des Tieres mit einer Pinzette gespreizt, so daß der Augapfel sichtbar wurde. Das umliegende Binde- und Muskelgewebe, sowie der Sehnerv wurden mit einer Schere durchtrennt und das Auge wurde aus der Augenhöhle gehoben.

2.3.2 Bestimmung des Schilddrüsenhormongehalts im Serum

Die Eppendorfgefäße mit dem enthaltenen Blut wurden für 2 Minuten bei 13,2 rpm zentrifugiert. Dadurch wurde die feste Phase des Blutes, die die Zellen enthielt, von der flüssigen Phase des Blutes, dem Serum, getrennt. Das Serum wurde in ein spezielles

Material und Methoden

Meßgefäß überführt und bis zur Messung des Schilddrüsenhormons bei -80°C gelagert. Die Messung aller vier Formen des Schilddrüsenhormons (jeweils gebundene und freie Form des Thyroxins T4 und Triiodothyronins T3) erfolgt durch ein kompetitiven Immunoassay unter Anwendung der direkten Chemilumineszenz-Technik mit dem Gerät ACS:180 der Firma Bayer Health Care im Hormonlabor der Endokrinologie des Universitätsklinikums Frankfurt am Main. Der Schilddrüsenhormongehalt wurde in nmol/l umgerechnet.

Rechnung:

| | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| freies Triiodothyronin (fT3) in pg/ml | Meßwert $\times 0,651 = \text{nmol/l}$ | Umrechnungsfaktor $0,651 \mu\text{g/l} = 1 \text{ nmol/l}$ |
| freies Thyroxin (fT4) in ng/dl | Meßwert $\times 0,0777 = \text{nmol/l}$ | Umrechnungsfaktor $0,0777 \mu\text{g/dl} = 1 \text{ nmol/l}$ |
| Triiodothyronin (T3) in ng/ml | Meßwert $\times 0,651 = \text{nmol/l}$ | Umrechnungsfaktor $0,651 \mu\text{g/l} = 1 \text{ nmol/l}$ |
| Thyroxin (T4) in $\mu\text{g/dl}$ | Meßwert $\times 0,0777 = \text{nmol/l}$ | Umrechnungsfaktor $0,0777 \mu\text{g/dl} = 1 \text{ nmol/l}$ |

Schwellenwert:

| | |
|-----|----------------|
| fT3 | 0,00031 nmol/l |
| fT4 | 0,00129 nmol/l |
| T3 | 0,31 nmol/l |
| T4 | 6,44 nmol/l |

2.3.3 Dokumentation des Körper- und Augengewichts und der Augenparameter

Vor der Tötung des Tieres wurde das Körpergewicht aller Versuchstiere bestimmt.

Die Augen, die anschließend für immunzytochemische Färbungen fixiert wurden, wurden mit einer Schieblehre vermessen. Folgende Augenparameter wurden ermittelt: äquatorialer Durchmesser, axiale Länge, Durchmesser der Hornhaut und Hornhautanteil der axiale Länge (Abb. 4).

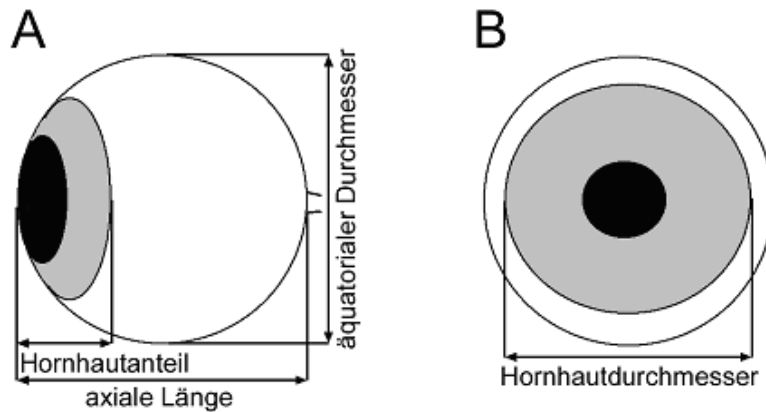


Abbildung 4 Augenvermessung
A Seitenansicht, B Frontalansicht

2.4 Molekularbiologische Techniken

Im Kern jeder Körperzelle befindet sich die genomische DNA. Sie besteht aus zwei Strängen, die sich aus dem Zuckermolekül, der Desoxyribose, und den vier Nukleinbasen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C) zusammensetzen. Die Basen der beiden Einzelstränge bilden durch Wasserstoffbrücken Paarungen aus. Da sich nur A und T sowie G und C paaren, sind die beiden Stränge komplementär zueinander. Die Stränge werden Sense und Antisense genannt. Aus der DNA werden alle Proteine des Körpers hergestellt, dabei kodieren festgelegte Bereiche, die Gene, für spezifische Proteine. Zur Herstellung der Proteine wird zunächst die DNA in eine Ribonukleinsäure (Abk. RNS, engl. RNA) transkribiert. Die RNA ist ähnlich aufgebaut wie die DNA. Ihr Zuckermolekül ist die Ribose. Sie liegt als Einzelstrang vor und hat anstelle von T die Base Uracil (U). Die transkribierte RNA enthält die genetische Information zur Herstellung eines Proteins und wird deshalb Boten-RNA (engl. messenger RNA, Abk. mRNA) genannt. Die darauf folgende Translation der mRNA erfolgt durch die Anlagerung von Transfer-RNA-Molekülen (Abk. tRNA). Die tRNA besteht aus einer kurzen RNA-Basen-Sequenz und ist kovalent an eine Aminosäure gebunden. Dabei wird jede Aminosäure durch festgelegte Basen-Sequenzen kodiert. Durch die komplementäre Bindung der tRNA an eine mRNA kommt es zu einer Aneinanderreihung der Aminosäuren. Die Aneinanderreihung der Aminosäuren führt zur Bildung eines Proteins. (Henning 1998)

In der vorliegenden Arbeit wurde die RT-PCR (reverse Transkription-PCR) zum qualitativen Nachweis von mRNA im Gewebe eingesetzt.

2.4.1 Präparation der Retina für molekularbiologische Untersuchungen

Zunächst wurde die Retina aus dem entnommenen Auge präpariert. Dabei mußte so steril wie möglich gearbeitet werden, um eine Degeneration von mRNA und Proteinen zu verhindern. Es wurde die Hornhaut des Auges abgetrennt. Anschließend konnte die Retina samt Linse und Glaskörper aus dem Augenbecher entfernt werden. Für die RT-PCR wurde die Retina separat in ein Eppendorfgefäß mit RNA-Later (Tabelle 8) gegeben. Die Aufbewahrung des Gewebes in RNA-Later verhinderte die Degeneration der mRNA. Zusätzliches Einfrieren und Aufbewahren des Gewebes bei -80°C unterstützte die Konservierung.

2.4.2 Nachweis der mRNA im Gewebe durch RT-PCR

Die PCR dient der Vermehrung (engl. amplification) eines definierten Bereichs einer DNA (PCR-Produkt). Dabei wird dieser durch zwei Oligonukleotide (Primer) begrenzt. Die Primer sind die Start- und Endpunkte der Amplifikation. Sie werden forward und reverse Primer genannt und binden an den Sense- und Antisense-Strang der cDNA (Henning 1998).

Für die PCR wurde die Retina von Pax8-Mäusen im Alter von P21 verwendet.

2.4.2.1 Isolation der gesamten RNA aus dem Gewebe

Die mRNA spezifischer Proteine wurde mit einer RT-PCR nachgewiesen. Zuerst mußte die gesamte RNA aus dem Gewebe isoliert werden. Dazu wurde das RNA-Later entfernt und durch 600 µl pro Retina des RLT Puffers aus dem RNeasy Mini Kit (Tabelle 8) ersetzt. In diesem Puffer wurde das Gewebe mit einem elektrischem Rotor homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat für 3 Minuten bei 13,2 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 600 µl 70% Ethanol geklärt. Dieses Gemisch wurde durch einen Filter für 15 Sekunden bei 10,0 rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde dabei verworfen. Um die DNA zu verdauen wurden zunächst 350 µl des RW1 Waschpuffers des Kits auf den Filter pipettiert und bei 10,0 rpm für 15 Sekunden abzentrifugiert. Anschließend wurden 10 µl DNase, zum Abbau der DNA, aus dem RNase freien DNase Set (Tabelle 8) mit 70 µl des enthaltenen RDD Puffers gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf den Filter gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden nochmals 350 µl des RW1 Waschpuffers auf den Filter pipettiert und bei 10,0 rpm für 15 Sekunden abzentrifugiert. Nun wurde der Filter zweimal mit je 500 µl RPE Puffer des RNeasy Mini Kits gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die Flüssigkeit bei 10,0 rpm für 15 Sekunden beim ersten Mal und für 2 Minuten beim zweiten Mal herunterzentrifugiert und verworfen. Nun konnte die gewonnen mRNA in autoklaviertem Aqua bidest. eluiert werden. Dazu wurden in zwei Schritten je 30 µl des Wassers auf den Filter gegeben und bei 10,0 rpm für 1 Minute

zentrifugiert. Die herunterzentrifugierte Flüssigkeit enthielt die isolierte mRNA und wurde in einem Eppendorfgefäß aufgefangen. Die RNA-Konzentration (ng/µl) wurde mit einem Nanodrop-Computerprogramm-System ermittelt.

2.4.2.2 Reverse Transkriptase Reaktion

Die gewonnene mRNA wurde durch reverse Transkriptase (RT) in ein komplementäres DNA-Molekül, eine sogenannte cDNA, umgewandelt. (Henning 1998) Für die reverse Transkriptase Reaktion wurden je nach mRNA-Gehalt zwischen 100 ng und 500 ng mRNA pro Reaktion eingesetzt. Die mRNA wurde mit 1 µl Oligo-[dt]-Primern aus dem Reverse Transkription System (Tabelle 8) für 5 Minuten bei 70°C erhitzt. Die Oligo-[dt]-Primer waren kurze Fragmente unbestimmter Basenfolge. Sie lagerten sich an die mRNA an und synthetisierten ihren komplementären DNA-Strang. Nach dem Abkühlen der Probe auf 4°C wurde diese mit 4 µl Reaktionspuffer, 4 µl MgCl₂, 1 µl dNTP, 0,5 µl RNase Inhibitor, 1 µl reverse Transkriptase aus dem System und einer entsprechenden Menge an autoklaviertem Aqua bidest. versetzt, so daß das Gesamtvolumen 20 µl ergab. Das folgende PCR-Programm wurde zur Synthese der cDNA verwendet: 25°C für 5 Minuten, 42°C für eine Stunde und abschließend 70°C für 15 Minuten. Anschließend wurde die Probe auf 4°C abgekühlt. Die fertige cDNA konnte zum Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen verwendet werden.

2.4.2.3 RT-PCR zum Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen

Da die mRNA nun als cDNA vorlag, konnten in einer RT-PCR durch ausgewählte Primer spezifische mRNA Moleküle der Retina amplifiziert und somit nachgewiesen werden. Folgende mRNAs sollten nachgewiesen werden: S-Zapfenopsin, M-Zapfenopsin, Stäbchenopsin, Schilddrüsenhormonrezeptor β 2 (TRβ2), Deiodenase 2 und 3 (Deio 2, 3). Die Sequenz der Primer wurde mit Hilfe von Gendatenbanken und Primerdesignprogrammen erstellt und anschließend wurden die Primer bei der Firma MWG bestellt. Für jede PCR wurden die Komponenten des Taq DNA Polymerase Kits verwendet (Tabelle 8). Es wurden 2 µl 10x Reaktionspuffer, 2 µl MgCl₂, 1 µl dNTPs, 1 µl des forward und reverse Primer eines Paares (Tabelle 2), 0,2 µl Taq-Polymerase, eine hitzestabile DNA-Polymerase, 1 µl cDNA als Ausgangsmaterial zur Synthese der spezifischen mRNA-Fragmente und 11,8 µl autoklaviertes Aqua bidest. gemischt, so daß das Gesamtvolumen 20 µl betrug. Dann folgte die RT-PCR mit 30 Zyklen von je drei Schritten. Im ersten Schritt wurde die Probe bei 94°C für 30 Sekunden denaturiert, dabei trennten sich die zwei DNA-Stränge voneinander. Anschließend mußten die Primer an die DNA binden (annealing). Die Annealingtemperatur ist primerspezifisch und lag zwischen 54°C und 58°C (Tabelle 2). Die Amplifikation wurde bei 72°C durchgeführt. Dies war die optimale Arbeitstemperatur der eingesetzten Taq-Polymerase. Nach allen Zyklen erfolgte eine abschließende Erhitzung auf 72°C für 5

Material und Methoden

Minuten, um zu gewährleisten, daß nur vollständig amplifizierte DNA-Fragmente vorlagen. Die Zusammensetzung der Reaktionslösung konnte hinsichtlich einzelner Parameter variieren, um ein optimales Ergebnis zu erzielen. Das entstandene Produkt entsprach dem amplifizierten Bereich. Es wurde im Verhältnis 5 zu 1 mit einem 6x Ladepuffer (Tabelle 8) gemischt und auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden wie unter 2.2 durch eine Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend die Banden in einem Ethidiumbromidbad angefärbt. Mittels UV-Lampe konnten die Banden sichtbar gemacht und fotografiert werden.

| Gen | Primersequenz | Länge und Position | Referenz | AT |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|------------------|--------|
| S | Sense: 5'-GTGGGCACCAAGTATCGAAG-3' Antisense: 5'-GAGACAGAAGGATCCCACCA-3' | 630bp- 820bp | NM_007538 | 56°C |
| M | Sense: 5'-CATCTTCCCCTCAGCATCA-3' Antisense: 5'-GCAGTAGCAAAGCATGCAAA-3' | 712bp- 906bp | NM_008106 | 58°C |
| Rho | Sense: 5'-ACATGTTCTGCTCATCGTG-3' Antisense: 5'-GCTTGCAGACCACCACGTA-3' | 206bp- 502bp | NM_145383 | 55°C |
| TRβ2 | Sense: 5'-ACAGTCCGGCTCTCAGTGGT-3' Antisense: 5'-TGCATTTCTTAAAGCGACATTCC-3' | 95bp- 547bp | OTTMUSG 23243 | 56,5°C |
| Deio2 | Sense: 5'-CAAGTCCACTCGCGGAGA-3' Antisense: 5'-TGAACCAAAGTTGACCACCA-3' | 285bp- 535bp | NM_010050 | 58,5°C |
| Deio3 | Sense: 5'-ATCCTCGACTACGCACAAGG-3' Antisense: 5'-GGGCTTCTCGATGTAGATG-3' | 450bp- 603bp | NM_172119 | 54,5°C |

Tabelle 2 Primersequenzen für RT-PCR

AT Annealing-Temperatur, S S-Opisin, M M-Opisin, Rho Stäbchenopsin, TRβ2
Schilddrüsenhormonrezeptor β2, Deio2 & 3 Deiodinase 2 & 3

2.5 Methoden zur histologischen Untersuchung und In-situ-Hybridisierung der Retina

Mit den histologischen Untersuchungen und der In-situ-Hybridisierung der Retina können mRNAs und Proteine qualitativ nachgewiesen werden. Insbesondere geben diese Methoden einen Hinweis auf die genaue Lage dieser Moleküle im Gewebe.

Material und Methoden

Für die In-situ-Hybridisierung wurden Pax8-Mäuse im Alter von PWo 3 verwendet. Die immunzytochemischen Färbungen wurden an Retinae von Mäusen verschiedenen Alters der Stämme Pax8, C57BL/6J und Sv129 durchgeführt.

2.5.1 Fixierung

Für immunzytochemische oder histologische Färbungen und In-situ-Hybridisierungen wurden die Augen zuvor fixiert. Dazu wurde zunächst das Auge in 0,1 M Phosphatpuffer (PB) (Lsg. 5, Tabelle 7) überführt und anschließend die Hornhaut entfernt. Zur Entfernung der Hornhaut wurde diese mit einer spitzen Skalpellklinge punktiert und davon ausgehend mit einer feinen Schere parallel zum Hornhautrand abgetrennt. Die Linse wurde entnommen. Dann wurde der Augenbecher mit der innen anliegenden Retina in 4% Paraformaldehyd immersionsfixiert (Lsg. 6, 7 Tabelle 7). Augen, die zur immunzytochemischen Färbung von Flachpräparaten der ganzen Retina benutzt wurden, wurden 1 Stunde fixiert. Die Augen, die zu Färbungen von Kryostat-Vertikalschnitten benutzt wurden, wurden 2 Stunden fixiert. Die In-situ-Hybridisierung erfolgte an Gewebe, welches mindestens 2 Stunden fixiert wurde. Zur histologischen Färbung an Semidünnschnitten verwendetes Gewebe wurde für 4 Stunden in einer Mischung aus 4% Paraformaldehyd und 2,5% Glutaraldehyd fixiert (Tabelle 8). Nach der jeweiligen Fixierung wurde das Gewebe in PB überführt.

2.5.2 Anfertigung und Färbung von transversalen Semidünnschnitten

Die im Paraformaldehyd-Glutaraldehyd-Gemisch fixierten Augen wurden für histologische Untersuchungen an Semidünnschnitten verwendet. Die Augen stammten von Tieren des Stammes Pax8 im Alter von PWo 1, PWo 2 und PWo 3. Aus definierten Regionen des Augenbechers dieser Mäuse wurden Gewebestücke entnommen und in 0,1 M Cacodylatpuffer (Lsg. 8, Tabelle 7) für 3 x 10 Minuten gewaschen. Anschließend wurden sie für 90 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln in einem Gemisch aus Cacodylatpuffer, 1,5% Kaliumhexacyanoferrat und 2% Osmiumtetroxid inkubiert. Zur Entfernung des überschüssigen Osmiumtetroxids aus dem Gewebe wurde es für 3 x 10 Minuten in Cacodylatpuffer gewaschen. Nun wurde das Gewebe in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Dazu wurde es zunächst für jeweils 15 Minuten in 30% und 50% Ethanol gegeben. Dann wurde es für 1 Stunde in 70% Ethanol mit 0,5% Uranylacetat inkubiert und anschließend für jeweils 15 Minuten in 90% und 100% Ethanol dehydriert. Die Entwässerung in 100% Ethanol wurde wiederholt. Der nächste Schritt war die Inkubation in Propylenoxid für 2 x 5 Minuten. Es folgte eine Inkubation des Gewebes in einem 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und Epon (Lsg. 9, Tabelle 7) für 30 Minuten und anschließend in reinem Epon

Material und Methoden

über Nacht, d.h. für mindestens 12 Stunden. Zur Dehydrierung und Inkubation in Epon wurden die Gewebstücke freischwimmend in einem Schnappdeckelglaschen aufbewahrt. Das Gewebe für die Anfertigung von transversalen Schnitten (im Folgenden Vertikalschnitte genannt) wurde mit dem Epon in eine vorgeformte Kammer gegeben und kam zum Auspolymerisieren des Epons für mindestens 48 Stunden bei 65°C in einen Wärmeschrank. Die Eponblöcke wurden in den Objektkopf eines Ultramikrotoms eingespannt und mit einem Diamantmesser geschnitten. Die 0,5 µm oder 1 µm dicken Semidünnschnitte wurden mit einer Drahtöse aus dem befüllten Wasserbehälter des Diamantmessers gefischt und auf Objektträger gegeben. Die Schnitte wurden bei einer Temperatur zwischen 70°C und 80°C angetrocknet. Anschließend konnten die Schnitte mit 0,1% - 1% Toluidinblaulösung (Lsg. 10, Tabelle 7) für 15 Sekunden bis 3 Minuten bei 80°C angefärbt werden. Die Konzentration der Lösung und die Dauer der Färbung wurden je nach der gewünschten Intensität der Färbung gewählt. Nach der Färbung wurden die Präparate mit Permount eingedeckelt.

Aus denselben Eponblöcken wurden Ultradünnschnitte angefertigt, die mit einem Elektronenmikroskop (Zeiss EM 10 CR) betrachtet und photographiert (Gatan Bio Scan Kamera) wurden. Es wurden Photos von der Zapfensynapse erstellt.

2.5.3 Herstellung von Vertikalgefrierschnitten am Kryostaten

Für immunzytochemische Färbungen mit verschiedenen Antikörpern wurden Vertikalgefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden aus den Augenbechern von Pax8-Mäusen im Alter von PWo 1, PWo 2 und PWo 3 hergestellt. Zum Gefrierschutz wurden die zuvor fixierten Augenbecher in eine Saccharose-Lösung (Lsg. 11, Tabelle 7) gegeben. Zunächst wurden die Augenbecher in eine 10% und dann in eine 20% Saccharose-Lösung gegeben, bis sie jeweils auf den Boden des Gefäßes abgesunken waren, anschließend wurden sie für mindestens zwei Stunden bis zwölf Stunden (über Nacht) in 30% Saccharose eingelegt. Danach wurde das verwendete Auge zur Anfertigung von Gefrierschnitten für ein paar Minuten in dem Einbettmedium Tissue tec (Tissue freezing medium) (Tabelle 8) inkubiert. Die Einbettung des Gewebes erfolgte in einem mit Tissue tec gefüllten Zylinder aus Tesafilm. Als Unterlage des Zylinders diente ein Stück Kork. Um orientierte Schnitte anfertigen zu können, wurde das Auge mit der Öffnung des Augenbechers, welche sich an der Stelle der entfernten Hornhaut befand, immer nach links gerichtet und die dorso-ventrale Achse des Augenbechers horizontal ausgerichtet. Das Gewebe im präparierten Zylinder wurde in 2-Methyl-Butan, welches zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlt wurde, eingefroren und bis zum Schneiden bei -80°C in Alufolie gelagert.

Die weiteren Schritte wurden im Kryostaten durchgeführt, der eine Kammertemperatur von -25°C hatte. Die Objekttemperatur des Objektkopfes betrug -45°C. Auf den Objektkopf wurde ein 90° Prisma mit eingespannter Objektplatte gebracht, auf die nun Tissue tec gefroren

Material und Methoden

wurde. Die Oberfläche des Einbettmittels wurde mit einem mit Parafilm ummantelten Glasplättchen flach gedrückt. Die Korkplatte mit dem gefrorenen Zylinder wurde nach Entfernen des Tesafilms auf das gefrorene, flache Tissue tec gedrückt, so daß die Korkplatte anfror. Nach Zurechtschneiden (Trimmen) des Zylinders konnte das Gewebe bei einer Objekttemperatur von -17°C und einer Kammertemperatur von nun -21°C geschnitten werden. Die $20\ \mu\text{m}$ dicken Schnitte wurden auf Superfrost-Objektträger aufgenommen und im Gefrierschrank bei einer Temperatur von -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die retinalen Vertikalgefrierschnitte aller drei Pax8-Genotypen gleichen Alters wurden auf demselben Objektträger aufgenommen, um sie später den exakt gleichen Färbebedingungen aussetzen und sie so besser miteinander vergleichen zu können.

2.5.4 Präparation der Retina zur Anfertigung von Flachpräparaten

Das linke und das rechte Auge wurden bei der Entnahme gekennzeichnet. Die dorsale und ventrale Region des Auges konnten an Hand des unterhalb des Sehnervaustrittspunktes horizontal verlaufenden Blutgefäßes auf der Sklera bestimmt werden. Zur Markierung der Augenorientierung wurde am dorsalen Rand des Augenbechers mit einer Schere ein radialer Einschnitt durch Sklera und Retina gemacht. Nach Abtrennung des Ziliarkörpers mit einer Pinzette konnte die Retina herauspräpariert werden. Dazu wurde sie mit einer Pinzette, beginnend an der dorsalen senkrechten Schnittstelle, hinterfahren. Die Backen der Pinzette fixierten dabei die Sklera und das Pigmentepithel. Mit einer zweiten Pinzette konnte nun vorsichtig der komplette Augenbecher umgestülpt werden, so daß die Retina sich vom Pigmentepithel löste. Zum Schluß mußte der Sehnerv mit einer Pinzette durchtrennt werden, um die Retina vollständig vom Augenbecher zu separieren. Die isolierte Retina wurde anschließend in PB im Kühlschrank aufbewahrt.

2.5.5 In-situ-Hybridisierung

Eine künstlich erzeugte Sonde wurde synthetisiert, um an eine spezifische mRNA, die im Gewebe vorlag, zu binden/hybridisieren. Durch diese In-situ-Hybridisierung konnte die vorliegende mRNA sichtbar gemacht werden. Für die In-situ-Hybridisierung wurden Pax8-Mäuse im Alter von P21 verwendet.

2.5.5.1 Herstellung der Sonden

Die Sonde war eine künstlich erzeugte doppelsträngige Abfolge von Basenpaaren (DNA). Der Antisense-Strang der Sonde war komplementär zur natürlich synthetisierten mRNA im Gewebe. Es wurden Sonden zum Nachweis von S-Opsin und M-Opsin hergestellt. Zur Herstellung der Sonde wurde ein durch Primer festgelegter Bereich einer cDNA amplifiziert

Material und Methoden

(siehe 2.4.2.3 RT-PCR). Zwei Dinge mußten bei der Herstellung einer Sonde berücksichtigt werden: der forward Primer mußte an den Antisense-Strang der cDNA binden und mit einem kurzen Fragment einer festgelegten Basenfolge (T7-Polymerase) (Tabelle 3) versehen werden. Dieses war wichtig, damit der amplifizierte Antisense-Strang der Sonde, der komplementär zur natürlich synthetisierten mRNA im Gewebe war, bei der folgenden In-vitro-Transkription markiert werden konnte. Bei der In-vitro-Transkription wurde jede vierte Uracilbase durch eine Digoxigenin-markierte Base ersetzt. Das Digoxigenin konnte in der späteren Posthybridisierung von einem Antikörper, der mit einem Enzym gekoppelt war (Anti-Digoxigenin-AP, Tabelle 8), erkannt werden. Das Enzym katalysierte dann die anschließende Farbreaktion. Für die In-vitro-Transkription wurden 1-2 µl der amplifizierten cDNA mit 2 µl dNTPs, 2 µl Transkriptionspuffer, 1 µl RNase Inhibitor, 2 µl RNA Polymerase T7 des Dig Labelling Kit (Tabelle 8) und 11-12 µl autoklaviertes Aqua bidest. gemischt, so daß das Endvolumen 20 µl betrug. Durch das T7-Polymerase-Fragment am forward Primer konnte diese Reaktion durch die RNA Polymerase T7 erfolgen. Das Gemisch wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8 gestoppt. Die so Digoxigenin-markierte Sonde wurde mit 78 µl autoklaviertem Aqua bidest. nach Aufreinigung (Quick Spin Columns, Tabelle 8) bei -20°C aufbewahrt.

| Gen | Primersequenz | Sonde | Referenz |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|
| S-Opsin | Sense: 5'-GTGGGCACCAAGTATCGAAG-3' Antisense: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG AAGCAGTAGATGATGGGGTTG-3' | 630bp- 973bp | NM_007538 |
| M-Opsin | Sense: 5'-TGCTGACCTAGCAGAGACCA-3' Antisense: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG AAGACCATCACCACCACCAT-3' | 319bp- 852bp | NM_008106 |
| T7-Polymerase | 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' | | |

Tabelle 3 In-situ-Hybridisierungssonden

2.5.5.2 In-situ-Hybridisierung

Die In-situ-Hybridisierung erfolgte an fixiertem Gewebe. Dazu wurden präparierte ganze Retinae verwendet.

Alle folgenden Schritte mußten RNase-frei sein. Nachdem das Fixativ ausgewaschen war, wurde das Gewebe für 10 Minuten in TEA (Lsg. 12, Tabelle 7, Tabelle 9) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler bei 100 rpm inkubiert. Anschließend wurde es für 15 Minuten in TEA versetzt mit AA gegeben (Lsg. 13, Tabelle 7, Tabelle 9). Nach zweimaligem Spülen in 0,01 M PBS (Lsg. 14, Tabelle 7) und 10-minütigem waschen in 5x SSC (Lsg. 15, Tabelle 7, Tabelle 9) erfolgte die Prähybridisierung. Dazu wurde das Gewebe in der Prähybridisierungslösung (Lsg. 16, Tabelle 7, Tabelle 9) für 2 Stunden bei 65°C und 300 rpm

Material und Methoden

inkubiert. Anschließend konnte die Hybridisierung erfolgen. Zunächst wurde die Sonde bei 95°C für 3 Minuten denaturiert und dann auf Eis schockgefroren. Durch die Denaturierung wurde die doppelsträngige Sonde in ihre zwei Einzelstränge aufgetrennt. Der komplementäre Antisense-Strang konnte dann an die mRNA hybridisieren. Die denaturierte Sonde konnte in den Hybridisierungspuffer (Lsg. 17, Tabelle 7, Tabelle 9) gegeben werden. Die Hybridisierung der ganzen Retina erfolgte bei 65°C und 300 rpm über Nacht.

Am folgenden Tag wurde das Gewebe posthybridisiert. Nun mußte nicht mehr RNase-frei gearbeitet werden. Zunächst wurde das Gewebe gründlich mit 2x SSC- und 0,1x SSC-Puffer (Lsg. 18,19, 20, Tabelle 7) durch mehrere Wechsel gewaschen. Alle Waschschriffe erfolgten bei 65°C und 300 rpm. Anschließend folgte die Färbereaktion. Dazu wurde das Gewebe zunächst für 5 Minuten bei Raumtemperatur und 100 rpm in Puffer 1 (Lsg. 21, Tabelle 7) gegeben. Alle weiteren Schritte erfolgten ebenfalls bei Raumtemperatur und 100 rpm. Das Gewebe wurde für 1 Stunde in die Präinkubationslösung (Lsg. 22, 23, Tabelle 7) gegeben und anschließend mit dem Antikörper, dem Fab-Fragment (Tabelle 4), das gegen das Dioxiginin gerichtet war, für 2 Stunden inkubiert (Lsg. 24, Tabelle 7). Der Antikörper war außerdem mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt. Nach der Inkubation des Antikörpers wurde das Gewebe für 6 x 10 Minuten in High-Salt-Tris Puffer (Lsg. 25, Tabelle 7) gewaschen. Nach Einwirken des Gewebes in Puffer 2-Gemisch (Lsg. 26, 27, 28, Tabelle 7) für 30 Minuten konnte die Farbreaktion im Dunkeln gestartet werden. Dazu wurde das Gewebe mit dem Farbreaktionsgemisch (Lsg. 29, Tabelle 7) versetzt. Die Farbreaktion wurde durch die Phosphatase katalysiert. Dabei wurden die Substrate NBT (Tabelle 8) und BCIP (Tabelle 8) verwendet. Es kam zu einer Färbung der mRNA im Gewebe. Die Farbreaktion dauerte je nach Färbeintensität 2-48 Stunden. Sie wurde mittels visueller Kontrolle durch Entfernen des Gemisches gestoppt. Das Gewebe wurde in einer aufsteigenden Reihe mit Glycerinlösung (Lsg. 30, Tabelle 7) inkubiert und als Flachpräparat eingedeckelt. Dazu wurde die Retina mit der Photorezeptorseite nach oben flach auf einem Objektträger ausgebreitet und mit 70% Glycerinlösung eingedeckelt.

2.5.6 Immunzytochemische Färbungen der Retina

Die immunzytochemische Färbetechnik dient der Markierung und Sichtbarmachung von Proteinen im Gewebe durch Antikörper. Die Antikörper binden an spezifische Antigene (Proteine). Polyklonale Antikörper, am häufigsten in Kaninchen (engl. rabbit, Abk. rb) durch Immunisierung mit dem Antigen hergestellt, werden von verschiedenen Immunzellen gebildet und interagieren mit unterschiedlichen Epitopen eines Antigens. Monoklonale Antikörper, meist durch Immunisierung von Mäusen (engl. mouse, Abk. ms) hergestellt, stammen hingegen aus denselben Immunzellen und binden nur an ein Epitop des Antigens. Zur immunzytochemischen Färbung der Retina wurde die indirekte Immunfluoreszenz-Methode

verwendet. Dabei wird das Antigen im Gewebe durch einen Primärantikörper markiert. Der Primärantikörper wird in einem zweiten Schritt durch einen Sekundärantikörper gebunden, der mit einem Fluorochrom gekoppelt ist. Das Fluorochrom kann durch Licht einer bestimmten Wellenlänge zum Leuchten angeregt werden. Die zur Anregung und Betrachtung der Fluoreszenz nötigen Wellenlängen werden durch entsprechende Filter am Mikroskop eingestellt (Boenisch 2003).

2.5.6.1 Immunzytochemische Färbungen von vertikalen Gefrierschnitten

Die Kryostatvertikalschnitte konnten nach dem Schneiden mit Antikörpern gegen verschiedene Proteine immunzytochemisch angefärbt werden. Dazu wurden die Schnitte aufgetaut und mit einem Fettstift (Pap-Pen) umrandet, um das Abfließen der aufgetragenen Flüssigkeiten zu verhindern. Anschließend wurde das Einbettmedium mit PB zweimal für jeweils 10 Minuten ausgewaschen. Um die Schnitte nicht trocken fallen zu lassen, wurden die Inkubationen in Feuchtkammern durchgeführt.

Als erstes erfolgte die Präinkubation. Durch die Detergentien und Salze im Präinkubationsmedium (Lsg. 31, Tabelle 7) wurden unspezifische Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Bindungen und elektrostatische Wechselwirkungen unterdrückt. Die Schnitte wurden für 1 Stunde präinkubiert. Nach dem Abnehmen des Präinkubationsmediums wurde die Primärantikörperlösung über Nacht auf die Schnitte gegeben. Die Antikörperlösung bestand aus dem Primärantikörpermedium (Lsg. 32, Tabelle 7) und dem jeweiligen Primärantikörper (Tabelle 4).

Zur Markierung des S-Zapfenopsins wurde der Antikörper sc-14363 verwendet, der gegen das N-terminale Ende des S-Opsins gerichtet ist (Santa Cruz). Das M-Zapfenopsin wurde mit dem Antikörper JH 492 markiert, der gegen eine C-terminale Peptidsequenz des M-Opsins gerichtet ist (Wang et al. 1992). Zur Überprüfung der Spezifität der S-Zapfenantikörper diente eine Doppelfärbung mit sc-14363 und dem Primärantikörper JH 455, der gegen eine Peptidsequenz des C-terminalen Endes des S-Opsins gerichtet ist (Chiu & Nathans 1994). Die Doppelfärbungen mit den verschiedenen S-Zapfenantikörpern zeigten, daß sc-14363 und JH 455 dieselbe Struktur färbten.

Zum qualitativen Vergleich der retinalen Entwicklung bei den drei Genotypen des Pax8-Stammes wurden unterschiedliche Zelltypen mit entsprechenden Antikörpern markiert. Der Antikörper gegen Glykogenphosphorylase (Glypho) färbte alle Zapfen an (Pfeiffer-Guglielmi et al. 2003). Außerdem wurde zur Markierung der Zapfen Peanut-Agglutinin (PNA) verwendet (Blanks & Johnson 1984), das mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war und zusammen mit dem Zweitantikörper für eine Stunde auf das Gewebe gegeben wurde. Zur Markierung aller Stäbchen wurde der Antikörper rho4D2 verwendet, der gegen das Stäbchenopsin gerichtet war (Hicks & Molday 1986). Die Stäbchenbipolarzellen wurden mit einem Antikörper gegen die Proteinkinase C (PKC) markiert (Sigma-Aldrich). Zwei Typen der

Material und Methoden

OFF-Zapfenbipolarzellen konnten mit einem Antikörper gegen den Neurokinin-Rezeptor 3 (NK3-R) angefärbt werden (Ding et al. 1996). Ein Calbindin-Antikörper färbte die Horizontalzellen sowie bestimmte Typen von Amakrinzellen und Ganglienzellen an. Ein Calretinin-Antikörper färbte weitere Amakrin- und Ganglienzell-Typen an. Die cholinergen Amakrinzellen konnten durch einen ChAT-Antikörper markiert werden. Die dopaminergen Amakrinzellen wurden mit einem Tyrosinhydroxylase-Antikörper und die Typ-II-Amakrinzellen mit dem disabled-Antikörper (DAB 1) (Lee et al. 2004) angefärbt. Auch die Neurotransmitter GABA (Sigma-Aldrich) und Glyzin wurden mit entsprechenden Antikörpern angefärbt. Zur Färbung der Müller-Gliazellen wurde ein Glutaminsynthetase-Antikörper verwendet. Mit DAPI, welches die DNA anfärbte, wurden die Kerne aller Retinazellen visualisiert. Die Spezifität der Antikörper Calbindin, Calretinin, ChAT, Glutaminsynthetase, Glyzin und Thyrosinhydroxylase wurde durch Haverkamp und Wässle 2000 beschrieben.

Die verwendeten Antikörper-Verdünnungen sind in Tabelle 4 angegeben. Nach der Inkubation mit den jeweiligen Primärantikörpern wurden die Schnitte 3 x 10 Minuten in PB gewaschen. Nach dem Waschen der Schnitte erfolgte die einstündige Inkubation des Gewebes mit dem im Sekundärantikörpermedium verdünnten Sekundärantikörper (Lsg. 32, Tabelle 7; verwendete Verdünnungen siehe Tabelle 5). Der Sekundärantikörper wurde passend zum jeweiligen Primärantikörper gewählt. War der Primärantikörper zum Beispiel im Kaninchen erzeugt worden, wurde ein Esel-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper verwendet. Zur Visualisierung der Antikörpermarkierung wurde die indirekte Immunfluoreszenz verwendet, bei der ein Fluoreszenzfarbstoff an den Sekundärantikörper gebunden war. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Sekundärantikörper (Tabelle 5) mußte nach der Verdünnung im Medium und vor dem Aufbringen auf das Gewebe für 6 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert werden. Dabei wurden mögliche Proteinklumpen des Antikörpers herunterzentrifugiert, um Hintergrund in den Präparaten zu vermeiden. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Schnitte wieder 3 x 10 Minuten in PB gewaschen. Die Inkubation mit fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern und die folgenden Waschschrte erfolgten im Dunkeln. Danach konnten die Schnitte mit Aqua Poly Mount eingedeckelt werden.

2.5.6.2 Immunzytochemische Färbungen der ganzen Retina

Für die Vorbehandlung zur immunzytochemischen Färbung wurde die isolierte ganze Retina (whole-mount) zunächst gefrier-geschützt. Dafür wurde sie nacheinander in eine 10% und 20% Saccharose-Lösung gegeben, bis sie jeweils auf den Boden des Gefäßes abgesunken war. Dann wurde die Retina in 30% Saccharose-Lösung für 2-12 Stunden (über Nacht) inkubiert. Um das Gewebe zugänglicher für die Antikörper zu machen, wurden durch mehrfaches Einfrieren und Auftauen die Zellmembranen sanft aufgebrochen (cracking). Dazu wurde die Retina samt Saccharose-Lösung auf einen Objektträger gegeben. Dieser

Material und Methoden

wurde über einen zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlten Messingblock gehalten, bis die Retina durchgefroren war. Die Retina wurde anschließend wieder aufgetaut. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt. Nach dem Cracking wurde die Retina für ca. 15 Minuten in PB gewaschen.

Bei der immunzytochemischen Färbung der ganzen Retina wurde nach demselben Schema vorgegangen wie bei der Färbung der Vertikalgefrierschnitte. Die Retina wurde freischwimmend inkubiert. Zunächst erfolgte die Präinkubation für 1 Stunde. Nach Abziehen der Präinkubationslösung wurde die Retina in Primärantikörperlösung inkubiert. Für die Färbung der ganzen Retina wurden die Primärantikörper sc-14363 und JH 492 einzeln oder für Doppelfärbungen zusammen auf das Gewebe gegeben (Verdünnungen siehe Tabelle 4). Das Gewebe wurde einen Tag in der jeweiligen Primärantikörperlösung inkubiert. Bei einer Doppelfärbung müssen die Antikörper aus verschiedenen Spezies stammen, um die verschiedenen primärantikörpermarkierten Strukturen durch unterschiedliche, speziesspezifische Sekundärantikörper sichtbar machen zu können. Die für Doppelfärbungen verwendeten Sekundärantikörper wurden überprüft und zeigten keine Kreuzreaktivität mit der jeweils anderen Spezies. Nach der Inkubation des Primärantikörpers wurde für 2 Stunden in PB gewaschen und dann für eine Stunde im Sekundärantikörper inkubiert (Verdünnungen siehe Tabelle 5). Die Antikörpermarkierung wurde wieder mit der indirekten Immunfluoreszenz visualisiert. Die fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper wurden zuvor für 6 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Nach einem anschließenden zweistündigen Waschschrift in PB wurde die Retina mit der Photorezeptorseite nach oben flach auf einem Objektträger ausgebreitet und mit Aqua Poly Mount eingedeckelt. Diese Flachpräparate wurden zur Dichtebestimmung der Zapfentypen verwendet. Sie wurden von Retinae der Stämme Pax8, C57BL/6J und Sv129 im Alter von PWo 3 und im adulten Alter (adult = ab PWo12 - PWo 24) angefertigt.

| Bezeichnung des Antikörpers | Art | erzeugt in | verwendete Konzentration | Quelle & Nachweis |
|-----------------------------|------------|------------|--------------------------|------------------------------------|
| Fab Fragment | | | 1:2500 | Roche Diagnostics GmbH |
| Calbindin | polyklonal | rb | 1:2000 | Swant (Haverkamp & Wässle 2000) |
| Calretinin | polyklonal | rb | 1:2000 | Swant (Haverkamp & Wässle 2000) |
| ChAT | polyklonal | rb | 1:50 | Chemicon (Haverkamp & Wässle 2000) |
| DAB 1 | polyklonal | rb | 1:500 | B. Howell (Lee et al. 2004) |
| GABA | polyklonal | rb | 1:2000 | Sigma-Aldrich |

Material und Methoden

| | | | | |
|---------------------------------|------------|----|---------|---------------------------------------------------------------|
| Glutaminsynthetase | monoklonal | ms | 1:500 | Transduction (Haverkamp & Wässle 2000) |
| Glykogen phosphorylase (Glypho) | polyklonal | gp | 1:1000 | B. Hamprecht, Tübingen (Pfeiffer-Guglielmi et al. 2003) |
| Glykogen phosphorylase (Glypho) | polyklonal | rb | 1:1000 | B. Hamprecht Tübingen (Pfeiffer-Guglielmi et al. 2003) |
| Glyzin | polyklonal | rt | 1:1000 | D. Pow (Haverkamp & Wässle 2000) |
| JH 455 | polyklonal | rb | 1:5000 | J. Nathans, Baltimore (Chiu & Nathans 1994) |
| JH 492 | polyklonal | rb | 1:2000 | J. Nathans, Baltimore (Wang et al. 1992) |
| NK3-R | polyklonal | rb | 1:1000 | R. Shigemoto (Ding et al. 1996) |
| Proteinkinase C (PKC) | polyklonal | rb | 1:10000 | Sigma-Aldrich |
| rho4D2 | monoklonal | ms | 1:50 | R.S. Molday, Vancouver (Hicks & Molday 1986) |
| sc-14363 | polyklonal | gt | 1:500 | Santa Cruz |
| Tyrosinhydroxylase (TH) | monoklonal | ms | 1:1000 | Dianova (Haverkamp & Wässle 2000) |

Tabelle 4 Primärantikörper

| Antikörper | Absorption | Emission | verwendete Konzentration | Hersteller |
|----------------------|------------|----------|--------------------------|---------------------------------------------|
| PNA Alexa 594 | 550 nm | 570 nm | 1:200 | Molecular Probes (Blanks & Johnson 1984) |
| d anti gp Alexa 488 | 495nm | 519 nm | 1:500 | Molecular Probes |
| d anti gt Alexa 488 | 495nm | 519 nm | 1:500 | Molecular Probes |
| d anti ms Alexa 488 | 495nm | 519 nm | 1:500 | Molecular Probes |
| d anti rb Alexa 488 | 495nm | 519 nm | 1:500 | Molecular Probes |
| gt anti rt Alexa 488 | 495nm | 519 nm | 1:500 | Molecular Probes |
| d anti gt Cy5 | 649 nm | 670 nm | 1:250 | Dianova |

Material und Methoden

| | | | | |
|---------------|--------|--------|-------|---------|
| d anti rb Cy5 | 649 nm | 670 nm | 1:250 | Dianova |
|---------------|--------|--------|-------|---------|

Tabelle 5 Sekundärantikörper

Spezies:

d = Esel, gp = Meerschweinchen, gt = Ziege, ms = Maus, rb = Kaninchen, rt = Ratte

An die Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe:

Cy5 = rote Fluoreszenz, 488 = grüne Fluoreszenz.

2.6 Manipulationen des Schilddrüsenhormonhaushalts

Um die spezifische Rolle des Schilddrüsenhormons bei den beobachteten Photorezeptorveränderungen zu belegen, wurden einerseits Pax8^{-/-} Mäuse durch Substitution des Hormons euthyreot und andererseits wildtypische Mäuse durch pharmakologische Blockierung des Hormons hypothyreot gemacht.

Alle Tierversuche wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes, sowie mit Genehmigung und unter Kontrolle des Veterinärdezernats des zuständigen Regierungspräsidiums Darmstadt durchgeführt.

Alle Versuchsansätze sind in Tabelle 6 veranschaulicht.

| Genotyp | Art des Eingriffs | Versuchsnummer | P0 | PWo6 | PWo12 | PWo18 | PWo24 | |
|---------------------|--------------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------|------|-------|-------|-------|---|
| Pax8 ^{-/-} | Thyroxin-Substitution | V1 | [Bar chart showing euthyrotic treatment from P0 to PWo12] | | | | | * |
| Pax8 ^{-/-} | Thyroxin-Substitution | V2 | [Bar chart showing euthyrotic treatment from P0 to PWo6] | | | | | * |
| Pax8 ^{-/-} | Thyroxin-Substitution | V3 | [Bar chart showing hypothyrotic treatment from PWo12 to PWo18] | | | | | * |
| C57BL/6J | Künstliche Hypothyreose durch MMI + NaClO ₄ | V4 | [Bar chart showing hypothyrotic treatment from PWo12 to PWo24] | | | | | * |

Tabelle 6 Versuchsansätze

2.6.1 Manipulation des Schilddrüsenhormonhaushalts von Pax8^{-/-}

Um Pax8^{-/-} Mäuse euthyreot zu machen, wurde einzelnen Tieren täglich subkutan 18 ng L-Thyroxin/g Körpergewicht (Lsg. 33, 34, Tabelle 7) injiziert. L-Thyroxin ist ein chemisch hergestelltes Thyroxin (im folgenden Thyroxin). Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde täglich ermittelt. Nach Versuchsende wurde die Konzentration des Schilddrüsenhormons im Serum bestimmt und die Retina zur Dichtebestimmung der Zapfentypen anhand der

Material und Methoden

Opsinexpression (siehe 2.5.6.2) verwendet. Als Kontrolle dienten heterozygote und wildtypische Wurfgeschwister gleichen Alters. Um Effekte durch die physikalische Injektion selbst auszuschließen, wurden die Kontrolltiere mit derselben Konzentration einer 0,9% Natriumchloridlösung (NaCl-Lösung) injiziert. Des Weiteren wurden zum Vergleich unbehandelte Mutanten gleichen Alters untersucht.

2.6.1.1 Thyroxinsubstitution während der Entwicklung

Um die Frage zu klären, ob eine Thyroxinsubstitution während der Entwicklung einen euthyreoten Zustand in der Pax8-Mutante erzeugen konnte und welche Auswirkung diese Änderung des Schilddrüsenhormonhaushalts auf die Expression der Zapfentypen hat, wurden verschiedene Gruppen zu unterschiedlichen Entwicklungsphasen mit Thyroxin behandelt. Die Pax8^{-/-} Tiere wurden nach der Genotypisierung vom postnatalen Tag 2 (P2) bis P_{Wo} 12 mit Thyroxin behandelt und anschließend getötet. Diese mit Thyroxin behandelten Pax8^{-/-} wurden im Weiteren als Versuchsgruppe 1 (V1) bezeichnet. Bis zur Mitte der vierten postnatalen Woche (P_{Wo} 4) waren alle Geschwister eines Wurfes bei den Elterntieren. Nach dem Abstillen wurde der Nachwuchs nach seinem Geschlecht getrennt und in separaten Käfigen gehalten. Dabei kam es vor, daß V1 mit unbehandelten Pax8^{-/-} und Kontrolltieren zusammengehalten wurden. Der euthyreote Zustand der V1 wurde durch den Schilddrüsenhormongehalt im Serum bestimmt.

Außerdem sollte überprüft werden, ob die Zapfenopsinexpression während der gesamten Entwicklung plastisch war und durch die Veränderung des Schilddrüsenhormonhaushalts beeinflusst werden konnte. Dazu wurden Pax8^{-/-} Wurfgeschwister der wie oben mit Thyroxin behandelten Pax8^{-/-} Tiere nur von P2 bis P_{Wo} 4 mit Thyroxin behandelt und blieben danach acht Wochen unbehandelt (Versuchsgruppe V2). Auch V2 wurde nach der 12. postnatalen Woche (P_{Wo} 12) getötet. Der hypothyreote Zustand von V2 wurde ebenfalls durch die Messung des Schilddrüsenhormongehalts im Serum überprüft.

2.6.1.2 Thyroxinsubstitution adulter Pax8^{-/-}

Mit der Thyroxininjektion adulter Pax8^{-/-} Mäuse sollte geprüft werden, ob eine Veränderung des Schilddrüsenhormonhaushalts auch bei adulten Tieren eine Auswirkung auf die Zapfenopsinexpression hat, diese somit lebenslang plastisch ist. Pax8^{-/-} Tieren wurde ab dem adulten Alter von P_{Wo} 12 für 6 Wochen mit Thyroxin wie oben beschrieben injiziert (V3). Die Tötung erfolgte nach der 18. postnatalen Woche (P_{Wo} 18). Der euthyreote Zustand von V3 wurde durch Bestimmung des Schilddrüsenhormongehalts im Serum ermittelt.

2.6.2 Erzeugung einer Hypothyreose in wildtypischen Mäusen

Wildtypische Mäuse des Stammes C57BL/6J und Pax8 wurden verwendet, um sie hypothyreot zu machen. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn adult (PWo 12). Nach Beendigung des Versuches wurden die Augen zur Dichtebestimmung der Zapfentypen anhand der Opsinexpression (siehe 2.5.6.2) entnommen und der hypothyreote Zustand durch Bestimmung des Schilddrüsenhormongehalts im Serum ermittelt.

2.6.2.1 Entfernung der Schilddrüse

Das Entfernen der Schilddrüse bei adulten wildtypischen Pax8-Mäusen (Pax8^{+/+}) konnte zu einem hypothyreoten Zustand führen, da das Schilddrüsenhormon nur in der Schilddrüse produziert werden konnte. Zur Entfernung der Schilddrüse wurde das Tier mit 10 µl/g Körpergewicht eines Ketamin-Rompun-Gemisches (Lsg. 35, Tabelle 7) narkotisiert. Um ein Auskühlen des Tieres zu verhindern, wurde es während der Operation auf eine 36°C warme Wärmeplatte gelegt. Nach Fixierung der Vorderbeine seitlich des Körpers wurde das Fell am Hals und am Brustkorb mit einer Enthaarungscreme (Tabelle 8) entfernt. Die Augen des Tieres wurden durch eine Augensalbe (Tabelle 8) vor dem Austrocknen geschützt. Die Operation der Schilddrüse erfolgte unter einem binokularen Präparationsmikroskop. Zunächst wurde mit einer Schere im Halsbereich ein Hautschnitt vom Brustbein bis unter die Schnauze gesetzt. Das Bindegewebe wurde ebenfalls mit der Schere durchtrennt und die Muskeln, die sich oberhalb der Trachea befanden, vorsichtig zur Seite geschoben. Mit Hilfe eines Retraktors wurden die Muskeln fixiert, so daß ein freier Zugang zur Trachea und der sie umgebenden Schilddrüse möglich war. Die Schilddrüse wurde mit einer Mikroschere vorsichtig von der Trachea gelöst. (Zarrow et al. 1964). Dabei mußte vor allem darauf geachtet werden, umliegendes Gewebe und Nerven nicht zu beschädigen. Auftretende Blutungen beim Entfernen der Schilddrüse wurden mit einem Tupfer abgesaugt. Nach der Entfernung der Schilddrüse wurde der Retraktor entfernt und die Muskeln in ihre natürliche Position gebracht. Die Haut wurde mit resorbierbarem Nahtmaterial (Tabelle 8) vernäht. Zur Desinfektion wurde die Wunde mit einer Desinfektionslösung behandelt. Das Tier wurde bis zum Erwachen in einen sauberen Käfig auf ein Wärmekissen gelegt. Die Operation dauerte 40 Minuten. Kein Tier war länger als 2 Stunden narkotisiert. Nach Erwachen des Tieres wurde es 12 Wochen in den Quarantäneräumen der Tierhaltung gehalten. Nach 12 Wochen wurden die Tiere getötet. Als Kontrolltiere wurden nicht operierte Pax8^{+/+} Mäuse gleichen Alters verwendet.

2.6.2.2 Applikation von Methimazol

Eine Hypothyreose wurde auch in wildtypischen Mäusen des Stammes C57BL/6J erzeugt. Dazu wurden adulte Tiere für den Zeitraum von PWo 12 bis PWo 24 mit dem Thyreostatikum

Material und Methoden

Methimazol (Abk. MMI) (Tabelle 9) behandelt. Das Wasser der Versuchstiere (V4) wurde mit 0,074% MMI und 0,74% Natriumperchlorat (Tabelle 9) sowie 26% Himbeersirup (Tabelle 8) (Lsg. 36, 37, Tabelle 7) versetzt. Das Thyreostatikum verhinderte die Produktion des Schilddrüsenhormons in der Schilddrüse. Das Natriumperchlorat verhinderte die Aufnahme von Iodatomen, die zur Produktion des Hormons benötigt wurden. Der Himbeersirup wurde zugegeben, um die Bitterkeit des MMI zu überlagern und somit eine bessere Akzeptanz des Wassers zu erreichen. Als unterschiedliche Kontrollen dienten C57BL/6J Mäuse gleichen Alters, deren Wasser entweder ohne Zusatz war, nur mit 26% Himbeersirup oder mit 26% Himbeersirup und 0,74% Natriumperchlorat versetzt war. V4 und die Kontrolltiere wurden mit einer iodfreien Diät (Tabelle 8) ernährt. Im Alter von PWo 24 wurden die Tiere getötet.

2.7 Mikroskopische Analyse der Retina

Die gefärbten semidünnen Vertikalschnitte, Vertikalgefrierschnitte und Flachpräparate wurden mit einem Photomikroskop mit Epifluoreszenzeinrichtung und digitaler Kamera (Tabelle 8) analysiert.

2.7.1 Qualitative und quantitative Analyse

Die Eponvertikalschnitte und in-situ-hybridisierten Flachpräparate konnten bei Durchlicht betrachtet und photographiert werden. Die Eponvertikalschnitte wurden mit einem x63 Objektiv und die in-situ-hybridisierten Flachpräparate bei einer Vergrößerung von x20 fach photographiert.

Die fluoreszenzgefärbten Vertikalgefrierschnitte und ganzen Retinae wurden unter Epifluoreszenz analysiert und photographiert. Die verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit den passenden Filtersätzen betrachtet. Die Schnitte wurden mit einem x20 Objektiv photographiert. Dabei wurden zur Analyse möglichst zentrale Bereiche der Retina gewählt. Die Flachpräparate der Retina wurden zunächst mit einem x2,5 Objektiv photographiert, so daß vier zusammengesetzte Bilder ein Bild der gesamten Fläche der Retina darstellten. Die Retinafläche wurde an diesen Photomontagen mit dem Programm ImageJ bestimmt.

Zur Bestimmung der Zelldichten der zwei Zapfentypen wurden in einzel- oder doppelt-opsingefärbten Retinae definierte Positionen mit einem x40 Objektiv photographiert. Diese Positionen befanden sich in der dorsalen und ventralen Region der Retina und entsprachen dem Bereich, der jeweils 50% und 75% auf der Strecke zwischen Sehnervaustrittspunkt und Retinarand lag (siehe Abb. 30). Die Photos wurden am Computer im Bildbearbeitungsprogramm AxioVision auf Helligkeit und Kontrast optimiert und die Zapfendichten von Hand ausgezählt. Die einzelnen Zählfelder hatten eine Größe von

Material und Methoden

100 µm x 100 µm. Die Meßfeldzählungen wurden in Dichten (Zapfentyp/mm²) umgerechnet. Anhand der Doppelfärbungen konnte die Gesamtzapfendichte ermittelt werden. Mit den Dichtewerten wurden Excel-Graphiken erstellt, die in CorelDraw bearbeitet wurden.

2.8 Lösungen

| | | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Lysierungspuffer | 500 µl 5 M NaCl 250 µl 1 M Tris HCl 24,5 ml Aqua bidest., Lsg. autoklavieren |
| 2 | dNTPs | 5 µl 100 mM dATP 5 µl 100 mM dCTP 5 µl 100 mM dTTP 5 µl 100 mM dGTP auf 100 µl Aqua bidest. |
| 3 | 1,5% Agarosegel | 75 g Agarose auf 50 ml 0,5x TBE-Puffer |
| 4 | 10x TBE-Puffer | 108 g TrisBase 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA pH 8 auf 1 l Aqua bidest., Lsg. autoklavieren |
| 5 | 0,1 M Phosphat-Puffer pH 7,4 (PB) | 2,622 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, 21,708 g Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O auf 1 l Aqua bidest. |
| 6 | Paraformaldehyd (PFA) | 4% PFA in 0,1 M PB pH 7,4 |
| 7 | 4% ige PFA-Lösung DT (50 ml) DT = 0,1% DEPC (Diethylpyrocarbonat) | 2 g Paraformaldehyd (Rnase-frei) durch erwärmen (65°C) und 3 Tropfen 5 M NaOH in 0,01 M PBS DT lösen. Danach mit HCl zurücktitrieren. (für In-situ- Hybridisierung) |
| 8 | Cacodylatpuffer pH 7,4 | Dimethylarsinsäure Natriumsalz 2,14 g auf 50 ml Aqua bidest. mit 1 N HCl pH 7,4 Endvolumen 100 ml |
| 9 | Epon | Stammlösung A: 75,7 g Epon 812, 100 g Härter DDSA Stammlösung B: 122,2 g Epon 812, 108,5 g Härter MNA mischen A:B = 1,7 :1 Epon 812= Epoxy Embedding Medium DDSA= 2- Dodecemylsuccinic anhydride MNA= Methylnadidic anhydride |
| 10 | 1% Toluidinblau | 1% Borax-Lösung (1 g Borax in 100 ml Aqua bidest.), 1 g Toluidinblau in 100 ml 1% Borax-Lösung |
| 11 | 30% Saccharoselösung | 30 g Saccharose auf 100 ml PB |
| 12 | TEA DT (50 ml) pH 8,0 pH mit NaOH korrigieren | 0,1 M Triethanol-hydrochlorid 0,9485 g Aqua DT |
| 13 | TEA/AAD DT (50 ml) pH ~8,0 pH nicht korrigieren | 0,1 M Triethanol-hydrochlorid 0,9485 g 0,25% Acetic-Anhydrid 125 µl Aqua DT |

Material und Methoden

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 14 | 0,01 M PBSDT (1000 ml) | Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O 21,76 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O 2,76 g KCl 2,0 g NaCl 87,6 g AquaDT |
| 15 | 5 x SSCDT (500 ml) | 125 ml 20x SSC 375 ml Aqua bidest. |
| 16 | Prehybridisierungslösung | 10 x SSCDT 500 µl 99% Formamide 500 µl 50 x Denhardt's solution 50 µl salmon testis DNA 10 µl Yeast tRNA 10 µl 0,1 M EDTA 50 µl 10% CHAPS 5 µl Tween 20 1 µl |
| 17 | Hybridisierungslösung | Prehybridisierungslösung + 50 ng/µl Sonde (Die Sonden-Lösung wird zuvor 3 min bei 95°C denaturiert und dann in einem Eisbad schockgefroren) |
| 18 | 20 x SSCDT (1000 ml) pH 7,5 | 3,0 M NaCl 175,32 g 0,3 M NaCitrat 88,23 g Aqua bidest. |
| 19 | 2 x SSCDT (50 ml) | 20 x SSCDT 5 ml Aqua bidest. 45 ml |
| 20 | 0,1 x SSCDT (50 ml) | 5 x SSCDT 1 ml Aqua bidest. 49 ml |
| 21 | Puffer 1 (1 l) pH 7,5 | 0,1 M Tris-HCl 15,76 g 0,15 M NaCl 8,766 g Aqua bidest. |
| 22 | Blocking-Medium (40 ml) | 1% BSA 0,4 g 0,5% Boehringer blocking Medium 0,2 g in Puffer 1 unter Erwärmen (56°C) lösen sterilfiltrieren (0,2 µm Filter), Lagerung 4°C |
| 23 | Präinkubationslösung (2 ml) | Blocking-Medium 999 µl 0,05% Tween 20 1 µl |
| 24 | Inkubationslösung | Fab-Fragment 1:2500 mit Präinkubationslösung verdünnen. Fab-Fragment zuerst 1:100 vorverdünnen, 6 min bei 13,2 rpm zentrifugieren und dann vom Überstand 40 µl zu den 1 ml Präinkubationslösung zugeben, die sich bereits im Tube befinden |
| 25 | High-Salt-Tris-Puffer (1 l) pH 7,5 | 0,1 M Tris-HCl 15,76 g 0,4 M NaCl 23,38 g |
| 26 | Puffer 2 (1 l) pH 9,5 | 0,1 M Tris-HCl 15,76 g 0,1 M NaCl 5,844 g Aqua bidest. |
| 27 | 2,5 M Magnesiumchlorid-Stammlösung (50 ml) | MgCl ₂ x 6 H ₂ O 25,42 g Aqua bidest. |
| 28 | Puffer 2 + 0,05 M MgCl ₂ + 1 mM Levamisol (1 l) | 2,5 M MgCl ₂ -Lösung 20 µl 1 M Levamisol 1 µl Puffer 2 779 µl |

Material und Methoden

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 29 | Colour Reaction Mix (1 ml) | NBT 5 µl BCIP 3,76 µl 1 M Levamisol 1 µl 2,5 M MgCl ₂ -Lösung 20 µl Puffer 2 970,24 µl |
| 30 | 30% Glycerin-Lösung (1 ml) | Glycerin 300 µl Aqua bidest. 700 µl |
| 31 | Präinkubationsmedium | 10% NDS, 0,5% Triton-x-100, 1% BSA in 0,1 M PB pH 7,4 |
| 32 | Primär- und Sekundäntikörpermedium | 3% NGS, 0,5% Triton-x-100, 1% BSA, 0,05% NaN ₃ in PB pH 7,4 |
| 33 | Thyroxinlösung | 1mg Thyroxin in 1 ml 0,1 N NaOH |
| 34 | Thyroxininjektion | 1800 µl 0,9% NaCl 182 µl 0,1 N NaOH 18 µl Thyroxinlösung Injektion: 2 µl/g Körpergewicht = 18 ng Thyroxin/g Körpergewicht |
| 35 | Ketamin-Rompun-Gemisch | 100 ng/g Körpergewicht einer 10% Ketaminlösung + 4 ng/g Körpergewicht einer 2% Rompunlösung |
| 36 | 1% Natriumperchlorat- 0,1% Methimazol-Lösung | 1 g Natriumperchlorat 0,1 g Methimazol auf 100 ml Aqua |
| 37 | 0,74% Natriumperchlorat- 0,074% Methimazol- 26% Himbeersirup-Lösung | 74 ml Lösung 36 + 26 ml Himbeersirup |

Tabelle 7 Lösungen
Lsg. =Lösung

2.9 Geräte und sonstige Hilfsmittel

| Geräte und sonstige Hilfsmittel | Bezugsfirma |
|---------------------------------------------------|------------------------|
| Adobe Photoshop 5.0 | Adobe |
| Anti-Digoxigenin-AP 11093274910 (Fab-Fragment) | Roche Diagnostics GmbH |
| Aqua Poly Mount | Polysciences. Inc |
| Augensalbe Bepanthen 602909.00.00 | Bayer |
| Axioplan 2 Photomikroskop | Zeiss |
| Axiovision 4.2 | Zeiss |
| BCIP (5-Brom-4-chloro-3-indolyl-phosphat) 1383221 | Roche Diagnostics GmbH |
| Binokular OPMI 1-F | Zeiss |
| Blocking Medium 1096176 | Roche Diagnostics GmbH |
| CorelDRAW 12 | Corel |
| Desinfektionslösung Octeniderm | Schülke & Mayr |
| DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) 11175025910 | Roche Diagnostics GmbH |

Material und Methoden

| Geräte und sonstige Hilfsmittel | Bezugsfirma |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| DNase Set RNase frei | Qiagen |
| Einfriermedium für Kryostat: Tissue Freezing Medium (Tissue tec) | Jung |
| Enthaarungscreme 3215774013300 | Veet |
| Excel | Microsoft |
| Glutaraldehyd 94195/121003201 | Fluka |
| Himbeersirup | Tritop |
| ImageJ | Freeware, http://rsb.info.nih.gov/ij/ |
| ImProm-IITM Reverse Transcription System | Promega |
| Iodarme Diät EF R/M Jod-arm 10 mm pellets E 15550-24, entsprechendes Kontrollfutter (= mit Iod) | Ssniff |
| Kryostat CM 30505 | Leica |
| Ladepuffer 6 x für PCR-Probe | Fermentes |
| Mausfutter R/M-H Extrudat V 1536 | Ssniff |
| Nahtmaterial Vicryl V493H | Ethicon |
| NBT (4-Nitro-blue-tetrazolin-chloride) 11383213001 | Roche Diagnostics GmbH |
| Pap-Pen | Science Services SCI |
| PCR Maschine MJ Mini Personal Thermal Cycler | Biorad |
| Permout | FisherChemical |
| Proteinase K 03115844001 | Roche Diagnostics GmbH |
| Quick Spin Columns 11274015001 | Roche Diagnostics GmbH |
| RNA-Later | Ambion |
| RNeasy Mini Kit | Qiagen |
| Smart Ladder 22B07-2 (Laufpuffer für Agarosegel) | Eurogentec |
| Taq DNA Polymerase Kit 2012207 Qiagen | Qiagen |
| Tupfer Sugi REF 31602 | Kettenbach |

Tabelle 8 Geräte und Hilfsmittel

2.10 Chemikalien

| Chemikalien | Bezugsfirma |
|-----------------------------|-------------|
| 2-Methyl-Butan | Merck |
| AA (engl. acetic-anhydride) | Fluka |
| Aceton | Fluka |
| Agarose | Biozym |

Material und Methoden

| Chemikalien | Bezugsfirma |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| Borax (Di-Natriumtetraborat) | Merck |
| BSA (Bovines Serumalbumin) | Merck |
| Cacodylatpuffer (Dimethylarsinsäure-Natriumsalz) | Merck |
| CHAPS 10% | Sigma-Aldrich |
| D+/- Saccharose | Roth |
| DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindole-1-HCl) | Boehringer-Mannheim |
| Denhardt's solution 50 x D9905 | Sigma-Aldrich |
| DEPC (Diethylpyrocarbonat) | Sigma-Aldrich |
| EDTA 0,1 M (Ethyldiamintetraacetat) | Sigma-Aldrich |
| Eisessig | Roth |
| Epon 812 | Fluka |
| Ethanol 100% | J.T. Baker |
| Formaldehydlsg. 37% | Merck |
| Formamide 99% | Sigma-Aldrich |
| Glyzin | Roth |
| Isofluran | DeltaSelect |
| KCl (Kaliumchlorid) | Merck |
| Ketamin 10% | WDT |
| L-Thyroxin T1775 | Sigma-Aldrich |
| Methanol 100% | J.T. Baker |
| Methimazol M8506 | Sigma-Aldrich |
| MgCl ₂ (Magnesiumchlorid) | Merck |
| Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O (Di-natriumhydrogenphosphat) | Merck |
| NaCitrat | Merck |
| NaCl (Natriumchlorid) | Roth |
| NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (Natriumhydrogenphosphat) | Merck |
| NaOH (Natriumhydroxid) | Roth |
| Natriumperchlorat 410241 | Sigma-Aldrich |
| NDS (normal donkey serum) | Sigma-Aldrich |
| NGS (normal goat serum) | Sigma-Aldrich |
| Osmiumtetroxid 4% | Roth |
| Propylenoxid 1,2 | Merck |
| Rompun 2% | Bayer |
| salmon testis DNA D7656 | Sigma-Aldrich |

Material und Methoden

| Chemikalien | Bezugsfirma |
|-------------------------------|--------------------|
| TEA (Triethanol-hydrochlorid) | Sigma-Aldrich |
| Toluidinblau | Merck |
| Triton-x-100 | Sigma-Aldrich |
| Trizma Base | Sigma-Aldrich |
| Trizma HCl | Sigma-Aldrich |
| Tween 20 | Calbiochem |
| Yeast tRNA R5636 | Sigma-Aldrich |

Tabelle 9 Chemikalien

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeine Befunde bei der Pax8-Maus

Zunächst wurde eine Entwicklungsstudie mit Pax8 $-/-$ Mäusen in den ersten drei Wochen postnatal durchgeführt (1. postnatale Woche, Abk. PWo 1, entspricht Postnataltag 7, Abk. P7; 2. postnatale Woche, Abk. PWo 2, entspricht Postnataltag 14, Abk. P14; 3. postnatale Woche, Abk. PWo 3, entspricht Postnataltag 21, Abk. P21). Als Kontrolltiere wurden heterozygote (Pax8 $+/-$) und wildtypische (Pax8 $+/+$) Wurfgeschwister gleichen Alters verwendet. Für alle Untersuchungen wurden Tiere beider Geschlechter verwendet. Zur Analyse der Konzentration der Schilddrüsenhormone und des Körpergewichts wurden die Werte der jeweiligen Genotypen beider Geschlechter gemittelt. Zur Berechnung von signifikanten Unterschieden zwischen den Genotypen wurde ein Student's t-Test verwendet.

3.1.1 Konzentration der Schilddrüsenhormone im Serum

In Abbildung 5 sind die Mittelwerte der jeweils zwei Formen der beiden Schilddrüsenhormone graphisch dargestellt. Tabelle 10 gibt für die verschiedenen Zeitpunkte die Anzahl der verwendeten Tiere jedes Genotyps Pax8 $+/+$, $+/-$ und $-/-$ an.

Der Gehalt der Schilddrüsenhormone freies Triiodothyronin (fT3), freies Thyroxin (fT4), gebundenes Triiodothyronin (T3) und gebundenes Thyroxin (T4) jedes Altersstadiums ist bei Pax8 $+/+$ (weißes Dreieck) und Pax8 $+/-$ (graues Viereck) gleich (Abb. 5). Der fT3-Gehalt beider Tiere steigt von ungefähr 0,003 nmol/l bei PWo 1 auf das Doppelte in der PWo 2 an. Auf diesem Niveau von ca. 0,006 nmol/l bleibt das fT3 über den gesamten gemessenen Zeitraum. Der fT3-Gehalt von Pax8 $-/-$ (schwarzer Kreis) ist niedriger als bei den Kontrolltieren und liegt über den gesamten gemessenen Zeitraum bei einem Wert unterhalb 0,002 nmol/l.

Die Konzentration des fT4 in den Kontrolltieren steigt von ungefähr 0,04 nmol/l in Pax8 $+/+$ und 0,05 nmol/l in Pax8 $+/-$ zum Zeitpunkt PWo 1 auf 0,06 nmol/l in PWo 2 an. In PWo 2 ist der höchste fT4-Wert erreicht. Danach fällt der Gehalt auf ungefähr 0,04 nmol/l ab und bleibt ab PWo 3 bei diesem Wert. Für Pax8 $-/-$ ist der fT4-Gehalt nur für die PWo 16 und PWo 24 detektierbar. Die Konzentration liegt für die anderen Zeitpunkte unterhalb der Nachweisschwelle. Der fT4-Gehalt ist in Pax8 $-/-$ knapp über 0 nmol/l.

Die Kurvenverläufe von Pax8 $+/+$ und Pax8 $+/-$ für den Gehalt von gebundenem T3 und T4 sind gleich dem für fT4. Der T3-Gehalt liegt in PWo 1 bei 0,7 nmol/l und steigt in PWo 2 auf einen Wert von 1,2 nmol/l an. Anschließend fällt der Gehalt wieder ab und liegt ab PWo 3 zwischen 0,9 nmol/l und 1,1 nmol/l.

Ergebnisse

Der T4-Gehalt steigt von 20 nmol/l in Pax8 +/+ und 40 nmol/l in Pax8 +/- bei PWo 1 auf ca. 100-110 nmol/l bei PWo 2 an. Danach fällt der Gehalt auf einen Wert zwischen 40-60 nmol/l. Bei Pax8 +/- bleibt der T4-Gehalt auf diesem Wert in PWo 24. Bei Pax8 +/+ hingegen steigt der Gehalt in PWo 24 auf 80 nmol/l an. Für den gesamten gemessenen Zeitraum liegt T3 und T4 bei Pax8 -/- unterhalb der Nachweisschwelle, zu jedem gemessenen Zeitpunkt ist Pax8 -/- also hypothyreot.

| Woche postnatal | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Schilddrüsenhormongehalts im Serum | | |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----|------|
| | Pax8 | | |
| | +/+ | +/- | -/- |
| 1 | 4 | 1 | n.g. |
| 2 | 3 | 2 | 2 |
| 3 | 15 | 17 | 14 |
| 12 | 4 | 5 | 4 |
| 16 | 1 | 1 | 1 |
| 20 | 1 | 3 | 1 |
| 24 | 2 | 4 | 2 |

Tabelle 10 Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Schilddrüsenhormongehalts im Serum bei Pax8
n.g. = nicht gemessen

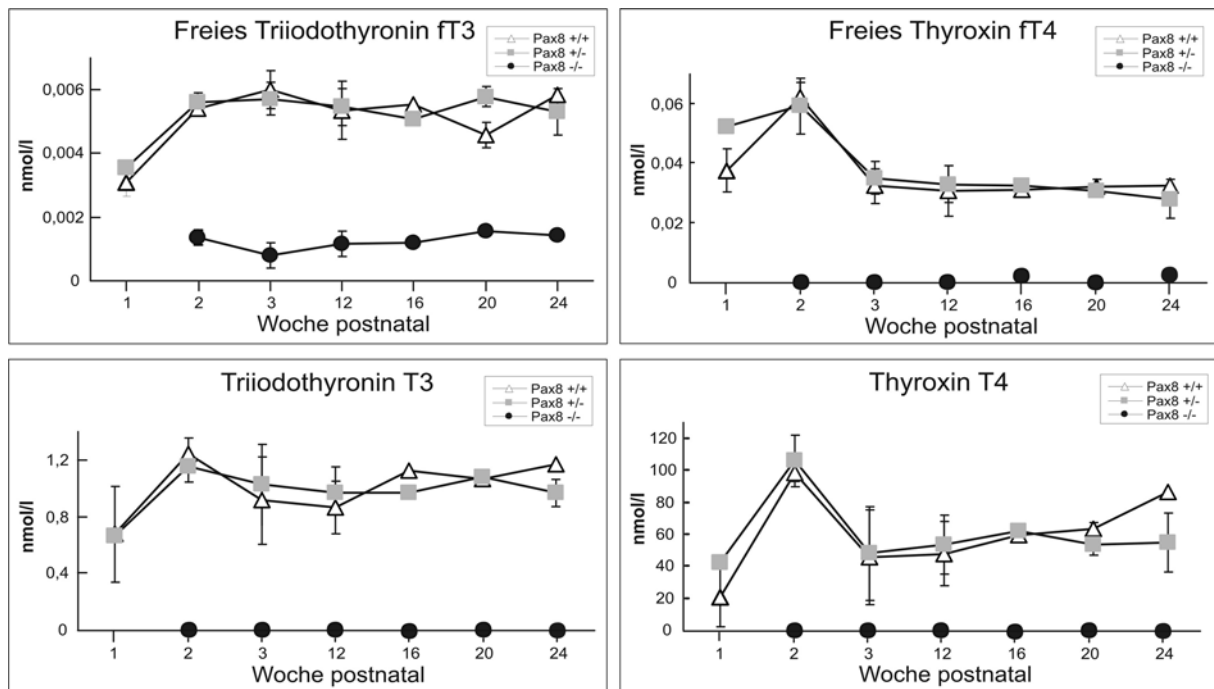


Abbildung 5 Schilddrüsenhormongehalt im Serum von Pax8

Auf der Ordinate sind die Werte des Schilddrüsenhormons aller vier Formen (ft3, ft4, T3, T4) für Pax8 +/+, +/- und -/- einzeln angegeben. Standardabweichungen sind angegeben, wo sie ermittelt werden konnten.

3.1.2 Körpergewicht

In Abbildung 6 sind die gemittelten Körpergewichte von Pax8 +/+, Pax8 +/- und Pax8 -/- Wurfgeschwistern dargestellt. In Tabelle 11 ist die Zahl der dafür verwendeten Tiere aufgeführt.

Das Körpergewicht aller drei Genotypen steigt mit dem Alter an. Die Körpergewichte von Pax8 +/+ und Pax8 +/- sind zu allen gemessenen Zeitpunkten in etwa gleich. Am P7 sind die Körpergewichte aller drei Genotypen ungefähr gleich und liegen bei etwa 5 Gramm. Danach steigen die Körpergewichte von Pax8 +/+ und Pax8 +/- gleich stark an und erreichen im Alter PWo 8 (P56) 22 bis 26 Gramm. Ab P8 ist ein Unterschied in den Körpergewichten von Pax8 -/- und den Kontrolltieren erkennbar. Das Körpergewicht von Pax8 -/- steigt schwächer an und liegt bei P56 bei etwa 10 Gramm. Zum Zeitpunkt PWo 2 und PWo 3 ist das Körpergewicht von Pax8 -/- signifikant kleiner als das der Wurfgeschwister Pax8 +/+ und Pax8 +/- . Die Signifikanz anderer Stadien wurde wegen geringer Individuenzahl nicht bestimmt.

| Tag postnatal | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Körpergewichts | | |
|---------------|----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| | Pax8 | | |
| | +/+ | +/- | -/- |
| 5 | 1 | 1 | 1 |
| 7 | 7 | 9 | 6 |
| 8 | 1 | 1 | 1 |
| 10 | 2 | 2 | 1 |
| 12 | 1 | 1 | 1 |
| 14 | 7 | 7 | 8 |
| 17 | 1 | 1 | 1 |
| 21 | 5 | 6 | 7 |
| 24 | 1 | 1 | 1 |
| 56 | 2 | 2 | 1 |

Tabelle 11 Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Körpergewichts bei Pax8

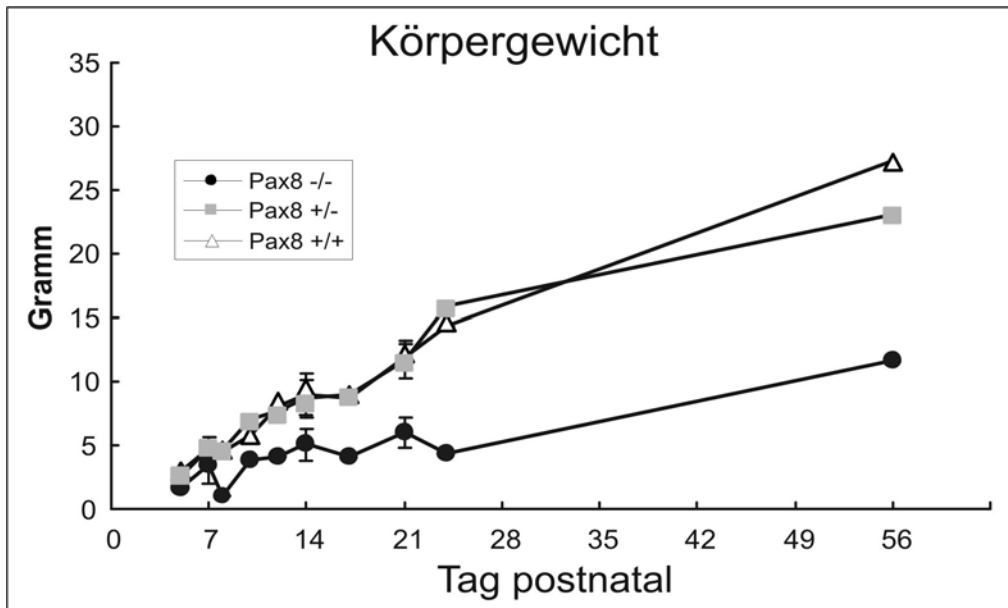


Abbildung 6 Entwicklung des Körpergewichts der Pax8-Genotypen bis Postnatalwoche 8
Standardabweichungen sind angegeben, wo sie ermittelt werden konnten.

3.2 Postnatale Entwicklung des Auges und der Retina bei Pax8^{-/-}

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde zunächst die Auswirkung der Hypothyreose der Pax8^{-/-} Mäuse auf die postnatale Entwicklung des Auges und der Retina untersucht. Für die Entwicklungsstudie wurden dieselben Altersstadien wie für die Analyse des Schilddrüsenhormongehalts und des Körpergewichts verwendet (PWo 1, PWo 2, PWo 3). Pax8^{+/-} und Pax8^{+/+} Wurfgeschwister gleichen Alters fanden als Kontrolltiere Verwendung. Auch für diese Studie wurden Tiere beider Geschlechter untersucht und die Werte von den Augenvermessungen und Zapfendichten der jeweiligen Genotypen gemittelt. Zur Berechnung von signifikanten Unterschieden zwischen den Genotypen wurde ein Student's t-Test verwendet.

3.2.1 Augenvermessungen

Der äquatoriale Durchmesser und die axiale Länge des Augapfels, der Hornhautdurchmesser (cornealer Durchmesser) und der Hornhautanteil an der axialen Länge (cornealer Anteil) wurden bei Pax8^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} in den ersten drei postnatalen Wochen gemessen und die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt. Die Anzahl der verwendeten Tiere ist in Tabelle 12 angegeben.

Die Augen aller drei Genotypen (Pax8^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-}) haben ungefähr denselben äquatorialen Durchmesser (Abb. 7). Er beträgt in PWo 1 etwa 2,3-2,4 mm und ist im Alter von PWo 3 bei allen Genotypen auf etwa 2,7 mm angewachsen.

Ergebnisse

Auch die axiale Länge des Auges ist zwischen den drei Genotypen zu keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich. In PWo 1 beträgt sie zwischen 2,25 mm (Pax8 +/+, -/-) und 2,325 mm (Pax8 +/-). In PWo 2 liegen die Werte bei 2,5 mm für Pax8 -/-, 2,55 mm für Pax8 +/- und 2,65 mm für Pax8 +/+ und in PWo 3 ist die axiale Länge weitergewachsen und beträgt ca. 2,7 mm.

Der Hornhautdurchmesser beträgt in PWo 1 bei Pax8 -/- und Pax8 +/- 1,7 mm und bei Pax8 +/+ 1,85 mm. In PWo 2 ist der Hornhautdurchmesser von Pax8 -/- mit 2,0 mm um 0,1 mm kleiner als bei Pax8 +/- und Pax8 +/+. In PWo 3 haben alle drei Genotypen denselben Hornhautdurchmesser von ungefähr 2,18 mm.

Der Hornhautanteil an der axialen Länge ist in allen drei Pax8-Genotypen zu jedem Zeitpunkt gleich. In PWo 1 liegt er bei ca. 0,8 mm und steigt in PWo 3 auf einen knappen Millimeter an. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß alle ermittelten Augenparameter sich zwischen Pax8 +/+, +/- und -/- im Zeitraum PWo 1 bis PWo 3 nicht signifikant unterscheiden.

| Woche postnatal | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der Augenparameter | | |
|-----------------|----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| | Pax8 | | |
| | +/+ | +/- | -/- |
| 1 | 2 | 3 | 2 |
| 2 | 3 | 3 | 3 |
| 3 | 5 | 5 | 5 |

Tabelle 12 Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der Augenparameter

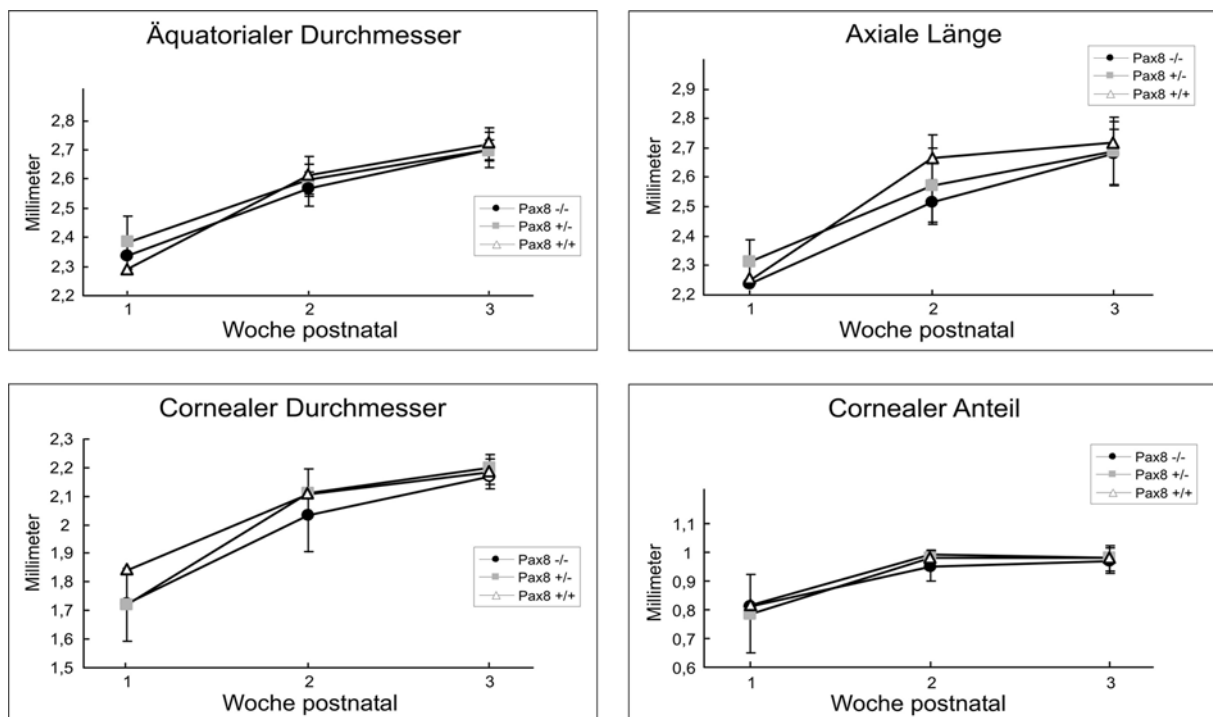


Abbildung 7 Entwicklung der Augendimensionen der Pax8-Genotypen bis Postnatalwoche 3
Standardabweichungen sind angegeben, wo sie ermittelt werden konnten.

3.2.2 Morphologie und Schichtung der Retina

Die Schichtung der Retina wurde an transversalen Semidünnschnitten, die mit Toluidinblau gefärbt waren, analysiert. Im Folgenden werden solche Transversalschnitte als Vertikalschnitte bezeichnet. In Abbildung 8 sind vertikale Schnitte von Pax8 +/+, +/- und -/- am Tag P7 gezeigt. Die Aufnahmen stammen alle aus der zentralen Retina, so daß regionale Unterschiede den Vergleich nicht beeinträchtigen. In allen drei Genotypen sind alle Schichten vorhanden und es sind keine auffälligen morphologischen Unterschiede erkennbar. Die Somata und besonders Zellkerne in der äußeren Körnerschicht (ONL), inneren Körnerschicht (INL) und Ganglienzellschicht (GCL) sind deutlich zu erkennen. Zwischen ONL, INL und GCL liegen die äußere plexiforme Schicht (OPL) und innere plexiforme Schicht (IPL), die aus den Fortsätzen der Zellen bestehen.

Die Außensegmente (OS) der Photorezeptoren aller Genotypen sind in PWo 1 noch sehr kurz. Die INL von Pax8 -/- scheint aus weniger Reihen von Zellkörpern zu bestehen und ist somit dünner als bei Pax8 +/+ und +/- . Deshalb wirkt die gesamte Retina von Pax8 -/- ein wenig dünner. Die IPL ist in allen drei Retinae sehr viel dicker als die OPL und die Ganglienzellschicht besteht aus nur einer Zellreihe.

In Abbildung 9 sind Retinaschnitte von Tieren im Alter von P14 gezeigt. Die langen Außensegmente der Photorezeptoren sind nun vollständig entwickelt und wie die langen Innensegmente (IS) in allen drei Genotypen deutlich erkennbar. Auch die Schichten und Schichtdicken sehen nun bei allen Tieren gleich aus. Die IPL hat bei allen drei Pax8-Genotypen an Dicke zugenommen.

Auch bei P21 (Abb.10) sehen die Retinae von Pax8 +/+, +/- und -/- gleich aus. Im Vergleich zu PWo 2 scheinen nur die Außensegmente an Länge zugenommen zu haben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß sich die retinale Schichtung bei allen drei Genotypen gleich entwickelt.

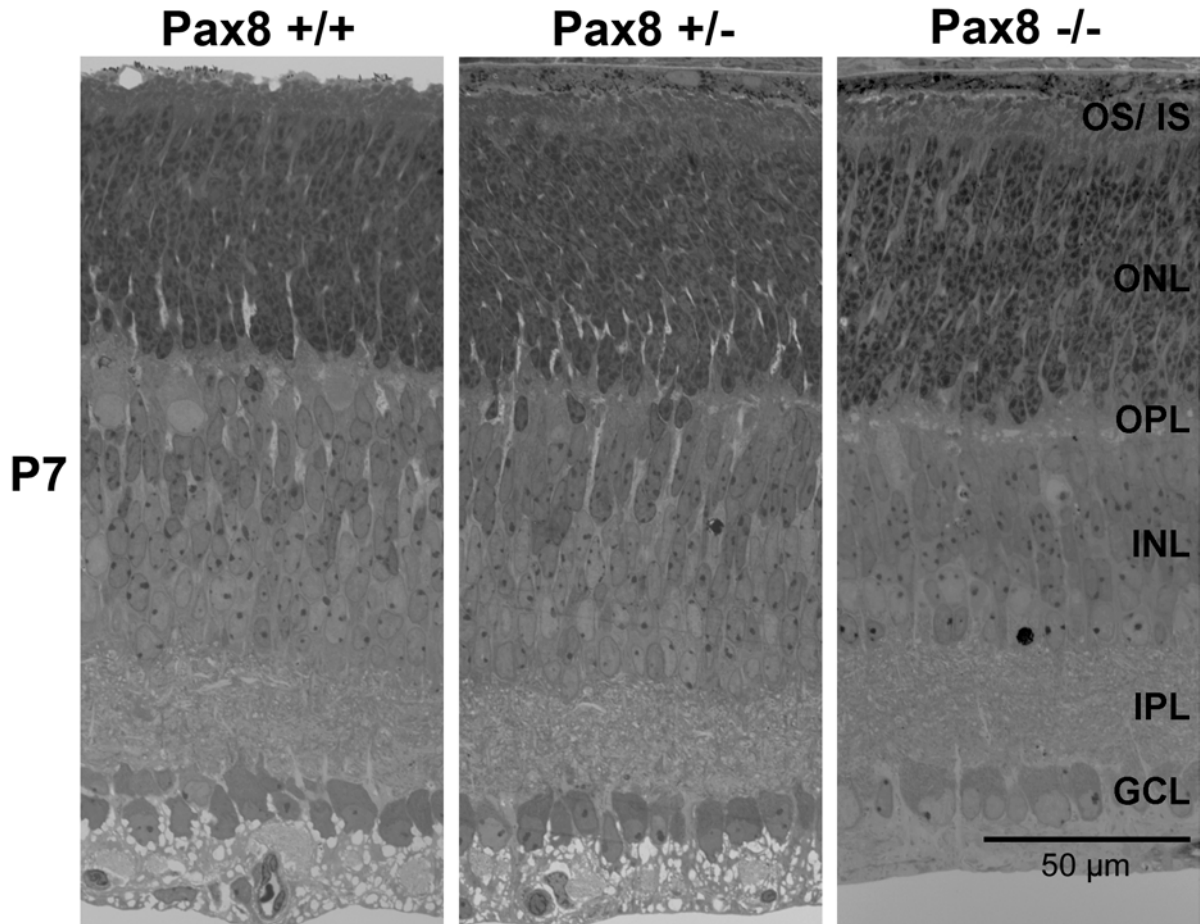


Abbildung 8 Retinaschichtung an P7

Toluidinblau gefärbte vertikale Semidünnschnitte aus den Retinae von Pax8 +/+, +/- und -/-. Die Skala gilt für alle drei Bilder. OS Außensegmente und IS Innensegmente der Photorezeptoren, ONL äußere Körnerschicht, OPL äußere plexiforme Schicht, INL innere Körnerschicht, IPL innere plexiforme Schicht, GCL Ganglienzellschicht

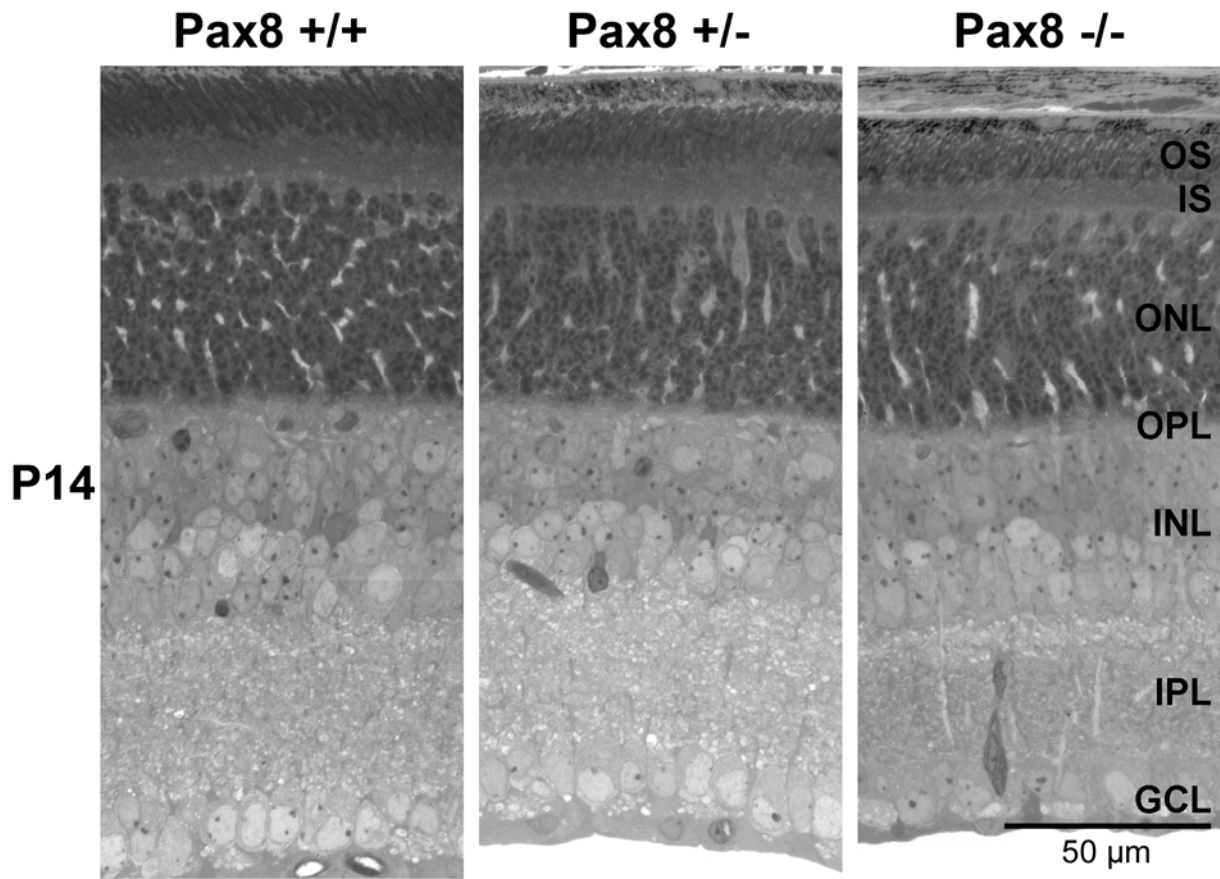


Abbildung 9 Retinaschichtung an P14
Färbung und Konventionen wie in Abb. 8.

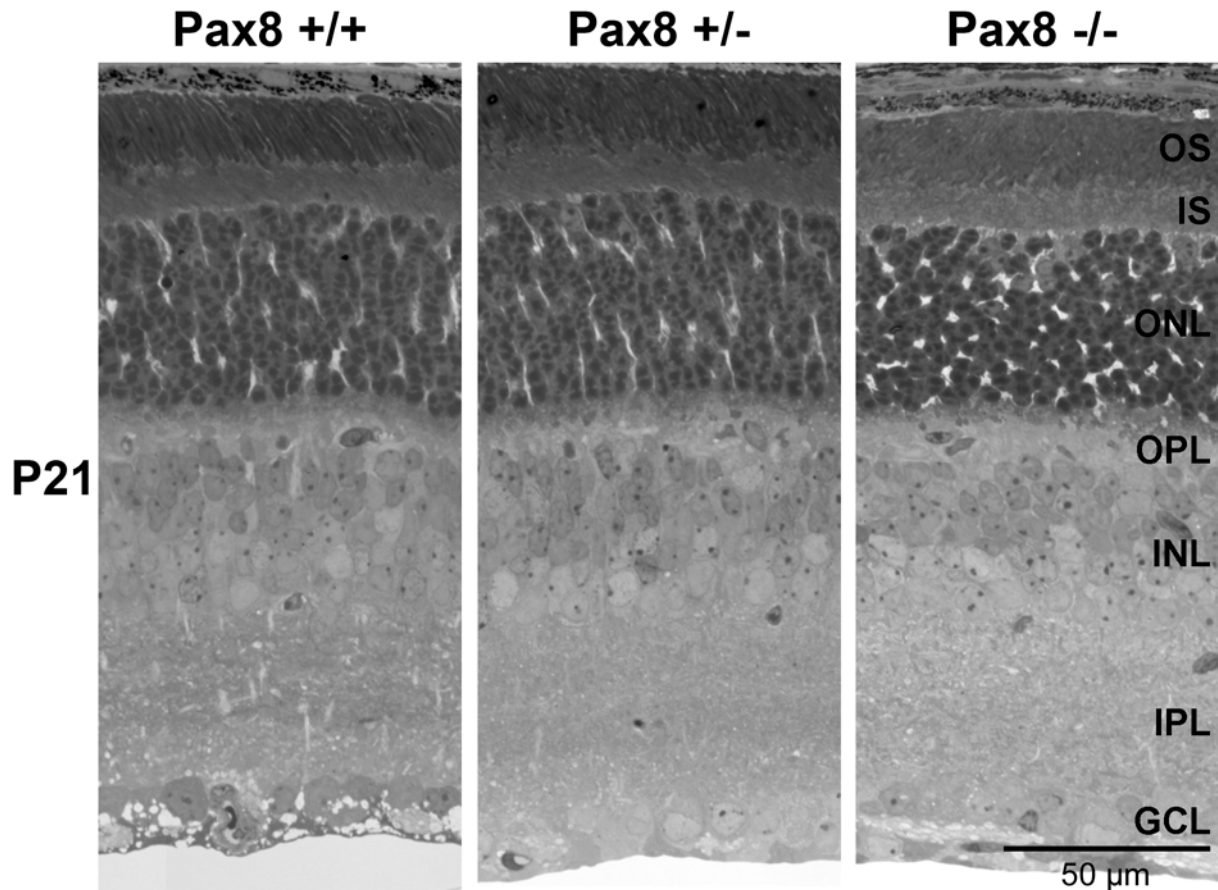


Abbildung 10 Retinaschichtung an P21
Färbung und Konventionen wie in Abb. 8.

3.2.3 Morphologie verschiedener Zelltypen in der Retina

Um zu prüfen, ob sich die grundsätzlichen Neuronentypen der Mausretina bei allen drei Genotypen gleichermaßen entwickeln, wurden vertikale Kryostatschnitte mit verschiedenen zellspezifischen Antikörpern angefärbt. Verglichen wurden die Altersstadien P7, P14 und P21.

Zunächst wurden die Somata aller Retinazellen mit DAPI angefärbt (Abb. 11). Die ONL, INL und GCL von Pax8 +/+, +/- und -/- sind in jedem verglichenem Alter in etwa gleich. Dies entspricht den oben gezeigten Befunden an vertikalen Semidünnschnitten. An P7 sind die ONL und INL sehr dick. Die GCL scheint mehrreihig zu sein, da einige Zellen unterhalb der eigentlichen GCL liegen. An P14 und P21 sind die ONL und INL schmäler als bei P7. Auch besteht die GCL aus einer Zellkörperreihe.

Mit einem Glutaminsynthetase-Antikörper wurden die Müller-Gliazellen der Retina angefärbt (Abb. 12). An P7 sind die Müllerzellen in allen drei Genotypen noch kaum entwickelt. Ab P14 sind die Müllerzellen voll entwickelt und bei P21 nicht erkennbar verändert. Zwischen den Pax8-Genotypen gibt es keine offensichtlichen Unterschiede.

Ergebnisse

Mit dem PKC-Antikörper sind in allen drei Genotypen bei P7, P14 und P21 die Stäbchenbipolarzellkörper in der INL und ihre Fortsätze in der OPL und IPL angefärbt (Abb. 13). Das Muster ist bei allen drei Genotypen vergleichbar.

Zwei Typen von OFF-Zapfenbipolarzellen sind durch den Antikörper NK3-R markiert (Abb. 14). Es sind keine Unterschiede zwischen den Pax8-Genotypen ersichtlich. An P7 sind nur wenige Zellen zu sehen, wobei die Zellkörper und Fortsätze zu erkennen sind. An P14 sind sehr viele Bipolarzellen schwach markiert und heben sich kaum vom Hintergrund ab. An P21 sind die Somata der zwei Typen von OFF-Zapfenbipolarzellen gut zu sehen. Ihre Fortsätze bilden ein dichtes Geflecht in der IPL.

Mit dem Calbindin-Antikörper werden mehrere Zelltypen markiert (Abb. 15). Zwischen Pax8 +/+, +/- und -/- gleichen Alters gibt es keine augenscheinlichen morphologischen Unterschiede. In der INL sind die Horizontalzellen und Amakrinzellen sichtbar. Auch Ganglienzellen und displazierte Amakrinzellen (Amakrinzellen mit Soma in der GCL) in der GCL sind zu erkennen. Außerdem sind zwei Bänder in der IPL zu sehen, die von den Fortsätzen der cholinergen Amakrinzellen gebildet werden.

Der Calretinin-Antikörper färbt ebenfalls Amakrinzellen, displazierte Amakrinzellen und Ganglienzellen an (Abb. 16). Ab P14 sind in der IPL drei Bänder von Zellfortsätzen zu erkennen. Zwischen den Pax8-Genotypen gibt es keinen Unterschied.

Mit dem ChAT- Antikörper werden die cholinergen Amakrinzellen angefärbt (Abb. 17). An P7 sind sie in allen drei Genotypen noch kaum erkennbar. An P14 und P21 ist deutlich eine kleine Population von Amakrinzellen zu erkennen. Die zwei charakteristischen cholinergen Bänder in der IPL entsprechen dem ersten und dritten Band in der Abb. 16.

Weitere Subtypen von Amakrinzellen wurden nur in den Retinae von drei Wochen (P21) alten Pax8-Genotypen gefärbt. Dazu gehören die dopaminergen Amakrinzellen, die mit dem TH-Antikörper gefärbt wurden (Abb. 18) und der Amakrinzell-Typ A II, der mit einem DAB 1-Antikörper gefärbt wurden (Abb. 19). Auch diese Färbungen sehen bei allen Genotypen gleich aus.

Außerdem wurden die Neurotransmitter GABA und Glyzin durch Antikörper markiert. In Abbildung 20 sind bei allen drei Genotypen die GABAergen Amakrinzellen zu sehen. Zwischen Pax8 +/+, +/- und -/- sind keine Unterschiede zu erkennen.

Alle drei Genotypen haben Amakrinzellen, die Glyzin enthalten (Abb. 21). Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte gibt es Unterschiede zwischen den Genotypen.

Neben den zuvor beschriebenen Färbungen der verschiedenen Zelltypen wurden auch die Photorezeptoren markiert. Die Stäbchen wurden mit dem rho4D2 Antikörper gefärbt (Abb. 22). Es ist zu sehen, daß an P7 in allen drei Genotypen vor allem die Somata zu sehen sind. Ab P14 sind die Außen- und Innensegmente gut entwickelt und stark gefärbt. Die Helligkeitsintensität in den Bildern der Retinae im Alter P14 und P21 wurde so gewählt, daß

Ergebnisse

die stark gefärbten Außensegmente gut zu erkennen sind. Die schwächer gefärbten Somata der Stäbchen sind deshalb nicht zu sehen.

Der Glypho-Antikörper färbt die Zapfen und auch einige Bipolarzellen an (Abb. 23). Zu jedem Zeitpunkt P7 bis P21 sieht das Muster in allen drei Pax8-Genotypen identisch aus.

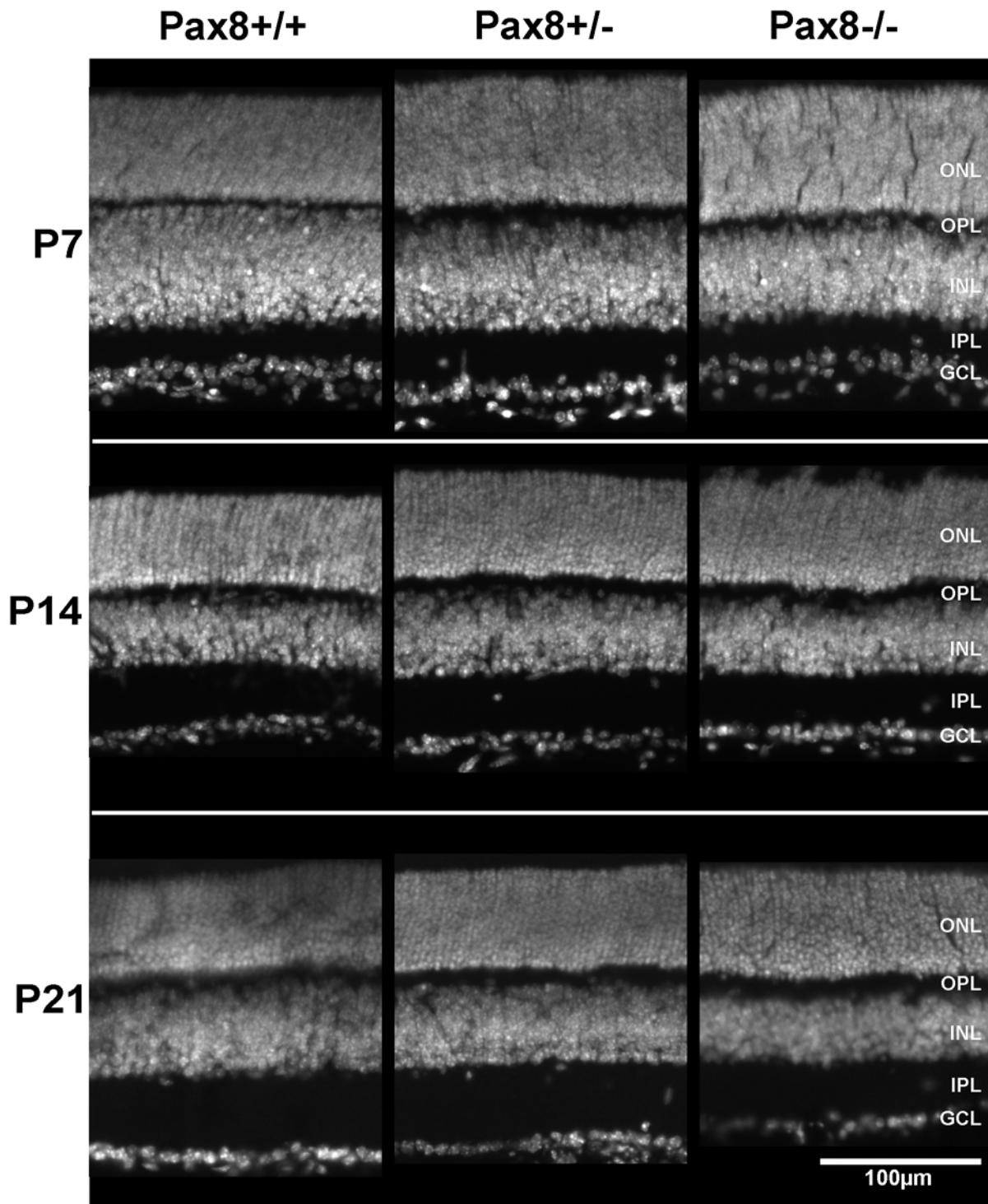


Abbildung 11 Zellkerne

Es wurden aus den Retinae von Pax8 ^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} im Alter von P7, P14 und P21 vertikale Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit DAPI angefärbt. Die Skala gilt für alle Bilder. Schichtenbeschriftung siehe Abb. 8

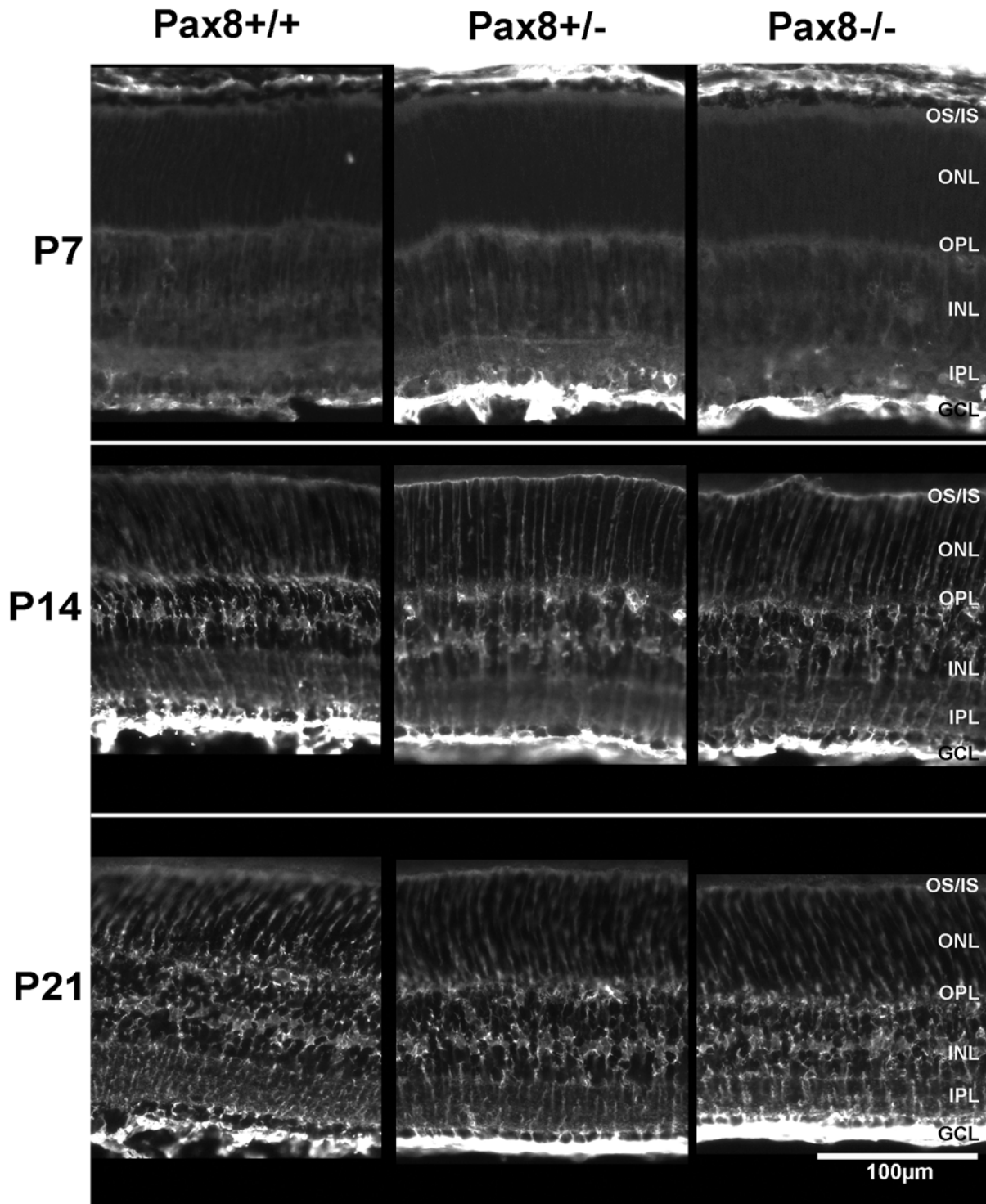


Abbildung 12 Müller-Gliazellen

Es wurden aus den Retinae von Pax8 ^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} im Alter von P7, P14 und P21 vertikale Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit dem Glutaminsynthetase-Antikörper angefärbt. Die Skala gilt für alle Bilder. Schichtenbeschriftung siehe Abb. 8

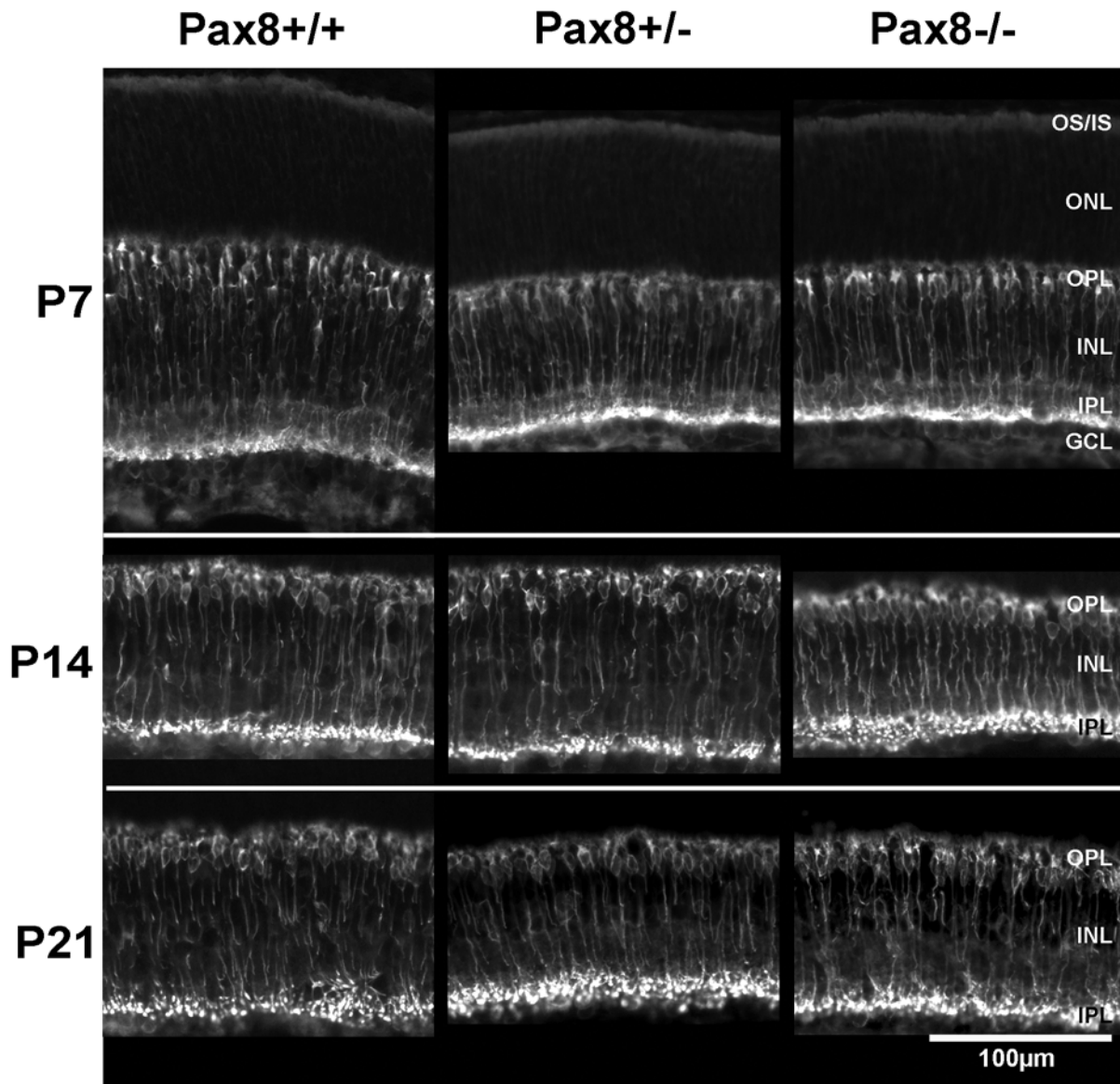


Abbildung 13 Stäbchenbipolarzellen

Es wurden aus den Retinae von Pax8 ^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} im Alter von P7, P14 und P21 vertikale Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit dem PKC-Antikörper angefärbt. Die Skala gilt für alle Bilder. Schichtenbeschriftung siehe Abb. 8

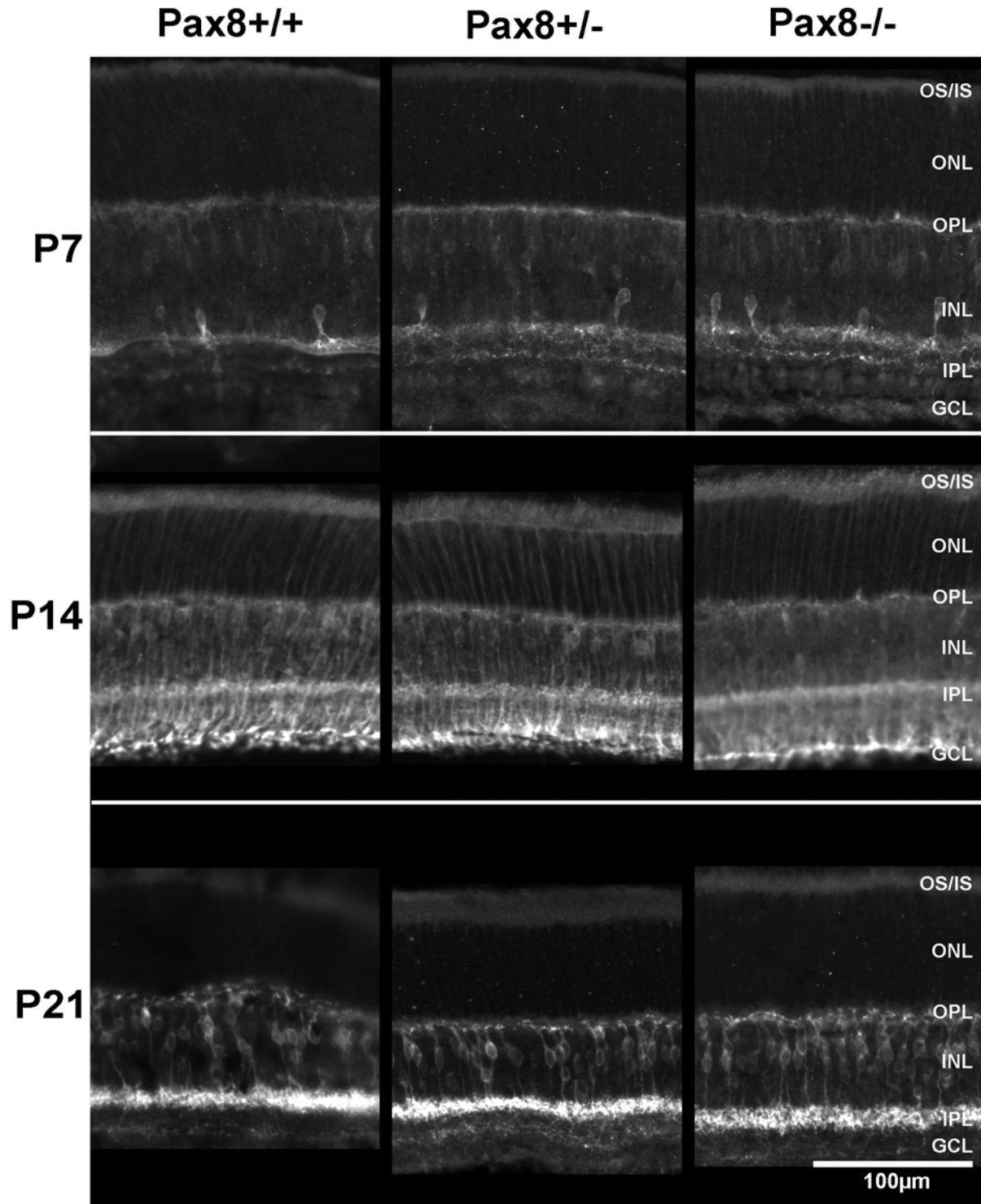


Abbildung 14 OFF-Zapfenbipolarzellen

Es wurden aus den Retinae von Pax8 ^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} im Alter von P7, P14 und P21 vertikale Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit dem NK3-R-Antikörper angefärbt. Die Skala gilt für alle Bilder. Schichtenbeschriftung siehe Abb. 8

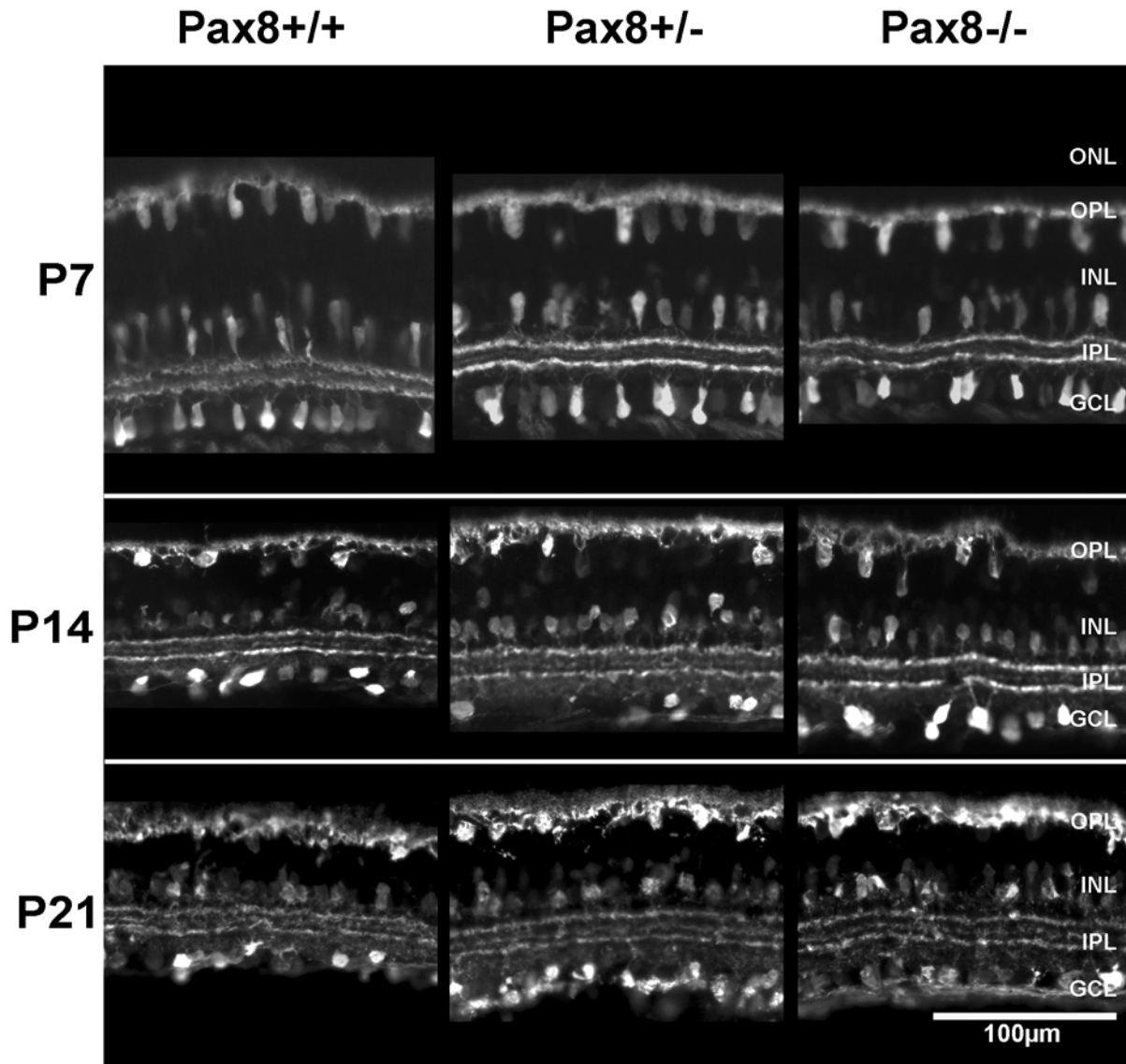


Abbildung 15 Horizontal-, Amakrin- und Ganglienzellen

Es wurden aus den Retinae von Pax8 ^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} im Alter von P7, P14 und P21 vertikale Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit dem Calbindin-Antikörper angefärbt. Die Skala gilt für alle Bilder. Schichtenbeschriftung siehe Abb. 8

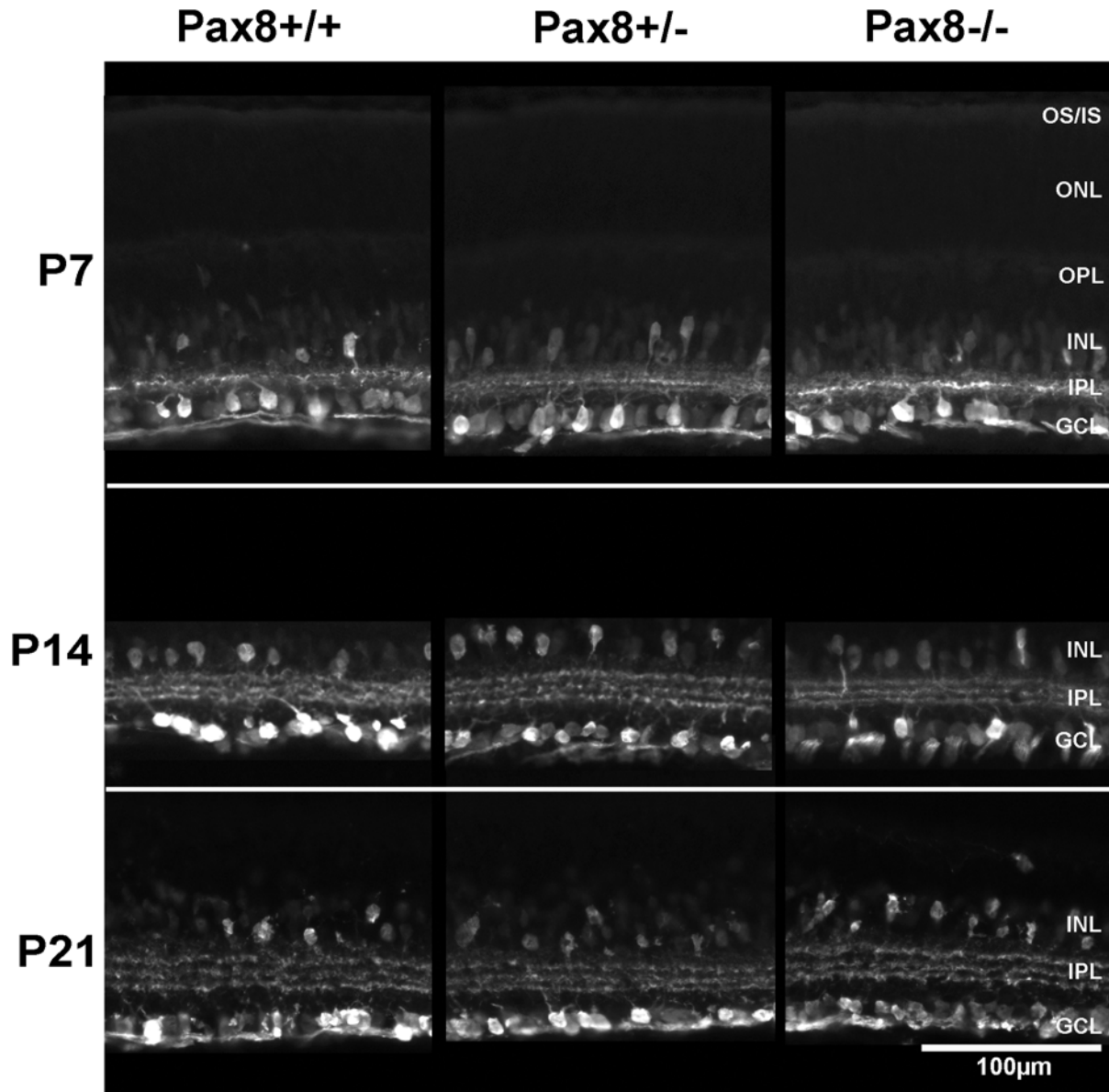


Abbildung 16 Amakrin- und Ganglienzellen

Es wurden aus den Retinae von Pax8 ^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} im Alter von P7, P14 und P21 vertikale Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit dem Calretinin-Antikörper angefärbt. Die Skala gilt für alle Bilder. Schichtenbeschriftung siehe Abb. 8

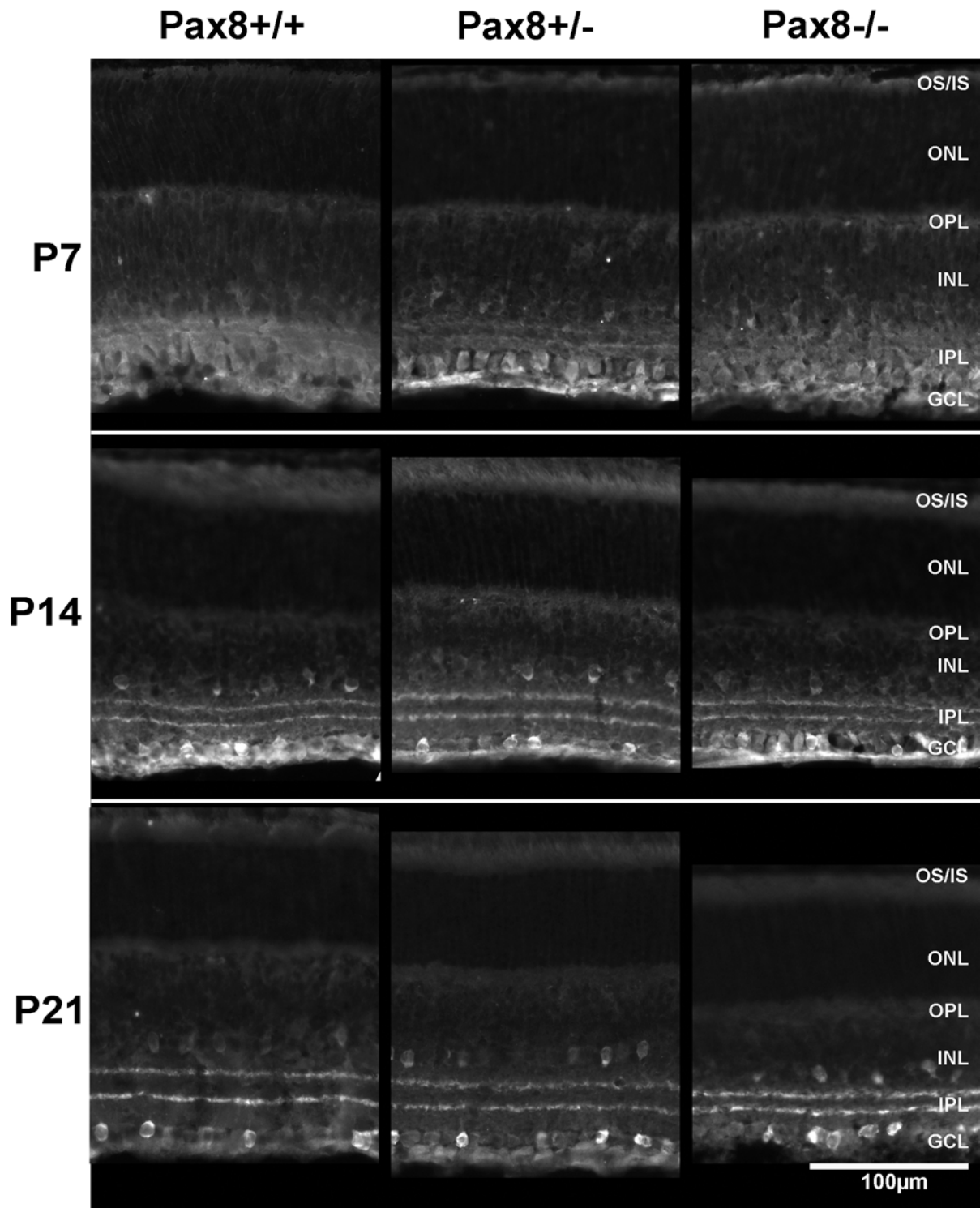


Abbildung 17 Cholinerge Amakrinzellen

Es wurden aus den Retinae von Pax8 ^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} im Alter von P7, P14 und P21 vertikale Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit dem ChAT-Antikörper angefärbt. Die Skala gilt für alle Bilder. Schichtenbeschriftung siehe Abb. 8

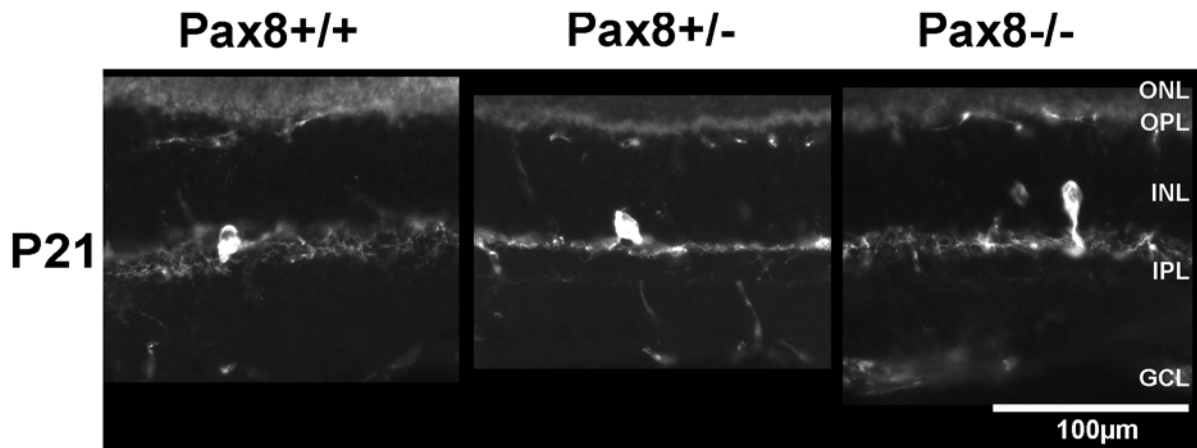


Abbildung 18 Dopaminerge Amakrinzellen

Es wurden aus den Retinae von Pax8 ^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} im Alter von P7, P14 und P21 vertikale Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit dem TH-Antikörper angefärbt. Die Skala gilt für alle Bilder. Schichtenbeschriftung siehe Abb. 8

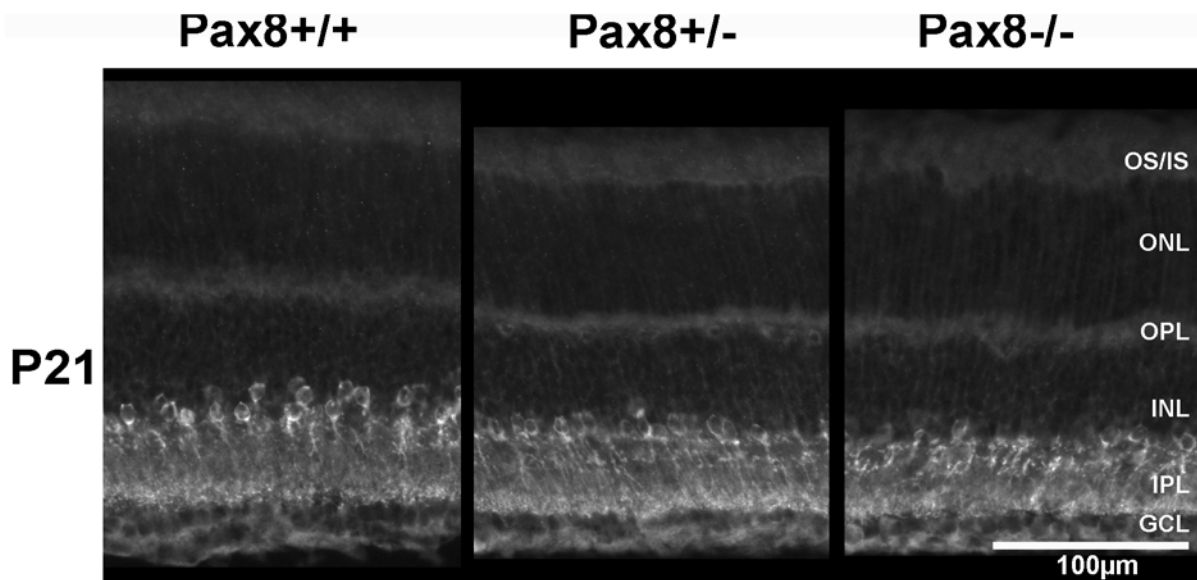


Abbildung 19 Amakrinzellen Typ All

Es wurden aus den Retinae von Pax8 ^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} im Alter von P7, P14 und P21 vertikale Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit dem DAB 1-Antikörper angefärbt. Die Skala gilt für alle Bilder. Schichtenbeschriftung siehe Abb. 8

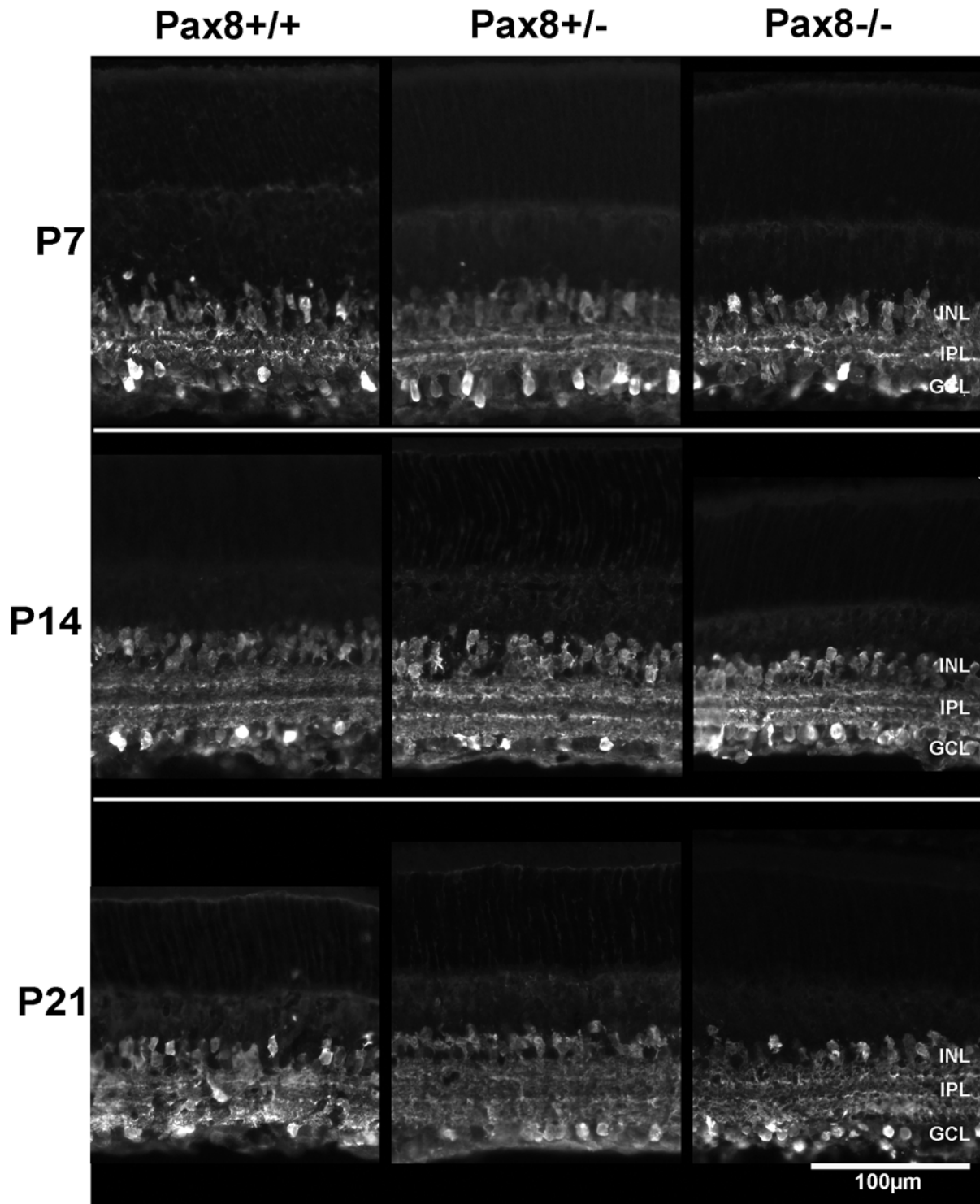


Abbildung 20 GABA

Es wurden aus den Retinae von Pax8 ^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} im Alter von P7, P14 und P21 vertikale Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit dem GABA-Antikörper angefärbt. Die Skala gilt für alle Bilder. Schichtenbeschriftung siehe Abb. 8

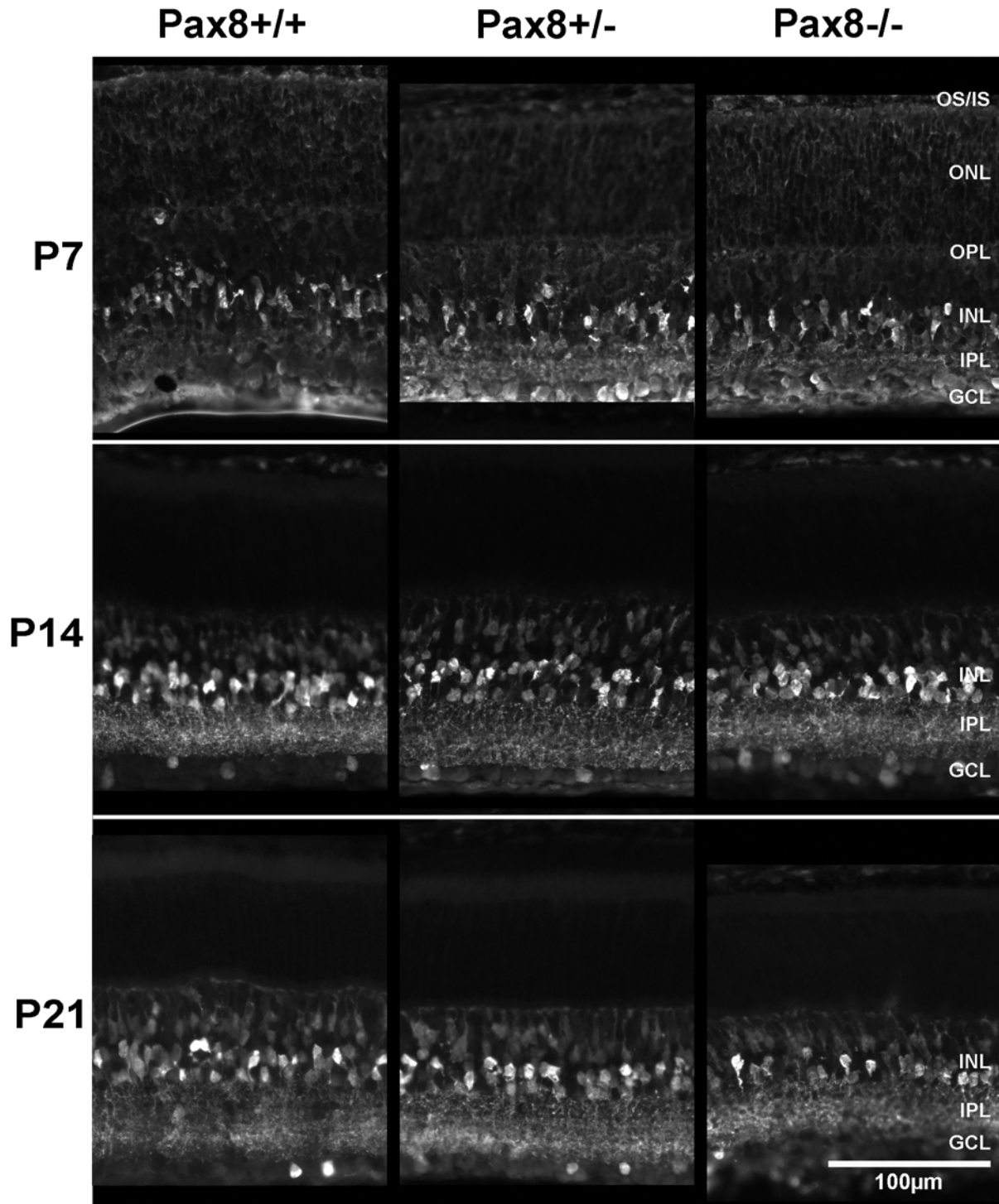


Abbildung 21 Glyzin

Es wurden aus den Retinae von Pax8 ^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} im Alter von P7, P14 und P21 vertikale Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit dem Glyzin-Antikörper angefärbt. Die Skala gilt für alle Bilder. Schichtenbeschriftung siehe Abb. 8

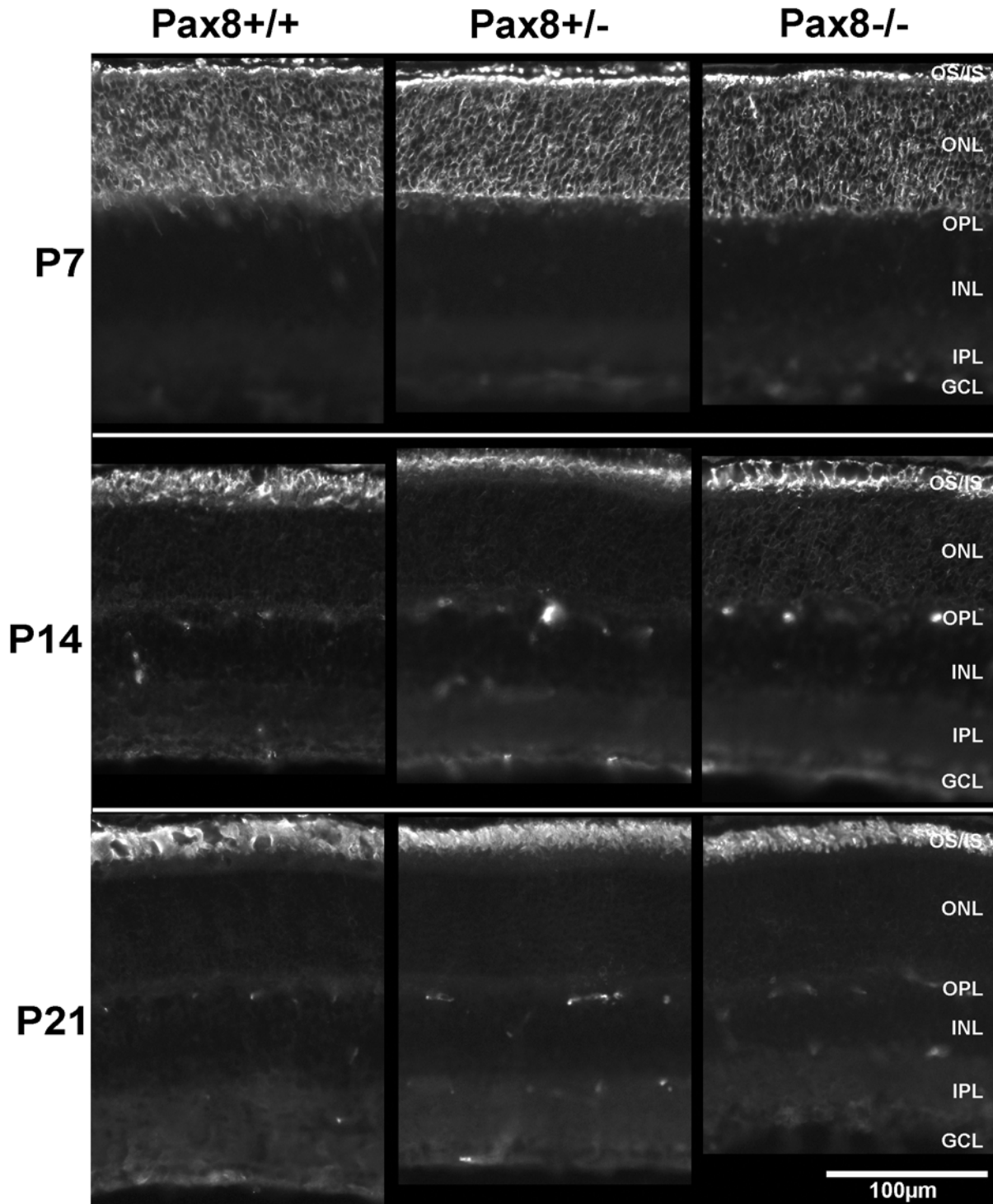


Abbildung 22 Stäbchen

Es wurden aus den Retinae von Pax8 ^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} im Alter von P7, P14 und P21 vertikale Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit dem rho4D2-Antikörper angefärbt. Die Skala gilt für alle Bilder. Schichtenbeschriftung siehe Abb. 8

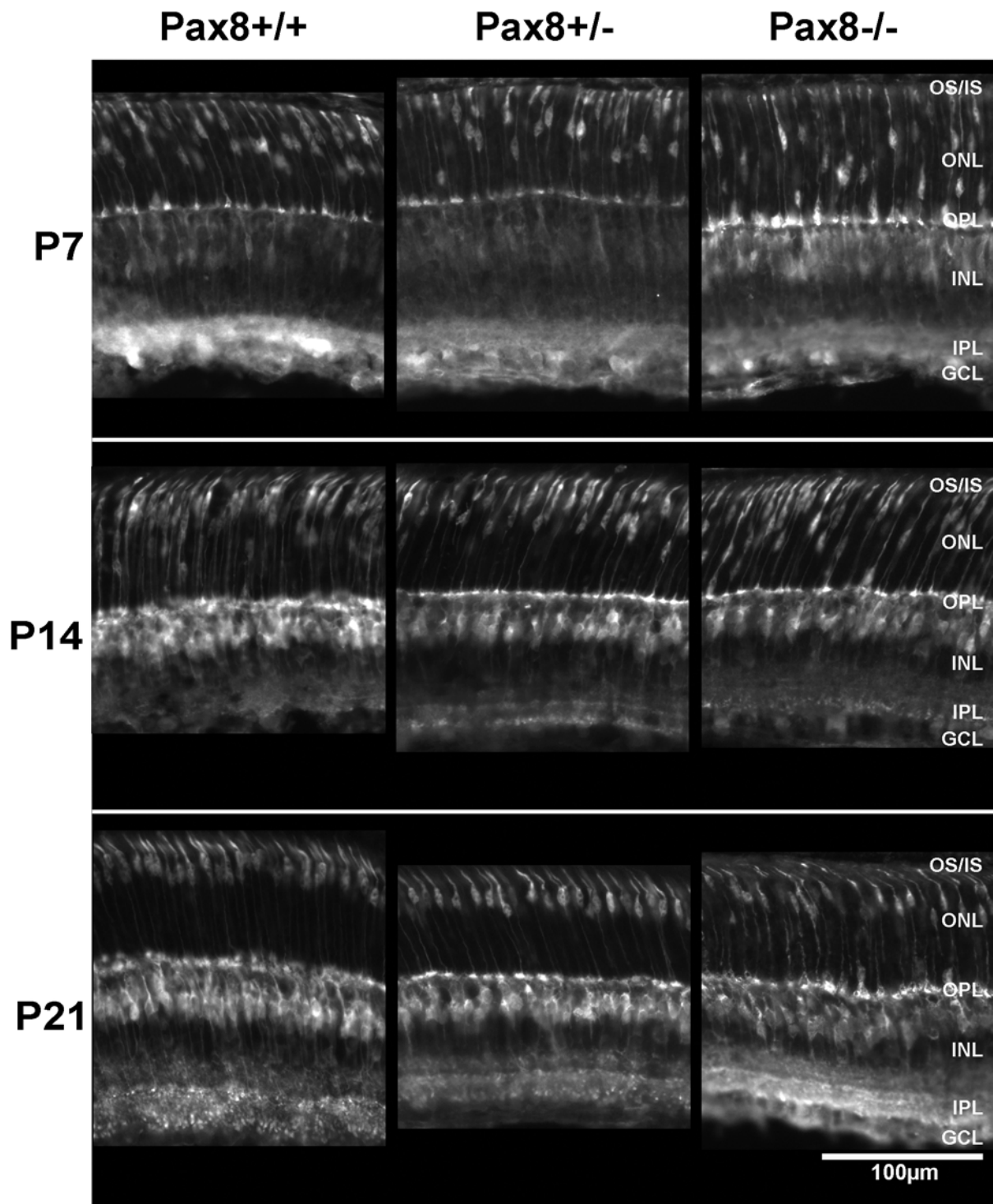


Abbildung 23 Zapfen

Es wurden aus den Retinae von Pax8 ^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} im Alter von P7, P14 und P21 vertikale Gefrierschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit dem Glypho-Antikörper angefärbt. Die Skala gilt für alle Bilder. Schichtenbeschriftung siehe Abb. 8

3.2.4 Zapfensynapse

Zur Prüfung eventueller ultrastruktureller Unterschiede der Zapfensynapsen von Pax8 ^{+/+} und ^{-/-} wurden diese im Alter von PWo 3 elektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 24). Die

Ergebnisse

typische Morphologie der Synapse und ihre Invaginierungen ist bei Pax8 $+/+$ und $-/-$ gleich. Auch in der Ribbonstruktur gibt es keinen offensichtlichen Unterschied.

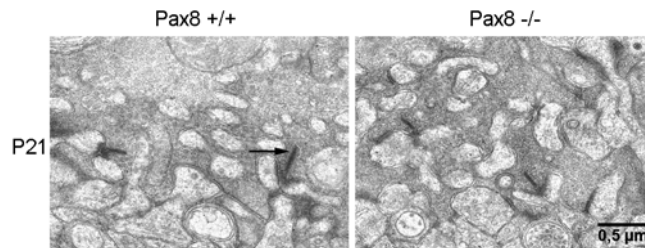


Abbildung 24 Zapfensynapse

Elektronenmikroskopische Bilder der Zapfensynapse im Vertikalschnitt. Die Skala gilt für beide Bilder. Ein Ribbon ist mit Pfeil markiert.

3.2.5 Nachweis von mRNA in der Retina

Das Stäbchenopsin und die beiden Zapfenopsine (S-Opisin, M-Opisin) konnten auch auf Transkriptebene durch PCR in der Retina nachgewiesen werden. Ebenso wurden die Transkripte des Schilddrüsenhormonrezeptors β 2 (TR β 2) und der Enzyme Deiodinase 2 (D2) und 3 (D3) nachgewiesen. Die Retinae aller drei Genotypen Pax8 $+/+$, $+/-$ und $-/-$ im Alter von PWo 3 enthalten diese Transkripte (Abb. 25). Die Banden entsprechen jeweils der Länge des zu erwartenden Produkts aus der Amplifikation in der PCR. Im Falle des Stäbchenopsins entspricht die Länge des Produkts einer Größe von 296 bp. Das Produkt aus der Amplifikation der mRNA des M-Opisins hat 194 bp und des S-Opisin 190 bp. Das Produkt für D2 ist 250 bp und für D3 153 bp lang. Für TR β 2 ist das Produkt 452 bp lang.

Ergebnisse

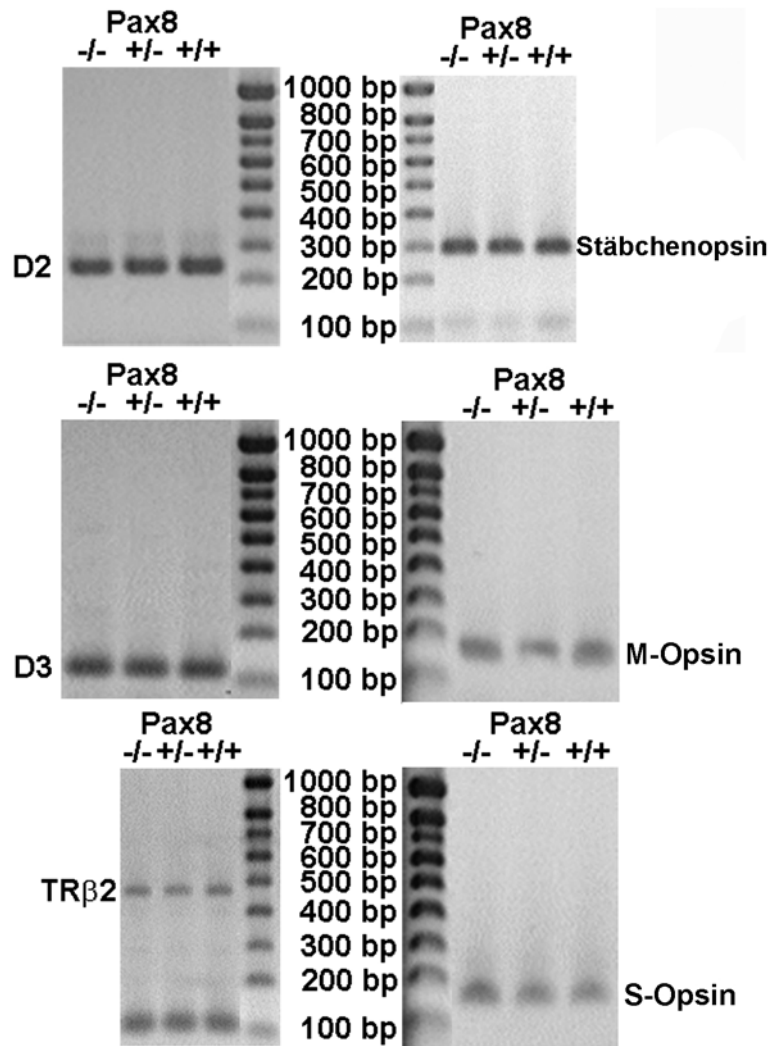


Abbildung 25 Nachweis von Transkripten in der Retina

Gele mit den nachgewiesenen Transkripten der Retina von Pax8 $-/-$, $+/-$ und $+/+$ im Alter P3. Die Größe der Markerbanden in Basenpaaren (bp) ist angegeben. Die Banden der Transkripte sind namentlich gekennzeichnet: D2, Deiodinase 2; D3, Deiodinase 3; TR β 2, Schilddrüsenhormonrezeptor β 2

3.3 Entwicklung des S- und M-Zapfenmuster in der Maus

Das Zapfenmuster der Maus entwickelt sich postnatal. Die Expression des S-Opsins beginnt embryonal und ist postnatal ab dem Tag der Geburt immunzytochemisch nachweisbar. Abbildung 26 zeigt Flachpräparate der Retina, die mit dem S-Opsin-spezifischen Antikörper sc-14363 gefärbt wurden, für den wildtypischen Stamm C57BL/6J (C57) und die drei Pax8 Genotypen $+/+$, $+/-$ und $-/-$ im Alter von P7. Die Zapfen aller Tiere haben zu diesem Zeitpunkt nur kurze Außensegmente, in denen das Opsin enthalten ist. Auch die Somata der Zapfen sind durch den Antikörper markiert. Anhand der Bilder aus dem dorsalen und ventralen Bereich der Retina ist zu erkennen, daß das S-Opsin in allen Zapfen sowohl bei C57 als auch bei allen Pax8-Genotypen über die gesamte Retina gleich stark exprimiert wird. Dies bestätigt, daß im Alter von P7 alle Zapfen das S-Opsin exprimieren.

Ergebnisse

An P14 ist das S-Opsin in den nun längeren Außensegmenten der Zapfen enthalten (Abb. 27). Bei C57 ist die Zahl der S-Zapfen im ventralen Bereich höher als im dorsalen Bereich der Retina. Dies trifft auch auf die Pax8-Genotypen zu. In der dorsalen Retina hat die Zahl der S-Zapfen jedoch bei C57 stärker abgenommen als bei den Pax8-Genotypen.

Die Expression des M-Opsins beginnt postnatal und kann ab P14 durch den Antikörper JH 492 nachgewiesen werden. Anhand von Färbungen kann jedoch keine Aussage über Unterschiede in der Ausprägung des M-Zapfenmusters der vier Tiere (C57, Pax8 +/+, +/- und -/-) gemacht werden, da sie gerade erst begonnen hat. Individuelle Unterschiede innerhalb eines Genotyps sind ebenso groß wie die Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen.

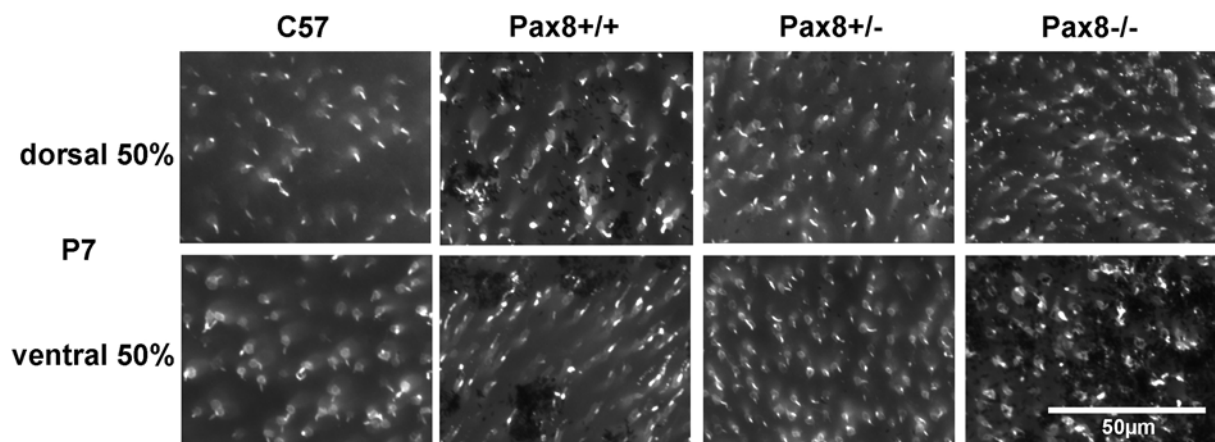


Abbildung 26 S-Zapfen an P7

Flachpräparate der Retina von C57, Pax8 +/+, +/- und -/- an P7, gefärbt mit dem Antikörper sc-14363 zur Sichtbarmachung des S-Opsins in den Zapfen. Für alle Retinae der vier Tiere ist ein dorsaler und ein ventraler Ausschnitt der Retina gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder.

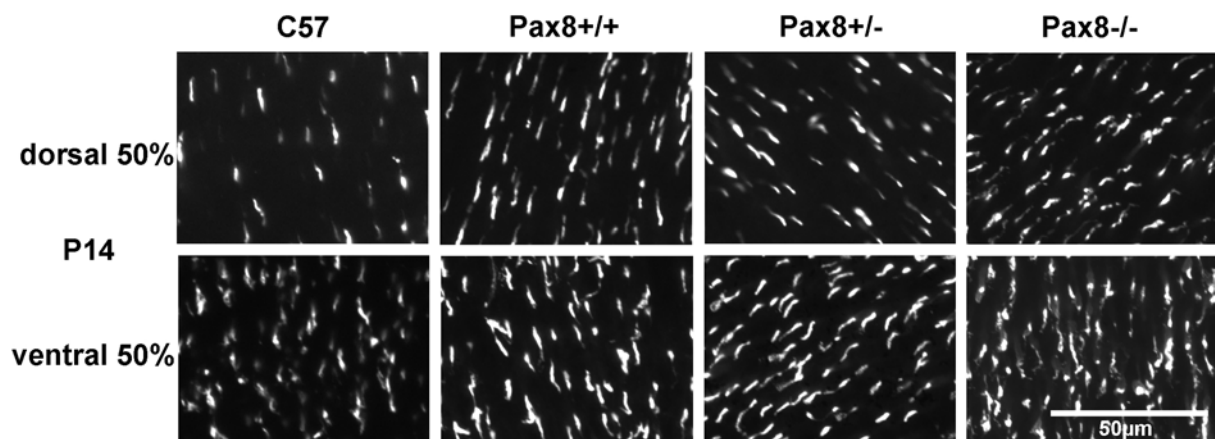


Abbildung 27 S-Zapfen an P14

Flachpräparate der Retina von C57, Pax8 +/+, +/- und -/- an P14, gefärbt mit dem Antikörper sc-14363 zur Sichtbarmachung des S-Opsins in den Zapfen. Für alle Retinae der vier Tiere ist ein dorsaler und ein ventraler Ausschnitt der Retina gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder.

3.4 Vergleich des Zapfenmusters wildtypischer Mäuse verschiedener Stämme

Zunächst wurde das Zapfenmuster von drei wildtypischen Mäusen unterschiedlicher Stämme verglichen. Die Stämme C57BL/6J (C57) und Sv129 gelten als wildtypische. Der genetische Hintergrund des Pax8-Stammes beruht auf einer Kreuzung dieser beiden wildtypischen Stämme. Um die ermittelten Befunde des Pax8-Stammes besser einordnen zu können, wurden deshalb zunächst die Zapfenmuster von C57, Sv129 und Pax8 +/- untereinander verglichen.

Das Muster der S- und M-Zapfen der wildtypischen Stämmen C57 und Sv129 und des Wildtyps Pax8 ++ wurde untersucht. Die Retinae wurden mit Antikörpern, die gegen das S- und M-Opsin gerichtet sind, gefärbt und die Dichten der S- und M-Zapfen/mm² wurden ermittelt. Für den Vergleich wurden zwei Altersstufen herangezogen das junge Stadium PWo 3 und das adulte Stadium PWo 22.

3.4.1 Vergleich des Schilddrüsenhormongehalts im Serum von C57, Sv129 und Pax8 ++

Die jeweiligen Mittelwerte der vier Formen des Schilddrüsenhormons von C57, Sv129 und Pax8 ++ sind im Säulendiagramm im Alter von PWo 3 (Abb. 28) und PWo 22 (Abb. 29) dargestellt. Tabelle 13 gibt für die zwei Zeitpunkte die Anzahl der verwendeten wildtypischen Tiere jedes Stammes an.

Bei PWo 3 ist die Konzentration des freien Triiodothyronins in allen drei Stämmen gleich und liegt bei 0,006 nmol/l. Der Gehalt des freien Thyroxins liegt in C57 und Pax8 ++ bei ungefähr 0,035 nmol/l. Bei Sv129 ist der Gehalt des fT4 mit 0,025 nmol/l etwas geringer. Der Triiodothyroningehalt unterscheidet sich in den drei Stämmen geringfügig. In C57 ist er mit 1,2 nmol/l am höchsten, in Sv129 liegt er bei 1,0 nmol/l und in Pax8 ++ ist er mit 0,9 nmol/l am geringsten. Beim T4-Gehalt gibt es zwischen C57 und den anderen beiden Stämmen große Unterschiede. Das T4 in Sv129 und Pax8 ++ liegt bei etwa 50 nmol/l. In C57 ist es mit etwa 100 nmol/l fast doppelt so hoch.

Der fT3-, fT4- und T3-Gehalt ist bei C57 in PWo 22 identisch mit dem Gehalt in PWo 3 (Abb. 28). Die Thyroxin-Konzentration ist auf 60 nmol/l gesunken. Das fT3 von Sv129 und Pax8 ++ ist im Vergleich zur PWo 3 niedriger und liegt bei 0,0045 nmol/l. Der fT4-Gehalt ist bei Sv129 und Pax8 ++ gleich geblieben. Auch der T3- und T4-Gehalt ist in etwa gleich hoch bei 0,9 nmol/l T3 und 50-60 nmol/l T4. Anhand der Schilddrüsenhormone kann gesagt werden, daß alle drei Stämme euthyreot sind.

Ergebnisse

| Woche postnatal | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Schilddrüsenhormongehalts im Serum | | |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------|----------|
| | C57BL/6J | Sv129 | Pax8 +/+ |
| 3 | 4 | 6 | 15 |
| 22 | 8 | 6 | 4 |

Tabelle 13 Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Schilddrüsenhormongehalts im Serum verschiedener Wildtypen

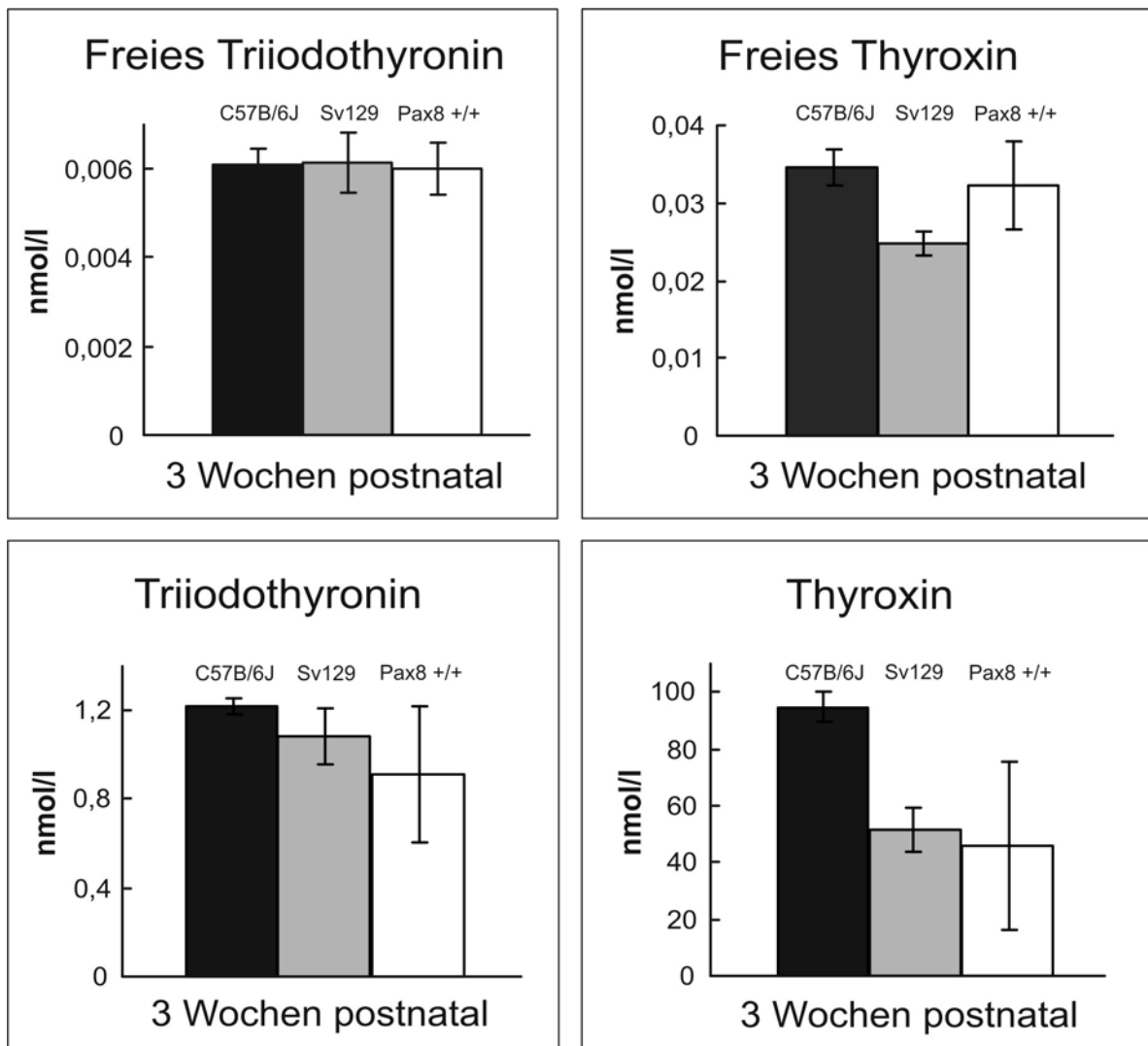


Abbildung 28 Schilddrüsenhormongehalt im Serum von Wildtypen in PWo 3 Säulendiagramme der Konzentrationen des Schilddrüsenhormons für alle vier Formen (fT3, fT4, T3, T4) von C57, Sv129 und Pax8 +/+.

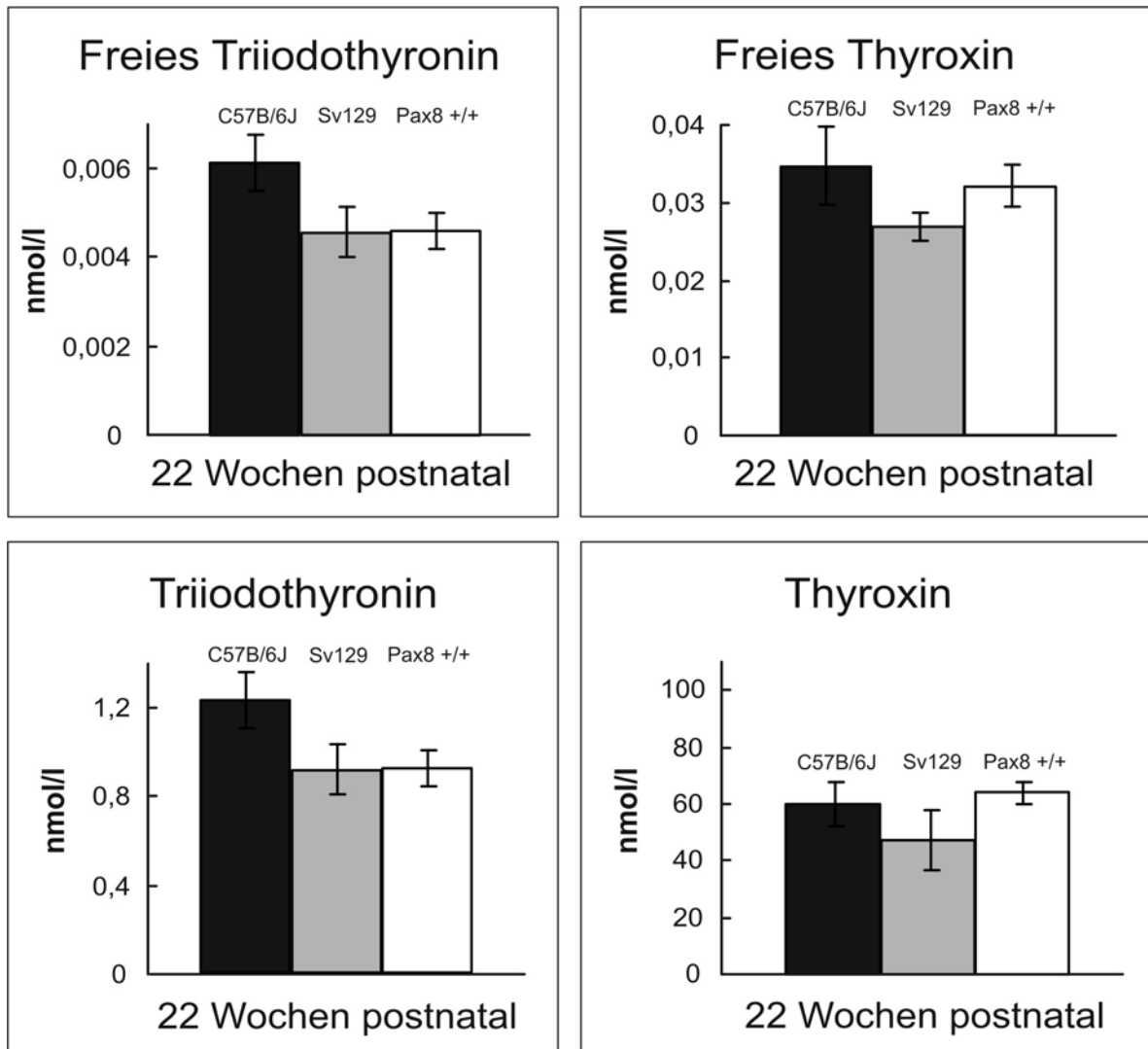


Abbildung 29 Schilddrüsenhormongehalt im Serum von Wildtypen in PWo 22
 Säulendiagramme der Konzentrationen des Schilddrüsenhormons für alle vier Formen (fT3, fT4, T3, T4) von C57, Sv129 und Pax8 +/+.

3.4.2 Schematische Darstellung der Retina und Definition der Positionen zur Dichtebestimmung der S- und M-Zapfen

In Abbildung 30 ist die Fläche einer Retina schematisch dargestellt. In der Mitte befindet sich der Sehnervaustrittspunkt (weißer Kreis). Die vier Kästchen geben die Positionen an, an denen Mikrophotographien aufgenommen und die Dichten/mm² der S- und M-Zapfen ermittelt wurden. Das Kästchen mit der Bezeichnung 50% dorsal gibt die Position in der Retina an, die im dorsalen Bereich auf halbem Wege zwischen Sehnervaustrittspunkt und Retinarand liegt. Die Position, die $\frac{3}{4}$ der Strecke zwischen Sehnervaustrittspunkt und Retinarand im dorsalen Bereich der Retina markiert, wird als 75% dorsal bezeichnet. Die entsprechenden Positionen im ventralen Bereich sind als 50% und 75% ventral gekennzeichnet.

Ergebnisse

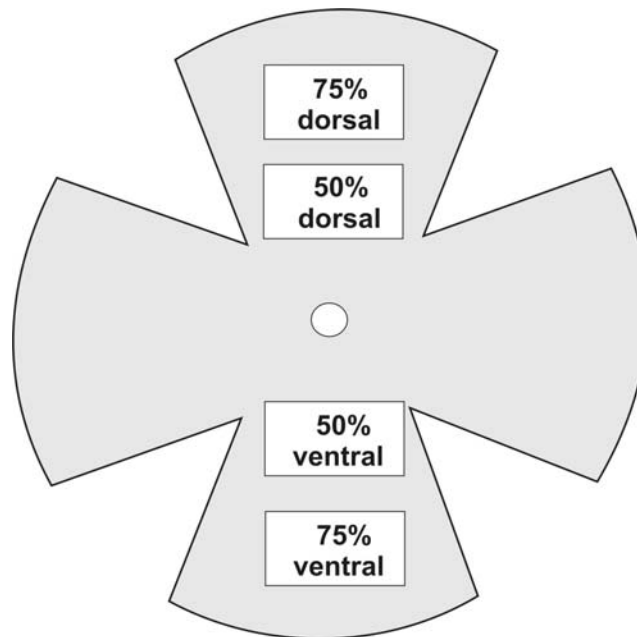


Abbildung 30 Schematische Darstellung der Retina

3.4.3 Postnatale Entwicklung des S- und M-Zapfenmusters in den Wildtypen von drei Stämmen

Die Abbildungen 31-34 zeigen Bilder aus definierten Regionen (siehe 3.4.2) der Retina von C57, Sv129 und Pax8 +/+, die mit den Antikörpern sc-14363 und JH 492 zur Markierung der S- und M-Opsine gefärbt wurden. Die Abbildungen zeigen das Muster der S- und M-Zapfen im Alter von PWo 3 und PWo 22.

Es ist zu erkennen, daß in allen drei Stämmen die Zahl der Zapfen, die das S-Opsin exprimieren, im ventralen Bereich höher ist als im dorsalen Bereich (Abb. 31). Die Zahl der S-Zapfen in der ventralen Retina erscheint bei C57, Sv129 und Pax8 +/+ gleich. Die Zahl der S-Zapfen im dorsalen Bereich aller drei Tiere ist deutlich geringer. Da die Färbung der S-Zapfen im dorsalen Bereich der Retina intensiver wirkt, scheint die Expression des S-Opsins pro Zapfen höher zu sein, als in den Zapfen im ventralen Bereich. Die Anzahl der Zapfen, die das M-Opsin exprimieren (Abb. 32), erscheint bei C57, Sv129 und Pax8 +/+ ungefähr gleich. Auch gibt es zwischen dem dorsalen Bereich und dem ventralen Bereich der Retina anscheinend keine Unterschiede in der Anzahl der M-Zapfen. Der Unterschied zwischen dorsalen und ventralen Bereich der Retina liegt in der Expressionsstärke, dorsale Zapfen exprimieren das M-Opsin stärker als ventrale Zapfen. An der Position 50% ventral in der Retina von Sv129 ist das M-Opsin so schwach exprimiert, daß es den Anschein hat, die Zahl der M-Zapfen sei geringer als an der Position 75% ventral. Auch in PWo 22 ist das S-Opsin (Abb. 33) in allen drei Stämmen stärker im ventralen als im dorsalen Bereich exprimiert. Der Dichtegradient erscheint noch stärker als im Alter von PWo 3, da noch weniger S-Zapfen in der dorsalen Retina vorhanden sind. Die M-Zapfen (Abb. 34) in C57, Sv129 und Pax8 +/+

Ergebnisse

scheinen in gleicher Zahl vorzuliegen wie in PWo 3. Eine genauere Dichteanalyse wird unter 3.4.6 beschrieben.

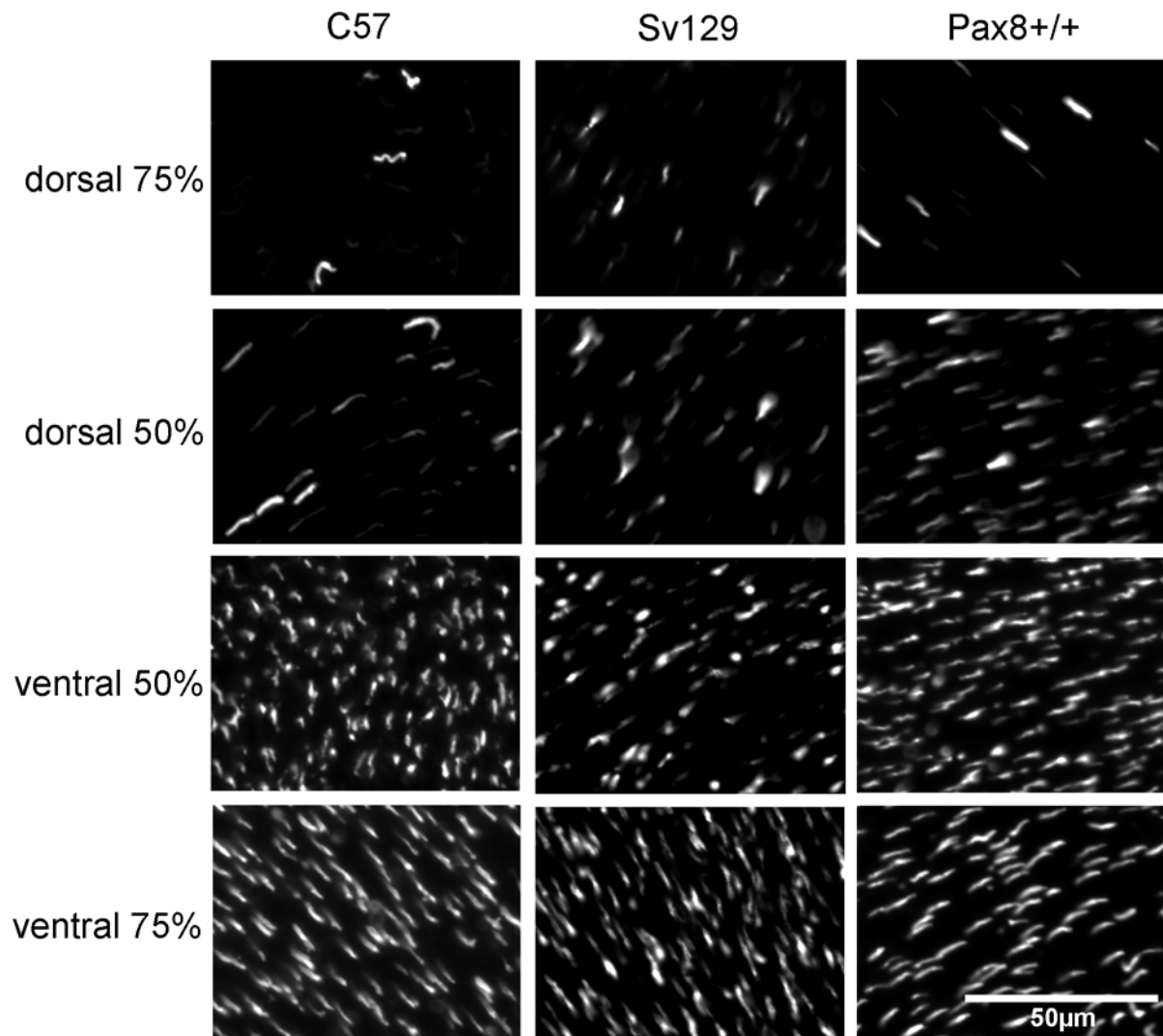


Abbildung 31 S-Zapfen von drei Wildtypen bei PWo 3

Flachpräparate der Retina von C57, Sv129 und Pax8 +/+ bei PWo 3, gefärbt mit dem Antikörper sc-14363 zur Sichtbarmachung des S-Opsins in den Zapfen. Von der Retina der drei Tiere ist ein zentraler (50%) und peripherer (75%) Bereich der dorsalen und ventralen Region gezeigt. Die Skala ist für alle Bilder gleich.

Ergebnisse

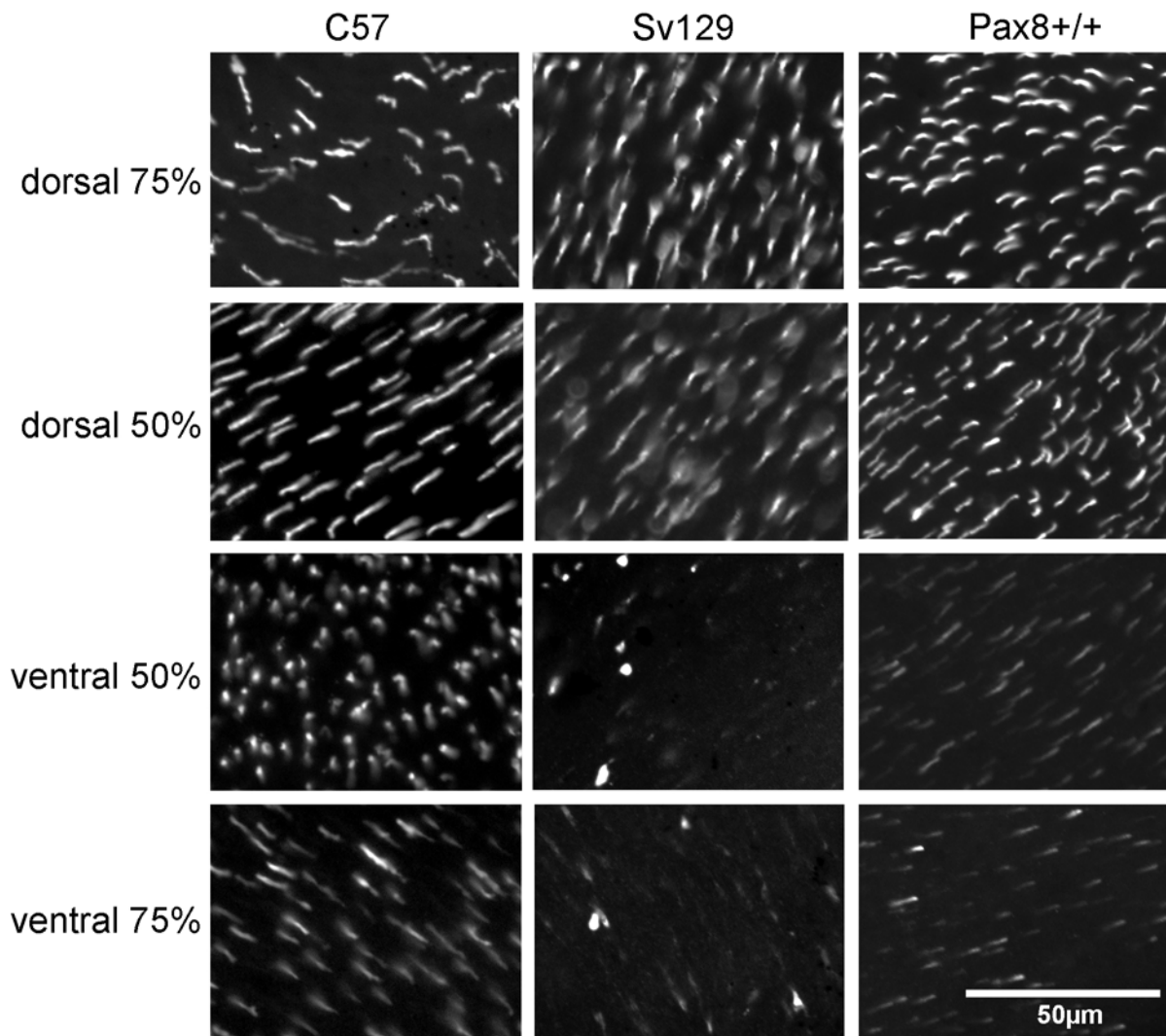


Abbildung 32 M-Zapfen von drei Wildtypen bei PWO 3

Flachpräparate der Retina von C57, Sv129 und Pax8^{+/+} bei PWO 3, gefärbt mit dem Antikörper JH 492 zur Sichtbarmachung des M-Opsins in den Zapfen. Konventionen wie Abb. 31

Ergebnisse

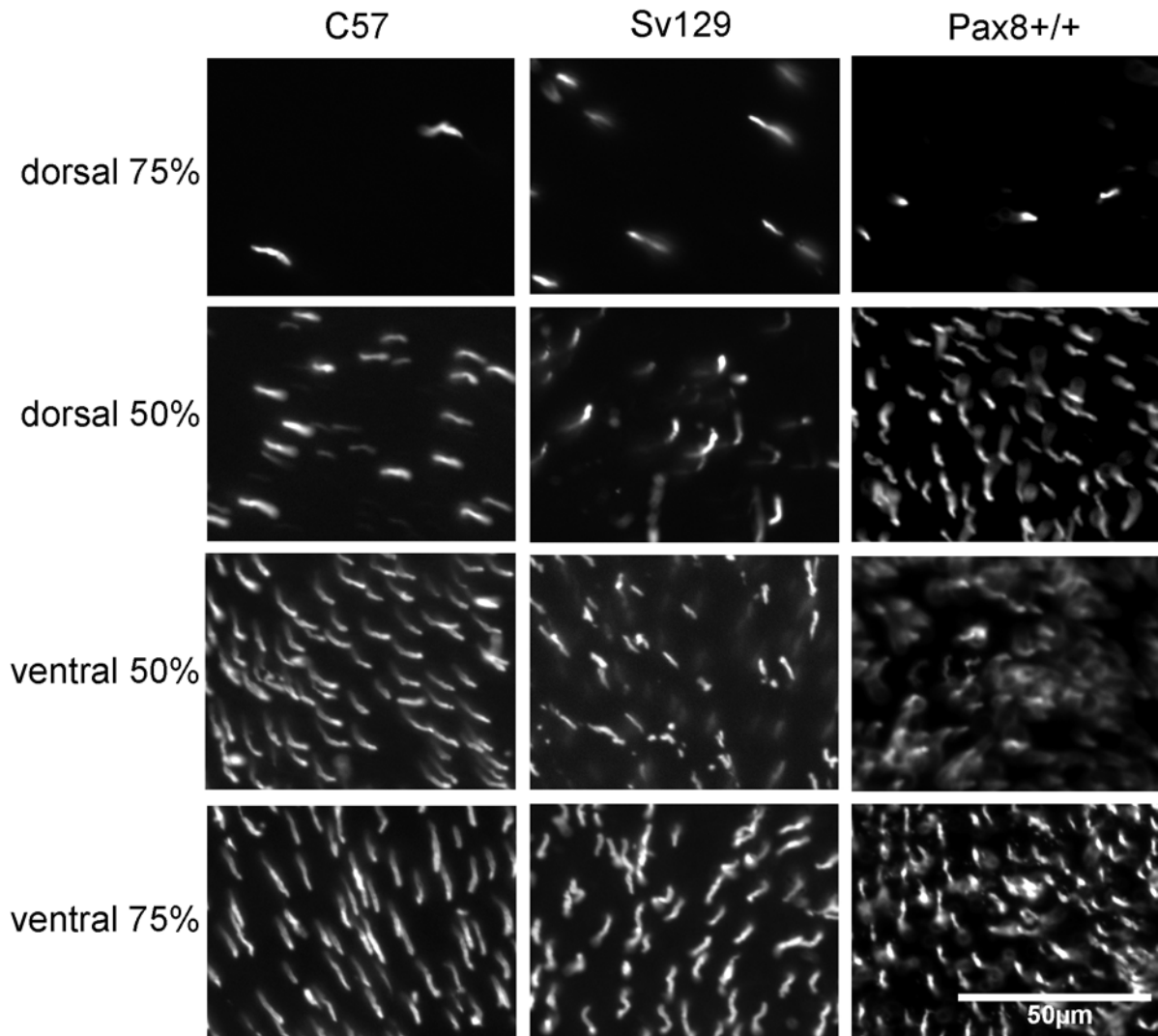


Abbildung 33 S-Zapfen von drei Wildtypen bei PWo 22

Flachpräparate der Retina von C57, Sv129 und Pax8 ^{+/+} im adulten Alter von PWo 22, gefärbt mit dem Antikörper sc-14363. Konventionen wie Abb. 31

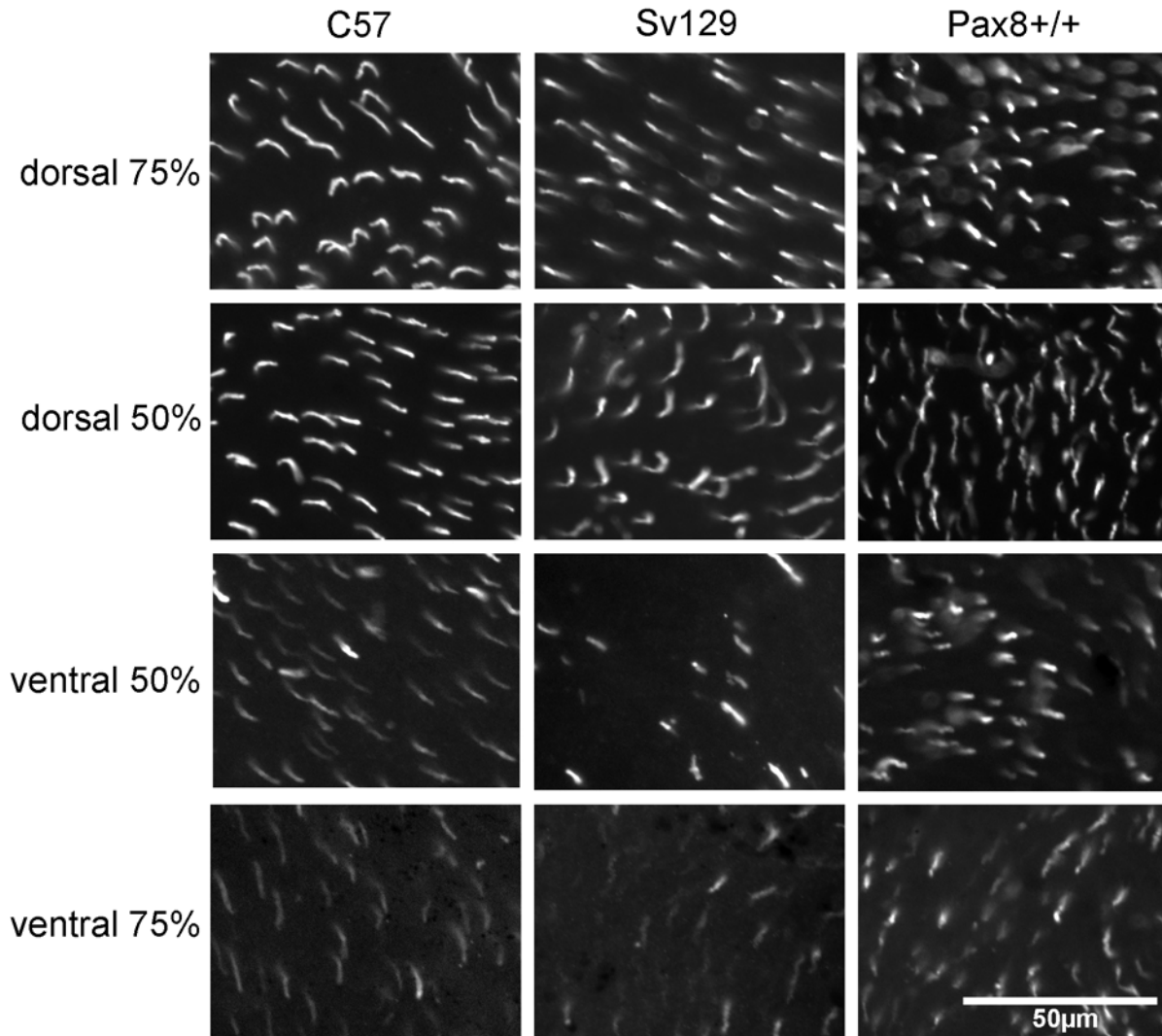


Abbildung 34 M-Zapfen von drei Wildtypen bei PWO 22

Flachpräparate der Retina von C57, Sv129 und Pax8 +/+ im adulten Alter von PWO 22, gefärbt mit dem Antikörper JH 492. Konventionen wie Abb. 31

3.4.4 Größe der Retinaflächen von C57, Sv129 und den drei Pax8-Genotypen

Die Mittelwerte der Retinaflächen von C57, Sv129 und Pax8 +/+, +/- und -/- im Alter von PWO 3, PWO 12 und PWO 22 sind als Säulendiagramme dargestellt (Abb. 35, 36, 37). Die Anzahl der verwendeten Tiere jedes Stammes und Genotyps ist in Tabelle 14 angegeben. Die Fläche der Retina hat bei allen verglichenen Tieren im Alter von PWO 3 (Abb. 35) dieselbe Größe von ungefähr $13,5 \text{ mm}^2$. Im Alter von PWO 12 ist die Fläche von Pax8 +/+, +/- und -/- gleich (Abb. 36). Sie hat eine ungefähre Größe von $15,5 \text{ mm}^2$. Auch bei PWO 22 (Abb. 37) ist die Retina vergleichbar groß (etwa $15,5 \text{ mm}^2$) bei C57, Sv129 und den drei Pax8-Genotypen. Nur die Retinafläche von Sv129 ist mit $17,5 \text{ mm}^2$ ein wenig größer. Sie ist aber nur zu C57 signifikant unterschiedlich ($p < 0,01$).

Ergebnisse

Die Kenntnis der Retinafläche ist relevant, wenn anhand der ermittelten Zapfendichte auf die Gesamtzapfendichte/Retina geschlossen werden soll.

| Woche postnatal | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der Retinafläche | | | | |
|-----------------|--------------------------------------------------------------|-----|-----|----------|-------|
| | Pax8 | | | C57BL/6J | Sv129 |
| | +/+ | +/- | -/- | | |
| 3 | 6 | 4 | 5 | 10 | 6 |
| 12 | 4 | 6 | 4 | n.g. | n.g. |
| 22 | 3 | 10 | 6 | 10 | 10 |

Tabelle 14 Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der Retinafläche
n.g. = nicht gemessen

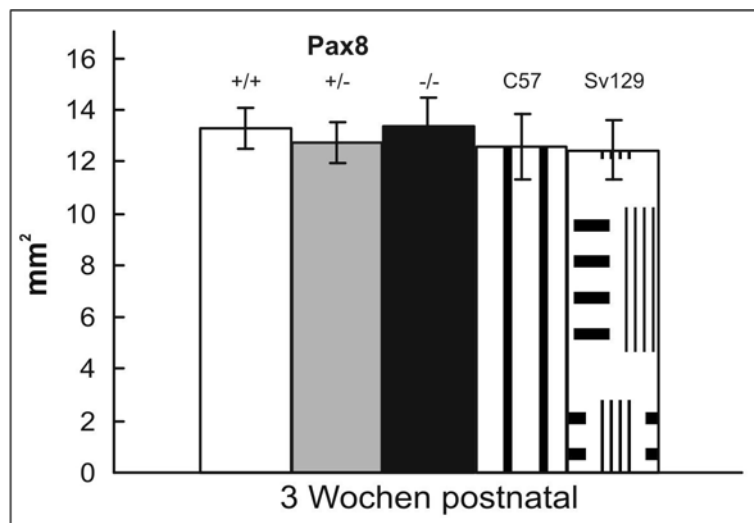


Abbildung 35 Retinafläche in PWo 3

Säulendiagramm der Retinafläche für C57, Sv129 und Pax8 +/+, +/-, -/- im Alter von PWo 3.

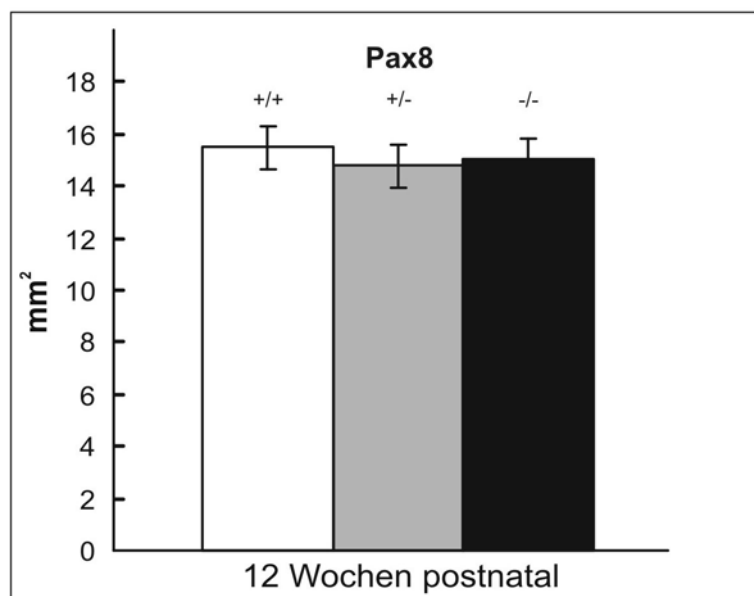


Abbildung 36 Retinafläche in PWo 12

Abbildung 36 Retinafläche in PWo 12

Säulendiagramm der Retinafläche für Pax8 +/+, +/- und -/- im Alter von PWo 12.

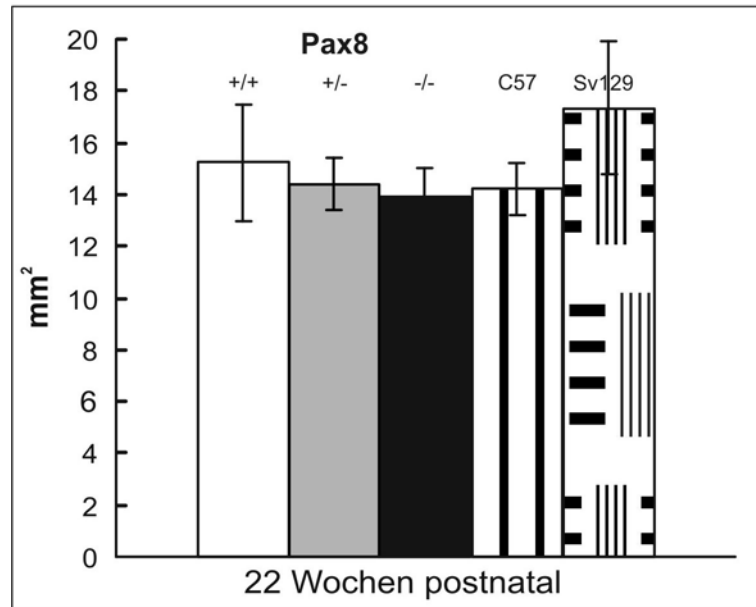


Abbildung 37 Retinafläche in PWo 22

Säulendiagramm der Retinafläche für C57, Sv129 und Pax8 +/+, +/-, -/- im Alter von PWo 22.

3.4.5 Technik zur Bestimmung der S- und M-Zapfendichten

Anhand eines Beispiels soll nun auf die Schwierigkeiten, die bei der Bestimmung der S- und M-Zapfendichten auftreten können, eingegangen werden. In Abbildung 38 sind die M-Zapfen im ventralen Bereich der Retina von Pax8 +/+ im Alter von PWo 3 gezeigt. Die linken Bilder zeigen Aufnahmen, bei denen die verschiedenen Positionen (50% und 75% ventral) der Retina mit derselben Belichtungszeit photographiert wurden. Es wird angenommen, daß eine stärkere Immunfluoreszenz eines Zapfens, ersichtlich an der größeren Helligkeit, eine höhere Expression des M-Opsins widerspiegelt. Dieses gilt nur zwischen verschiedenen Bereichen ein und derselben Retina. Somit ist in den oberen Bildern zu erkennen, daß die Expression im Bereich 75% ventral deutlich geringer ist als im Bereich 50% ventral. Dieser Unterschied der Expressionsstärke tritt für das M-Opsin im ventralen und für das S-Opsin im dorsalen Bereich der Retina der Maus auf. Eine schwache Expression der Opsine könnte zum Übersehen dieser Zapfen bei der Ermittlung der Dichte führen. Deshalb wurde für die Dichtebestimmungen die Helligkeit der Bilder in Photoshop erhöht. Die rechten Bilder sind solche aufgehellten Versionen der linken Bilder. Das Zählen der Zapfen wurde dadurch wesentlich erleichtert und es mußte nicht befürchtet werden, schwach M-Opsin-exprimierende Zapfen zu übersehen. Ziel war es, die Dichte aller Zapfen, die das jeweilige Opsin enthielten, zu bestimmen. Es kam bei dieser Studie nicht auf die Expressionsstärke der Zapfenopsine an, sondern nur auf das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein des jeweiligen Opsins.

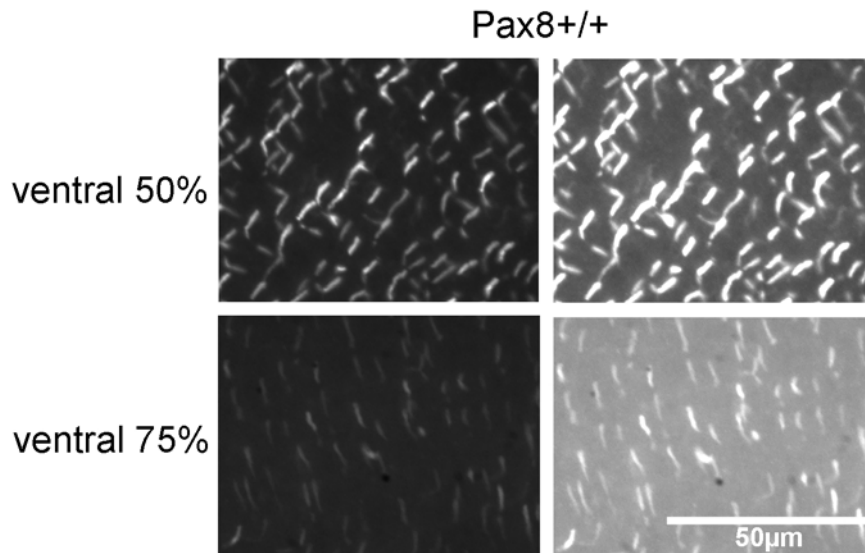


Abbildung 38 M-Zapfenmuster mit verschiedener Helligkeitsbearbeitung

Flachpräparate der Retina einer Maus, gefärbt mit dem Antikörper JH 492 zur Sichtbarmachung des M-Opsins in den Zapfen. Es sind die Bereiche 50% und 75% ventral der Retina gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder. Die Bilder links und rechts zeigen jeweils dasselbe Motiv, rechts mit höherer Helligkeit.

3.4.6 S- und M-Zapfendichte bei C57, Sv129 und Pax8 ^{+/+} im Alter von PWo 3 und PWo 22

Die Zapfendichten wurden in Bildern wie unter 3.4.5 beschrieben ermittelt. Die S-Zapfendichte gibt die Zahl aller Zapfen an, die das S-Opsin exprimieren (S-Zapfen und Dualpigmentzapfen). Das gleiche gilt für die Dichte der M-Zapfen. Die Anzahl der verwendeten Tiere jedes Stammes ist in Tabelle 15 angegeben. Die adulten Pax8 ^{+/+} hatten ein Alter zwischen PWo 20 und PWo 24 und werden hier als PWo 22 zusammengefaßt. Die S- und M-Dichtewerte für die vier Positionen in den zwei Altersstadien sind in Tabelle 16-23 aufgeführt.

Im Alter von PWo 3 sind die S-Zapfendichten bei allen drei Stämmen im ventralen Bereich höher als im dorsalen Bereich (Abb. 39). Die höchsten S-Zapfendichten befinden sich in den Retinae von C57 und Pax8 ^{+/+} im ventralen Zentrum (50% ventral). Bei Sv129 hingegen existieren die höchsten S-Zapfendichten in der ventralen Peripherie (75% ventral). Sie sind signifikant unterschiedlich zu den Dichten von C57 und Pax8 ^{+/+} ($p < 0,01$).

Der Gradient der M-Zapfendichte verläuft gegenläufig zur S-Zapfendichte, d.h., daß alle drei Stämme höhere M-Zapfendichten im dorsalen Bereich der Retina haben als im ventralen Bereich. Die Dichten sind bei den Tieren der drei Stämme im zentralen Bereich der dorsalen Retina (50% dorsal) am höchsten und in der ventralen Peripherie (75% ventral) am geringsten.

Auch im adultem Alter von PWo 22 bleiben die Dichtegradien der S- und M-Zapfen erhalten (Abb. 40). Die S-Zapfendichte ist in allen drei Stämmen im ventralen Bereich der Retina am höchsten und nimmt zum dorsalen Bereich hin ab. Die Dichtewerte im ventralen

Ergebnisse

Bereich bei C57 und Pax8 +/+ sind vergleichbar mit den Dichtewerten im Alter von PWO 3. Die Dichten für die beiden ventralen Bereiche bei Sv129 haben in der PWO 22 im Vergleich zur PWO 3 stark abgenommen. Im dorsalen Bereich aller drei Stämme haben die Dichten sehr stark abgenommen, so daß sich der S-Zapfengradient im adulten Alter noch stärker ausgebildet hat, dabei ist der Dichtegradient der S-Zapfen von Pax8 +/+ am wenigsten stark ausgeprägt. Die dorsalen S-Zapfendichten von C57 und Pax8 +/+ sind signifikant unterschiedlich ($p < 0,01$). Die S-Zapfendichten von Sv129 sind über die gesamte Retina signifikant niedriger als bei C57 und Pax8 +/+ (nicht eingezeichnet). Darauf wird in der Diskussion eingegangen.

Die M-Zapfendichte ist auch in PWO 22 bei allen drei Stämmen im dorsalen Zentrum der Retina am höchsten. Für C57 hat sie den gleichen Wert wie in der PWO 3. Für alle anderen Positionen und über die gesamte Retina von Sv129 und Pax8 +/+ haben die Dichten im Vergleich zu PWO 3 abgenommen. Die niedrigsten Werte der M-Zapfendichten liegen bei allen Tieren im Bereich 75% ventral. Auch die M-Zapfendichten von Sv129 sind signifikant unterschiedlich zu den Dichten von C57 und Pax8 +/+.

| Woche postnatal | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der S- und M-Zapfendichte | | | | |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------|-----|-----|----------|-------|
| | Pax8 | | | C57BL/6J | Sv129 |
| | +/+ | +/- | -/- | | |
| 3 | 10 | 11 | 9 | 10 | 6 |
| 12 | 4 | 5 | 4 | n.b. | n.b. |
| 22 | 7 | 7 | 3 | 10 | 10 |

Tabelle 15 Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der S- und M-Zapfendichte
n.b.= nicht bestimmt

| Tiere | S-Zapfendichte bei 75% dorsal (1/mm ²) | | | |
|-----------------|----------------------------------------------------|--------|-------|--------|
| | Wochen postnatal | | | |
| | 3 | 12 | 18 | 22 |
| Pax8 +/+ | 6.600 | 1.700 | 3.700 | 2.900 |
| Pax8 +/- | 7.500 | 3.100 | 3.100 | 3.000 |
| Pax8 -/- | 10.100 | 9.300 | 7.900 | 11.500 |
| C57 | 8.700 | n.b. | n.b. | 200 |
| Sv129 | 7.700 | n.b. | n.b. | 2.000 |
| V1 | n.b. | 1.600 | n.b. | n.b. |
| V2 | n.b. | 10.000 | n.b. | n.b. |
| V3 | n.b. | n.b. | 6.700 | n.b. |

Tabelle 16 S-Zapfendichte bei 75% dorsal
n.b.= nicht bestimmt

V1, V2, V3 substituierte Pax8 -/-, nähere Erläuterung siehe 3.7 und 3.8

Ergebnisse

| Tiere | S-Zapfendichte bei 50% dorsal (1/mm ²) | | | |
|----------|----------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| | Wochen postnatal | | | |
| | 3 | 12 | 18 | 22 |
| Pax8 +/+ | 11.300 | 7.800 | 10.100 | 8.700 |
| Pax8 +/- | 12.100 | 7.800 | 8.400 | 9.400 |
| Pax8 -/- | 9.900 | 11.300 | 10.900 | 14.800 |
| C57 | 10.800 | n.b. | n.b. | 3.400 |
| Sv129 | 8.800 | n.b. | n.b. | 4.500 |
| V1 | n.b. | 8.400 | n.b. | n.b. |
| V2 | n.b. | 12.900 | n.b. | n.b. |
| V3 | n.b. | n.b. | 12.000 | n.b. |

Tabelle 17 S-Zapfendichte bei 50% dorsal
n.b.= nicht bestimmt

| Tiere | S-Zapfendichte bei 50% ventral (1/mm ²) | | | |
|----------|-----------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| | Wochen postnatal | | | |
| | 3 | 12 | 18 | 22 |
| Pax8 +/+ | 14.800 | 15.600 | 18.400 | 13.600 |
| Pax8 +/- | 15.100 | 14.200 | 15.000 | 16.200 |
| Pax8 -/- | 10.100 | 13.100 | 12.500 | 14.100 |
| C57 | 14.400 | n.b. | n.b. | 14.500 |
| Sv129 | 14.700 | n.b. | n.b. | 10.500 |
| V1 | n.b. | 14.500 | n.b. | n.b. |
| V2 | n.b. | 13.900 | n.b. | n.b. |
| V3 | n.b. | n.b. | 15.300 | n.b. |

Tabelle 18 S-Zapfendichte bei 50% ventral
n.b.= nicht bestimmt

| Tiere | S-Zapfendichte bei 75% ventral (1/mm ²) | | | |
|----------|-----------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| | Wochen postnatal | | | |
| | 3 | 12 | 18 | 22 |
| Pax8 +/+ | 12.700 | 13.700 | 14.200 | 10.700 |
| Pax8 +/- | 12.200 | 12.400 | 11.900 | 14.000 |
| Pax8 -/- | 9.100 | 9.900 | 11.200 | 12.100 |
| C57 | 12.800 | n.b. | n.b. | 11.800 |
| Sv129 | 17.100 | n.b. | n.b. | 8.100 |
| V1 | n.b. | 11.400 | n.b. | n.b. |
| V2 | n.b. | 11.800 | n.b. | n.b. |
| V3 | n.b. | n.b. | 11.900 | n.b. |

Tabelle 19 S-Zapfendichte bei 75% ventral
n.b.= nicht bestimmt

Ergebnisse

| Tiere | M-Zapfendichte bei 75% dorsal (1/mm ²) | | | |
|----------|----------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| | Wochen postnatal | | | |
| | 3 | 12 | 18 | 22 |
| Pax8 +/+ | 11.500 | 10.500 | 9.300 | 9.200 |
| Pax8 +/- | 11.400 | 9.600 | 9.200 | 10.500 |
| Pax8 -/- | 10.200 | 9.900 | 7.700 | 11.100 |
| C57 | 12.900 | n.b. | n.b. | 10.600 |
| Sv129 | 10.500 | n.b. | n.b. | 6.400 |
| V1 | n.b. | 10.000 | n.b. | n.b. |
| V2 | n.b. | 9.000 | n.b. | n.b. |
| V3 | n.b. | n.b. | 10.800 | n.b. |

Tabelle 20 M-Zapfendichte bei 75% dorsal
n.b.= nicht bestimmt

| Tiere | M-Zapfendichte bei 50% dorsal (1/mm ²) | | | |
|----------|----------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| | Wochen postnatal | | | |
| | 3 | 12 | 18 | 22 |
| Pax8 +/+ | 15.200 | 14.900 | 14.100 | 11.700 |
| Pax8 +/- | 14.500 | 13.000 | 12.700 | 14.500 |
| Pax8 -/- | 10.100 | 11.200 | 10.400 | 13.800 |
| C57 | 13.500 | n.b. | n.b. | 13.800 |
| Sv129 | 11.600 | n.b. | n.b. | 8.900 |
| V1 | n.b. | 13.400 | n.b. | n.b. |
| V2 | n.b. | 11.500 | n.b. | n.b. |
| V3 | n.b. | n.b. | 13.100 | n.b. |

Tabelle 21 M-Zapfendichte bei 50% dorsal
n.b.= nicht bestimmt

| Tiere | M-Zapfendichte bei 50% ventral (1/mm ²) | | | |
|----------|-----------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| | Wochen postnatal | | | |
| | 3 | 12 | 18 | 22 |
| Pax8 +/+ | 11.300 | 11.800 | 12.800 | 9.600 |
| Pax8 +/- | 11.600 | 9.900 | 9.400 | 11.000 |
| Pax8 -/- | 7.700 | 9.000 | 6.000 | 10.200 |
| C57 | 11.900 | n.b. | n.b. | 10.200 |
| Sv129 | 8.900 | n.b. | n.b. | 4.300 |
| V1 | n.b. | 9.200 | n.b. | n.b. |
| V2 | n.b. | 10.400 | n.b. | n.b. |
| V3 | n.b. | n.b. | 11.100 | n.b. |

Tabelle 22 M-Zapfendichte bei 50% ventral
n.b.= nicht bestimmt

Ergebnisse

| Tiere | M-Zapfendichte bei 75% ventral (1/mm ²) | | | |
|----------|-----------------------------------------------------|-------|-------|-------|
| | Wochen postnatal | | | |
| | 3 | 12 | 18 | 22 |
| Pax8 +/+ | 9.000 | 6.200 | 9.900 | 6.600 |
| Pax8 +/- | 10.200 | 8.000 | 7.800 | 9.200 |
| Pax8 -/- | 5.500 | 7.600 | 6.700 | 7.900 |
| C57 | 9.400 | n.b. | n.b. | 7.800 |
| Sv129 | 6.800 | n.b. | n.b. | 4.100 |
| V1 | n.b. | 7.100 | n.b. | n.b. |
| V2 | n.b. | 8.800 | n.b. | n.b. |
| V3 | n.b. | n.b. | 7.800 | n.b. |

Tabelle 23 M-Zapfendichte bei 75% ventral
n.b.= nicht bestimmt

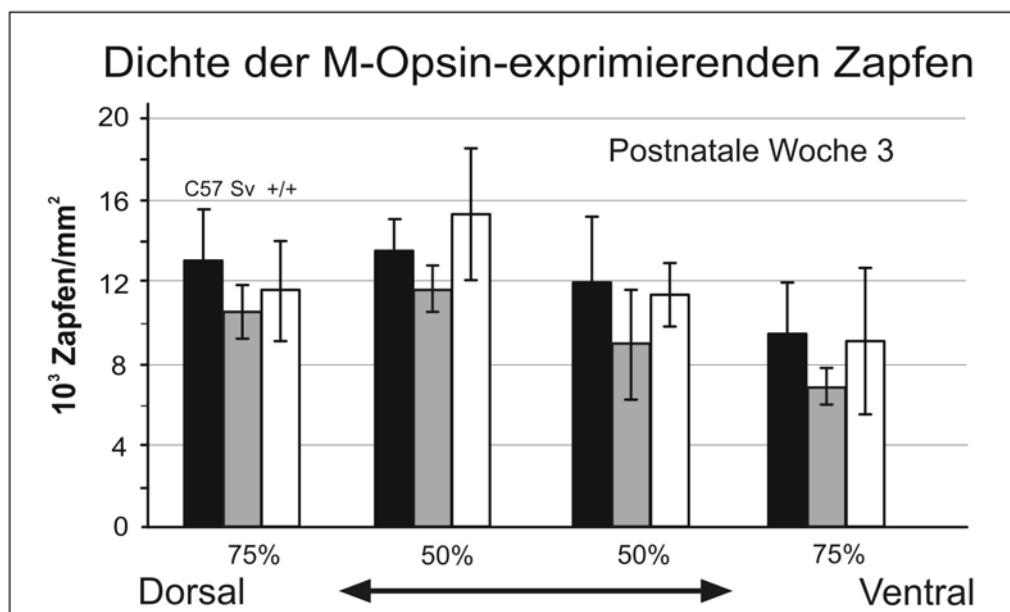
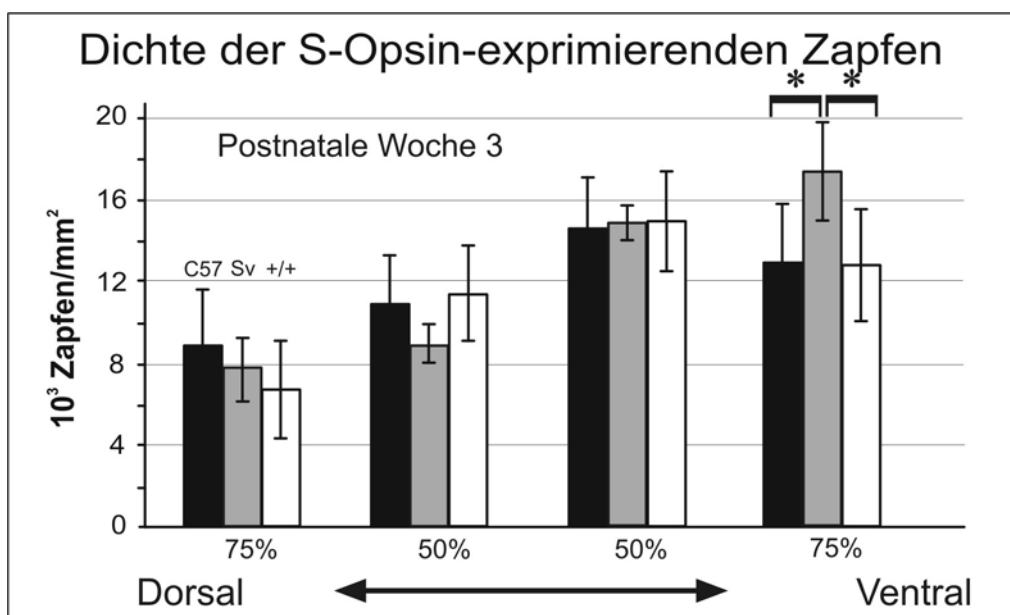


Abbildung 39 S- und M-Zapfendichte von Wildtypen in PWo 3

Ergebnisse

Abbildung 39 S- und M-Zapfendichte von Wildtypen in PWo 3

Säulendiagramme der S- und M-Zapfendichten für alle vier Positionen (50% und 75% dorsal, 50% und 75% ventral) von C57, Sv129 und Pax8 +/+ im Alter von PWo 3. Die Dichte ist in Zapfen/mm² angegeben. Die Signifikanz zwischen zwei Tieren ist durch einen Balken gekennzeichnet. Stern = p < 0,01

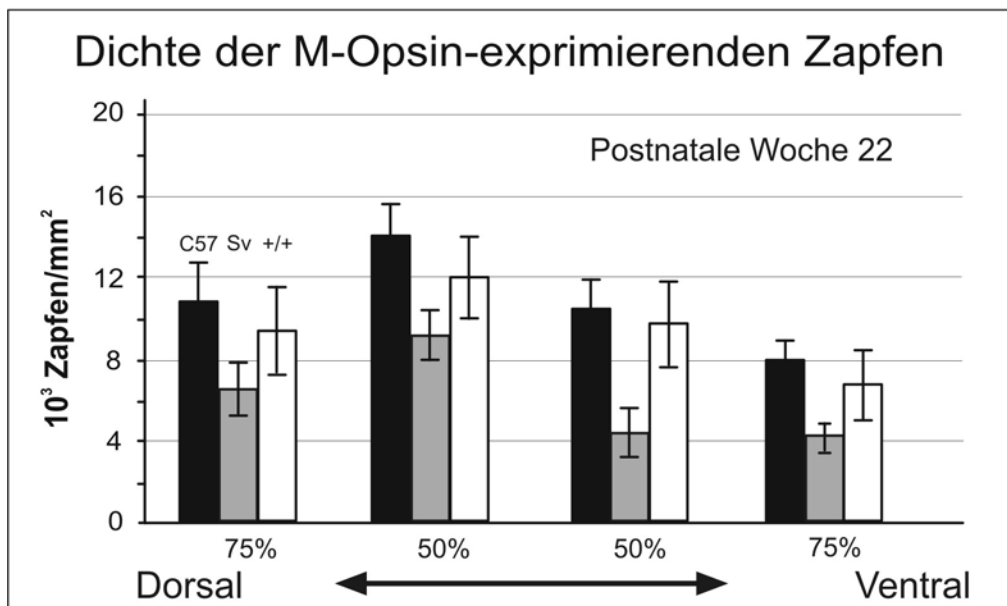
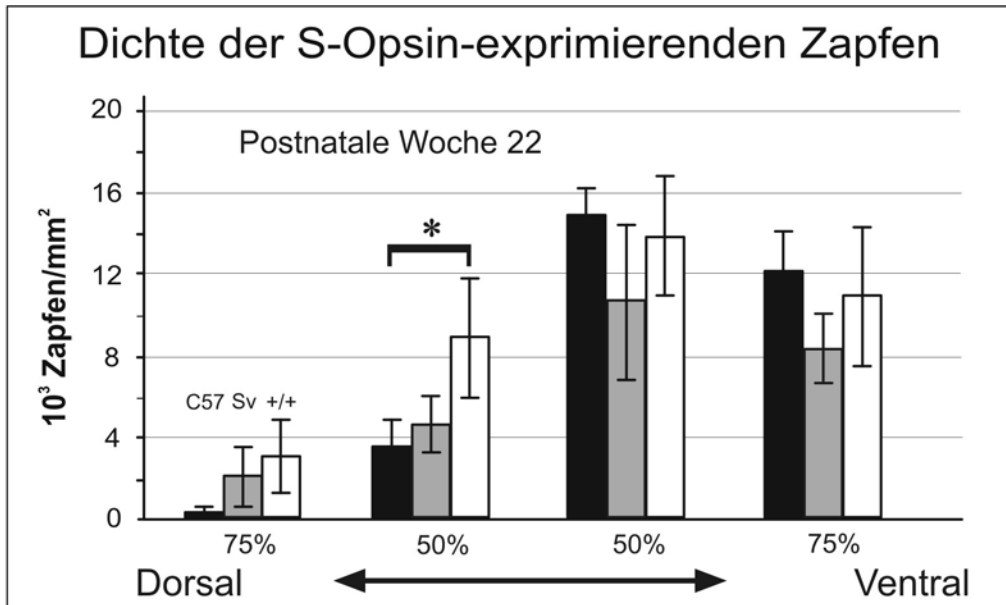


Abbildung 40 S- und M-Zapfendichte von Wildtypen in PWo 22

Säulendiagramme der S- und M-Zapfendichten für alle vier Positionen (50% und 75% dorsal, 50% und 75% ventral) von C57, Sv129 und Pax8 +/+ im Alter von PWo 22. Konventionen wie Abb. 39

3.5 Vergleich des S- und M-Zapfenmusters von Pax8 -/- mit Pax8 +/- und Pax8 +/+

Die oben gezeigten Ergebnisse zeigen, daß das S- und M-Zapfenmuster der Maus bei verschiedenen Stämmen ähnlich aber nicht gleich ist. Es gibt Unterschiede in der absoluten

Dichte und dem Dichtegradienten der S- und M-Zapfen. Daher ist die Auswirkung der Hypothyreose der Pax8 $-/-$ Maus auf die postnatale Entwicklung des Zapfenmusters am besten zu erkennen, wenn Pax8 $+/-$ und Pax8 $+/+$ als Vergleichstiere verwendet werden.

3.5.1 S- und M-Zapfengradient

In Abbildung 41 sind Flachpräparate der ganzen Retina von Pax8 $+/+$, $+/-$ und $-/-$ im Alter von PWo 3 zu sehen, in denen die S-Zapfen durch den Antikörper sc-14363 markiert sind; dunklere Färbung bedeutet hier stärkere Immunreaktivität. Der Dichtegradient der S-Zapfen ist bei Pax8 $+/+$ deutlich zu erkennen, im ventralen Bereich der Retina sind die Dichten höher. Im dorsalen Bereich exprimieren nur wenige Zapfen das S-Opsin. Auch bei Pax8 $+/-$ existiert dieser Gradient mit einer hohen S-Zapfendichte im ventralen Bereich und geringer S-Zapfendichte im dorsalen Bereich der Retina. Allerdings erscheint der Gradient anhand dieses Präparates in Pax8 $+/-$ flacher als bei Pax8 $+/+$. In Pax8 $-/-$ ist offenbar kein Gradient zwischen der ventralen und dorsalen Retina vorhanden, im dorsalen Bereich wird das S-Opsin genauso stark exprimiert wie im ventralen Bereich. Das Fehlen des Schilddrüsenhormons bewirkt also eine stärkere Expression des S-Opsins im dorsalen Bereich der Retina.

Auch die M-Zapfen wurden immunzytochemisch mit dem Antikörper JH 492 markiert (Abb. 42). Der dorso-ventrale Gradient der M-Zapfen ist in der Retina von Pax8 $+/+$ deutlich zu erkennen. Die M-Opsin Expression ist im dorsalen Bereich stärker als im ventralen Bereich, in dem das M-Opsin nur schwach exprimiert wird. Zwischen Pax8 $+/+$ und Pax8 $+/-$ gibt es keinen Unterschied in der Expression des M-Opsins. Die Expression des M-Opsins in Pax8 $-/-$ erscheint gestört. Nur wenige Zapfen in der zentralen Retina enthalten das M-Opsin. Somit hat die Hypothyreose anscheinend auch einen Einfluß auf die Expression des M-Opsins.

Ergebnisse

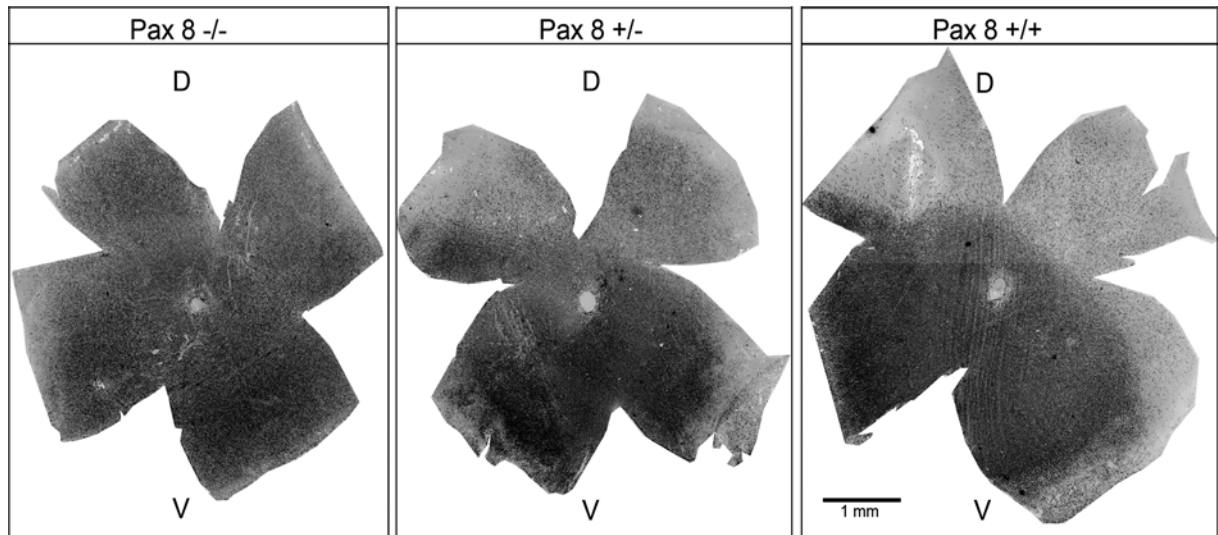


Abbildung 41 S-Zapfenverteilung über die Retina bei Pax8

Flachpräparate je einer Retina von Pax8 +/+, +/- und -/- im Alter von PWo 3, gefärbt mit dem Antikörper sc-14363 zur Sichtbarmachung des S-Opsins in den Zapfen. Die dunklen Bereiche in der Retina zeigen die Färbung der S-Zapfen. Die Skala gilt für alle drei Bilder. D dorsal, V ventral

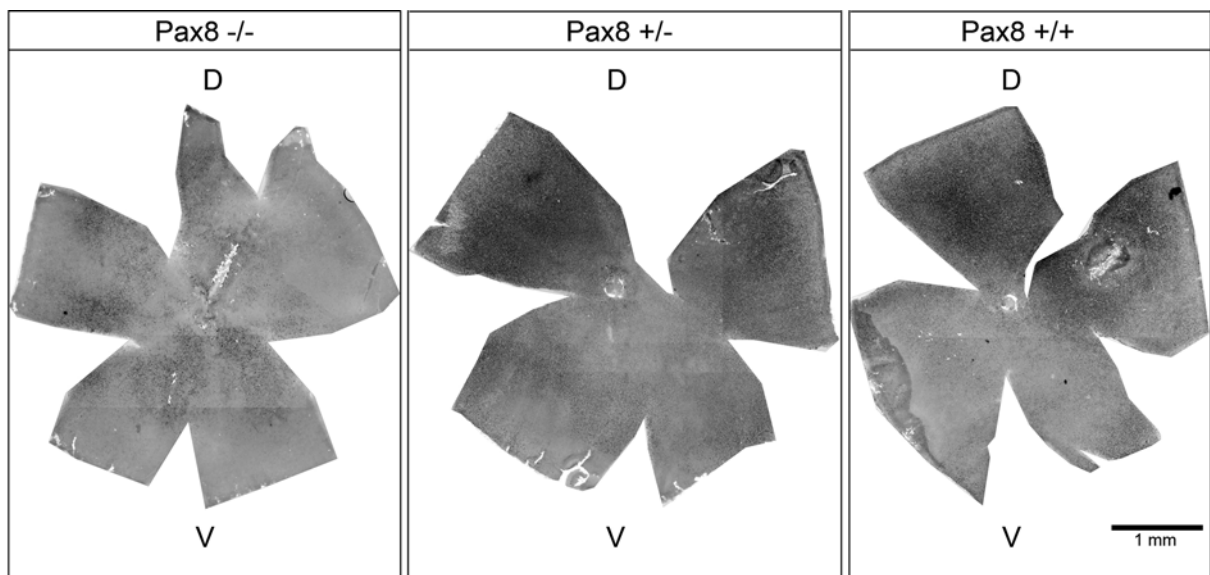


Abbildung 42 M-Zapfenverteilung über die Retina bei Pax8

Flachpräparate je einer Retina von Pax8 +/+, +/- und -/- im Alter von PWo 3, gefärbt mit dem Antikörper JH 492 zur Sichtbarmachung des M-Opsins in den Zapfen. Die dunklen Bereiche in der Retina zeigen die Färbung der M-Zapfen. Die Skala gilt für alle drei Bilder. D dorsal, V ventral

3.5.2 Postnatale Entwicklung des S- und M-Zapfenmusters bei Pax8

Die Expression des S- und M-Opsins in den Zapfen ist für dieselben Positionen der Retina, die bei dem Vergleich der Wildtypen verwendet wurden (50% und 75% dorsal, 50% und 75% ventral), dargestellt (Abb. 43-48). Das S-Zapfenmuster ist in allen drei Altersstufen PWo 3 (Abb. 43), PWo 12 (Abb. 44) und PWo 22 (Abb. 45) in den Retinae von Pax8 +/+ und +/-

Ergebnisse

identisch. Die adulten Tiere aller drei Genotypen hatten ein Alter zwischen PWo 20 und PWo 24, sie werden hier als PWo 22 zusammengefaßt.

Die Expression des S-Opsins ist in den ventralen Bereichen stärker. In den dorsalen Bereichen sind nur wenige S-Zapfen vorhanden. Die Expression des S-Opsins in Pax8 $-/-$ hingegen ist über die gesamte Retina gleich stark und auch die Zahl der S-Zapfen ist im ventralen und dorsalen Bereich gleich hoch. Dieses trifft sowohl für das junge postnatale Stadium der Retina (PWo 3) als auch für die adulte Retina (PWo 12 und PWo 22) zu.

Das M-Opsin wird offenbar in allen drei Retinae von Pax8 $+/+$, $+/-$ und $-/-$ nach demselben Muster exprimiert (Abb. 46, 47, 48). In allen drei Altersstadien ist die Zahl der Zapfen, die das M-Opsin enthalten, über die gesamte Retina gleich, aber im ventralen Bereich wird das M-Opsin schwächer exprimiert. Die Anzahl der M-Zapfen scheint zum Zeitpunkt PWo 3 bei Pax8 $-/-$ insgesamt geringer zu sein als bei Pax8 $+/+$ und $+/-$. Im Alter PWo 22 scheint die Anzahl der M-Zapfen in allen drei Tieren gleich zu sein.

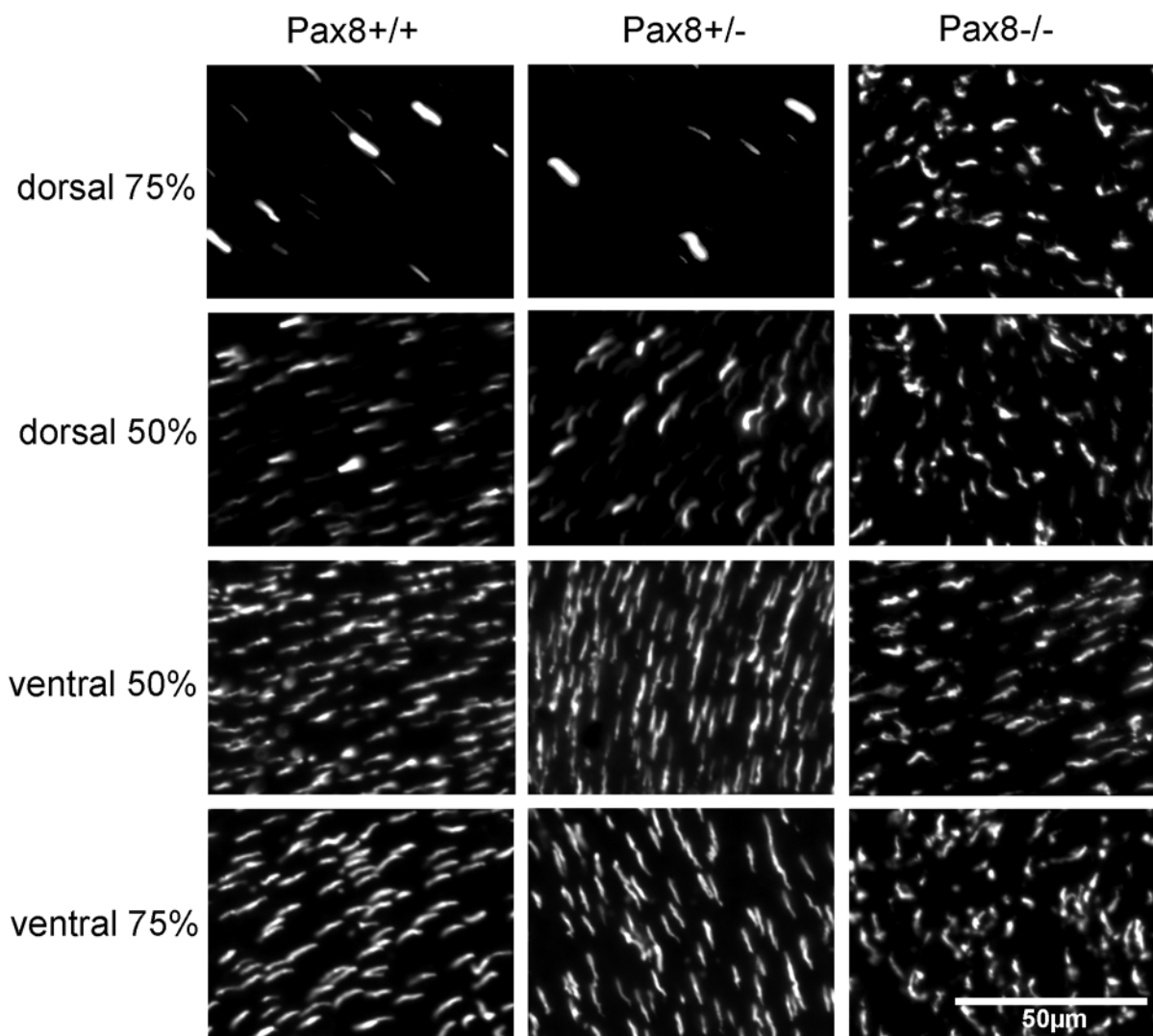


Abbildung 43 S-Zapfen von Pax8-Genotypen bei PWo 3

Abbildung 43 S-Zapfen von Pax8-Genotypen bei PWo 3

Flachpräparate der Retina von Pax8 +/+, +/- und -/- bei PWo 3, gefärbt mit dem Antikörper sc-14363 zur Sichtbarmachung des S-Opsins in den Zapfen. Für jeden Genotyp ist ein zentraler (50%) und peripherer (75%) Bereich der dorsalen und ventralen Retina gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder.

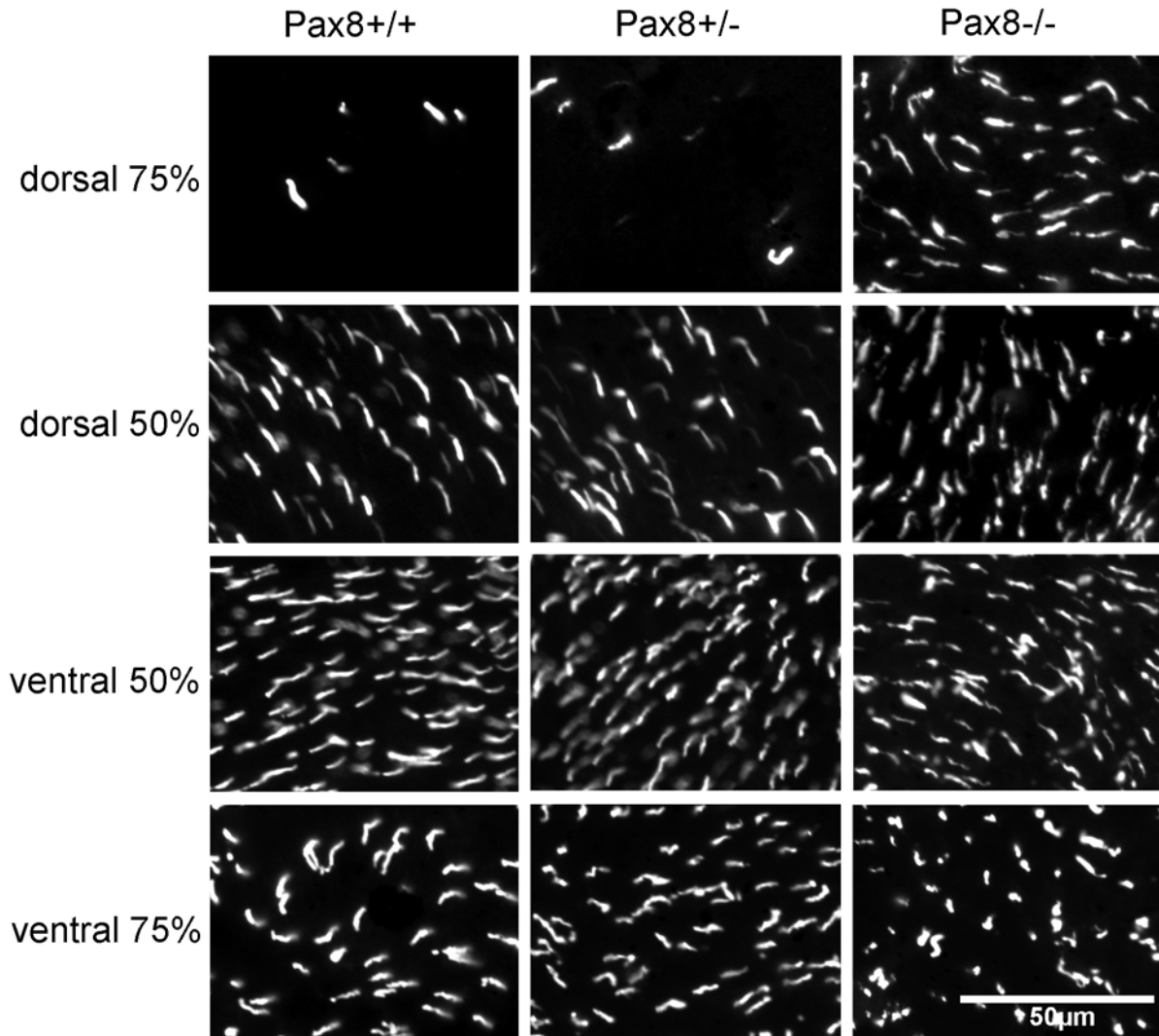


Abbildung 44 S-Zapfen von Pax8-Genotypen bei PWo 12

Flachpräparate der Retina von Pax8 +/+, +/- und -/- bei PWo 12, gefärbt mit dem Antikörper sc-14363. Für jeden Genotyp ist ein zentraler (50%) und peripherer (75%) Bereich der dorsalen und ventralen Retina gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder.

Ergebnisse

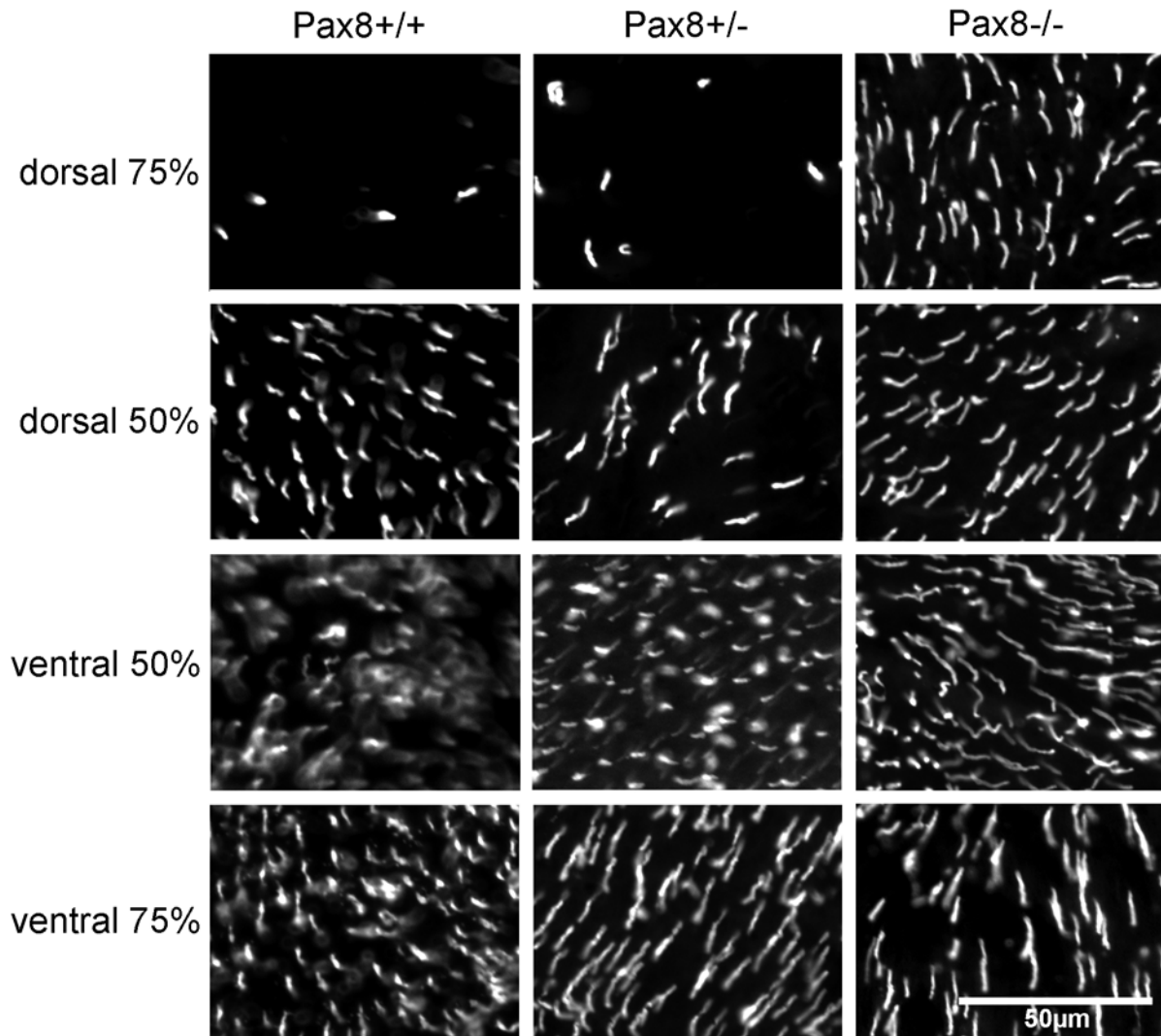


Abbildung 45 S-Zapfen von Pax8-Genotypen bei PWO 22

Flachpräparate der Retina von Pax8 ^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} im adulten Alter PWO 22, gefärbt mit dem Antikörper sc-14363. Für jeden Genotyp ist ein zentraler (50%) und peripherer (75%) Bereich der dorsalen und ventralen Retina gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder.

Ergebnisse

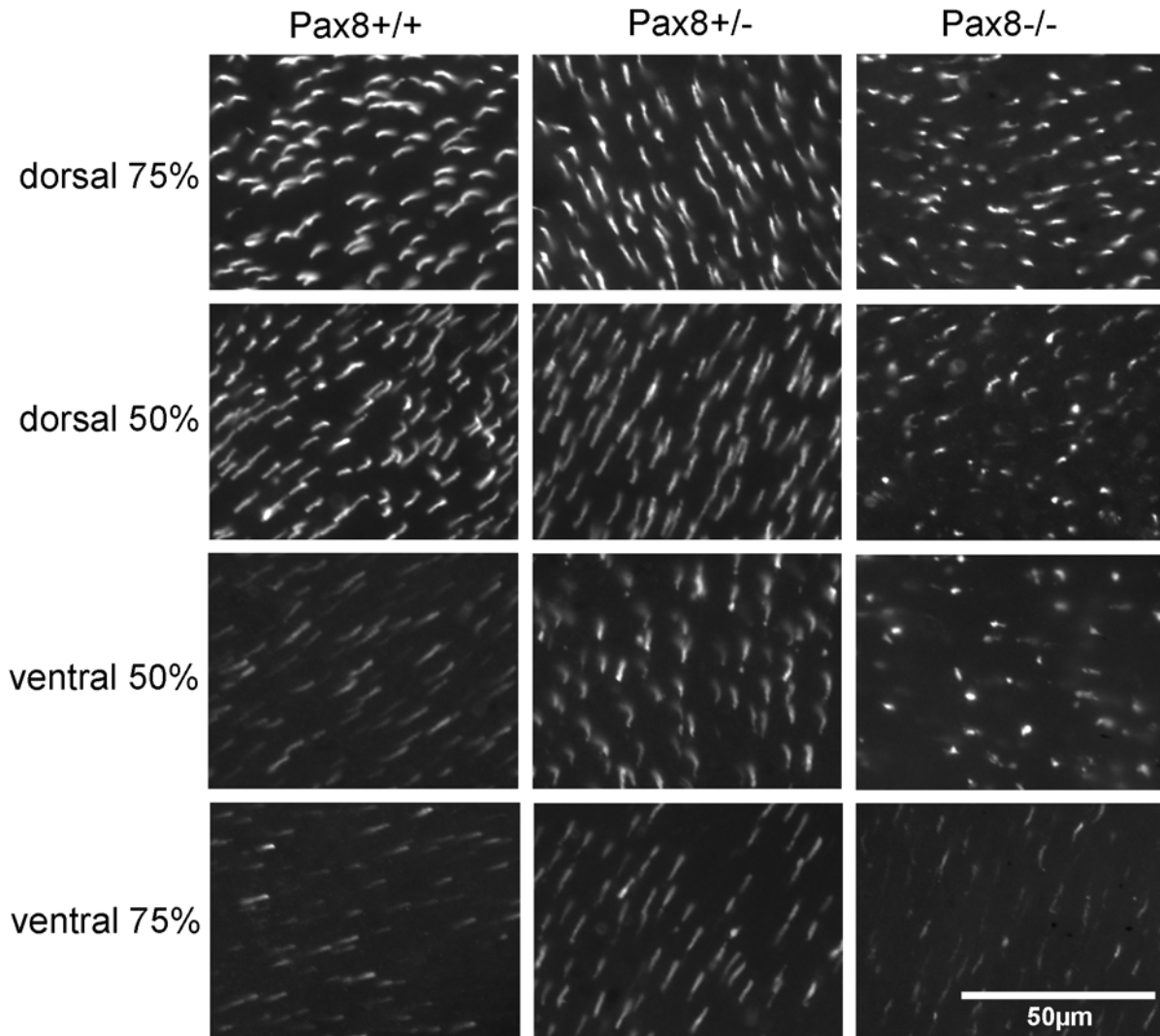


Abbildung 46 M-Zapfen von Pax8-Genotypen bei PWo 3

Flachpräparate der Retina von Pax8 ^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} bei PWo 3, gefärbt mit dem Antikörper JH 492 zur Sichtbarmachung des M-Opsins in den Zapfen. Für jeden Genotyp ist ein zentraler (50%) und peripherer (75%) Bereich der dorsalen und ventralen Retina gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder.

Ergebnisse

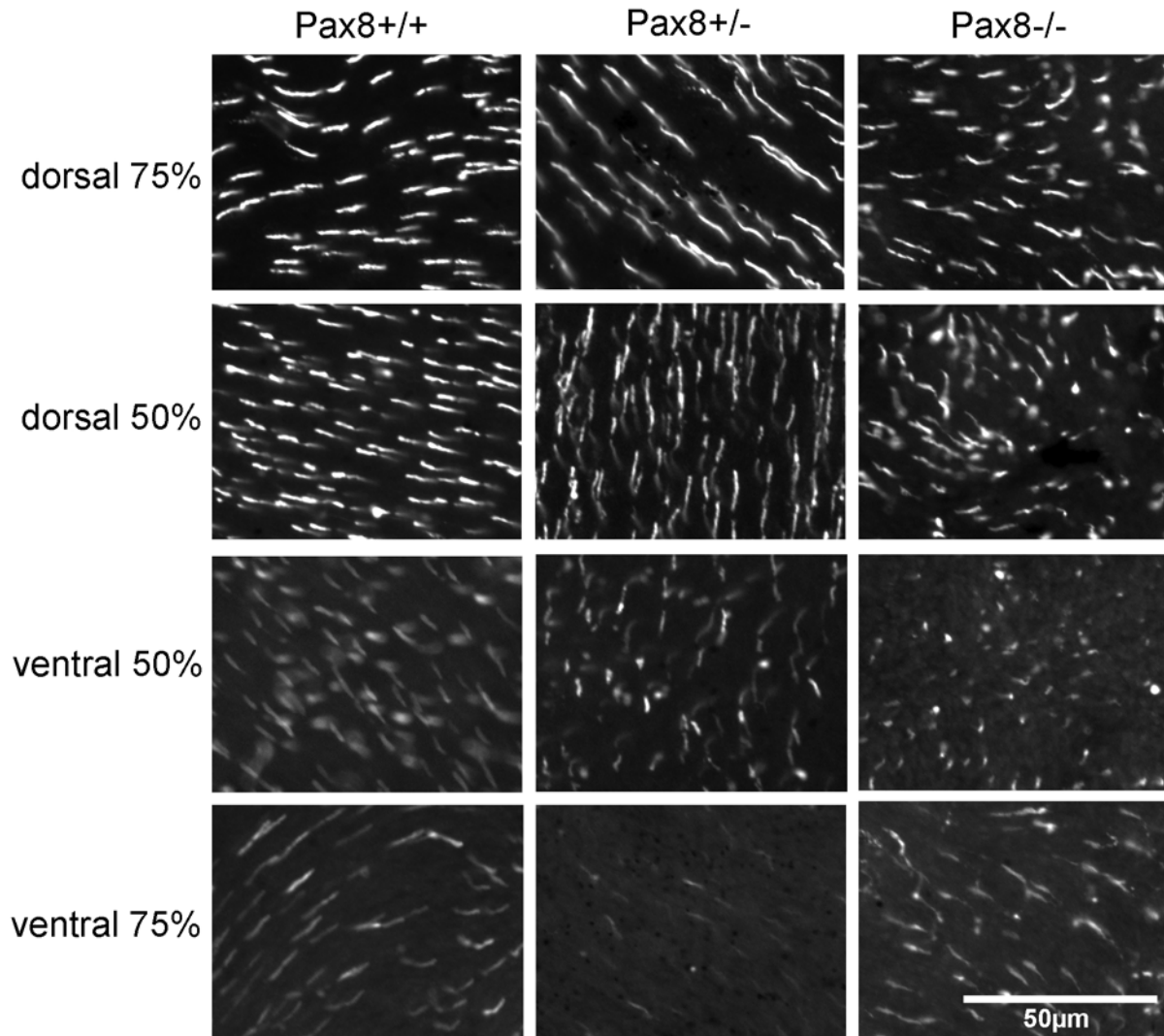


Abbildung 47 M-Zapfen von Pax8-Genotypen bei PWO 12

Flachpräparate der Retina von Pax8 ^{+/+}, ^{+/-} und ^{-/-} bei PWO 12, gefärbt mit dem Antikörper JH 492. Für jeden Genotyp ist ein zentraler (50%) und peripherer (75%) Bereich der dorsalen und ventralen Retina gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder.

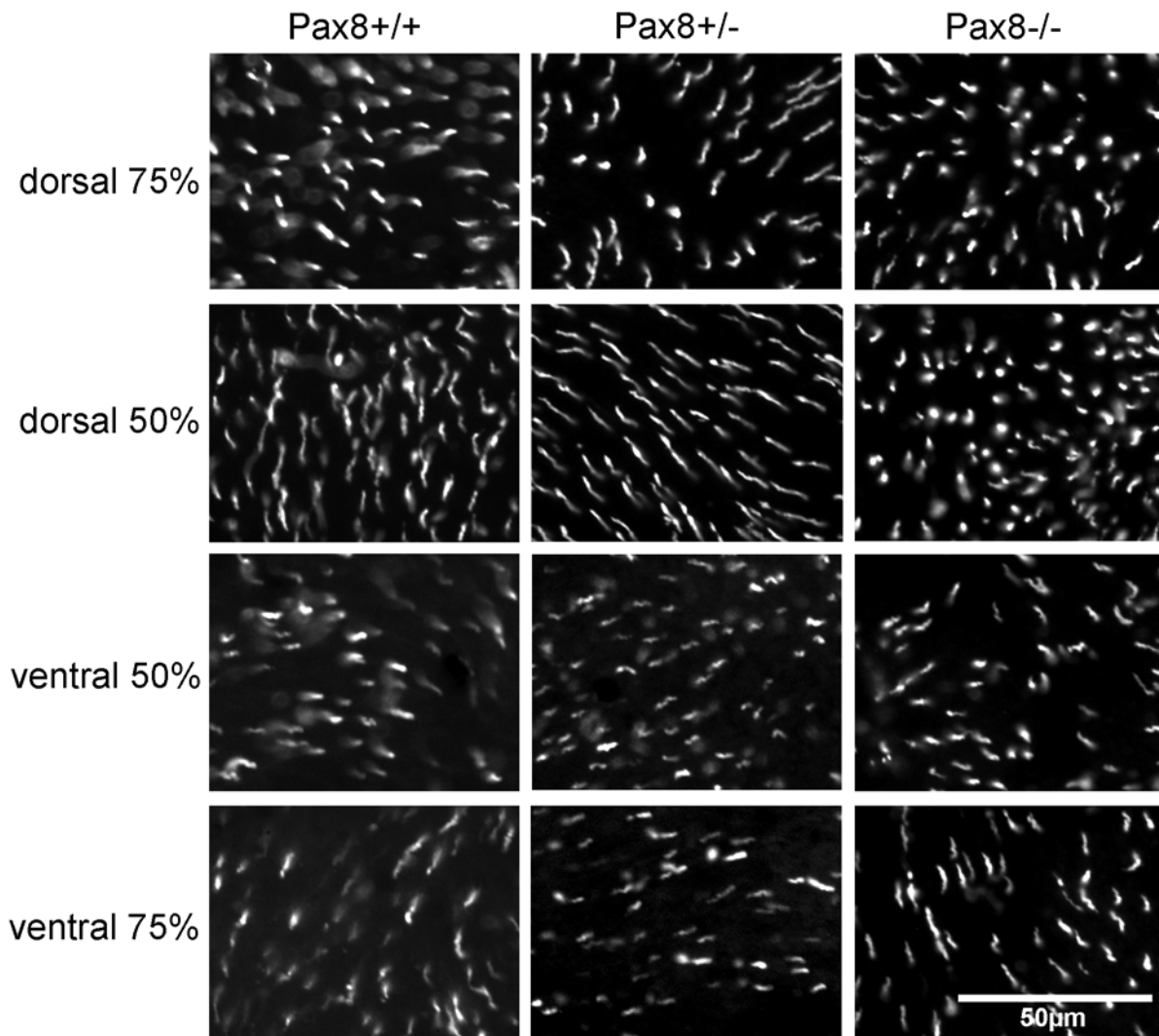


Abbildung 48 M-Zapfen von Pax8-Genotypen bei PWO 22

Flachpräparate der Retina von Pax8 +/+, +/- und -/- im adulten Alter PWO 22, gefärbt mit dem Antikörper JH 492. Für jeden Genotyp ist ein zentraler (50%) und peripherer (75%) Bereich der dorsalen und ventralen Retina gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder.

3.5.3 Verteilung der mRNA von S- und M-Opsin im Alter PWO 3

Auch anhand der mRNA, die in den Somata der Zapfen lokalisiert ist und durch In-situ-Hybridisierung sichtbar gemacht werden kann, sind die Unterschiede in der Expression von den S- und M-Opsinen zwischen Pax8+/+, +/- und -/- zu erkennen (Abb. 49, 50). Die Verteilung der mRNA des S-Opsins (S-Opsin-Transkript) entspricht dem Muster der S-Zapfen, die durch Immunfärbung des S-Opsins identifiziert werden konnten. Das Muster des Transkripts ist in der Retina von Pax8 +/+ und +/- identisch (Abb. 49). Weniger Zapfen in der dorsalen Retina enthalten die mRNA des S-Opsin. Auch das Muster, das sich durch die Färbung der mRNA des S-Opsins von Pax8 -/- ergibt, entspricht dem Zapfenmuster der S-Opsinfärbung. Die Expression des S-Opsin-Transkripts ist über die gesamte Retina gleich. Es scheint, daß die Expression des S-Opsin-Transkripts in der ventralen Retina von Pax8 -/-

Ergebnisse

etwas höher ist als in der dorsalen Retina. Dennoch wird das Transkript in der dorsalen Retina von Pax8 $-/-$ sehr viel stärker exprimiert als in den Retinae von Pax8 $+/+$ und $+/-$.

Auch das Zapfenmuster der mRNA des M-Opsins (M-Opsin-Transkript) (Abb. 50) ist gleich dem Muster der M-Opsinsfärbung. In den drei Retinae von Pax8 $+/+$, $+/-$ und $-/-$ ist die Expression der mRNA im dorsalen Bereich höher als im ventralen Bereich. Die Zahl der Zapfen, die das Transkript enthalten, scheint dabei über die gesamte Retina von Pax8 $+/+$ und $+/-$ gleich zu sein. Die Expression der mRNA des M-Opsins ist bei Pax8 $-/-$ im Vergleich zu Pax8 $+/+$ und $+/-$ im ventralen Bereich geringer.

In der hypothyreoten Pax8 $-/-$ Maus ist also die Expression der mRNA beider Opsine ebenso beeinflusst wie die Opsinexpression selbst. Die mRNA des S-Opsins wird in der dorsalen Retina stärker exprimiert. Gleichzeitig wird die mRNA des M-Opsins schwächer exprimiert, besonders auffällig in der ventralen Retina.

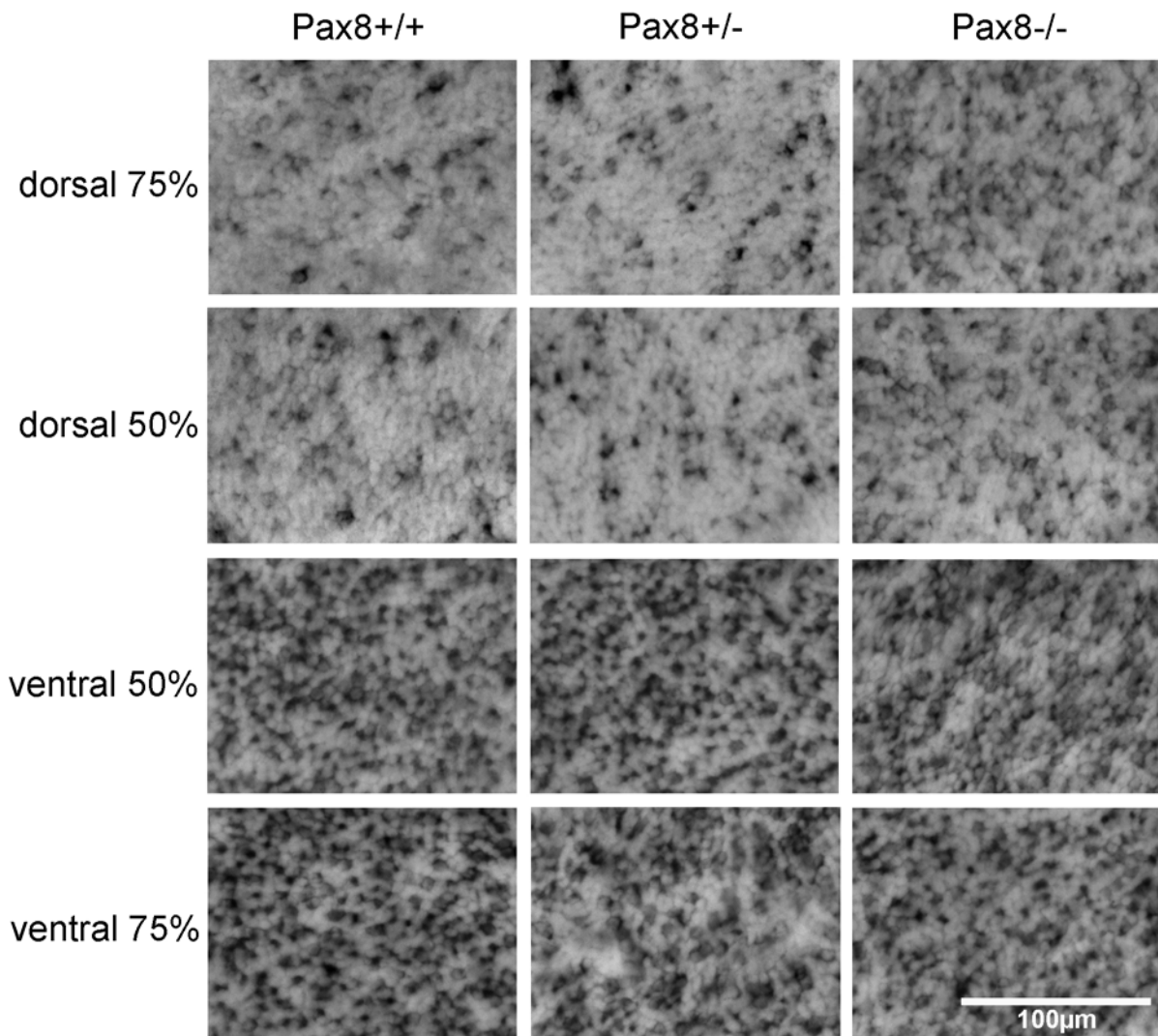


Abbildung 49 S-Opsin-Transkript von Pax8-Genotypen bei PWo 3

Abbildung 49 S-Opisin-Transkript von Pax8 Genotypen bei PWo 3

Das S-Opisin-Transkript ist in Flachpräparaten der Retina von Pax8 +/+, +/- und -/- bei PWo 3 durch In-situ-Hybridisierung in den Zapfensomata sichtbar. Für jeden Genotyp ist ein zentraler (50%) und peripherer (75%) Bereich der dorsalen und ventralen Retina gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder.

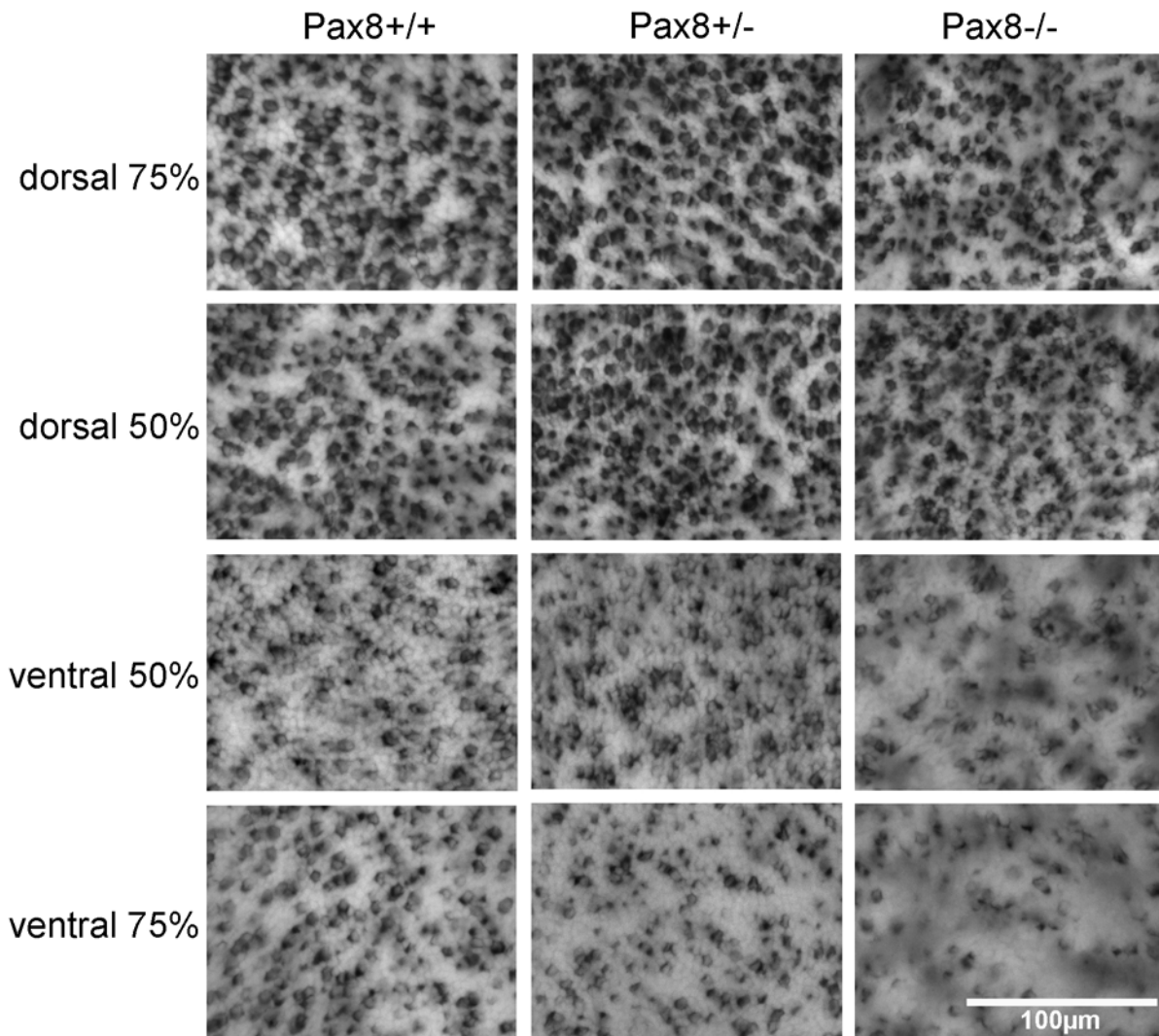


Abbildung 50 M-Opisin-Transkript von Pax8-Genotypen bei PWo 3

Das M-Opisin-Transkript ist in Flachpräparaten der Retina von Pax8 +/+, +/- und -/- bei PWo 3 durch In-situ-Hybridisierung in den Zapfensomata sichtbar. Für jeden Genotyp ist ein zentraler (50%) und peripherer (75%) Bereich der dorsalen und ventralen Retina gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder.

3.5.4 S- und M-Zapfendichte bei Pax8 im Alter von PWo 3 und PWo 22

Auch die S- und M-Zapfendichten von Pax8 +/+, +/- und -/- wurden an Bildern wie unter 3.4.5 beschrieben ermittelt. Die Anzahl der verwendeten Tiere jedes Stammes kann in Tabelle 15 abgelesen werden. PWo 22 entspricht einem tatsächlichen Alter aller Tiere zwischen PWo 20 und PWo 24. Die Werte der S- und M-Zapfendichten sind in Tabelle 16-23 angegeben.

Die S-Zapfendichten im Alter PWo 3 von Pax8 +/+ und +/- sind in allen vier Positionen (50% und 75% dorsal, 50% und 75% ventral) nahezu identisch (Abb. 51). Im zentralen Bereich der

Ergebnisse

ventralen Retina (50% ventral) ist die Dichte am höchsten. Die S-Zapfendichten im dorsalen Bereich sind geringer und nehmen zur Peripherie (75% dorsal) stärker ab. Die S-Zapfendichten von Pax8 $-/-$ sind an allen vier Positionen etwa gleich und in der dorsalen Peripherie (75% dorsal) sind sie größer als die Dichten von Pax8 $+/+$ und $+/-$. An den anderen Positionen sind die S-Zapfendichten von Pax8 $-/-$ geringer als bei den Kontrolltieren. Außer im ventralen Zentrum (50% ventral) sind die S-Zapfendichten von Pax8 $+/+$ und $+/-$ signifikant unterschiedlich zu den Dichten von Pax8 $-/-$ ($p < 0,01$). Da die Dichten von Pax8 $+/+$ und $+/-$ nie signifikant unterschiedlich sind, sind in der Abbildung 51 nur die signifikanten Unterschiede zwischen Pax8 $+/+$ und $-/-$ eingezeichnet.

Auch die Dichtewerte der M-Zapfen sind in Pax8 $+/+$ und $+/-$ nie signifikant unterschiedlich (Abb. 51). Der Gradient verläuft gegenläufig zu den S-Zapfendichten, d.h. sie sind dorsal höher als ventral, am niedrigsten sind die Dichten in der ventralen Peripherie (75% ventral). Auch bei Pax8 $-/-$ sind die M-Zapfendichten dorsal höher, aber sie sind an jeder Position geringer als bei Pax8 $+/+$ und $+/-$. Im zentralen Bereich der Retina (50% dorsal und ventral) von Pax8 $-/-$ sind die M-Zapfendichten sogar signifikant niedriger als bei Pax8 $+/+$ ($p < 0,01$). Im Alter von PWo 22 bleiben die Gradienten der S- und M-Zapfendichten in Pax8 $+/+$ und $+/-$ erhalten. Die höchste Dichte der S-Zapfen ist im Bereich 50% ventral und die niedrigsten Dichte im Bereich 75% dorsal (Abb. 52). Die S-Zapfendichten von Pax8 $+/-$ sind im ventralen Bereich geringfügig höher als bei Pax8 $+/+$. Im dorsalen Bereich der Retina sind die Dichten von Pax8 $+/+$ und $+/-$ gleich und haben im Vergleich zu PWo 3 in diesem Bereich am stärksten abgenommen. Im ventralen Bereich der Retina von Pax8 $-/-$ haben die Dichten im Vergleich zu PWo 3 zugenommen und erreichen in etwa dieselben Werte wie bei Pax8 $+/+$ und $+/-$. Im dorsalen Bereich der Retina von Pax8 $-/-$ sind die S-Zapfendichten gleich hoch wie im ventralen Bereich und damit höher als bei Pax8 $+/+$ und $+/-$. Für die ventrale Peripherie (75% ventral) ist der Unterschied zwischen Pax8 $-/-$ und den Kontrolltieren signifikant ($p < 0,01$).

Die Dichten der M-Zapfen nehmen in den verschiedenen Positionen der Retina von Pax8 $+/+$ und $+/-$ im Vergleich zu PWo 3 nur geringfügig ab (Abb. 52). Die M-Zapfendichten von Pax8 $-/-$ haben an allen Positionen der Retina im Vergleich zu PWo 3 zugenommen und sind nun gleich mit den Dichten von Pax8 $+/+$ und $+/-$. Die M-Zapfendichten sind unter den Genotypen nun an keiner Position mehr signifikant unterschiedlich.

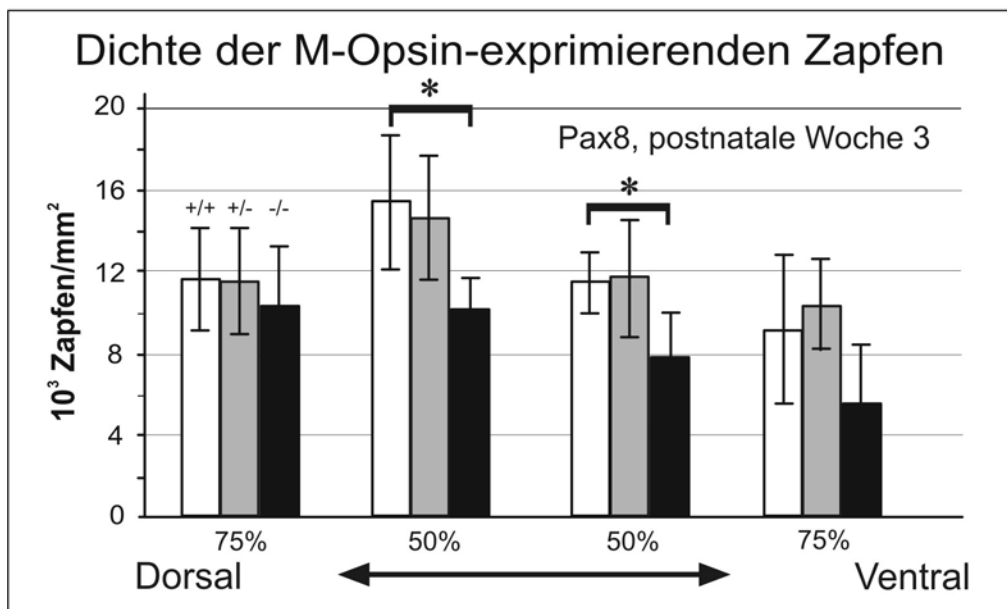
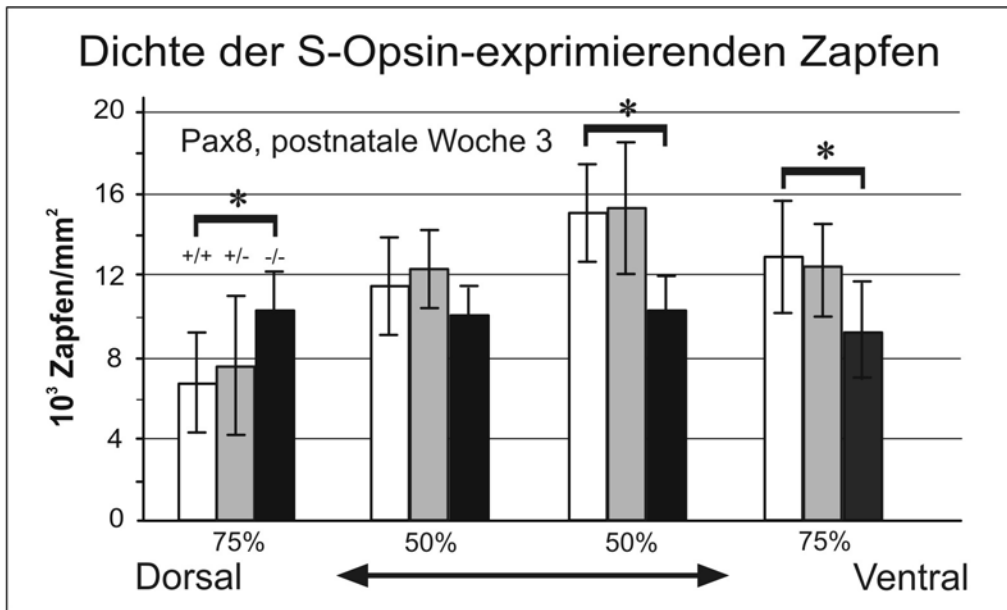


Abbildung 51 S- und M-Zapfendichte von Pax8 in PWo 3

Säulendiagramme der S- und M-Zapfendichten für alle vier Positionen (50% und 75% dorsal, 50% und 75% ventral) von Pax8 +/+, +/- und -/- im Alter von PWo 3. Die Dichte ist in Zapfen/mm² angegeben. Die Signifikanz zwischen zwei Tieren ist durch einen Balken gekennzeichnet. Stern = p < 0,01

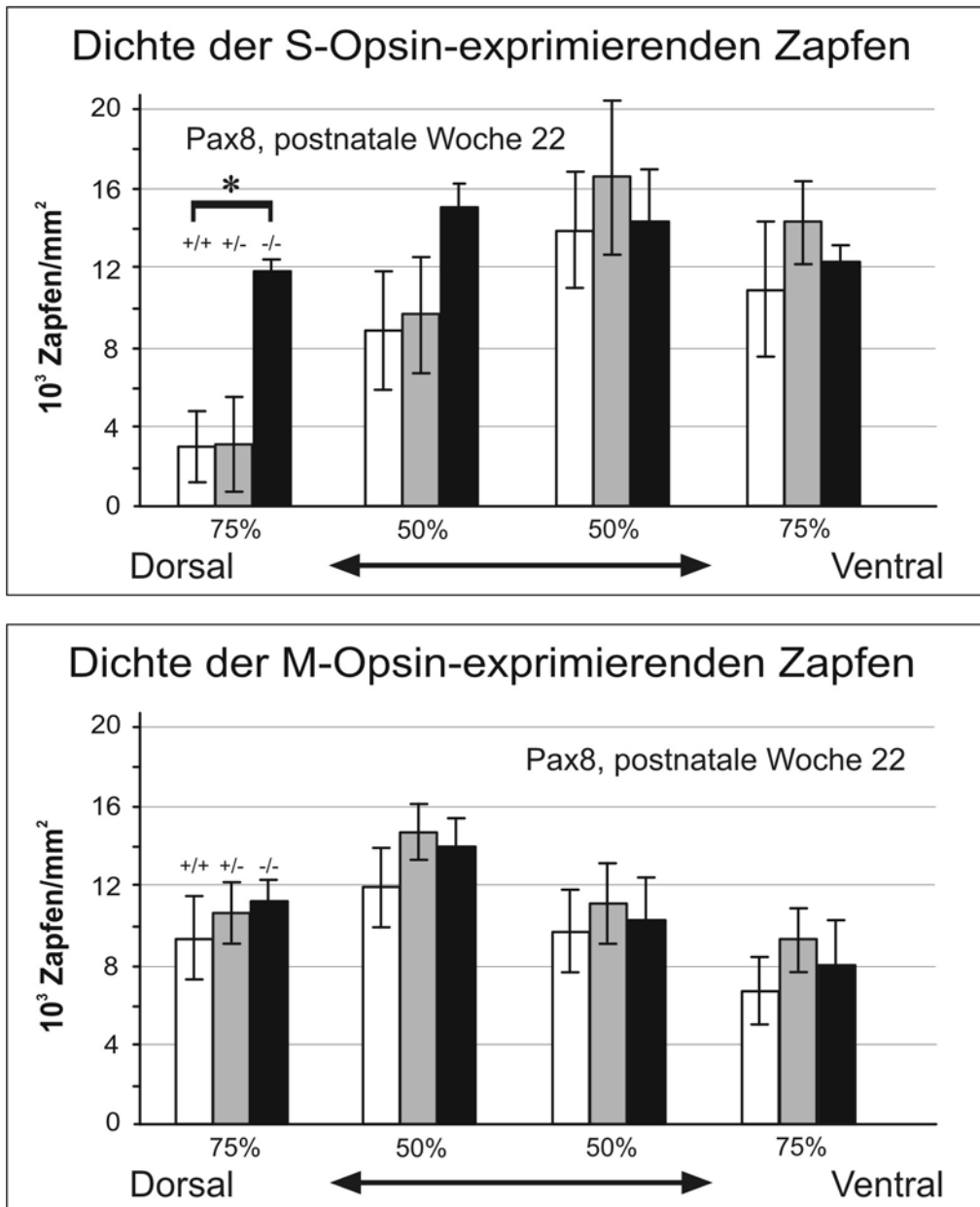


Abbildung 52 S- und M-Zapfendichte von Pax8 in PWo 22

Säulendiagramme der S- und M-Zapfendichte für alle vier Positionen (50% und 75% dorsal, 50% und 75% ventral) von Pax8 +/+, +/- und -/- im Alter von PWo 22. Die Dichte ist in Zapfen/mm² angegeben. Die Signifikanz zwischen zwei Tieren ist durch einen Balken gekennzeichnet. Stern = p < 0,01

3.6 Ermittlung der Gesamtzapfendichte an verschiedenen Positionen der Retina

Um die gesamte Zapfendichte, die sich aus den Dichten der S- und M-Zapfen ergibt, für die vier Positionen zu ermitteln, wurden Doppelfärbung der Retinae für beide Zapfenopsine durchgeführt (siehe 2.5.6.2). Wie im Methodenteil erwähnt, wurde keine Kreuzreaktivität zwischen den Sekundärantikörpern gefunden. Die Spezifität der Primärantikörper, die entweder gegen das S- oder das M-Opsin gerichtet sind, ist durch eine Vielzahl von Publikationen belegt. Da in der Maus sehr viele Zapfen beide Opsine exprimieren

Ergebnisse

(Dualpigmentzapfen), kann nur anhand einer Doppelfärbung die gesamte Zapfendichte ermittelt werden (Abb. 53). Für den dorsalen Bereich der Retina wurde zur Dichte der M-Zapfen (d.h. M-Opsin-exprimierenden Zapfen + Dualpigmentzapfen) die Dichte der Zapfen addiert, die ausschließlich das S-Opsin enthielten. Die Gesamtzapfendichten des ventralen Bereichs entsprachen den Dichten der S-Opsin-exprimierenden Zapfen (d.h. S-Zapfen + Dualpigmentzapfen), da in der ventralen Retina keine Zapfen gefunden wurden, die ausschließlich das M-Opsin exprimierten.

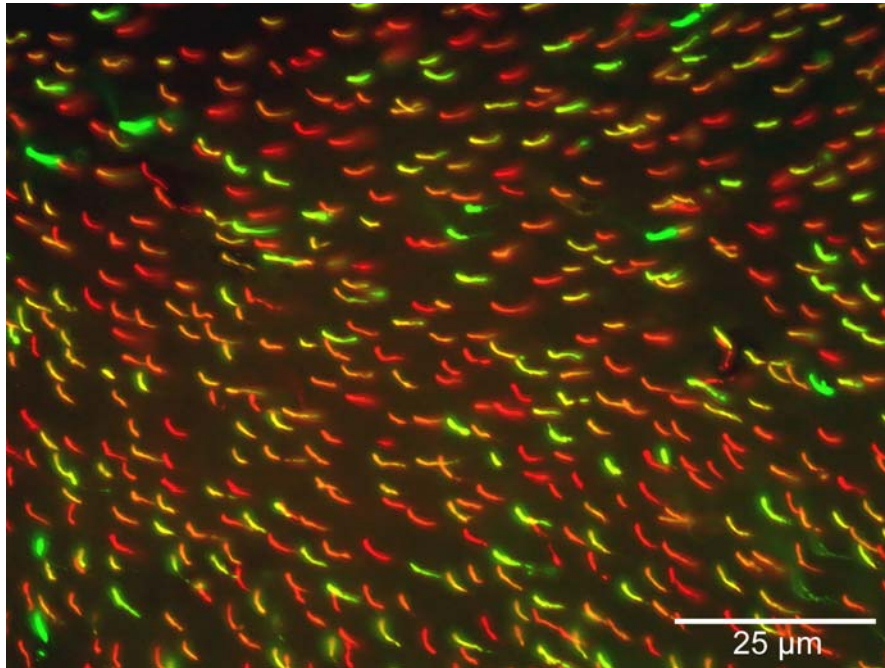


Abbildung 53 Opsindoppelfärbung

Flachpräparat der Retina einer Maus, die mit beiden Opsin-Antikörpern gefärbt wurde (sc-14363, Färbung des S-Opsins; JH 492, Färbung des M-Opsins). Das S-Opsin ist durch rote Fluoreszenz sichtbar gemacht, das M-Opsin durch grüne Fluoreszenz. Wenn beide Opsine in einem Zapfen exprimiert werden, erscheint er gelb.

3.6.1 Markierung der Zapfen durch PNA

Um die Gesamtzapfendichten anhand von Opsinfärbungen bestimmen zu können, muß sichergestellt sein, daß jeder Zapfen zumindest ein Opsin enthält. Durch Färbung mit peanut agglutinin (PNA) zur Markierung aller Zapfen und gleichzeitige Opsinfärbung konnte die Expression eines Opsins in jedem Zapfen nachgewiesen werden (Abb. 54). Somit kann mit einer Doppelfärbung der Opsine die Gesamtzapfendichte ermittelt werden.

Ergebnisse

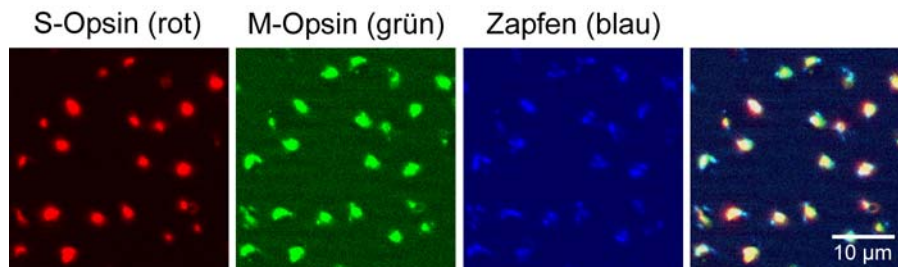


Abbildung 54 Opsinexpression in Zapfen

Flachpräparate der Retina einer Maus wurden mit beiden Opsin-Antikörpern (sc-14363, Färbung des S-Opsins; JH 492, Färbung des M-Opsins) und PNA (Färbung aller Zapfen) gefärbt. Die Bilder zeigen die Einzelfärbungen. Die Überlagerung aller drei Färbungen ist im rechten Bild zu sehen. Das S-Opsin ist durch rote Fluoreszenz sichtbar gemacht, das M-Opsin durch grüne Fluoreszenz und die PNA-Färbung ist blau dargestellt.

3.6.2 Vergleich der postnatalen Entwicklung der Gesamtzapfendichten bei C57, Sv129 und den drei Pax8-Genotypen

In den Abbildungen 55-57 sind die S- und M- und Gesamtzapfen-Dichten an den verschiedenen Positionen (50% und 75% dorsal, 50% und 75% ventral) zu den Zeitpunkten PWo 3, 12 und 22 für C57, Sv129 und die Genotypen von Pax8 zusammengetragen. Die S- und M- sowie Gesamtzapfen-Dichten sind zusätzlich in den Tabellen 16-27 aufgelistet. Tabelle 28 gibt die Anzahl der verwendeten Tiere zur Ermittlung der Gesamtzapfendichten an. Die Gesamtzapfendichte wurde aus doppelgefärbten Präparaten ermittelt. PWo 22 bei den Gesamtzapfendichten entspricht einem tatsächlichen Alter von PWo 18 bei Pax8^{-/-} und PWo 20-24 bei Pax8^{+/+} und Pax8^{+/-}.

Die S-Zapfendichten von C57, Pax8^{+/+} und Pax8^{+/-} sind über den Zeitraum PWo 3 bis PWo 22 in den jeweiligen Bereichen identisch (Abb. 55). Die S-Zapfendichten von Sv129 sind im ventralen Bereich im adulten Alter (PWo 22) unterschiedlich. Vor allem der Abfall der Dichten im Bereich 75% ventral von PWo 3 nach PWo 22 ist gravierend. Der Dichtegradient von ventral nach dorsal ist in C57 und Sv129 im adulten Altersstadium (PWo 22) ausgeprägter als bei Pax8^{+/+} und Pax8^{+/-}. Die S-Zapfendichten von Pax8^{-/-} nehmen mit dem Alter zu. Für den dorsalen Bereich übersteigen sie die Dichten der anderen Tiere. Im ventralen Bereich sind die Dichten mit PWo 3 geringer und steigen mit PWo 22 auf dieselben Werte wie bei den anderen Tieren an.

Die M-Zapfendichten von Sv129 sind im Alter von PWo 3 für den Bereich 50% dorsal und in der ventralen Retina geringer als bei C57, Pax8^{+/+} und Pax8^{+/-} (Abb. 56). Im adulten Alter (PWo 22) sind die Dichten der M-Zapfen an allen vier Stellen geringer als bei PWo 3 und allen anderen adulten Tieren. Die M-Zapfendichten von C57, Pax8^{+/+} und Pax8^{+/-} sind in allen Bereichen und Altersstadien ungefähr gleich. In der Retina von Pax8^{-/-} nehmen die Dichten der M-Zapfen an der Position 50% dorsal und im ventralen Bereich mit dem Alter zu. Im Alter von PWo 22 gleichen sie den Dichten von C57 und den Pax8-Kontrolltieren. Ein ähnliches

Ergebnisse

Bild ergibt sich auch bei der Darstellung der Gesamtzapfendichte (Abb. 57). Für C57, Pax8 +/+ und +/- bleibt die Zapfendichte an den verschiedenen Positionen über die Zeitspanne von PWo 3 bis PWo 22 in etwa gleich. Die Zapfendichten von Sv129 nehmen mit dem Alter ab. Am stärksten ist diese Abnahme der Gesamtzapfendichte im Bereich 75% ventral. Die Gesamtzapfendichten von Pax8 -/- steigen in allen Positionen mit dem Alter an und erreicht in PWo 22 dieselben Werte wie bei C57, Pax8 +/+ und +/-.

| Stämme | Gesamtzapfendichte bei 75% dorsal (1/mm ²) | | | |
|----------|--------------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| | Wochen postnatal | | | |
| | 3 | 12 | 18 | 22 |
| Pax8 +/+ | 10.800 | 13.100 | 9.400 | 10.500 |
| Pax8 +/- | 10.600 | 13.100 | 9.300 | 9.500 |
| Pax8 -/- | 10.000 | 10.200 | 10.300 | n.b. |
| C57 | 13.100 | n.b. | n.b. | 10.600 |
| Sv129 | 10.400 | n.b. | n.b. | 6.700 |
| V3 | n.b. | n.b. | 8.200 | n.b. |

Tabelle 24 Gesamtzapfendichte bei 75% dorsal

n.b.= nicht bestimmt

V3 adult-substituierte Pax8 -/-, nähere Erläuterung siehe 3.8

| Stämme | Gesamtzapfendichte bei 50% dorsal (1/mm ²) | | | |
|----------|--------------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| | Wochen postnatal | | | |
| | 3 | 12 | 18 | 22 |
| Pax8 +/+ | 13.200 | 16.100 | 14.300 | 12.800 |
| Pax8 +/- | 13.800 | 15.400 | 13.500 | 15.100 |
| Pax8 -/- | 9.900 | 11.900 | 13.300 | n.b. |
| C57 | 14.300 | n.b. | n.b. | 13.900 |
| Sv129 | 11.500 | n.b. | n.b. | 9.300 |
| V3 | n.b. | n.b. | 12.100 | n.b. |

Tabelle 25 Gesamtzapfendichte bei 50% dorsal

n.b.= nicht bestimmt

| Stämme | Gesamtzapfendichte bei 50% ventral (1/mm ²) | | | |
|----------|---------------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| | Wochen postnatal | | | |
| | 3 | 12 | 18 | 22 |
| Pax8 +/+ | 14.300 | 16.700 | 18.400 | 13.900 |
| Pax8 +/- | 14.900 | 15.000 | 14.600 | 12.900 |
| Pax8 -/- | 8.900 | 15.200 | 15.100 | n.b. |
| C57 | 14.500 | n.b. | n.b. | 14.500 |
| Sv129 | 14.500 | n.b. | n.b. | 10.500 |
| V3 | n.b. | n.b. | 15.000 | n.b. |

Tabelle 26 Gesamtzapfendichte bei 50% ventral

n.b.= nicht bestimmt

Ergebnisse

| Stämme | Gesamtzapfendichte bei 75% ventral (1/mm ²) | | | |
|----------|---------------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| | Wochen postnatal | | | |
| | 3 | 12 | 18 | 22 |
| Pax8 +/+ | 12.000 | 13.500 | 14.200 | 13.400 |
| Pax8 +/- | 11.900 | 13.600 | 12.000 | 12.100 |
| Pax8 -/- | 8.000 | 12.400 | 11.700 | n.b. |
| C57 | 12.600 | n.b. | n.b. | 11.800 |
| Sv129 | 17.100 | n.b. | n.b. | 8.100 |
| V3 | n.b. | n.b. | 11.100 | n.b. |

Tabelle 27 Gesamtzapfendichte bei 75% ventral
n.b.= nicht bestimmt

| Woche postnatal | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der Gesamtzapfendichte | | | | |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------|-----|-----|----------|-------|
| | Pax8 | | | C57BL/6J | Sv129 |
| | +/+ | +/- | -/- | | |
| 3 | 7 | 6 | 6 | 10 | 6 |
| 12 | 2 | 2 | 2 | n.b. | n.b. |
| 22 | 5 | 2 | 2 | 10 | 10 |

Tabelle 28 Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der Gesamtzapfendichte
n.b.= nicht bestimmt

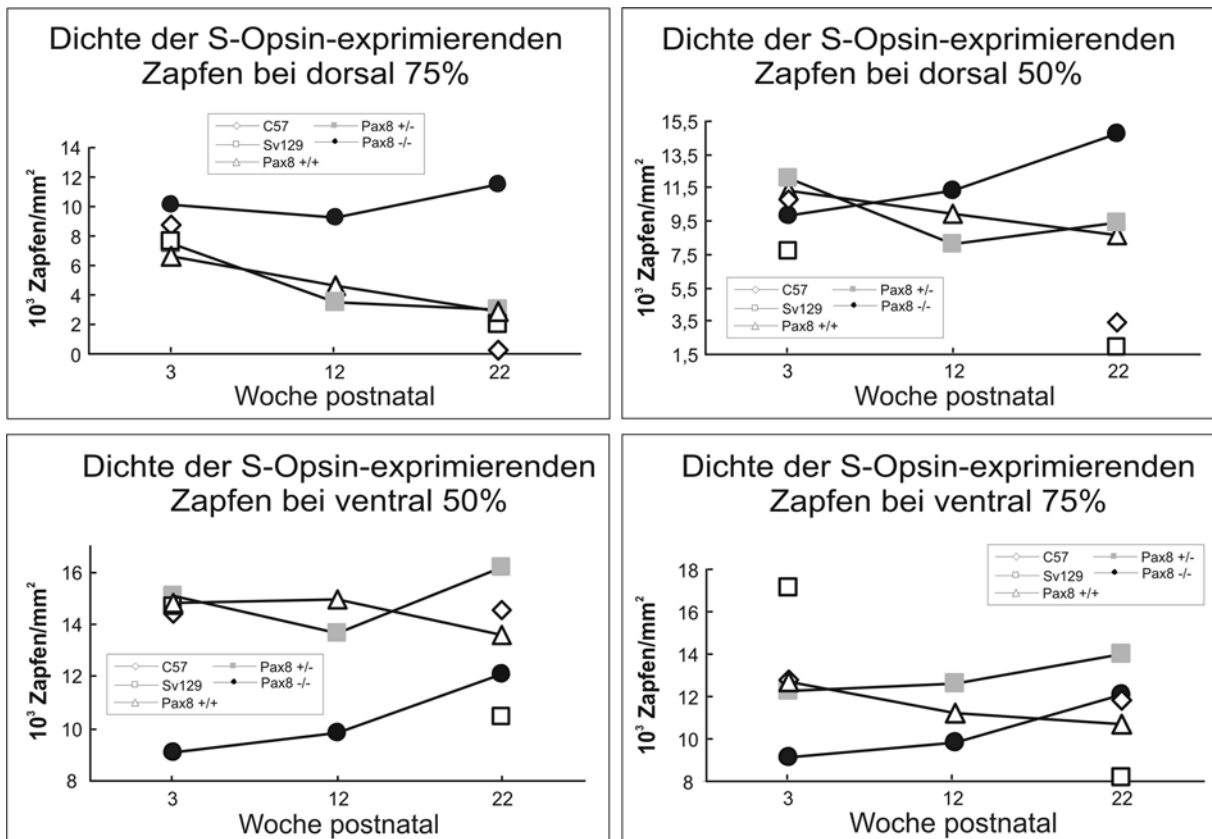


Abbildung 55 Vergleich der S-Zapfendichte

Die S-Zapfendichten von C57, Sv129 und Pax8 +/+, +/-, -/- für die vier Positionen (50% und 75% dorsal, 50% und 75% ventral). Die Dichten sind in Zapfen/mm² angegeben.

Ergebnisse

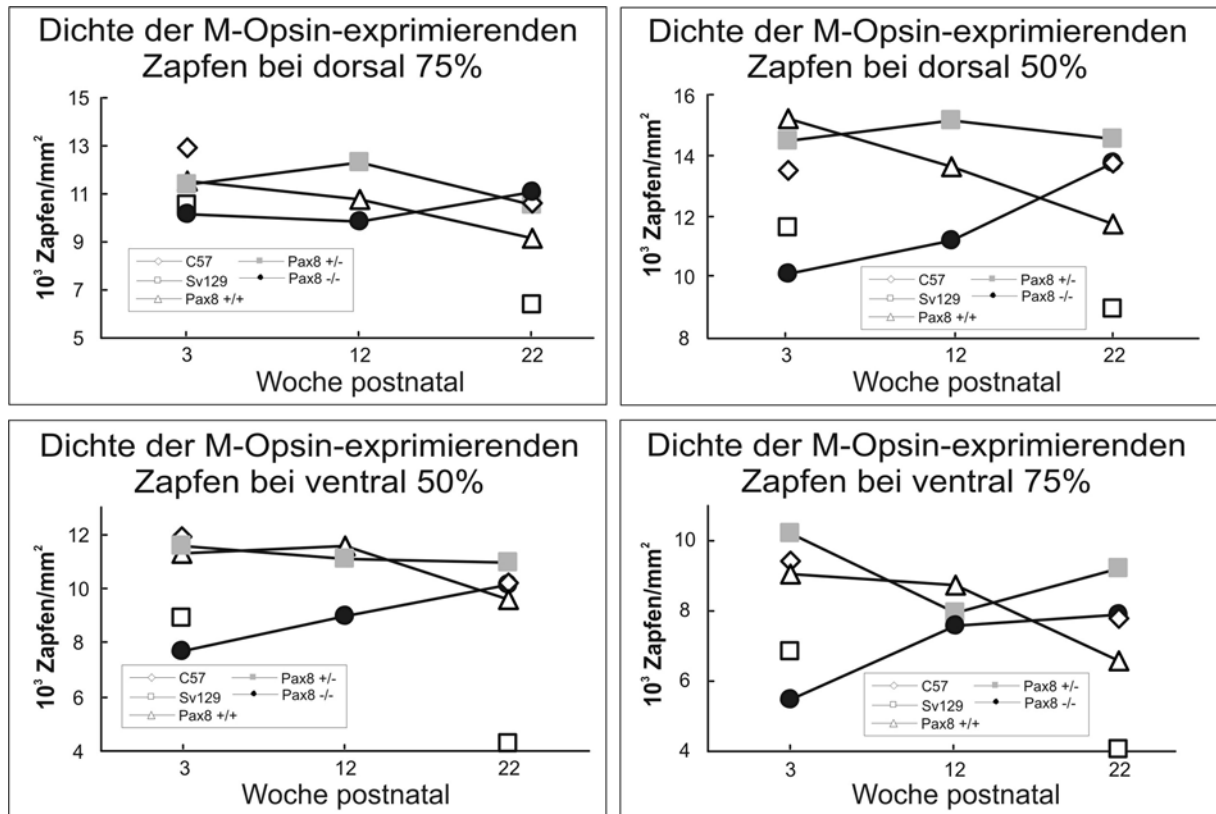


Abbildung 56 Vergleich der M-Zapfendichte

Die M-Zapfendichten von C57, Sv129 und Pax8 +/+, +/-, -/- für die vier Positionen (50% und 75% dorsal, 50% und 75% ventral). Die Dichten sind in Zapfen/ mm^2 angegeben.

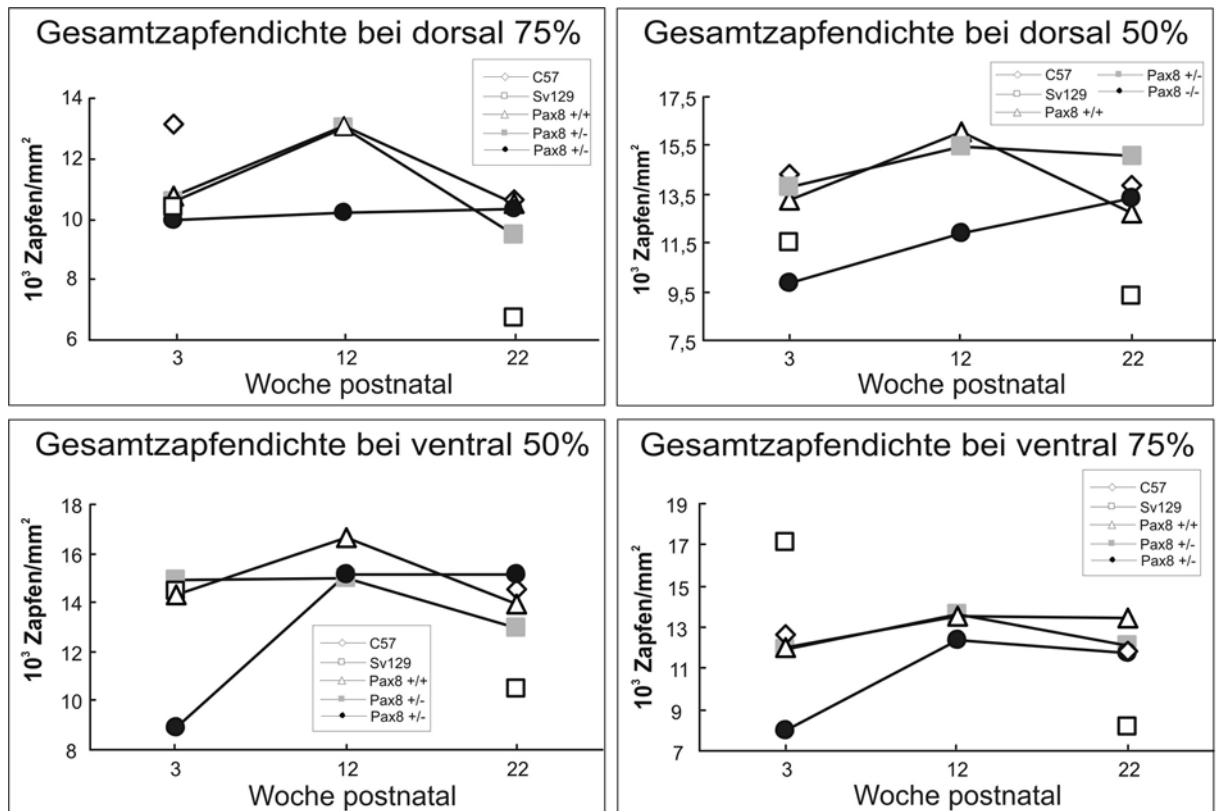


Abbildung 57 Vergleich der Gesamtzapfendichte

Abbildung 57 Vergleich der Gesamtzapfendichte

Die Gesamtzapfendichten von C57, Sv129 und Pax8 +/+, +/-, -/- für die vier Positionen (50% und 75% dorsal, 50% und 75% ventral). Die Dichten sind in Zapfen/mm² angegeben.

3.7 Künstlich erzeugte Euthyreose während der postnatalen Entwicklung von Pax8 -/-

Um die Auswirkung des Schilddrüsenhormons auf die Expression des S- und M-Opsins genauer zu untersuchen, wurden Pax8 -/- während der postnatalen Entwicklung mit Thyroxin substituiert. Pax8 -/- Tiere der Versuchsreihe V1 wurden ihr gesamtes Leben täglich mit 18 ng Thyroxin/g Körpergewicht (Vollzeit-Substitution) behandelt. Pax8 -/- Tiere der Versuchsreihe V2 wurden nur die ersten vier Wochen ihres Lebens täglich mit 18 ng Thyroxin/g Körpergewicht (Teilzeit-Substitution) behandelt und blieben anschließend bis zum Tod im adultem Alter (PWo 12) unbehandelt. Pax8 +/+ und +/- wurden entweder nicht substituiert oder wurden für denselben Zeitraum und mit derselben Menge wie V1 oder V2 mit einer 0,9% NaCl-Lösung behandelt (Kontrolltiere). Die substituierten Kontrolltiere zeigten keine Veränderung in den Schilddrüsenhormonwerten. Sie sind euthyreot. Es gab auch keine Veränderung in der Ausprägung des Zapfenmusters. Eine Veränderung in den Schilddrüsenhormonwerten und der Ausprägung des Zapfenmusters auf Grund der physikalischen Injektion selbst kann bei V1 und V2 deshalb ausgeschlossen werden.

Da die Ergebnisse von Pax8 +/+ und +/- gleich sind werden V1 und V2 in den Abbildungen 58-62 nur mit nicht substituierten Pax8 +/+ verglichen.

3.7.1 Körpergewicht von substituierten Pax8 -/-

Abbildung 58 vergleicht das Körpergewicht von substituierten Pax8 -/- mit den unbehandelten Kontrolltieren Pax8 +/+ gleichen Alters. Die Anzahl der verwendeten Tiere ist in Tabelle 29 angegeben.

Es ist zu sehen, daß das Körpergewicht von Pax8 +/+, V1 und V2 mit dem Alter gleichermaßen zunimmt. Die V1 und V2 haben in etwa dasselbe Gewicht wie die Kontrolltiere. Auch nach der Beendigung der Substitution von V2 ist das Körpergewicht in etwa identisch mit Pax8 +/+ und V1.

| Woche postnatal | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Körpergewichts | | |
|-----------------|----------------------------------------------------------------|----|----|
| | Pax8 | | |
| | +/+ | V1 | V2 |
| 1 | 6 | 9 | 9 |
| 2 | 6 | 9 | 9 |
| 3 | 6 | 9 | 9 |
| 4 | 3 | 3 | 3 |
| 8 | 4 | 7 | 2 |
| 12 | 5 | 7 | 2 |

Tabelle 29 Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Körpergewichts von V1 und V2
Pax8 +/+ : nicht substituiert

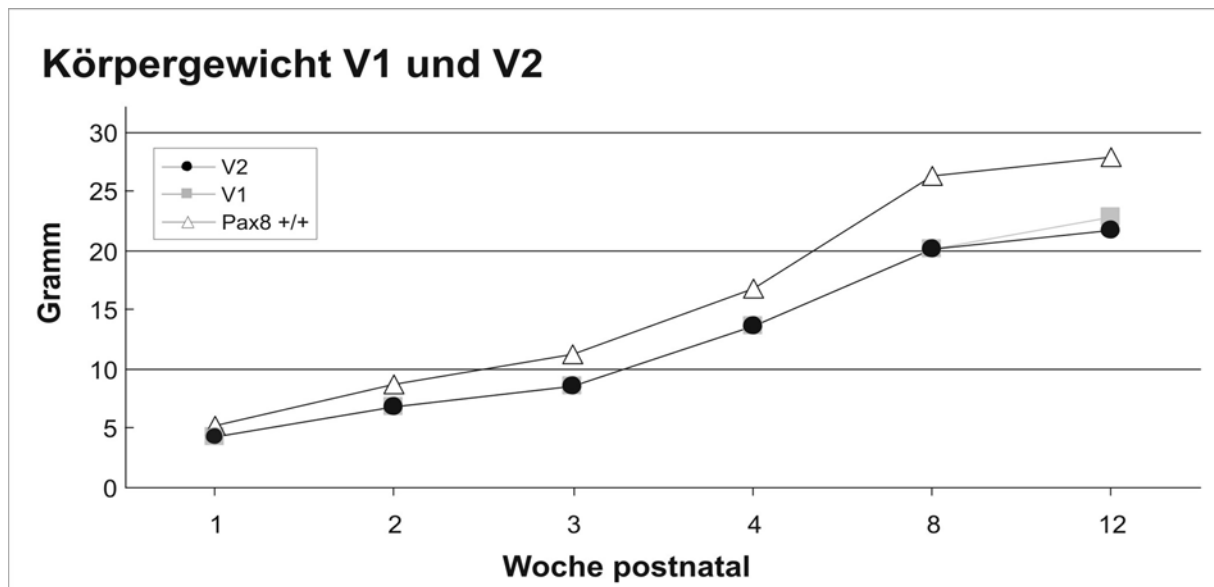


Abbildung 58 Körpergewicht von V1 und V2

3.7.2 Schilddrüsenhormongehalt im Serum von substituierten Pax8 -/-

Abbildung 59 zeigt, daß V1 den gleichen Schilddrüsenhormongehalt hat wie Pax8 +/+ gleichen Alters. Der Gehalt des fT3 liegt bei 0,005 nmol/l. fT4 ist bei V1 (0,025 nmol/l) etwas geringer als bei Pax8 +/+ (0,03 nmol/l). Auch die Konzentration der gebundenen Schilddrüsenhormone sind identisch (0,8 nmol/l T3, 40 nmol/l T4). V2 ist hingegen hypothyreat. Alle Werte des Schilddrüsenhormons liegen unterhalb der Werte für Pax8 +/+ (fT3, fT4) oder sind nicht detektierbar (T3, T4). Das fT3 hat einen Wert von 0,002 nmol/l und fT4 liegt unter 0,005 nmol/l. Die Anzahl der zur Hormonbestimmung verwendeten Tiere ist in Tabelle 30 angegeben.

| Woche postnatal | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Schilddrüsenhormongehalts im Serum | | | | | |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|------|------|
| | Pax8 | | | | | |
| | +/+ | +/- | -/- | V1 | V2 | V3 |
| 12 | 6 | 13 | 2 | 7 | 3 | n.g. |
| 18 | 2 | 2 | 2 | n.g. | n.g. | 2 |

Tabelle 30 Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Schilddrüsenhormongehalts im Serum von substituierten Pax8
n.g. = nicht gemessen

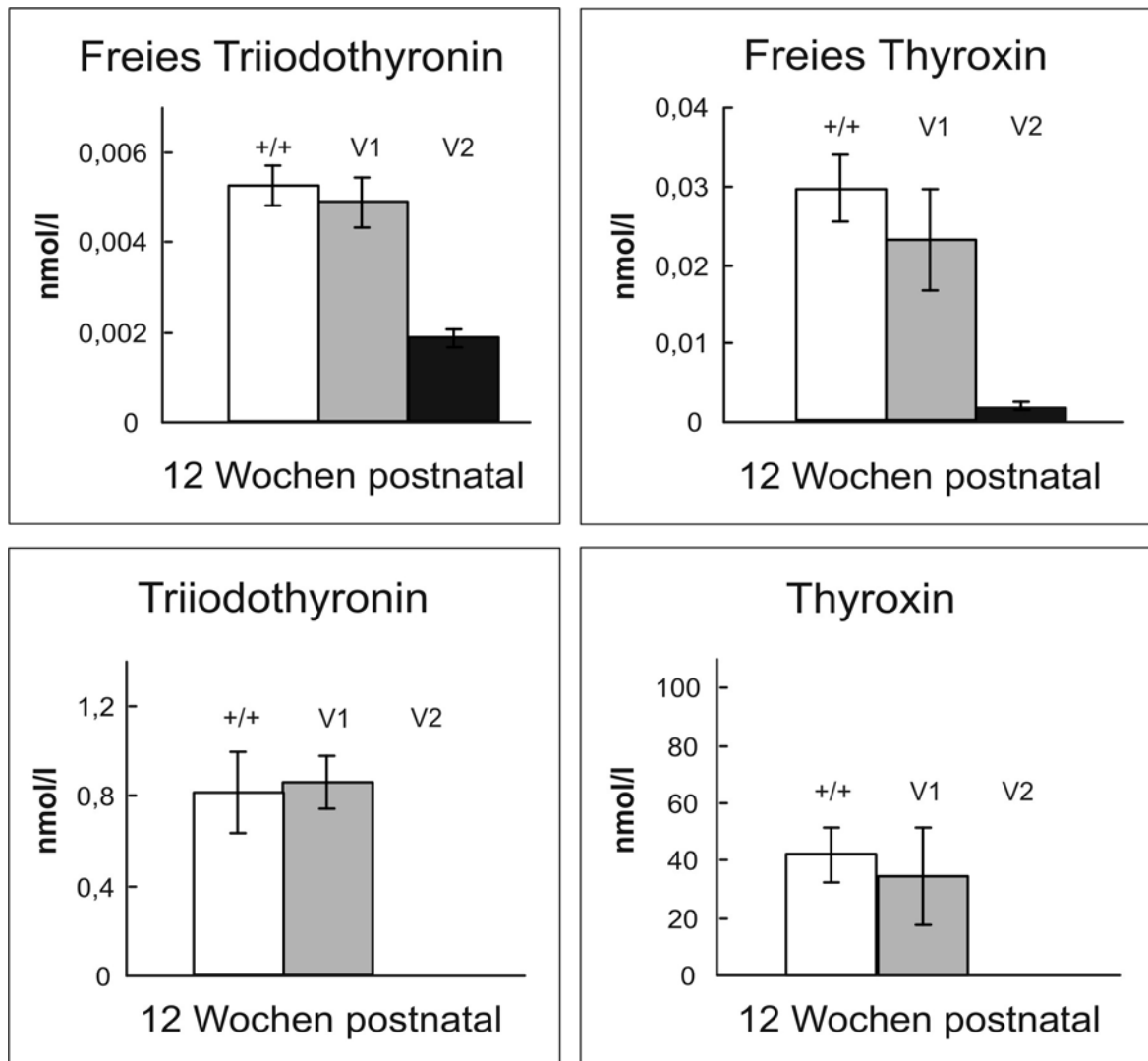


Abbildung 59 Schilddrüsenhormongehalt im Serum von V1 und V2

Werte des Schilddrüsenhormons für alle vier Formen (fT3, fT4, T3, T4) von Pax8 +/+, V1 und V2 im Alter von PWo 12. Bei V2 lagen T3 und T4 unter der Nachweisgrenze.

3.7.3 Verteilung der S- und M-Zapfen von substituierten Pax8 -/-

Das S-Zapfenmuster von Pax8 +/+ und V1 ist gleich (Abb. 60). Im ventralen Bereich der Retina ist die Zahl der S-Zapfen höher als im dorsalen Bereich. Im dorsalen Bereich exprimieren nur wenige Zapfen das S-Opsin. Durch den künstlich erzeugten euthyreoten

Ergebnisse

Zustand während der postnatalen Entwicklung von Pax8 $-/-$ (V1) konnte das wildtypische Expressionsmuster des S-Opsins hergestellt werden. Bei V2 wird hingegen das S-Opsin gleich stark in der gesamten Retina exprimiert. In der dorsalen Retina ist die Anzahl der S-Zapfen höher als bei Pax8 $+/+$ und V1. Das Muster der S-Zapfen von V2 entspricht dem Muster von Pax8 $-/-$. Wird V1 direkt nach Beendigung der Thyroxinsubstitution getötet, ist das S-Zapfenmuster identisch mit dem Muster von Pax8 $+/+$ gleichen Alters (nicht gezeigt). Erst durch das erneute Fehlen des Schilddrüsenhormons (V2) wandelt sich das S-Zapfenmuster zurück und ist gleich dem in Pax8 $-/-$.

Die Expression des M-Opsins über die ganze Retina scheint in Pax8 $+/+$, V1 und V2 gleich zu sein (Abb. 61). In der dorsalen Retina ist sie stärker als in der ventralen Retina. Ein Einfluß des Schilddrüsenhormons ist nicht ersichtlich.

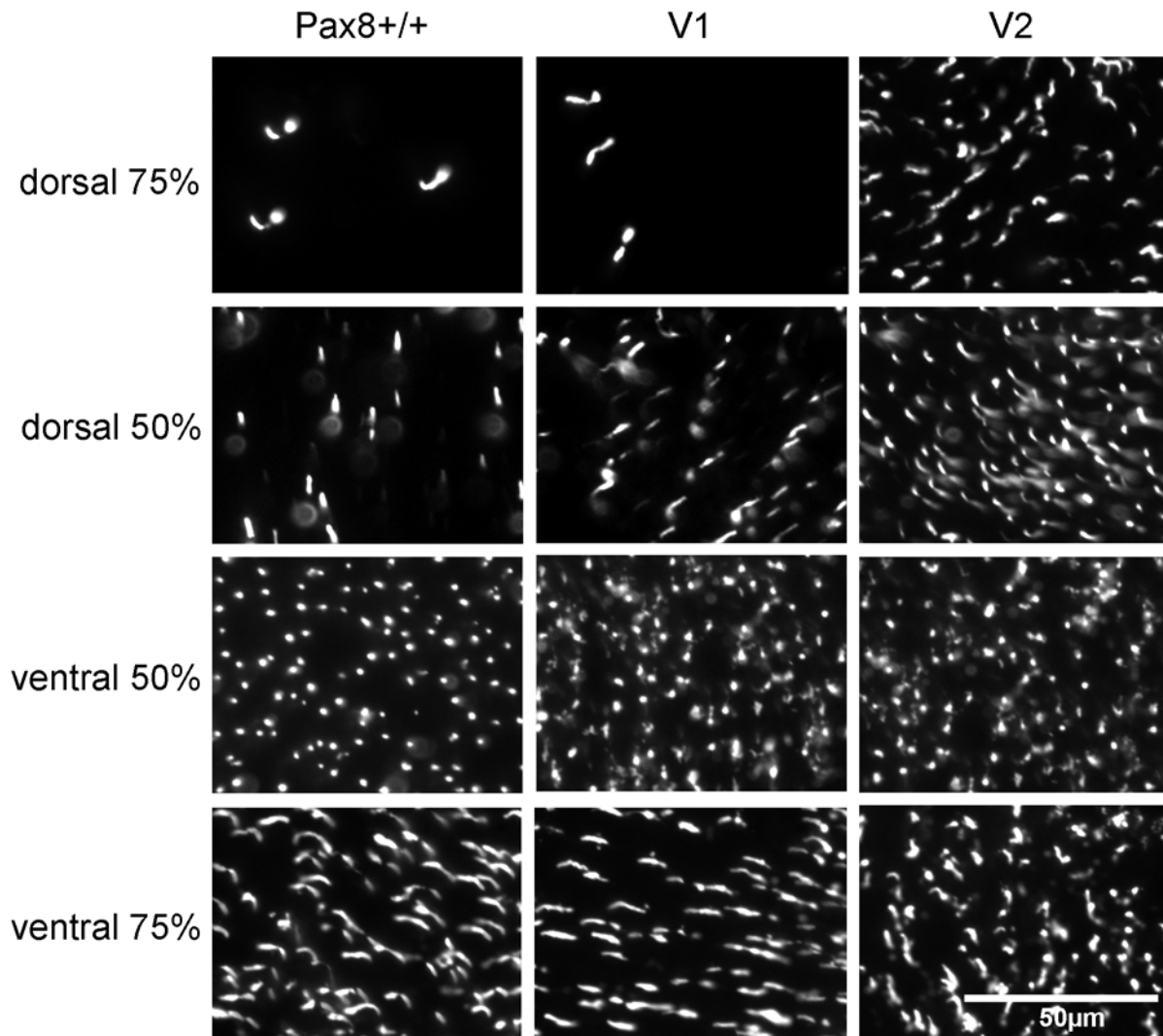


Abbildung 60 S-Zapfen bei V1 und V2

Abbildung 60 S-Zapfen bei V1 und V2

Flachpräparate der Retina von Pax8 +/+, V1 und V2 bei PWo 12, gefärbt mit dem Antikörper sc-14363 zur Sichtbarmachung des S-Opsins in den Zapfen. Es ist jeweils ein zentraler (50%) und peripherer (75%) Bereich der dorsalen und ventralen Region gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder. V1: Pax8 -/- täglich substituiert mit Thyroxin (18 ng/g Körpergewicht) von Postnataltag 2 bis postnatale Woche 12 (PWo 12); V2: Pax8 -/- täglich substituiert mit Thyroxin (18 ng/g Körpergewicht) von P2 bis P28, anschließend bis PWo 12 ohne Substitution.

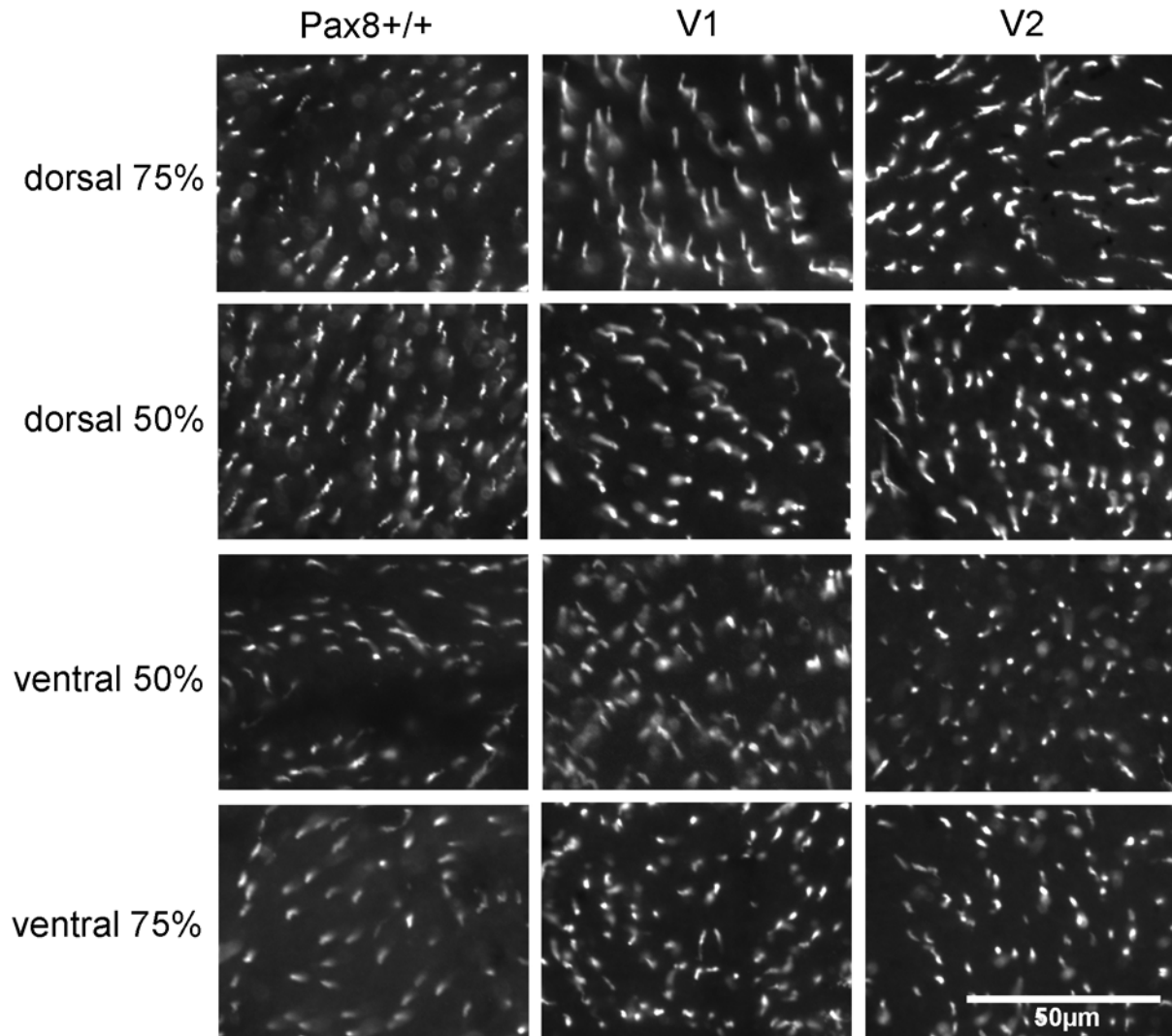


Abbildung 61 M-Zapfen bei V1 und V2

Flachpräparate der Retina von Pax8 +/+, V1 und V2 bei PWo 12, gefärbt mit dem Antikörper JH 492 zur Sichtbarmachung des M-Opsins in den Zapfen. Es ist jeweils ein zentraler (50%) und peripherer (75%) Bereich der dorsalen und ventralen Region gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder. V1: Pax8 -/- täglich substituiert mit Thyroxin (18 ng/g Körpergewicht) von Postnataltag 2 bis postnatale Woche 12 (PWo 12); V2: Pax8 -/- täglich substituiert mit Thyroxin (18 ng/g Körpergewicht) von P2 bis P28, anschließend bis PWo 12 ohne Substitution

3.7.4 S- und M-Zapfendichte von substituierten Pax8 -/-

Die Zapfendichten von Pax8 +/+, V1 und V2 wurden in Bildern wie unter 3.4.5 beschrieben ermittelt. Die Anzahl der verwendeten Tiere ist in Tabelle 31 angegeben. Die Tiere waren im Alter von PWo 12. Die Dichtewerte der einzelnen Positionen sind in Tabelle 16-23

Ergebnisse

aufgeführt. Die S-Zapfendichten von Pax8 +/+ und V1 haben in allen Bereichen der Retina gleiche Werte (Abb. 62). Bei beiden Tieren liegt das wildtypische S-Zapfenmuster mit den höchsten Dichten im ventralen und den niedrigsten Dichten im dorsalen Bereich vor. Auch bei V2 sind die S-Zapfendichten der ventralen Retina gleich hoch wie bei Pax8 +/+ und V1. Im dorsalen Bereich hingegen hat V2 höhere Dichten als Pax8 +/+ und V1. Damit gleicht das Zapfenmuster von V2 dem Muster von Pax8 -/-. Ein signifikanter Unterschied in den S-Zapfendichten von V2 und sowohl Pax8 +/+ als auch V1 existiert für den Bereich 75% dorsal ($p < 0,01$).

Die Dichten der M-Zapfen unterscheiden sich in allen Bereichen bei Pax8 +/+, V1 und V2 nur geringfügig und sind nicht signifikant unterschiedlich (Abb.62).

Der Einfluß des Thyroxins wird anhand der S-Zapfendichten von V1 und V2 sichtbar. Auf die Expression des M-Opsins kann kein Einfluß des Thyroxins gesehen werden.

| Woche postnatal | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der S- und M-Zapfendichte | | | | |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------|------|------|------|------|
| | Pax8 | | | | |
| | +/+ | V1 | V2 | V3 | -/- |
| 12 | 5 | 5 | 3 | n.b. | n.b. |
| 18 | 4 | n.b. | n.b. | 5 | 3 |

Tabelle 31 Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der S- und M-Zapfendichte von substituierten Pax8
n.b.= nicht bestimmt

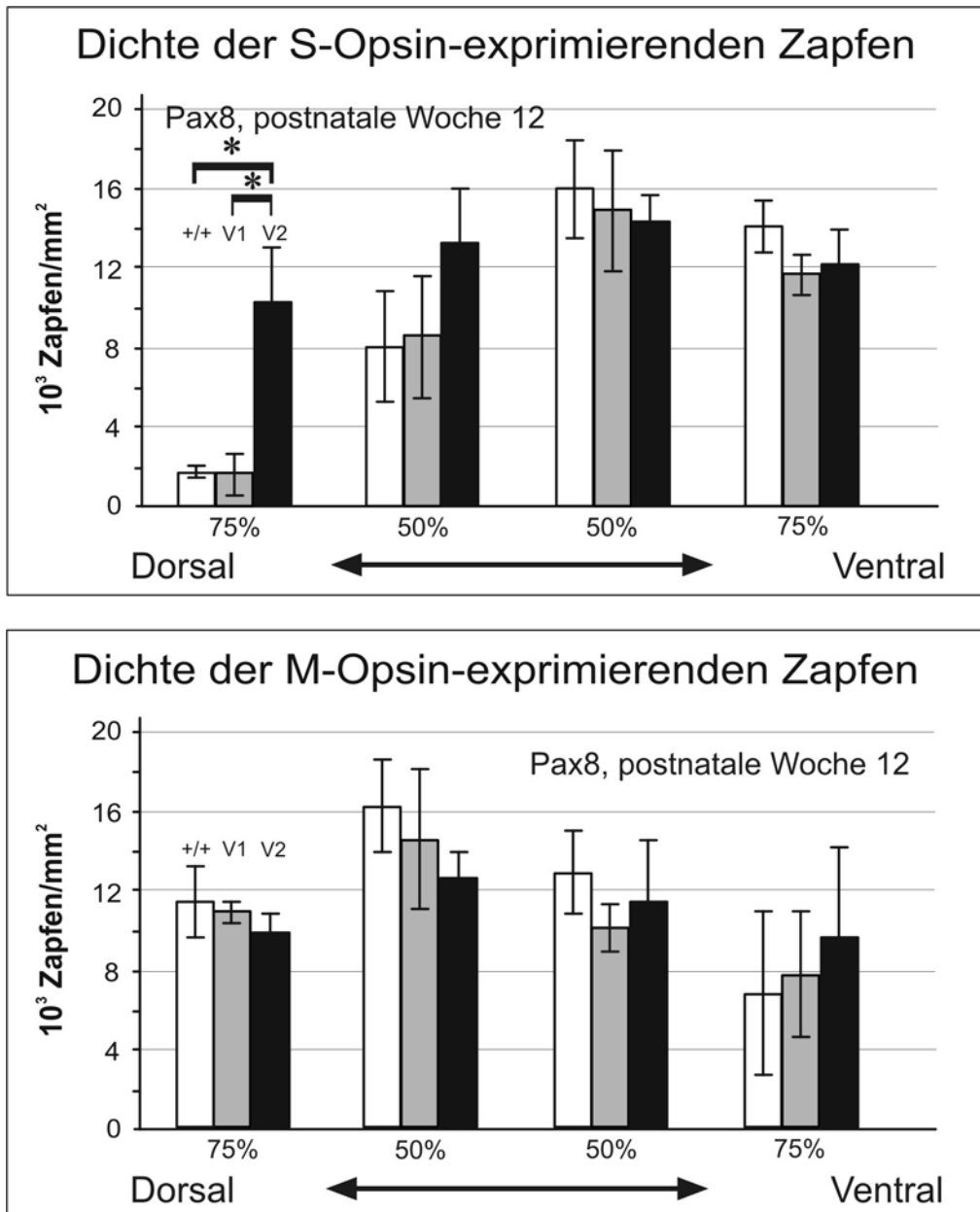


Abbildung 62 S- und M-Zapfendichten bei V1 und V2

Die Säulendiagramme zeigen die Werte der S- und M-Zapfendichte für alle vier Positionen (50% und 75% dorsal, 50% und 75% ventral) von Pax8 +/+, V1 und V2 im Alter von PWo 12. Signifikante Unterschiede zwischen Tieren sind durch einen Balken gekennzeichnet. V1: Pax8 -/- täglich substituiert mit Thyroxin (18 ng/g Körpergewicht) von P2 bis PWo 12; V2: Pax8 -/- täglich substituiert mit Thyroxin (18 ng/g Körpergewicht) von P2 bis P28, anschließend bis PWo 12 ohne Substitution, Stern = p < 0,01

3.8 Künstlich erzeugte Euthyreose bei adulten Pax8 -/-

Nach dem Nachweis der Bedeutung des Schilddrüsenhormons während der postnatalen Entwicklung wurde auch der Einfluß des Schilddrüsenhormons auf die Aufrechterhaltung des S- und M-Zapfenmusters bei adulten Pax8 -/- untersucht. Die Substitution von Pax8 -/- mit täglich 18 ng Thyroxin/g Körpergewicht wurde im adulten Alter (PWo 12) begonnen und bis

PWo 18 weitergeführt. Danach wurden die Tiere getötet. Diese Teilzeit-Substitution ist Versuchsreihe V3.

3.8.1 Körpergewicht von adult-substituierten Pax8 -/-

Die Körpergewichte von V3 und den Kontrolltieren Pax8 +/+, -/- zu Beginn der Substitution (PWo 12) und am Ende (PWo 18) sind in Abbildung 63 dargestellt. Die Anzahl der verwendeten Tiere ist in Tabelle 32 angegeben. In PWo 12 sind die Gewichte von Pax8 -/- und V3 identisch. Diese Tiere sind mit ca. 15 Gramm weniger als halb so schwer wie Pax8 +/+ (40 Gramm). Alle Tiere nehmen mit dem Alter an Gewicht zu. Zum Versuchsende sind alle Tiere 5-7 Gramm schwerer als bei Beginn des Versuches. Die Gewichte von Pax8 -/- und V3 (ca. 20 Gramm) liegen somit deutlich unter dem Körpergewicht von Pax8 +/+ (45 Gramm).

| Woche postnatal | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Körpergewichts | | |
|-----------------|----------------------------------------------------------------|----|-----|
| | Pax8 | | |
| | +/+ | V3 | -/- |
| 12 | 2 | 4 | 3 |
| 18 | 4 | 4 | 2 |

Tabelle 32 Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung des Körpergewichts von V3

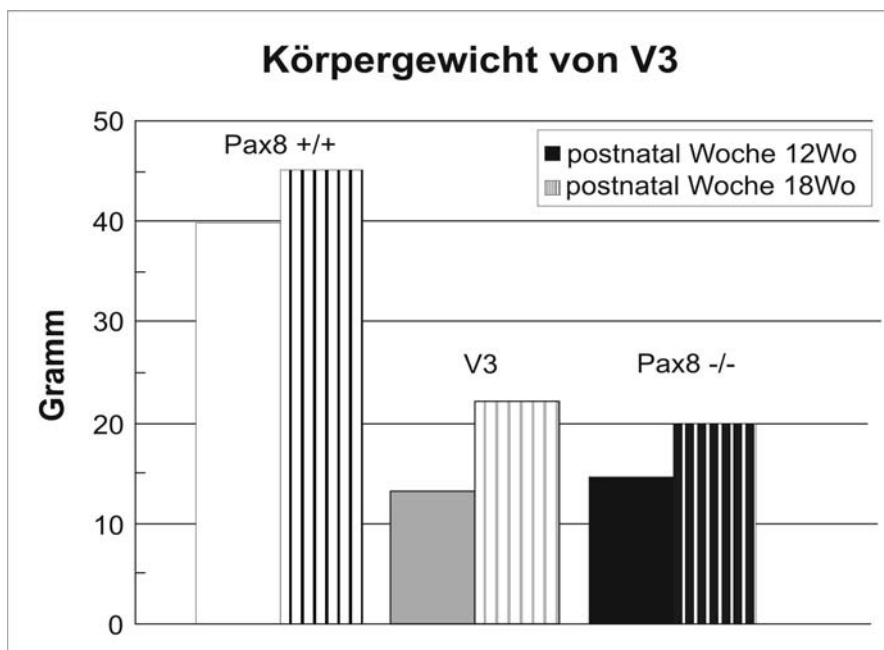


Abbildung 63 Körpergewicht von V3

Körpergewicht von Pax8 +/+, -/- und V3 für die Zeitpunkte PWo 12 und PWo 18.

3.8.2 Schilddrüsenhormongehalt im Serum von adult-substituierten Pax8 -/-

Alle Schilddrüsenhormonwerte von Pax8 +/+ und V3 sind gleich (Abb. 64). Die Konzentration von fT3 beträgt 0,004 nmol/l, die von fT4 ca. 0,025 nmol/l. Der Gehalt von T3 liegt bei 0,7 nmol/l und von T4 bei 50 nmol/l. Die Konzentration der Schilddrüsenhormone bei Pax8 -/- ist sehr viel geringer, das T3 ist gar nicht vorhanden. fT3 hat eine Konzentration von 0,001 nmol/l und fT4 von 0,005 nmol/l. T4 ist ebenfalls sehr stark reduziert (10 nmol/l). In V3 konnte also durch Thyroxinsubstitution ein euthyreoter Zustand erzeugt werden.

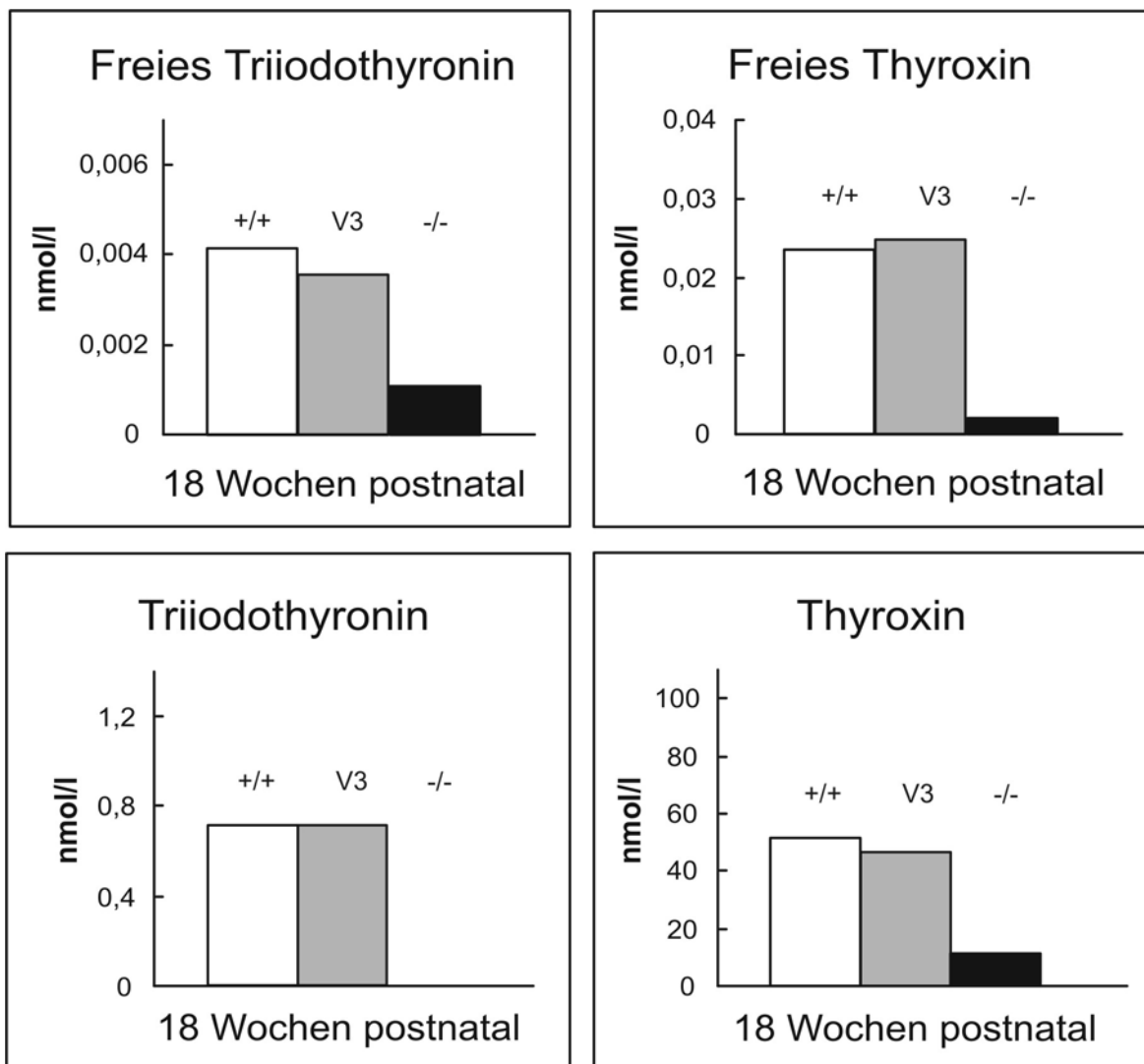


Abbildung 64 Schilddrüsenhormongehalt im Serum von V3

Werte des Schilddrüsenhormons für alle vier Formen (fT3, fT4, T3, T4) bei Pax8 +/+, -/- und V3 im Alter PWo 18.

3.8.3 Verteilung der S- und M-Zapfen von adult-substituierten Pax8 -/-

Die S-Opsinexpression ist in Pax8 +/+ und V3 im ventralen Bereich der Retina stärker als im dorsalen Bereich (Abb. 65). Die Anzahl der S-Zapfen von Pax8 +/+ ist im dorsalen Bereich geringer als in der ventralen Retina. Dies scheint auch für den Bereich 75% dorsal von V3 zu zutreffen. Aber im Vergleich ist die Zahl der S-Zapfen an dieser Stelle bei V3 höher als bei Pax8 +/+. Die Zahl der S-Zapfen von Pax8 -/- ist über die gesamte Retina gleich.

Die M-Opsinexpression ist bei Pax8 +/+, -/- und V3 im dorsalen Bereich höher als im ventralen Bereich der Retina (Abb. 66). Auch im Vergleich der drei Gruppen scheint die Zahl der M-Zapfen gleich zu sein.

Der euthyreote Zustand von V3 scheint nur einen geringen Effekt auf die Expression des S-Opsins zu haben. Einen Einfluß des Schilddrüsenhormons auf die Expression des M-Opsins scheint es nicht zu geben.

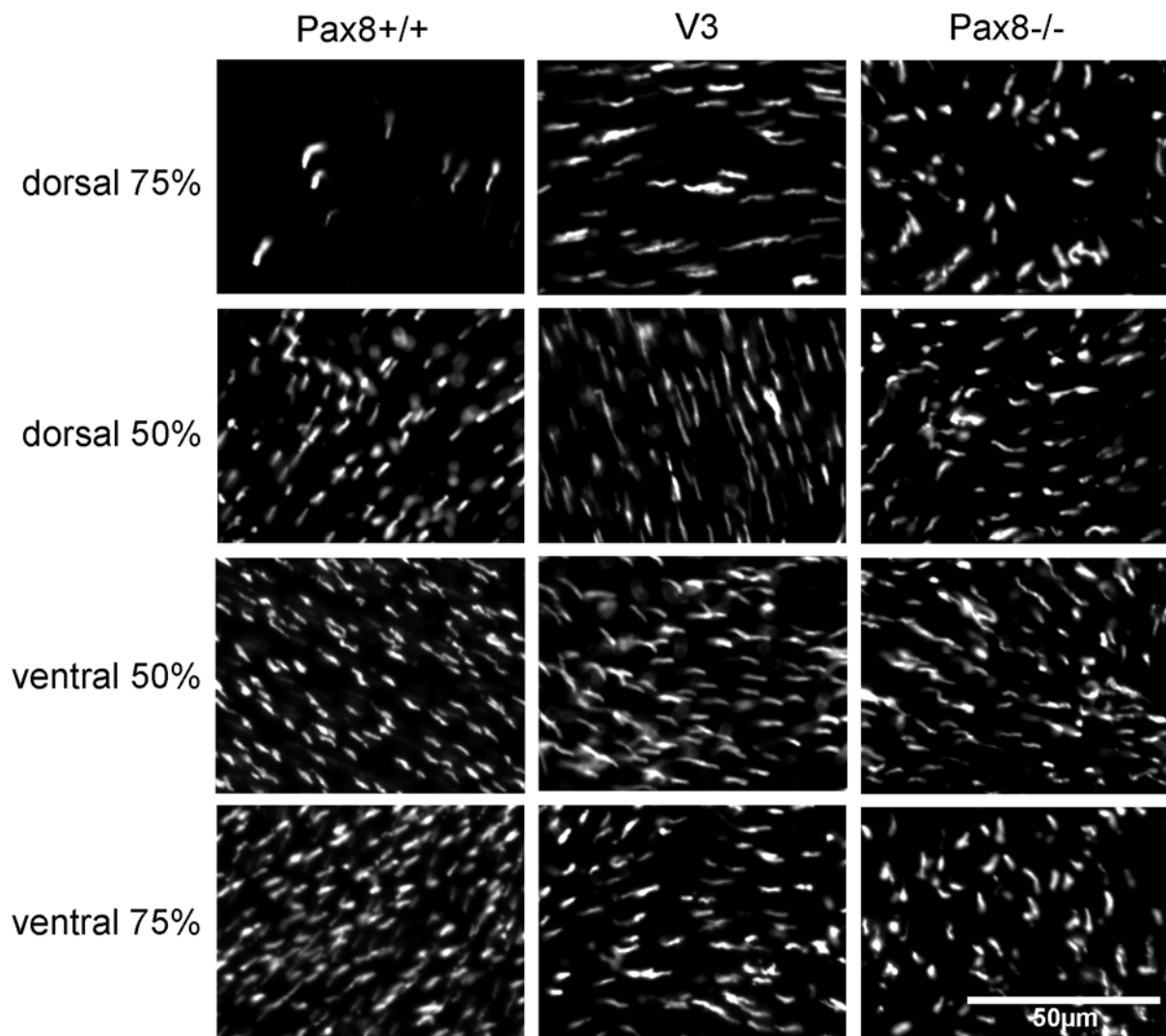


Abbildung 65 S-Zapfen bei V3

Abbildung 65 S-Zapfen bei V3

Flachpräparate der Retina von Pax8 +/+, V3 und Pax8 -/- bei PWo 18, gefärbt mit dem Antikörper sc-14363 zur Sichtbarmachung des S-Opsins in den Zapfen. Es ist jeweils ein zentraler (50%) und peripherer (75%) Bereich der dorsalen und ventralen Region gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder. V3: Pax8 -/- täglich substituiert mit Thyroxin (18 ng/g Körpergewicht) von PWo 12 bis PWo 18.

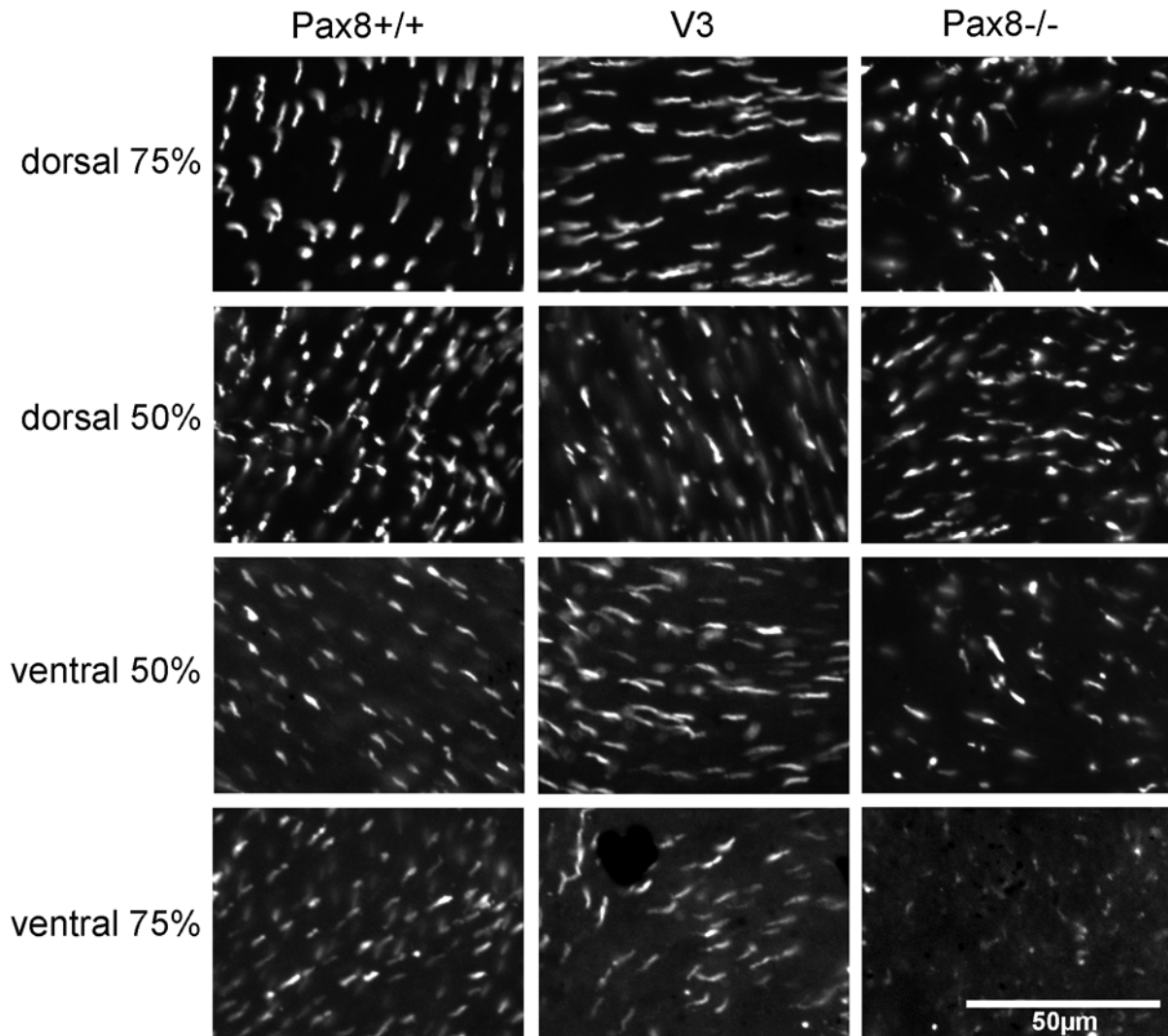


Abbildung 66 M-Zapfen bei V3

Flachpräparate der Retina von Pax8 +/+, V3 und Pax8 -/- bei PWo 18, gefärbt mit dem Antikörper JH 492 zur Sichtbarmachung des M-Opsins in den Zapfen. Es ist jeweils ein zentraler (50%) und peripherer (75%) Bereich der dorsalen und ventralen Region gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder. V3: Pax8 -/- täglich substituiert mit Thyroxin (18 ng/g Körpergewicht) von PWo 12 bis PWo 18.

3.8.4 S- und M-Zapfendichte von adult-substituierten Pax8 -/-

Die Zapfendichten von Pax8 +/+, -/- und V3 wurden in Bildern wie unter 3.4.5 beschrieben ermittelt. Die Anzahl der verwendeten Tiere jedes Stammes ist in Tabelle 31 angegeben. Das Alter der Tiere lag bei PWo 18. Die Dichtewerte der einzelnen Positionen sind in Tabelle 16-23 aufgeführt.

Pax8 +/+ zeigt das wildtypische S-Zapfenmuster. Auch das Zapfenmuster von Pax8 -/- ist typisch mit gleichen Dichten über die gesamte Retina (Abb. 67). Das ventrale S-

Ergebnisse

Zapfenmuster von V3 gleicht dem wildtypischen Muster. In der dorsalen Peripherie liegen die Dichten von V3 zwischen den niedrigsten Dichten von Pax8 +/+ und den höchsten Dichten von Pax8 -/-. Es existiert jedoch weder ein signifikanter Unterschied zwischen Pax8 +/+ und Pax8 -/- noch zwischen V3 zu jeweils den anderen beiden Gruppen.

Die M-Zapfendichten von Pax8 +/+, -/- und V3 sind wildtypisch und somit in der dorsalen Retina höher als in der ventralen Retina (Abb. 67). Die M-Zapfendichten von Pax8 +/+ und V3 sind an jeder Position größer als bei Pax8 -/-. Außer in dem Bereich 75% dorsal hat Pax8 +/+ die höchsten Dichten und Pax8 -/- die niedrigsten Dichten.

Eine Auswirkung der Euthyrose von V3 auf die Ausprägung des Zapfenmusters ist nur schwer zu sehen. Doch auch die Unterschiede zwischen Pax8 +/+ und -/- sind durch eine hohe Heterogenität in der Ausprägung des Zapfenmusters von Pax8 +/+ nicht signifikant. Diese Befunde scheinen mit den bisherigen Befunden nicht im Einklang zu stehen. Da, wie zu Beginn erwähnt wurde, für jeden Versuchsansatz Pax8 +/+ und +/- Wurfgeschwister als Kontrolltiere verwendet wurden, könnte die nicht sichtbare Veränderung des Zapfenmusters von V3 dadurch erklärt werden. Darauf soll genauer in der Diskussion eingegangen werden.

Die Gesamtzapfendichten von Pax8 +/+, -/- und V3 sind in Tabelle 24-27 angegeben. Die Anzahl der verwendeten Tiere ist in Tabelle 33 aufgeführt.

| Woche postnatal | Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der Gesamtzapfendichte | | |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------|----|-----|
| | Pax8 | | |
| | +/+ | V3 | -/- |
| 18 | 4 | 4 | 2 |

Tabelle 33 Anzahl der verwendeten Tiere zur Bestimmung der Gesamtzapfendichte von V3

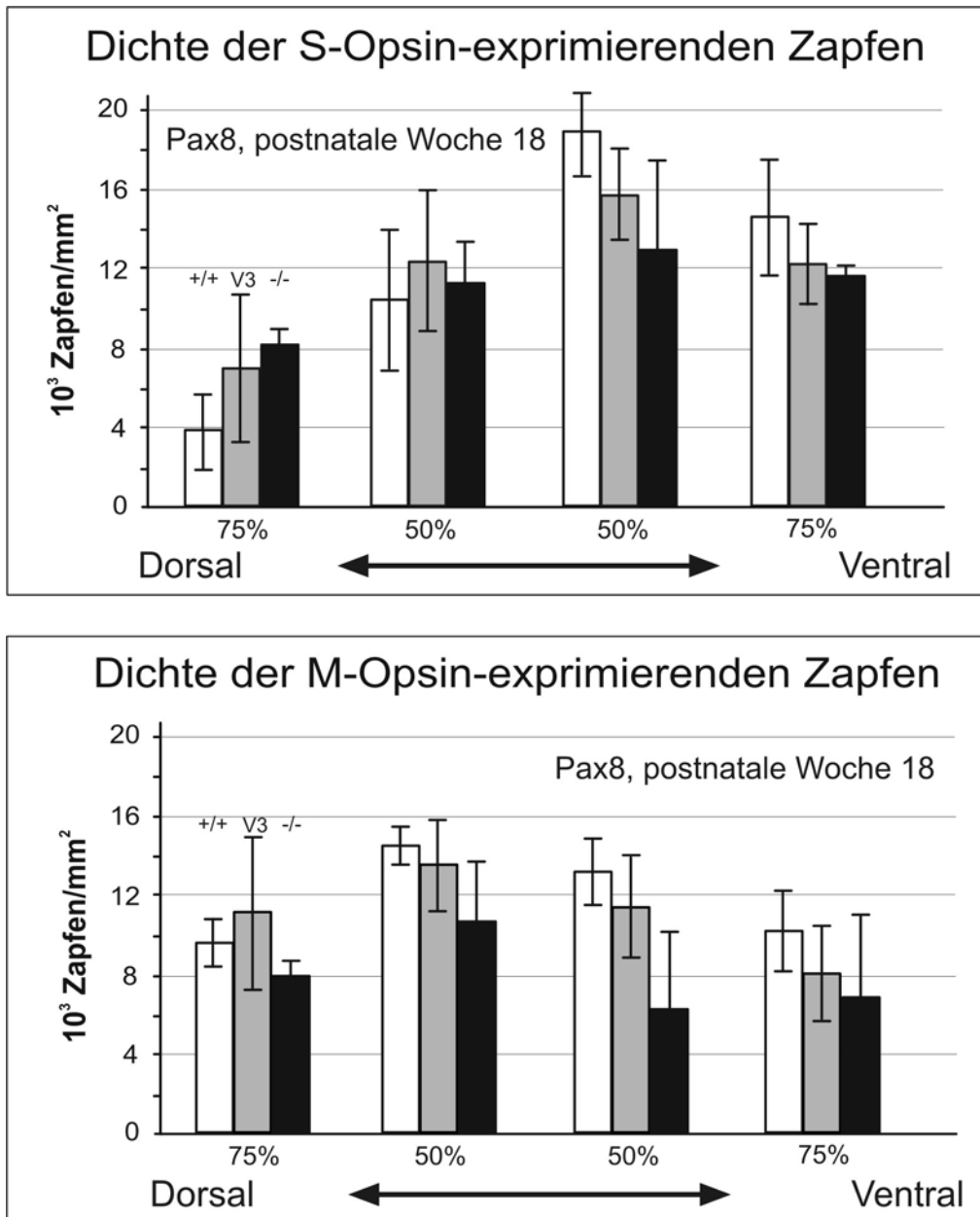


Abbildung 67 S- und M-Zapfendichte von V3

Säulendiagramme der S- und M-Zapfendichte für alle vier Positionen (50% und 75% dorsal, 50% und 75% ventral) von Pax8 +/+, -/- und V3 im Alter PWo 18. V3: Pax8 -/- täglich substituiert mit Thyroxin (18 ng/g Körpergewicht) von PWo 12 bis PWo 18, Stern = p < 0,01

3.9 Schilddrüsenhormongehalt von Pax8 +/+ nach Entfernung der Schilddrüse

Die Schilddrüse von adulten Pax8 +/+ (PWo 8-10) wurde bei sechs Tieren chirurgisch entfernt. Nach einem zehn bis zwölfwöchigen Zeitraum nach Entfernung der Schilddrüse wurden die Schilddrüsenhormonwerte dieser Tiere und sieben gleichaltriger nicht operierter Pax8 +/+ gemessen. Die Schilddrüsenhormonwerte (fT3, fT4, T3 und T4) beider Gruppen sind nahezu identisch (Abb. 68). Das Fehlen der Schilddrüse führte nicht zu einem hypothyreoten Zustand von Pax8 +/+, deshalb wurden keine weiteren Untersuchungen der

Ergebnisse

Augen und Retina angeschlossen. Da der operative Eingriff mit nur wenig Erfahrung durchgeführt wurde, könnte die Schilddrüse nur teilweise entfernt worden sein. Um einen hypothyreoten Zustand erzeugen zu können, muß das gesamte Gewebe der Schilddrüsen entfernt werden.

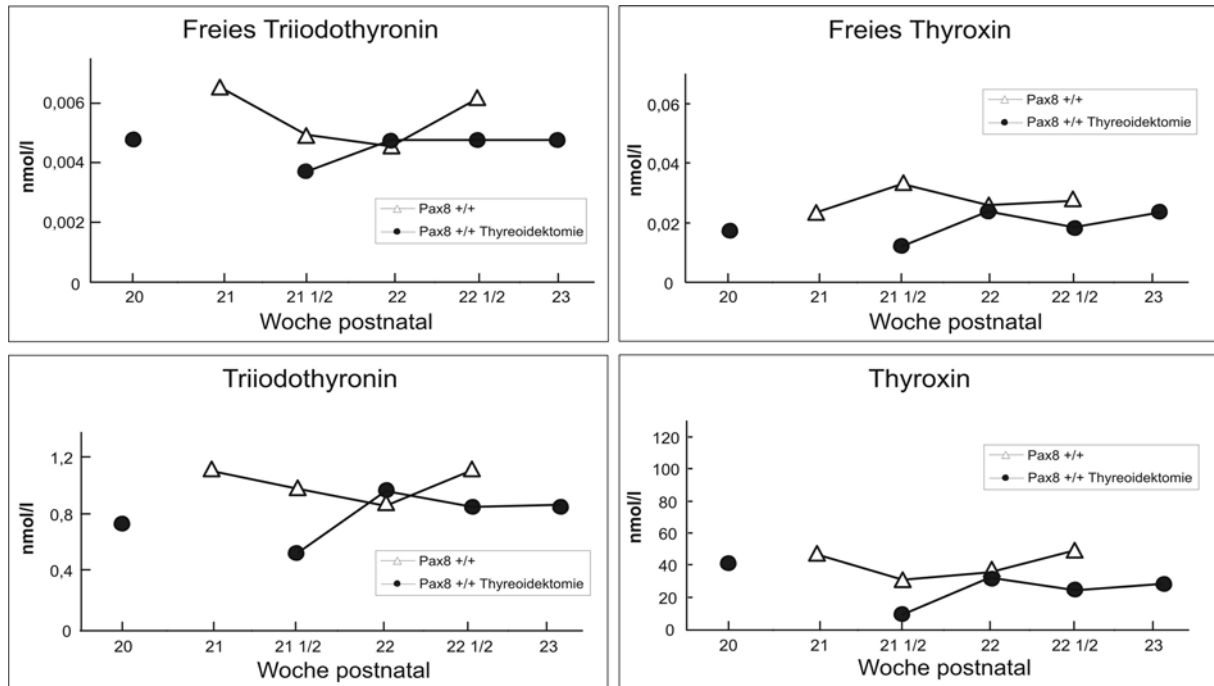


Abbildung 68 Schilddrüsenhormongehalt im Serum nach Thyreoidektomie

Werte des Schilddrüsenhormons für alle vier Formen (fT3, fT4, T3, T4) von operierten Pax8 +/+ und Kontrollen. Die postoperative Phase bis zur Tötung schwankte zwischen zehn und zwölf Wochen (d.h. PWo 20-23).

3.10 Pharmakologisch erzeugte Hypothyreose bei adulten C57-Mäusen

Als Alternative zur Thyreoidektomie wurden C57-Mäuse pharmakologisch hypothyreot gemacht, um die Auswirkung einer Hypothyreose auf die Expression des S- und M-Opsins im adulten Alter zu untersuchen. Die Tiere waren bis PWo12 euthyreot. Erst ab PWo 12 wurden sie bis PWo 24 mit dem Thyreostatikum Methimazol (MMI) behandelt um einen hypothyreoten Zustand zu erzeugen. Diese Versuchsgruppe wird V4 genannt.

Als Kontrolle für V4 dienen C57, die Leitungswasser als Trinkwasser bekamen. Weitere Kontrolltiere waren C57, die 26% Himbeersirup im Trinkwasser bekamen, und C57, die 26% Himbeersirup und 0,74% Natriumperchlorat imTrinkwasser bekamen. Die Kontrolltiere mit Himbeersirup waren euthyreot und das Natriumperchlorat führte zu einer schwachen Hypothyreose. (nicht gezeigt)

3.10.1 Körpergewicht hypothyreoter C57

Das Körpergewicht von vier V4 und zwei C57 Kontrolltieren (Leitungswasser) wurde vor Beginn der Behandlung mit Methimazol (MMI) und nach Beendigung des Versuches ermittelt. Vor Versuchsbeginn hatten beide Gruppen ein Körpergewicht von ca. 22 Gramm (Abb. 69). Zum Versuchsende hat das Gewicht von C57 um 5 Gramm zugenommen, das Körpergewicht von V4 ist gleich geblieben.

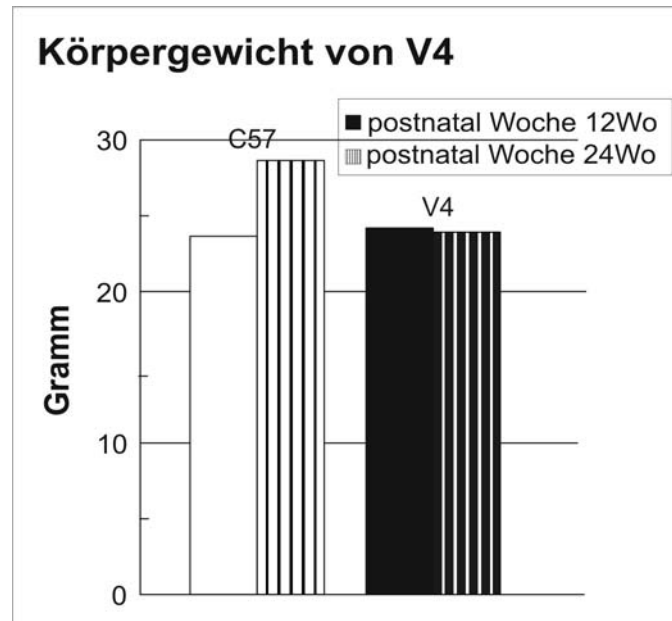


Abbildung 69 Körpergewicht von V4

3.10.2 Schilddrüsenhormongehalt von C57 nach Behandlung mit MMI

Bei sechs V4-Tieren und sechs Kontrolltieren wurde der Hormongehalt bestimmt. Bei V4 konnte nur FT3 nachgewiesen werden, die Konzentrationen aller anderen Formen lagen unterhalb der Nachweisgrenze. Das FT3 von C57 hat einen Wert von 0,0055 nmol/l, V4 hat einen niedrigeren FT3 Wert von ca. 0,001 nmol/l (Abb.70). V4 ist hypothyreat.

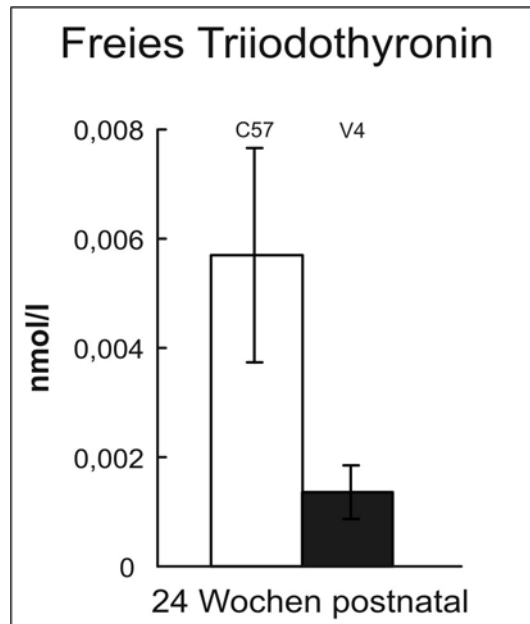


Abbildung 70 Schilddrüsenhormongehalt im Serum von V4
Diagramm des fT3 von C57 und V4 im Alter PWo 24.

3.10.3 Verteilung der S- und M-Zapfen von hypothyreoten C57

Die Expression der S-Zapfen erscheint im ventralen Bereich der Retina von C57 und V4 in etwa gleich (Abb. 71). Im dorsalen Bereich von V4 ist die Expression von S-Opsin höher und mehr Zapfen enthalten das S-Opsin als in der Kontrolle C57. Die S-Opsinexpression erscheint über die gesamte Retina von V4 gleich hoch. Der hypothyreote Zustand von V4 führt also zu einer stärkeren Expression des S-Opsins im dorsalen Bereich.

Die Expression des M-Opsins ist in beiden Tieren im dorsalen Bereich höher als im ventralen Bereich der Retina (Abb. 72). Zwischen C57 und V4 scheint es keinen Unterschied im Muster der M-Zapfen zu geben.

Ergebnisse

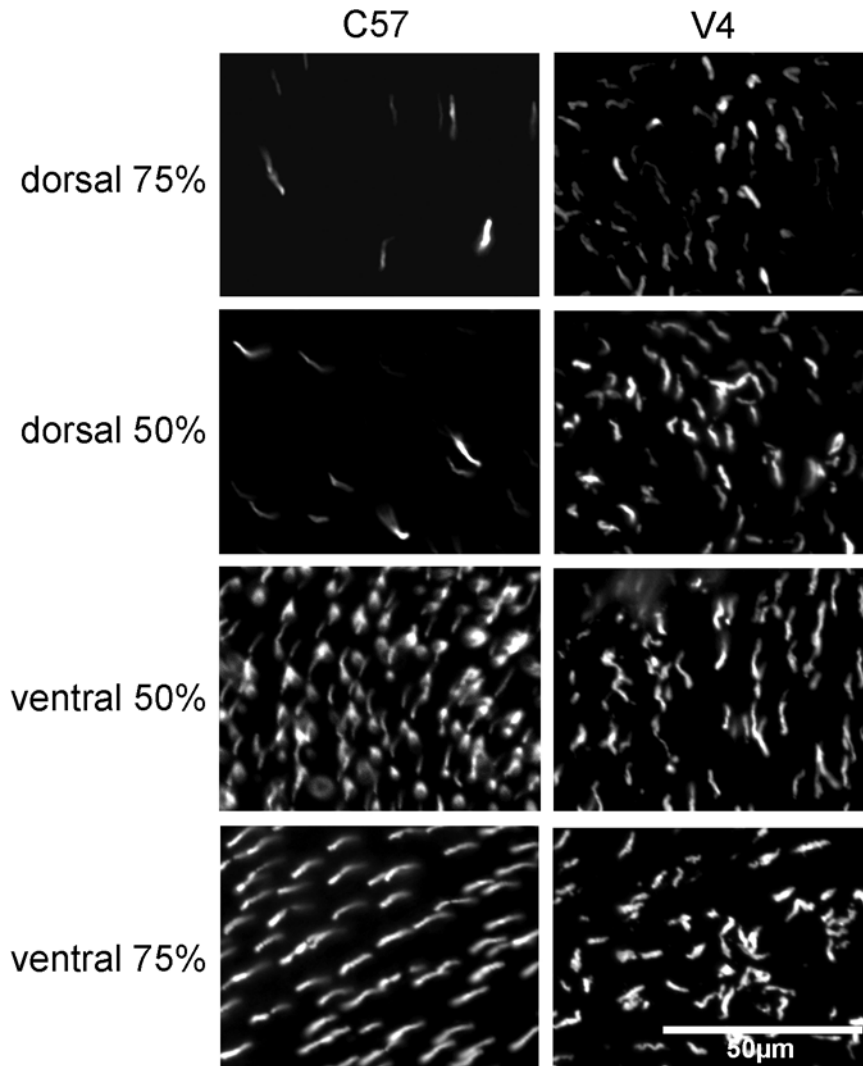


Abbildung 71 S-Zapfen bei V4

Flachpräparate der Retina von C57 und V4 bei PWo 24, gefärbt mit dem Antikörper sc-14363 zur Sichtbarmachung des S-Opsins in den Zapfen. Es ist jeweils ein zentraler (50%) und peripherer (75%) Bereich der dorsalen und ventralen Retina gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder. V4: C57 0,074% Methimazol, 0,74% Natriumperchlorat, 26% Himbeersirup von PWo 12 bis PWo 24

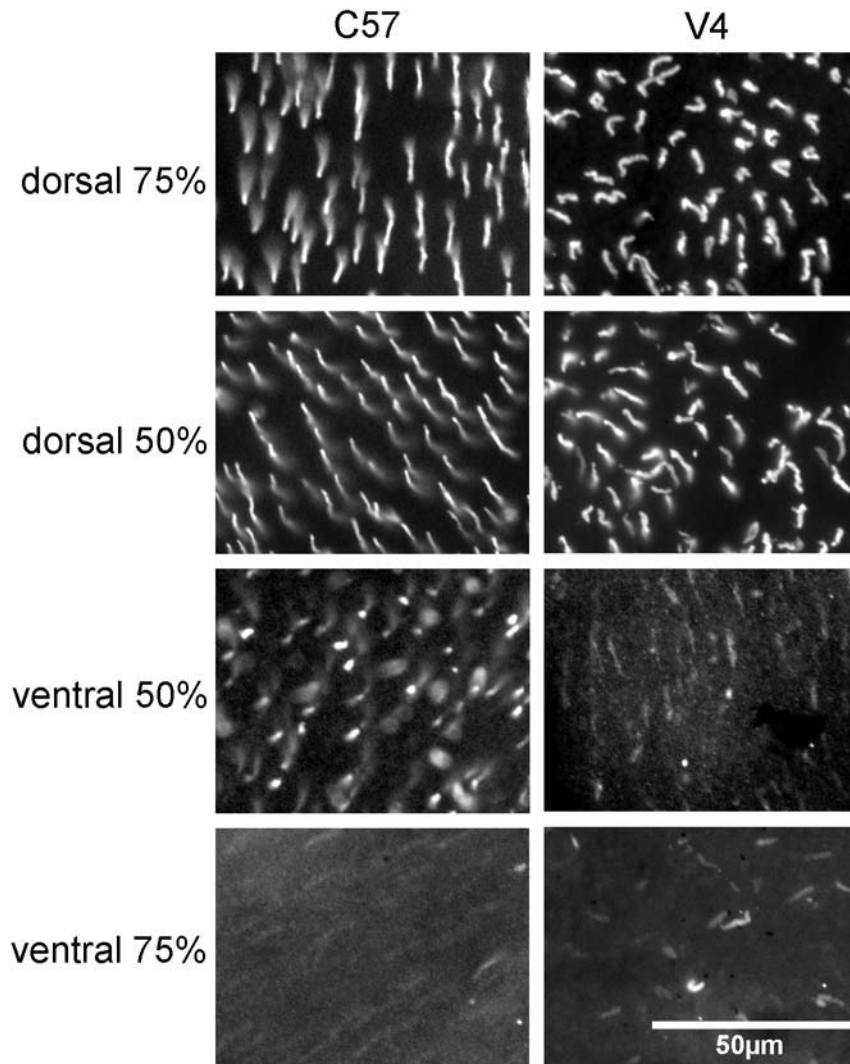


Abbildung 72 M-Zapfen bei V4

Flachpräparate der Retina von C57 und V4 bei PWo 24, gefärbt mit dem Antikörper JH 492 zur Sichtbarmachung des M-Opsins in den Zapfen. Es ist jeweils ein zentraler (50%) und peripherer (75%) Bereich der dorsalen und ventralen Retina gezeigt. Die Skala gilt für alle Bilder. V4: C57 0,074% Methimazol, 0,74% Natriumperchlorat, 26% Himbeersirup von PWo 12 bis PWo 24

3.10.4 S- und M-Zapfendichten von hypothyreoten C57

Die Zapfendichten von sechs C57-Tieren und sechs V4 wurden an Bildern wie unter 3.4.5 beschrieben ermittelt. Das Alter der Tiere lag bei PWo 24. Die Dichtewerte der einzelnen Positionen sind in Tabelle 34 und 35 aufgeführt.

Das wildtypische S-Zapfenmuster von C57 hat ventral höhere Dichten als in der dorsalen Retina (Abb. 73). Die S-Zapfendichten von V4 hingegen sind im ventralen Bereich der Retina nur geringfügig höher als im dorsalen Bereich. Im Vergleich zu C57 sind die Dichten von V4 ventral niedriger und dorsal höher. Im ventralen Zentrum und der dorsalen Retina sind die Dichten von V4 sogar signifikant unterschiedlich zu C57 ($p < 0,01$).

Die M-Zapfendichten von C57 zeigen das wildtypische Muster und die Dichten sind an jeder Stelle der Retina außer in der dorsalen Peripherie höher als bei V4 (Abb. 73). Die M-

Ergebnisse

Zapfendichte von V4 ist im Bereich 50% ventral signifikant unterschiedlich zu C57 ($p=0,007$). Die Hypothyreose in V4 führt zu einer stärkeren Expression des S-Opsins im dorsalen Bereich der Retina. Die M-Opsinexpression ist über die gesamte Retina vermindert. Auch im adulten Zustand wird die Zapfenopsinexpression also vom Schilddrüsenhormonniveau beeinflusst.

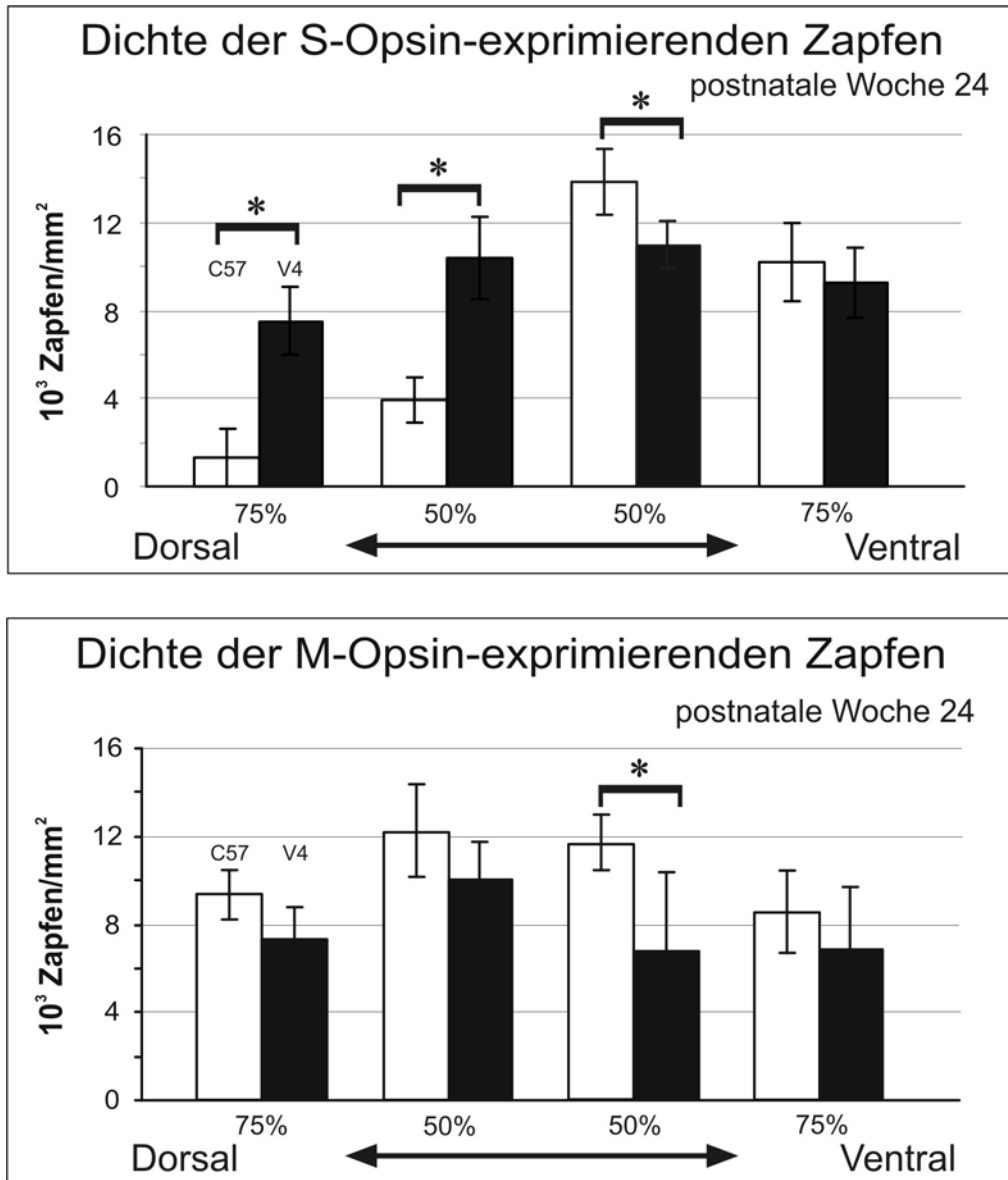


Abbildung 73 S- und M-Zapfendichten bei V4

Säulendiagramme der S- und M-Zapfendichte für alle vier Positionen (50% und 75% dorsal, 50% und 75% ventral) von C57 und V4 im Alter PWo 24. Die Signifikanz zwischen zwei Tieren ist durch einen Balken gekennzeichnet. V4: C57 0,074% Methimazol, 0,74% Natriumperchlorat, 26% Himbeersirup von PWo 12 bis PWo 24, Stern = $p < 0,01$

Ergebnisse

| Tiere | S-Zapfendichte bei PWo 24 (1/mm ²) | | | |
|------------|------------------------------------------------|------------|-------------|-------------|
| | Positionen | | | |
| | 75% dorsal | 50% dorsal | 50% ventral | 75% ventral |
| C57 | 1.300 | 3.900 | 13.800 | 10.200 |
| V4 | 7.500 | 10.400 | 11.000 | 9.200 |

Tabelle 34 S-Zapfendichtewerte von V4

| Tiere | M-Zapfendichte bei PWo 24 (1/mm ²) | | | |
|------------|------------------------------------------------|------------|-------------|-------------|
| | Positionen | | | |
| | 75% dorsal | 50% dorsal | 50% ventral | 75% ventral |
| C57 | 9.600 | 12.600 | 12.000 | 8.800 |
| V4 | 7.600 | 10.300 | 7.000 | 7.000 |

Tabelle 35 M-Zapfendichtewerte von V4

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das Zapfenmuster der Maus und dessen Generierung näher untersucht. Dabei ging es um die Rolle des Schilddrüsenhormons als Regulator der Expression der Zapfenopsine. Zunächst wurde untersucht, welche Auswirkung das Fehlen des Schilddrüsenhormons auf die postnatale Entwicklung der Augenmorphologie und der Retina hat. Die Untersuchungen wurden an der athyreoten Pax8 $-/-$ Maus durchgeführt. Dann wurde die postnatale Ausprägung des Zapfenmusters bei drei wildtypischen Mäusen unterschiedlicher Stämme quantitativ erfaßt, um eine Basis für die Beurteilung der Veränderungen bei Pax8 $-/-$ zu haben. Im Weiteren wurde durch quantitative Dichtebestimmung der S- und M-Zapfen bei den Pax8-Mäusen der Zusammenhang zwischen Schilddrüsenhormon und Zapfenopsinexpression während der postnatalen Entwicklung nachgewiesen. Im letzten Schritt wurde durch pharmakologisch erzeugte Hypothyreose bei erwachsenen wildtypischen Mäusen gezeigt, daß auch die Aufrechterhaltung des adulten Zapfenmusters vom Schilddrüsenhormon abhängt.

4.1 Methodische Aspekte

Bevor die Ergebnisse im Detail diskutiert werden, soll auf drei methodische Punkte eingegangen werden. Zum einen soll die Verwendung der Kontrolltiere erklärt werden und zum anderen soll auf die Verwendung der Pax8 $-/-$ eingegangen werden, die älter als PWo 3 waren. Drittens wird erklärt, daß anhand von Zapfendichten auf eine Veränderung der Zapfenopsin-Expressionsmuster geschlossen werden kann.

Als Kontrollen wurden immer Pax8 $+/+$ und $+/-$ Wurfgeschwister der Pax8 $-/-$ Tiere verwendet. Dies hat zwei Gründe. Der Pax8-Stamm basiert auf einer Kreuzung der Stämme C57BL/6 und Sv129 (Mansouri et al. 1998). Da im Vorfeld nicht einzuschätzen war, welche genetischen Merkmale dieser beiden Stämme sich im Stamm Pax8 wiederfinden, wurden Pax8 $+/+$ und $+/-$ als Kontrolltiere verwendet. Auch ist die genetische Variabilität bei Wurfgeschwistern am geringsten, deshalb waren die verwendeten Kontrolltiere Wurfgeschwister von Pax8 $-/-$. Bei einer großen Heterogenität in den untersuchten Merkmalen kann die Auswirkung der Hypothyreose am besten durch den Vergleich von Pax8-Wurfgeschwistern gegenüber der genetischen Variabilität abgegrenzt werden. Die Verwendung von Pax8 $+/-$ als Kontrolle war auch interessant, um einen eventuellen heterozygotischen Effekt untersuchen zu können.

Diskussion

Die meisten Pax8 ^{-/-} Mäuse überleben ohne Substitution des Schilddrüsenhormons nur bis PWo 3 (<http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=alleleDetail&key=5279>). Die Überlebensrate bis zum adulten Stadium ist sehr gering. Pax8 ^{-/-} Tiere haben eine Hypothyreose, welche sich durch die Messung der Hormonwerte im Serum ermitteln läßt und sich als ein Merkmal auch in einem verminderten Körpergewicht äußert. Ein Grund für das Überleben der Pax8 ^{-/-} bis über die PWo 3 hinaus ist nicht bekannt. Diese Tiere befinden sich vielleicht in einem besseren Allgemeinzustand als nicht überlebensfähige Pax8 ^{-/-}. Dieses könnte durch eine bessere Entwicklung im Mutterleib oder eine bessere postnatale Entwicklung hervorgerufen worden sein. Die bessere postnatale Entwicklung könnte mit der Versorgung von Muttermilch zusammenhängen. Eine Erklärung für das Überleben einiger Pax8 ^{-/-} und das Sterben anderer Pax8 ^{-/-} konnte nicht gefunden werden. Da die Auswirkung der Hypothyreose auch auf die Aufrechterhaltung des Zapfenmusters während des ganzen Lebens untersucht wurde, war die Verwendung adulter Pax8 ^{-/-} zur Kontrolle jedoch notwendig.

In der Einleitung wurde bereits erläutert, daß S- und M-Zapfen durch die Expression des jeweiligen Opsins unterschieden werden. Durch die Ermittlung der S- und M-Zapfendichten über die gesamte Retina wird die Ausprägung des S- und M-Zapfenmusters sichtbar. Eine Zu- oder Abnahme der S- und M-Zapfendichte an vergleichbaren Positionen der Retinae verschiedener Altersstufen (z.B. PWo 3 und PWo 22) oder Mäusen (C57, Sv129, Pax8-Genotypen) könnte als ein Hinzukommen neuer Zapfen oder Verschwinden von Zapfen gesehen werden.

Es ist jedoch bekannt, daß die Zapfenzahl embryonal festgelegt wird (Szel et al. 1998). Eine Veränderung der S- und M-Zapfendichte hängt deshalb nicht mit einer Veränderung der Gesamtzapfenzahl, sondern mit der Veränderung/Ausprägung des Opsinexpressionsmusters zusammen. Durch Doppelfärbungen des S- und M-Opsins konnte beispielsweise bei Pax8 ^{-/-} gezeigt werden, daß die Veränderung des S-Opsinmusters, die sich in einem Verschwinden des S-Zapfengradienten (dorsal mehr S-Zapfen als bei den Kontrolle) äußert, nicht mit einer Zunahme der Zapfenzahl zusammenhängt, sondern die Zahl der Dualpigmentzapfen zunimmt. Die Hypothyreose von Pax8 ^{-/-} hat somit keine Auswirkung auf die Zapfenzahl, sondern auf die Opsinexpression. In den Dichtegraphen der vorliegenden Studie kann der Grad der Koexpression allerdings nicht abgelesen werden, da die Dichte aller Zapfen ermittelt wurde, die das S- oder M-Opsin exprimierten. Auch kann die Gesamtzapfendichte nur aus S- und M-Zapfen ermittelt werden, die in Doppelfärbungen markiert wurden, sofern sichergestellt ist, daß alle Zapfen mindestens ein Opsin enthalten. Durch Doppelfärbungen beider Opsine und Markierung aller Zapfen mit Peanutagglutinin (PNA) wurde gezeigt, daß alle Zapfen mindestens ein Opsin exprimieren (Abb. 54).

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die S- und M-Zapfendichten Rückschlüsse auf die Ausprägung der S- und M-Opsinexpressionsmuster und den direkten Vergleich der Zapfenmuster verschiedener Wildtypstämme und der Pax8-Genotypen erlauben.

4.2 Rolle des Schilddrüsenhormons auf die postnatale Entwicklung des Auges und der Retina

Durch die Untersuchung der Schilddrüsenhormonkonzentration im Serum der Pax8 $-/-$ Maus wurde der hypothyreote Zustand des Tieres überprüft. Eine Verminderung des Schilddrüsenhormons in Pax8 $+/-$ gegenüber Pax8 $+/+$ konnte nicht festgestellt werden, die Hormonwerte von Pax8 $+/-$ und $+/+$ sind identisch (Abb. 5). Somit sind beide Genotypen euthyreot. Im Vergleich zu den wildtypischen (Pax8 $+/+$) und heterozygoten (Pax8 $+/-$) Wurfgeschwistern sind die Schilddrüsenhormonwerte von Pax8 $-/-$ deutlich erniedrigt (Abb. 5). Teilweise liegen die Werte unter dem Schwellenwert und sind somit nicht detektierbar (T3 und T4). Da Pax8 $-/-$ durch den Gendefekt nicht selbst in der Lage ist, Schilddrüsenhormon zu produzieren (Mansouri et al. 1998), gibt es drei Erklärungsmöglichkeiten für das gemessene fT3 und fT4 im Serum von Pax8 $-/-$. Zum einen könnte es sein, daß das gemessene Schilddrüsenhormon im Serum von Pax8 $-/-$ von der Mutter stammt. Im Mutterleib wird der Embryo mit mütterlichem Schilddrüsenhormon versorgt (Forrest 2004, Santisteban & Bernal 2005). Bei einer normalen Entwicklung des Embryos nimmt die Zufuhr des mütterlichen Hormons im Laufe der Schwangerschaft ab, sobald der Embryo in der Lage ist, sein eigenes Schilddrüsenhormon zu produzieren. Liegt hingegen ein Defekt in der Hormonproduktion des Embryos vor, wird der Transfer des Schilddrüsenhormons zwischen Mutter und Kind aufrechterhalten, um den embryonalen Hormonmangel durch das mütterliche Schilddrüsenhormon auszugleichen (Vulsma et al. 1989, Burrow et al. 1994). Da das Schilddrüsenhormon im Serum eine Halbwertszeit von sieben Tagen für T4 und ein bis zwei Tagen für T3 hat, kann das postnatal gemessene Schilddrüsenhormon in Pax8 $-/-$ noch von der Mutter stammen (Glossmann). Dies kann die Schilddrüsenhormonwerte im Serum von Pax8 $-/-$ aber maximal für die ersten 7 postnatalen Tage erklären. Ein weiterer Grund für die gemessenen Hormonwerte in Pax8 $-/-$ könnte mit der Muttermilch zugeführtes Schilddrüsenhormon sein. Sowohl in der Milch von Huftieren und Meerschweinchen (Akasha & Anderson 1984) als auch in der Muttermilch von Menschen (van Wassenaer et al. 2002) konnte Schilddrüsenhormon nachgewiesen werden. Diese Hormonkonzentration wird allerdings als zu gering angesehen, um eine frühkindliche Hypothyreose zu kompensieren (van Wassenaer et al. 2002). Auch könnte das Schilddrüsenhormon in der Muttermilch nur die gemessenen Schilddrüsenwerte von Pax8 $-/-$ in den ersten drei postnatalen Wochen (P0-PWo 3) erklären, da die Mäuse in der vierten Woche abgesetzt werden und somit keine

Muttermilch mehr erhalten. Die dritte Erklärung hängt mit der Zufuhr des Schilddrüsenhormons in der Nahrung zusammen. Dem hier verwendeten Futter ist laut Hersteller kein Schilddrüsenhormon zugesetzt (ssniff, http://www.ssniff.de/documents/03_katalog_dt_maus_ratte.pdf). Im Leitungswasser wurde hingegen FT3 (0,002 nmol/l) gemessen. Das Schilddrüsenhormon im Wasser könnte eine Erklärung für das Schilddrüsenhormon im Serum von Pax8^{-/-} über den gesamten gemessenen Zeitraum sein. Aus den Messungen der Schilddrüsenhormonwerte im Serum von Pax8^{-/-} ergibt sich, daß Pax8^{-/-} nicht athyreot sondern hypothyreot ist. Für die vorliegende Arbeit spielt dies keine Rolle. Die Auswirkungen eines veränderten, in unserem Fall hypothyreoten Zustandes des Schilddrüsenhormonwerts auf die postnatale Entwicklung des Auges und der Retina kann an der Pax8^{-/-} untersucht werden.

Die Augen von Pax8^{-/-} haben dieselbe Größe wie die der Kontrolltiere (Abb. 7). Alle vier ermittelten Parameter zur Bestimmung der Augengröße sind zu keinem Zeitpunkt der postnatalen Entwicklung (PWo 1-PWo 3) signifikant unterschiedlich zwischen den drei Pax8-Genotypen (+/+, +/- und -/-). Dies weicht von der Beobachtung eines reduzierten Körpergewichtes ab (siehe 4.6). Die auch postnatal normale Augenentwicklung von Pax8^{-/-} hängt vermutlich mit der pränatalen Anlage des Auges zusammen. In der pränatalen Entwicklung wird Pax8^{-/-} mit mütterlichem Schilddrüsenhormon versorgt. Ein Fehlen des Schilddrüsenhormons in der pränatalen Entwicklung führt zu einer reduzierten Augengröße (Gamborino et al. 2001). Im Gegensatz dazu zeigt die postnatale Hypothyreose von Pax8^{-/-} keinen Einfluß auf die Größe des Auges.

Auch die Entwicklung der Retina von Pax8^{-/-} ist nicht sichtbar verändert. Von PWo 1 bis PWo 3 ist die Entwicklung von Pax8^{-/-} identisch mit Pax8^{+/+} und Pax8^{+/-} (Abb. 8, 9, 10). Alle Schichten der Retina sind vorhanden und sehen bei den drei Genotypen vergleichbar aus. Die INL von Pax8^{-/-} scheint bei P7 aus weniger Zellreihen zu bestehen. Dies könnte aber einen technischen Grund haben. In PWo 2 erscheint die Gesamtretina von Pax8^{+/+} dicker und in PWo 3 weicht die Dicke der Retina von Pax8^{+/-} von den Retinadicken der anderen beiden Genotypen ab. Durch die Vorbehandlung und das Schneiden wird die Retina mechanisch stark belastet, es kann zu Stauchung und Dehnung des Gewebes kommen. Da die Dicke der Retina in allen drei Genotypen variiert, sind die Unterschiede wahrscheinlich ein technisches Artefakt.

Weiterhin zeigen die Anfärbungen verschiedener retinaler Zellklassen keine Veränderung der postnatalen Retina-Entwicklung von Pax8^{-/-}. Alle Färbungen mit den verschiedenen Antikörpern sehen bei Pax8^{-/-} und den Kontrollen gleichen Alters gleich aus (Abb. 11-23). Eventuelle Unterschiede in der Dicke einzelner Retinaschichten sind auch bei den

Diskussion

Kryostatgefrierschnitten auf technische Artefakte zurückzuführen, da auch in diesen Schnitten die Retinadicke innerhalb aller drei Genotypen variiert.

Wie bei der Augengröße führt ein Fehlen des Schilddrüsenhormons in der pränatalen Phase zu Veränderungen in der Schichtung und Differenzierung verschiedener Zelltypen der Retina (Sevilla-Romero et al. 2002, Pinazo-Duran et al. 2005). Der rein qualitative Vergleich der Retina-Morphologie von Pax8 $-/-$ mit den Kontrolltieren während den ersten drei Wochen der postnatalen Entwicklung hingegen zeigt, daß die Hypothyreose keinen Einfluß hat.

Die elektronenmikroskopische Betrachtung der Photorezeptorsynapsen zeigte für Pax8 $-/-$ ebenfalls keine Auffälligkeiten (Abb. 24). Auch die synaptische Struktur ist also durch die Hypothyreose nicht verändert. Die Zapfensynapsen sind ausgebildet. Die Synapse der Photorezeptoren ist eine besondere chemische Synapse. Sie wird Bandsynapse (engl. ribbon synapse) genannt, da sich die Neurotransmitter-Vesikel um ein Ribbon anordnen. Die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran zur Ausschüttung des Transmitters erfolgt an der Stelle, wo der Ribbon mit der Membran verbunden ist. Bei Pax8 $-/-$ sind die Ribbons in den Zapfensynapsen entwickelt und mit der Membran verbunden (Abb. 24). Dieses ist im Ohr von Pax8 $-/-$ anders. Die Pax8 $-/-$ Maus ist taub (Christ et al. 2004). Es wird angenommen, daß aufgrund der Hypothyreose eine Unterentwicklung der Ribbons in der Synapse der Haarsinneszellen im Ohr zur Taubheit von Pax8 $-/-$ führt (Sendin et al. 2007).

Der Nachweis der Transkripte für die zwei Zapfenopsine (S- und M-Opsin) und das Stäbchenopsin sowie den Schilddrüsenhormonrezeptor β 2 (TR β 2) und die Deiodinasen 2 und 3 (Deio 2, 3) konnte erbracht werden (Abb. 25). In P21 alten Pax8 $-/-$ und den Kontrolltieren werden diese Transkripte in der Retina exprimiert. Dieser Nachweis ist qualitativ und gibt keinen Aufschluß über die exprimierte Menge oder die Ortsverteilung einzelner Transkripte. Auch über das Vorhandensein der aus den Transkripten translatierten Proteine, außer für die Zapfenopsine, kann keine Aussage getroffen werden. Um eine qualitative Aussage über die jeweilige Transkriptmenge machen und um die Transkripte und Proteine in der Retina lokalisieren zu können, müßten weitere Versuche mit den Methoden der quantitativen RT-PCR, In-situ-Hybridisierung und Immunzytochemie angeschlossen werden.

Die Untersuchungen des Auges und der Retina von Pax8 $-/-$ in den ersten drei Wochen postnatal haben ergeben, daß die Hypothyreose keinen Einfluß auf die generelle postnatale Entwicklung der Morphologie des Auges und der Retina hat.

4.3 Entwicklung und Ausprägung des Zapfenmusters der wildtypischen Maus

Alle Säugetiere verfügen über ein speziesspezifisches Zapfenmuster, welches sich evolutionär an die unterschiedlichen visuellen Anforderungen angepasst hat. So kann beispielsweise die Zapfendichte genetisch nahe verwandter Tiere durch die Anpassung an unterschiedliche Lebensweisen (Nachtaktivität gegenüber Tagaktivität) verschieden sein (Peichl 1997, 2005; Ahnelt & Kolb 2000). Das Zapfenmuster der meisten Säuger weist trotzdem grundsätzliche Gemeinsamkeiten auf. Die meisten Säuger exprimieren beide Zapfentypen über die gesamte Retina, wobei die S-Zapfen in einer geringeren Dichte vorliegen als die M-Zapfen (Peichl 1997, 2005; Ahnelt & Kolb 2000). Das Zapfenmuster der Maus weicht von diesem Muster ab (Szel et al. 1998, Applebury et al. 2000). In der Retina der Maus sind die M- und S-Opsine in einem gegenläufigen dorso-ventralen Gradienten exprimiert. An der Ausbildung solcher retinalen topographischen Muster sind viele Faktoren beteiligt. Entlang der dorso-ventralen Achse der Retina werden während der Embryogenese verschiedene Faktoren exprimiert. Die Transkriptionsfaktoren Vax und Retinsäure werden in der ventralen Retina exprimiert, wohingegen die Mitglieder der Tbx-Familie und BMP in der dorsalen Retina vorzufinden sind (Peters 2002, Schulte & Bumsted-O'Brien 2007). Alle diese Faktoren sind an einer Musterbildung verschiedener Retinazellen beteiligt.

Das Zapfenmuster der Maus wird postnatal gebildet. Zunächst exprimieren alle Zapfen das S-Opsin (Abb. 26), erst in der zweiten postnatalen Woche sind die M-Zapfen immunzytochemisch nachweisbar. Das spezifische Zapfenmuster der Maus wird durch die postnatale Regulierung der Opsinexpression generiert, alle Zapfen werden hingegen pränatal generiert, die Gesamtzapfendichte wird also embryonal festgelegt (Szel et al. 1998). Eine regionale Veränderung des Zapfenmusters ist deshalb nicht auf eine Veränderung der Zapfenzahl zurückzuführen, sondern beruht auf einem Umschalten vom S- zum M-Opsin in einzelnen Zapfen. Ein wichtiger Faktor zur Regulierung der Opsinexpression ist der Schilddrüsenhormonrezeptor $\beta 2$ (TR $\beta 2$), der in den Zapfen exprimiert wird. Wie durch Ng et al. 2001 beschrieben, führt ein Fehlen dieses Rezeptors in der TR $\beta 2$ $-/-$ Maus zu einem völligen Verlust der M-Opsinexpression, gleichzeitig exprimieren alle Zapfen das S-Opsin. An der Musterbildung der Zapfen scheint aber nicht nur der Rezeptor sondern auch das Schilddrüsenhormon selbst beteiligt zu sein. Die Regulierung der Opsinexpression wird durch die Wirkung des Schilddrüsenhormons als Ligand des Rezeptors gesteuert. Das Schilddrüsenhormon liegt in einem dorso-ventralen Gradienten, mit hohen Mengen des Hormons im dorsalen Bereich der Retina, vor (Roberts et al. 2006). Anders als bei der TR $\beta 2$ $-/-$ Maus werden in der Pax8 $-/-$ Maus beide Opsine gebildet, so daß von einer hormonvermittelten Regulierung der Opsinexpression auszugehen ist. Die Untersuchung dieses Hormoneinflusses war das Kernthema der vorliegenden Arbeit.

Diskussion

Zunächst wurde das Zapfenmuster der drei Maus-Stämme C57BL/6J (C57), Sv129 und Pax8 +/- verglichen. Die Stämme C57 und Sv129 gelten als wildtypisch. Der Vergleich des Zapfenmusters wildtypischer Mäuse unterschiedlicher Stämme diente der Beantwortung zweier Fragen. Zum einen sollte geklärt werden, ob sich das Zapfenmuster in verschiedenen als wildtypisch geltenden Mäusen unterscheidet. Zum anderen basiert der Pax8-Stamm auf dem genetischen Hintergrund von C57 und Sv129 (Mansouri et al. 1998). Durch einen Vergleich des Zapfenmusters von Pax8 +/- mit den beiden wildtypischen Mäusen sollte die Bandbreite der genetischen Variabilität des Zapfenmusters von Pax8 bestimmt werden. Zur Untersuchung der Entwicklung des Zapfenmusters wurden die Zeitpunkte PWo 3 und PWo 22 gewählt. PWo 3 ist ein junges postnatales Stadium, bei dem das adulte Zapfenmuster noch nicht vollständig ausgeprägt ist, aber bereits beide Zapfenopsine exprimiert werden. Außerdem werden die meisten Pax8 -/- nicht älter als drei Wochen, so daß dieser Kontrollpunkt für den Vergleich der Pax8-Genotypen wichtig ist. Der zweite gewählte Zeitpunkt PWo 22 ist ein adultes Stadium. Aus eigenen Entwicklungsstudien des Zapfenmusters bei C57 und Sv129 ist bekannt, daß die Ausprägung des Zapfenmusters mit der 10. - 12. postnatalen Woche abgeschlossen ist. Bei PWo 22 ist somit ein vollständig ausgereiftes adultes Zapfenmuster sichergestellt.

Da in dieser Studie der Zusammenhang zwischen Schilddrüsenhormonkonzentration und Ausbildung des Zapfenmusters untersucht werden sollte, wurden auch die Hormonwerte (gebundenes und freies T3 und T4) der drei Wildtypen zu den gewählten Zeitpunkten gemessen. Für einen Vergleich ist die Konzentration aller Hormonformen relevant (Glossmann). In den drei Wildtypen C57, Sv129 und Pax8 +/- sind alle vier Schilddrüsenhormone vorhanden. Die fT3-Werte aller drei Wildtypen sind in PWo 3 gleich (Abb. 28). Die größten Unterschiede liegen bei den T4-Werten, die bei C57 doppelt so hoch sind wie bei Sv129 und Pax8 +/- . Das Vorhandensein aller vier Schilddrüsenhormone und dieselbe Menge an gemessenen fT3 als biologisch wirksamstes Schilddrüsenhormon sprechen trotz gewisser Unterschiede der fT4-, T3- und T4-Werte zwischen den drei Stämmen dafür, daß C57, Sv129 und Pax8 +/- euthyreot sind. Im adulten Alter (PWo 22) sind die Hormonwerte bei Sv129 und Pax8 +/- gleich und liegen niedriger als in PWo 3 (Abb. 29). Die niedrigeren Werte im adulten Alter wurden auch schon in Abb. 5 für Pax8 +/- und +/- beschrieben. Bei C57 ist nur der Gehalt des T4 deutlich abgesunken. Auch im adulten Alter sind alle drei Wildtypen, trotz Unterschieden in den Hormonwerten, euthyreot. Aus der Diagnostik ist bekannt, daß es individuelle Unterschiede geben kann, die innerhalb eines Normbereichs liegen. Erst wenn dieser Normbereich über- oder unterschritten wird, kann von einer veränderten Schilddrüsenhormonkonzentration gesprochen werden (Pschyrembel 1986). Außerdem können die Schilddrüsenhormonwerte zwischen verschiedenen

Diskussion

Mäusestämmen unterschiedlich sein. Deshalb wird angenommen, daß die wildtypischen gesunden C57-, Sv129- und Pax8 +/+ Tiere euthyreot sind.

Zur näheren Untersuchung der Ausprägung des Zapfenmusters wurden vier Standard-Positionen festgelegt, die dorsal und ventral jeweils die Peripherie und das Zentrum der Retina repräsentieren (Abb. 30). Für die drei Wildtypen C57, Sv129 und Pax8 +/+ wurde bei PWo 3 (Abb. 31, 32) und PWo 22 (Abb. 33, 34) durch Auszählen mikroskopischer Aufnahmen die Dichte der S- und M-Zapfen bestimmt (Abb. 39, 40). Dabei ging es vor allem um die regionalen Unterschiede im Mischungsverhältnis beider Zapfentypen, die durch das jeweils exprimierte S- und M-Opsin definiert sind.

Die drei Wildtypen C57, Sv129 und Pax8 +/+ zeigen ein gleiches Zapfenmuster: M- und S-Zapfen sind in einem gegenläufigen dorso-ventralen Gradienten über die Retina angeordnet (Abb. 39). Das wildtypische S-Zapfenmuster zeigt höchste Dichten von S-Zapfen in der ventralen Retina, in der dorsalen Retina hingegen exprimieren nur wenige Zapfen das S-Opsin. Das M-Zapfenmuster zeigt eine hohe Zahl von M-Zapfen in der dorsalen Retina. Im Gegensatz zum S-Zapfenmuster verläuft der M-Zapfengradient bei allen drei Mausstämmen flacher, da im Vergleich zu den geringen S-Zapfendichten in der dorsalen Retina die M-Zapfendichten in der ventralen Retina höher sind. Auch das vollständig ausgeprägte S- und M-Zapfenmuster bei PWo 22 ist bei alle drei Wildtypen vergleichbar.

Bei Betrachtung der Zapfendichten der drei Wildtypen gibt es leichte Unterschiede in den einzelnen Positionen im Alter von PWo 3. Einen signifikanten Unterschied gibt es nur zwischen den Werten der S-Zapfendichten von Sv129 und den beiden anderen Wildtypen an der Position 75% ventral. Die S-Zapfendichte von Sv129 ist an dieser Stelle signifikant höher. Die Folge ist, daß bei C57 und Pax8 +/+ die höchste S-Zapfendichte bei der Position 50% ventral liegt und zur ventralen Peripherie (75% ventral) hin abnimmt, wohingegen bei Sv129 die höchste S-Zapfendichte bei der Position 75% ventral liegt. Die M-Zapfendichten hingegen sind bei allen drei Wildtypen im Alter von PWo 3 gleich.

Wie bereits erwähnt bleiben auch im adulten Alter die Ausprägung des S- und M-Zapfenmusters über die gesamte Retina der drei Wildtypen erhalten (Abb. 40).

Der dorso-ventrale Dichtegradient der S-Zapfen wird jedoch durch eine stärkere Reduktion der dorsalen S-Zapfendichte verstärkt. Durch eine unterschiedlich starke Reduktion der dorsalen S-Zapfendichte in den drei Stämmen ist die Ausprägung des S-Zapfengradienten verschieden. An der Position 50% dorsal sind die S-Zapfendichten von Pax8 +/+ signifikant höher als bei C57. Der adulte S-Zapfengradient von Pax8 +/+ verläuft somit flacher.

Diskussion

Die Ausprägung des M-Zapfenmuster wird mit dem Alter nicht verändert, die M-Zapfendichten von C57 und Pax8 +/+ sind ähnlich. Die M-Zapfendichten bei Sv129 hingegen sind deutlich geringer als bei C57 und Pax8 +/+.

Sowohl die S- als auch die M-Zapfendichten von Sv129 sind im Alter von PWo 22 geringer als bei den anderen beiden Wildtypen und auch als bei PWo 3. Eine Erklärung dafür könnte sein, daß die Zapfen bei Sv129 mit dem Alter degenerieren. Die Dichtezählungen wurden, wie beschrieben, bei allen Tieren an opsingefärbten Retinae gemacht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß durch entweder eine schwache Opsinexpression oder methodischen Fehler nicht alle Zapfen sichtbar gemacht wurden. Bei jeder immunzytochemischen Färbung unter gleichen Bedingungen kann von einer gleichen Bindung des Antikörpers ausgegangen werden. Werden die Bedingungen geringfügig verändert, kann es zu einer Beeinträchtigung der Antikörperbindung kommen, die zu einem veränderten Resultat führt. Durch eine Färbung aller Zapfen mit PNA oder Glypho könnte die Zapfenzahl überprüft werden.

Anhand dieser Studie kann daher nicht entgültig geklärt werden, ob die ausgewerteten S- und M-Zapfendichten von Sv129 im Alter von PWo 22 den tatsächlichen Zapfendichten entsprechen. Aus diesem Grund sind die Signifikanzen für Sv129 nicht in der Abbildung 40 eingezeichnet.

Die Unterschiede in der Ausprägung des S-Zapfenmusters zwischen PWo 3 und PWo 22 lassen erkennen, daß sich das Zapfenmuster postnatal entwickelt.

Die Entwicklung des S-Zapfenmusters findet über eine Reduktion der S-Opsinexpression in Zapfen der dorsalen Retina statt, dabei nimmt die Expressionstärke in den meisten Zapfen bis auf Null ab. Die Entwicklung des M-Zapfenmusters findet über eine Reduktion der M-Opsinexpression in den ventralen Zapfen statt, dabei ist die Reduktion schwächer, so daß alle Zapfen M-Opsin exprimieren. In der vorliegenden Studie wurde nicht die Expressionsstärke bewertet, sondern es wurde die Zapfendichte aus allen Zapfen ermittelt, die das jeweilige Opsin enthielten. Dies könnte der Grund sein, warum es schwieriger ist, eine Entwicklung des M-Zapfenmusters zu erkennen.

Der Vergleich der S- und M-Zapfenmuster der drei Wildtypen unterschiedlicher Stämme zeigt, daß ein mausspezifisches Zapfenmuster, bestehend aus gegenläufigen dorso-ventralen S- und M-Zapfengradienten, existiert, daß aber die Ausprägung der Zapfenmuster in den drei Wildtypen unterschiedlich ist.

Aus diesem Grund wurde bei den Untersuchungen des Zapfenmusters von Pax8 -/- der Pax8-Wildtyp (+/+) als Kontrolltier verwendet. Generell war die Bewertung des Zapfenmusters des Pax8-Stammes schwierig. Der Pax8-Stamm basiert auf dem genetischen

Hintergrund der Stämme C57 und Sv129 (Mansouri et al. 1998). Durch die Kreuzung dieser beiden in ihrem Zapfenmuster unterschiedlichen Wildtypen zeigte sich bei Pax8 +/+ eine hohe Heterogenität hinsichtlich des Zapfenmusters. Um die Ausprägung des Zapfenmusters gegenüber der genetischen Variabilität abzugrenzen, wurden daher nicht nur die Zapfenmuster innerhalb des Pax8-Stammes verglichen, sondern bei jeder Untersuchung auch Wurfgeschwister für den Vergleich verwendet.

4.4 Generierung und Aufrechterhaltung des Zapfenmusters in Abhängigkeit vom Schilddrüsenhormon

Das Zapfenmuster von Pax8 -/- wird aus den oben erwähnten Gründen mit den Zapfenmustern von Pax8 +/- und +/+ verglichen.

Das wildtypische Zapfenmuster von Pax8 +/+ wurde unter 4.3 beschrieben. Das Zapfenmuster von Pax8 +/- gleich dem Muster von Pax8 +/+ (Abb. 41-48). Nach der Feststellung der Euthyreose von Pax8 +/- war eine Veränderung des Zapfenmusters in Abhängigkeit von der Schilddrüsenhormonkonzentration nicht zu erwarten. Auch in der Retina von Pax8 -/- wird das S- und M-Opsin exprimiert, jedoch mit abweichendem Verteilungsmuster. In Pax8 -/- ist kein S-Opsingradient ausgebildet, alle Zapfen über die gesamte Retina exprimieren das S-Opsin. Gleichzeitig ist die Expression des M-Opsins bei PWO 3 reduziert. Am stärksten ist die Reduktion der M-Opsinexpression in der zentralen Retina (Abb. 42, 46, 47, 48). Auch für die mRNAs des S- und M-Opsins zeigt sich in Pax8 -/- dasselbe veränderte Verteilungsmuster wie für die S- und M-Opsine (Abb. 49, 50). Es kann somit davon ausgegangen werden, daß der Effekt des Schilddrüsenhormons auf einer Regulierung der mRNA der S- und M-Opsine beruht und nicht durch eine posttranslationale Modifikation hervorgerufen wird. Da der Effekt des Hormonmangels sowohl in der Verteilung der mRNA als auch der Opsine sichtbar wird, kann durch Färbung der S- und M-Opsine eine Aussage über die Veränderung der Ausprägung des Zapfenmusters gemacht werden. Dies erfolgte durch eine Quantifizierung der S- und M-Zapfendichten.

Die S- und M-Zapfendichten von Pax8 +/+ und +/- sind in einem gegenläufigen dorso-ventralen Gradienten über die Retina angeordnet. Die höchsten S-Zapfendichten befinden sich dabei in der ventralen Retina und nehmen zur dorsalen Peripherie hin ab, die höchsten M-Zapfendichten hingegen liegen in der dorsalen Retina. Auch bei der Quantifizierung der S- und M-Zapfendichten konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Pax8 +/+ und +/- festgestellt werden (Abb. 51, 52). Die veränderte Ausprägung der Zapfenmuster bei Pax8 -/- hingegen wird durch die Quantifizierung der Dichten bekräftigt. Die S-Zapfendichten von Pax8 -/- haben bei PWO 3 über die gesamte Retina denselben Wert. Es ist somit im

Diskussion

Gegensatz zu den Kontrolltieren kein S-Zapfengradient zwischen der dorsalen und der ventralen Retina ausgebildet. Die S-Zapfendichten im ventralen Bereich der Retina sind signifikant geringer als bei Pax8 +/+. In der dorsalen Peripherie der Retina (75% dorsal) ist die S-Zapfendichte bei Pax8 -/- signifikant höher.

Durch die Ermittlung der M-Zapfendichten wird die Reduktion der M-Zapfen bei Pax8 -/- quantifiziert. Die Ausprägung des M-Zapfenmusters, mit den höchsten M-Zapfendichten im dorsalen Bereich, ist bei Pax8 -/- ebenso wie bei den Kontrolltieren vorhanden, aber die M-Zapfendichten von Pax8 -/- im Alter von PWo 3 sind an jeder Positionen geringer. Im zentralen Bereich sind die Dichten signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren.

Im adulten Alter von PWo 22 ist, wie schon bei den Untersuchungen der Wildtypen gesehen, der Gradient des S-Zapfenmuster bei den Kontrolltieren stärker ausgeprägt als bei Pwo 3. Im M-Zapfenmuster gibt es hingegen wie auch unter 4.3 beschrieben keine Veränderung. Das adulte S-Zapfenmuster von Pax8 -/- unterscheidet sich hingegen nicht vom S-Zapfenmuster bei PWo 3. Immer noch existiert kein Gradient, da die S-Zapfendichten über die gesamte Retina von Pax8 -/- gleich sind, allerdings sind die Dichten bei PWo 22 höher. Das M-Zapfenmuster von Pax8 -/- ist hingegen im Alter verändert und ist nun gleich mit dem Zapfenmuster der Kontrolltiere. Die M-Zapfendichten von Pax8 -/- haben an jeder Position zugenommen, so daß sie zwischen Pax8 -/- und den Kontrolltieren an keiner Position mehr signifikant unterschiedlich sind.

Die Zunahme in der M-Zapfendichte von Pax8 -/- könnte durch eine im Alter von PWo 3 zunächst schwache Expression des M-Opsins erklärt werden, die im adulten Alter von PWo 22 stärker ist und ein wildtypisches M-Zapfenmuster sichtbar werden läßt. Auch die höheren S-Zapfendichten im adulten Alter könnten durch eine anfänglich schwache und im Alter stärker werdende S-Opsinexpression erklärt werden.

Da die Zapfenzahl postnatal nicht verändert wird, erklärt sich die beobachtete Zunahme der S- und M-Zapfendichten durch eine stärkere Opsinexpression im adulten Alter, was zu einem Mitzählen der Zapfen bei Ermittlung der Zapfendichte führt. Um zu bestätigen, daß postnatal keine neuen Zapfen gebildet werden, könnten entweder alle Zapfen mit PNA oder Glypho markiert werden oder postmitotische Zapfen mit BrdU (Bromdesoxyuridin) oder einem Antikörper gegen die phosphorylierte Form des Histons 3 angefärbt werden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß die Hypothyreose von Pax8 -/- eine veränderte Ausprägung des S-Zapfenmusters bewirkt, das keinen Gradienten der S-Zapfen hat. Die Ausprägung des M-Zapfenmusters scheint hingegen nur verzögert zu sein, da das adulte M-Zapfenmuster von Pax8 -/- dem wildtypischem Muster entspricht.

Diskussion

Die Befunde der vorliegenden Studie sind ein weiterer Beleg dafür, daß das Schilddrüsenhormonsystem an der Generierung des Zapfenmusters beteiligt ist. Schon die Ergebnisse der TR β 2 -/- Maus haben gezeigt, daß ein Fehlen des Schilddrüsenhormonrezeptors zu Veränderungen in der Ausprägung des Zapfenmusters führt (Ng et al. 2001). Im Gegensatz zur TR β 2 -/- Maus, die über die gesamte Retina eine gleiche Verteilung von S-Zapfen hat und einen völligen Verlust von M-Zapfen (Ng et al. 2001), werden in der Pax8 -/- beide Opsine exprimiert. Während der Entstehung dieser Studie wurde von Robert et al. 2006 eine Arbeit zur Rolle des Schilddrüsenhormons veröffentlicht. In dieser Arbeit wird beschrieben, daß das Schilddrüsenhormon in einem dorso-ventralen Gradienten, der dem Gradienten der S-Zapfen gegenläufig ist, über die Retina exprimiert wird. Außerdem zeigten Roberts et al. 2006, daß eine sehr frühe (P2) Thyroxinsubstitution eine Veränderung in der Ausprägung des Zapfenmusters von wildtypischen Mäusen bewirkt. Es muß allerdings angemerkt werden, daß die von Roberts et al. 2006 verwendete Thyroxinkonzentration weit oberhalb der in der Maus vorkommenden physiologischen Konzentration lag und die Substitution in einem sehr frühen Alter stattfand. Eine Aussage zur Rolle des Schilddrüsenhormons bei der Aufrechterhaltung des Zapfenmusters über das ganze Leben, kann durch die Studie von Roberts et al. 2006 deshalb nicht gemacht werden.

Auch durch die vorliegende Studie sollte ein Zusammenhang zwischen dem Schilddrüsenhormonsystem und der Zapfenopsinexpression nachgewiesen werden. Außerdem sollte ermittelt werden, ob das Schilddrüsenhormon sowohl für die Generierung des Zapfenmusters als auch zur Aufrechterhaltung über das ganze Leben benötigt wird.

Zur Untersuchung dieser Frage wurde die Pax8 -/- Maus mit Schilddrüsenhormon substituiert.

Um die Rolle des Schilddrüsenhormons bei der Generierung des Zapfenmusters zu untersuchen, wurde die Pax8 -/- Maus ihr ganzes Leben mit der physiologischen Konzentration von 18 ng Thyroxin/g Körpergewicht substituiert. Da das Zapfenmuster der Maus postnatal gebildet wird, kann der Einfluß einer postnatalen Substitution mit Schilddrüsenhormon auf die Expression der Opsine untersucht werden. Neben der Arbeit von Roberts et al. 2006 ist auch durch andere Studien gezeigt worden, daß eine postnatale Substitution mit Schilddrüsenhormon zu einer normalen Entwicklung der Retina hypothyreoter Ratten führt (Pinazo-Duran et al. 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, daß eine tägliche physiologische Thyroxinsubstitution zu einer Euthyreose bei Pax8 -/- führt (Christ et al. 2004). In der vorliegenden Studie wurde die Thyroxinsubstitution der Pax8 -/- direkt nach der Genotypisierung am P2 begonnen und endete mit dem Tötungszeitpunkt im adulten Alter von P_{Wo} 12 (Versuch V1). Vor der Analyse des Zapfenmusters wurde der euthyreote Zustand von V1 überprüft. In der Graphik (Abb. 59) ist zu erkennen, daß V1

gleiche Schilddrüsenhormonwerte hat wie Pax8 +/+. Die Substitution von Thyroxin war erfolgreich und hat zu einer Euthyreose von V1 geführt. Anschließend wurde die Auswirkung der veränderten Schilddrüsenhormonwerte von V1 auf die Expression der Opsine analysiert (Abb. 60, 61, 62). Dabei wurden dieselben Positionen wie zur Ermittlung der Zapfendichte der anderen Tiere (C57, Sv129, Pax8-Genotypen) verwendet. Es ist deutlich zu erkennen, daß V1 dieselbe Ausprägung des M-Zapfenmusters wie Pax8 +/+ aufweist. Auch die M-Zapfendichten jeder Position sind nahezu identisch. Ebenso ist das S-Zapfenmuster von V1 identisch mit Pax8 +/+. Durch eine Reduktion der S-Zapfendichte in der dorsalen Retina hat V1 einen dorso-ventralen Dichtegradient der S- Zapfen.

In einer weiteren Versuchsreihe V2 wurden Pax8 -/- Mäuse in den ersten vier Postnatalwochen mit einer physiologischen Thyroxinkonzentration substituiert und blieben danach acht Wochen unsubstituiert, bevor sie ebenfalls im Alter von PWo 12 getötet wurden. Durch diesen Versuchsansatz sollte untersucht werden, ob die Ausbildung des Zapfenmusters in Abhängigkeit vom Schilddrüsenhormon plastisch ist.

Auch das M-Zapfenmuster von V2 ist identisch mit dem Muster von Pax8 +/+. Aus den bei der Beschreibung des Zapfenmusters von Pax8 -/- genannten Gründen ist ein Einfluß des Schilddrüsenhormons auf die Expressionsstärke des M-Opsins allerdings nicht so leicht ersichtlich. Da im Alter PWo 12 das M-Zapfenmuster von Pax8 -/- dem von Pax8 +/+, V1 und V2 gleicht (Abb. 56, 62), ist davon auszugehen, daß die Ausprägung des M-Zapfenmusters nur zeitlich verzögert ist und nicht durch das Schilddrüsenhormon reguliert wird. Die S-Zapfendichten von V2 sind identisch mit den Dichten von Pax8 -/- in der PWo 12 (Abb. 55, 62) und somit unterschiedlich zu Pax8 +/+ und V1. V2 zeigt ebenso wie Pax8 -/- keinen S-Zapfengradienten, die Dichten sind über die gesamte Retina nahezu identisch. An der Position 75% dorsal sind die S-Zapfendichten von V2 signifikant höher als von Pax8 +/+ und V1. Da im Versuch gezeigt wurde, daß eine Substitution mit Thyroxin bis zur PWo 4 eine Euthyreose und ein wildtypisches S-Zapfenmuster in Pax8 -/- erzeugt, kann gefolgert werden, daß die Hormonregulierung der S-Opsinexpression auch nach PWo 4 anhält und durch eine erneute Hypothyreose (V2) zu einer Veränderung des S-Zapfenmusters führt.

Auch in anderen Sinnessystemen wurde eine Beteiligung des Schilddrüsenhormons bei der Entwicklung nachgewiesen. So ist das Schilddrüsenhormon an der Entwicklung der Ribbonsynapse der inneren Haarsinneszellen im Ohr beteiligt (Sendin et al. 2007). Durch eine Substitution mit Thyroxin entwickelt sich die Synapse des Innenohrs von Pax8 -/- (Sendin et al. 2007) und das Hörvermögen kann verbessert werden (Christ et al. 2004).

Durch Thyroxinsubstitutionen bei Pax8 -/- im adulten Alter sollte sichergestellt werden, daß die Veränderungen im Zapfenmuster von V2 nicht die Folgen einer frühen postnatalen Substitution sind, sondern eine lebenslange Plastizität, also eine Regulierung des

Zapfenmusters durch das Schilddrüsenhormon über das ganze Leben, nachweisen. Als adulte Pax8 $-/-$ wurden P_{Wo} 12 alte Tiere verwendet, die sechs Wochen lang täglich mit 18 ng Thyroxin/g Körpergewicht (physiologische Konzentration) substituiert wurden (V3).

Die Schilddrüsenhormonwerte von V3 und Pax8 $+/+$ sind gleich, V3 ist euthyreot (Abb. 64).

Die gleichaltrigen Pax8 $-/-$ hingegen, die nicht mit Thyroxin behandelt wurden, sind hypothyreot. Das S-Zapfenmuster von V3 ist nicht signifikant unterschiedlich zu Pax8 $+/+$ und $-/-$ (Abb. 65, 67). Allerdings sind hier auch die S-Zapfendichten der Wurfgeschwister-Kontrollen von Pax8 $-/-$ und $+/+$ nicht signifikant unterschiedlich. Der Einfluß des Schilddrüsenhormons auf die Ausprägung des M-Zapfenmusters von V3 ist ebenfalls nicht zu erkennen (Abb. 66, 67).

Zunächst könnte aus V3 geschlossen werden, daß das Schilddrüsenhormon nach P_{Wo} 12 keinen Einfluß mehr auf das Zapfenmuster hat, es also keine lebenslange Plastizität gibt. Die ungewöhnlichen Opsinexpressionsmuster der V3-Kontrollen zeigen jedoch, wie heterogen die Opsinexpression bei Pax8 sein kann. Der Versuchsreihe V3 fehlt es deshalb an Aussagekraft. Womöglich hätte eine größere Zahl von Versuchstieren oder eine länger andauernde Hormonsubstitution klarere Ergebnisse erbracht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde jedoch ein zweiter methodischer Ansatz für zielführender erachtet, um die Frage nach der adulten Plastizität des Zapfenmusters anzugehen. Dies war die pharmakologische Suppression des Schilddrüsenhormons bei adulten wildtypischen C57-Mäusen. Der Vorteil des Ansatzes ist die Einbeziehung eines weiteren Mausstammes, dessen normale postnatale Zapfenentwicklung sichergestellt ist und dessen Opsinexpressionsmuster weniger heterogen als das von Pax8 ist.

Adulte C57 wurden im Alter von P_{Wo} 12 durch eine Applikation mit Methimazol hypothyreot gemacht (V4) (Abb. 70). Das Thyreostatikum Methimazol wurde gewählt, da es auch in der Humanmedizin zur Behandlung der Hyperthyreose eingesetzt wird und im Gegensatz zu dem Propylthiouracil (PTU) nicht die Deiodinase 1 hemmt (Pschyrembel 1986, Glossmann). Bei V4 wurde im Unterschied zu V3 Methimazol für einen verlängerten Zeitraum von 12 Wochen appliziert.

Die Zapfenmuster von V4 wurden im Vergleich mit C57-Kontrolltieren analysiert (Abb. 71, 72, 73).

Die S-Zapfendichten von V4 sind in allen Positionen über die gesamte Retina ungefähr gleich. In der ventralen Retina sind sie niedriger und in der dorsalen Retina höher als bei C57. Außer an der Position 75% ventral sind die S-Zapfendichten signifikant unterschiedlich zu C57. Die Verteilung der S-Zapfendichten von V4 entspricht somit dem hypothyreoten Muster von Pax8 $-/-$. Auch das M-Zapfenmuster von V4 ist verändert. Die M-Zapfendichte

von V4 ist an allen Positionen reduziert und an der Position 50% ventral signifikant unterschiedlich zu C57 (Abb. 73).

Die Rolle des Schilddrüsenhormons bei der Ausbildung des M-Zapfenmusters konnte bei der Pax8 $-/-$ Maus und den Versuchen V1, V2 und V3 nur schwer ausfindig gemacht werden. Die M-Zapfendichten von Pax8 $-/-$ und V2 waren im Vergleich zu den Kontrolltieren zwar ebenfalls wie bei V4 reduziert, aber sie waren nie signifikant unterschiedlich. Dennoch spricht eine Reduktion der M-Zapfendichte bei Pax8 $-/-$, V2 und V4 für eine Regulierung der M-Opsinexpression durch das Schilddrüsenhormon. Die Regulierung der M-Opsinexpression fällt allerdings geringer aus und ist nicht so offensichtlich wie die Regulierung der S-Opsinexpression durch das Schilddrüsenhormon.

Im Versuch V4 wurden als weitere Kontrollen C57-Tiere verwendet, die entweder nur mit Himbeersirup oder Natriumperchlorat behandelt wurden. Durch diese Kontrollen sollte der Effekt dieser zwei Substanzen überprüft werden. Die C57, die mit Himbeersirup behandelt wurden, sind euthyreot und zeigen ein wildtypisches Zapfenmuster. Das Natriumperchlorat führt wie Methimazol zu einer Hypothyreose, die allerdings schwächer ausgeprägt ist. Auch in der Humanmedizin wurde Natriumperchlorat früher zur Behandlung der Hyperthyreose eingesetzt (Pschyrembel 1986). Die schwache Hypothyreose der mit Natriumperchlorat behandelten C57 führt wie bei V4 zu Veränderungen des Zapfenmusters, die allerdings schwächer ausgeprägt sind.

Die Untersuchungen zeigen, daß die postnatale Hypothyreose der Pax8 $-/-$ Maus zu Veränderungen in der Ausprägung des Zapfenmusters führt, die vor allem im S-Zapfenmuster sichtbar werden. Das S-Zapfenmuster von V2 und V4 ist identisch mit dem S-Zapfenmuster von Pax8 $-/-$. Das S-Zapfenmuster von V1 hingegen ist identisch mit Pax8 $+/+$. Aus den Veränderungen der Zapfenmuster läßt sich deshalb folgern, daß das Schilddrüsenhormon durch eine Regulierung der Opsinexpression bei der Generierung des S- und M-Zapfenmusters beteiligt ist (Pax8 $-/-$, V1). Ebenso wird das Hormon lebenslang zur Aufrechterhaltung des wildtypischen Zapfenmusters benötigt (V2, V4). Hier liegt also eine adulte Plastizität vor, die als ungewöhnlich erachtet wird.

Durch viele Studien wurde die Rolle des Schilddrüsenhormons als wichtiger Signalgeber während der Entwicklung nachgewiesen, bei Ascidienlarven beispielsweise löst das Schilddrüsenhormon die Metamorphose aus (Patricolo et al. 2001, D'Agati & Cammarata 2006). Offenbar ist auch bei allen Vertebraten das Schilddrüsenhormon während der Entwicklung des Körpers essentiell (Yen 2001, Brown et al. 2005).

Als Ligand der TRs reguliert das Schilddrüsenhormon in vielen Zielorganen die Expression von Genen (Lazar et al. 2003, Ramos & Weiss 2006). Auch in der Retina wurden durch

Untersuchungen einer menschlichen Zelllinie neben den Opsinogenen weitere Zielgene des Schilddrüsenhormonsystems gefunden (Liu et al. 2007). Über den Regulierungsmechanismus der Genexpression ist jedoch wenig bekannt.

In der Maus wird die Opsinexpression durch eine spezielle Splicevariante des Schilddrüsenhormonrezeptors β , dem TR β 2, reguliert. Ein Fehlen des TR β 2 führt zu einer verstärkten S-Opsinexpression und zu einem völligen Verlust des M-Opsins. Dies zeigt sich an einer Veränderung des Zapfenmusters (Ng et al. 2001). Es wurde ebenfalls gezeigt, daß das Schilddrüsenhormon selbst, als Ligand des TR β 2, mit der Ausprägung des Zapfenmusters zusammenhängt (Roberts et al. 2006). Auch aus Untersuchungen der Retina anderer Vertebraten wie dem Fisch und dem Hühnchen ist bekannt, daß die Opsinexpression durch eine Veränderung der Schilddrüsenhormonkonzentration beeinflusst wird (Browman & Hawryshyn 1994, Hawryshyn et al. 2003, Harpavat 2005, Veldhoen et al. 2006).

An der Regulierung der Opsinexpression ist aber nicht nur der TR β 2 und das Schilddrüsenhormon beteiligt, auch die Retinsäurerezeptoren RXR γ und ROR β sind Regulatoren der S-Opsinexpression (Roberts et al. 2005, Srinivas et al. 2006). Die Retinsäure als Ligand der Retinsäurerezeptoren ist ebenfalls ein wichtiger Signalgeber in der Entwicklung (Mey 2006). Im Auge kommen verschiedener Formen des Retinsäurerezeptors vor (Mori et al. 2001). Die Retinsäure selbst ist in der Retina des Hühnchens in einem dorso-ventralen Gradienten angeordnet und reguliert die Expression musterbildender Faktoren (Sen et al. 2005). Auch das Schilddrüsenhormon wird in einem dorso-ventralen Gradienten in der Retina der Maus exprimiert (Roberts et al. 2006). Der TR β 2 ist hingegen gleichmäßig über die gesamte Retina verteilt (Applebury et al. 2007). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie und der Ausbildung des Zapfenmusters in der TR β 2 $-/-$ Maus kann geschlossen werden, daß entweder ein unligierter TR β 2 für die Ausprägung des M-Zapfenmusters verantwortlich ist, da ein Verlust des Rezeptors in der TR β 2 $-/-$ zum Verlust des M-Opsins führt (Ng et al. 2001), oder ein zweiter Faktor an der Regulierung der M-Opsinexpression mitbeteiligt ist, da eine Verminderung des Schilddrüsenhormons in der Pax8 $-/-$ oder in adulten C57 (V4) zu einer wildtypischen Ausprägung des M-Zapfenmusters, allerdings mit geringfügiger Reduktion der M-Zapfendichte, führt. Es kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden, daß eine verminderte Menge des Schilddrüsenhormons in der hypothyreoten und nicht athyreoten Pax8 $-/-$ und adulten C57-Maus (V4) zur Ausprägung des wildtypischen M-Zapfenmusters ausreicht. Für die Ausprägung des wildtypischen S-Zapfenmusters ist offenbar sowohl TR β 2 als auch das Schilddrüsenhormon verantwortlich. Das Fehlen des TR β 2 (TR β 2 $-/-$) (Ng et al. 2001) oder des Schilddrüsenhormons (Pax8 $-/-$) führt zu derselben Veränderung des S-Zapfenmusters, so daß davon auszugehen ist, daß die mit dem Schilddrüsenhormon ligierte Form des TR β 2 die Expression des S-Opsins

reguliert. Die Regulation findet dabei über eine Unterdrückung der S-Opsinexpression statt. Da das Schilddrüsenhormon graduell-verteilt in der Retina vorliegt, bildet sich das dorso-ventrale S-Zapfenmuster aus (Roberts et al. 2006). Durch andere Studien ist außerdem gezeigt worden, daß an der Ausprägung des S-Zapfenmusters auch Retinsäurerezeptoren beteiligt sind (Roberts et al. 2005, Srinivas et al. 2006).

4.5 Klinische Relevanz

Die Pax8 ^{-/-} Maus ist ein Model für das Krankheitsbild der angeborenen Hypothyreose. Diese Krankheit tritt beim Menschen bei einer von 3.600 Geburten auf (Mittag et al. 2005). Durch das Neugeborenen-Screening direkt nach der Geburt wird die Krankheit sofort erfaßt. Eine lebenslange Hormonsubstitution verhindert eine postnatale geistige und körperliche Unterentwicklung und die Patienten zeigen keine Symptome des Kretinismus (Pschyrembel 1986, Macchia et al. 1998). Auch im Laufe des Lebens können Erkrankungen erworben werden, die das Schilddrüsenhormon betreffen, als Beispiele seien Morbus Basedow (Hyperthyreose) und Hashimoto Thyreoiditis (Hypothyreose) genannt (Glossmann). Nach der Diagnose der Erkrankung werden die Patienten ebenfalls entsprechend behandelt (Grabenstein 2005). Da jede angeborene oder erworbene Störung des Schilddrüsenhormonsystems schwerwiegende physiologische Störungen zur Folge hat, werden betroffene Patienten sofort behandelt, um das Schilddrüsenhormon wieder ins Gleichgewicht (Euthyreose) zu bringen. Bisher wurden das Zapfenmuster und eventuelle Veränderungen des Sehvermögens bei solchen Patienten nicht untersucht. Eine Studie an Säuglingen mit mütterlicher Hypothyreose in der ersten Schwangerschaftshälfte zeigte Beeinträchtigungen des Sehvermögens (Mirabella et al. 2005). Dies betrachtet die Rolle des Schilddrüsenhormons bei der frühen Embryogenese, läßt aber noch keine Schlüsse auf die Folgen postnataler Hypothyreose zu. Durch die Untersuchungen der Pax8 ^{-/-} Maus und den Versuchen mit adulten wildtypischen Mäusen ist gezeigt worden, daß eine Euthyreose sowohl für die normale Entwicklung des Zapfenmusters als auch für seine lebenslange Aufrechterhaltung essentiell ist. Um eine Auswirkung auch beim Menschen zeigen zu können, müßten die Augen von Patienten, die eine Erkrankung des Schilddrüsenhormonsystems haben, untersucht werden.

4.6 Anmerkungen zum Körpergewicht

Die hypothyreote Pax8 ^{-/-} ist in der Körpergröße reduziert (<http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=alleleDetail&key=5279>). Eine Reduktion der Körpergröße korreliert mit einer Verminderung des Körpergewichts. Bei Pax8 ^{-/-} liegt durch die

Diskussion

angeborene Hypothyreose von Geburt an ein reduzierter Stoffwechsel vor, der zu einer Verminderung des Wachstum und der Differenzierung führt. Der Unterschied im Körpergewicht zwischen Pax8 -/- und den Kontrolltieren ist sowohl in der Entwicklung (PWo 1-PWo 3) als auch im adulten Alter (nach PWo 3) zu sehen. Ein signifikant geringeres Körpergewicht zeigt sich bei Pax8 -/- ab P8 (Abb. 6).

Eine früh begonnene Thyroxin-Substitution von Pax8 -/- führt zu einer normalen Zunahme des Körpergewichts (V1, V2), die auch durch eine Unterbrechung der Substitution nach PWo 4 nicht mehr beeinflusst wird (V2) (Abb. 58). Wird das Thyroxin hingegen erst im adulten Alter zugeführt (V3), verändert sich das Körpergewicht nur minimal und ist nicht identisch mit dem Gewicht wildtypischer Tiere (Abb. 63). Die im adulten Alter induzierte Hypothyreose von V4 führte zu einem im Vergleich zu den Kontrolltieren reduzierten Körpergewicht (Abb. 69). Das Gleichbleiben des Körpergewichts von V4 ist jedoch weniger durch die Veränderung des Schilddrüsenhormonsystems bedingt, als vielmehr durch eine verminderte Nahrungs- und Wasseraufnahme. Es wurde beobachtet, daß V4 im Vergleich zu Kontroll-C57, vermutlich durch eine Abneigung gegen das bitter schmeckende Methimazol, weniger Wasser zu sich genommen hat.

Zusammenfassend zeigt der Vergleich der Körpergewichte von V1, V2 und V3, daß eine frühe Thyroxin-Substitution zu einer normalen Entwicklung des Körpergewichts führt, eine im adulten Alter begonnene Substitution eine Zunahme des Körpergewichts auf ein normales Niveau hingegen nicht bewirken kann. Die Parameter für die Entwicklung des Körpergewichts werden deshalb vermutlich in der frühen Postnatalphase festgelegt.

5. Zusammenfassung

Die Maus hat wie die meisten Säugetiere zwei Zapfenopsine, das S-Opsin (UV-empfindlich) und das M-Opsin (grün-empfindlich). Die Zapfen werden nach dem jeweils exprimierten Opsin S-Zapfen oder M-Zapfen genannt. Bei der Maus wird die Zapfenzahl embryonal festgelegt, aber das Opsin-Expressionsmuster entwickelt sich erst postnatal (Szel et al. 1998). In der ersten Postnatalwoche (PWo 1) exprimieren alle Zapfen über die gesamte Retina das S-Opsin. Ab PWo 2 kann das M-Opsin immunzytochemisch nachgewiesen werden. Eine Besonderheit der adulten Maus ist die Koexpression beider Opsine in vielen Zapfen (Dualpigmentzapfen; Lukats et al. 2005). Außer einer geringen Zahl „echter“ S-Zapfen exprimieren alle Zapfen das M-Opsin entweder allein oder zusammen mit dem S-Opsin (Szel 1993, Applebury 2000, Haverkamp et al. 2005). Das adulte wildtypische Zapfenmuster besteht aus gegenläufigen dorso-ventralen Gradienten der S- und M-Zapfen (Szel 1993, Applebury 2000). Das M-Opsin wird stärker in der dorsalen Retina exprimiert und die Expression nimmt zur ventralen Retina ab. In der ventralen Retina exprimieren alle Zapfen das S-Opsin, in der dorsalen Retina ist die Zahl der S-Zapfen sehr gering. Das adulte Zapfenmuster entsteht durch einen Wechsel von S- zu M-Opsinexpression in vielen Zapfen. Die Expression der Opsine wird während der postnatalen Entwicklung durch den Schilddrüsenhormonrezeptor $\beta 2$ (TR $\beta 2$) reguliert. Ein Fehlen des TR $\beta 2$ (TR $\beta 2$ $-/-$) führt zum Verlust des M-Opsins und zur Expression des S-Opsins in allen Zapfen (Ng et al. 2001). Auch das Schilddrüsenhormon und der Retinsäurerezeptor γ (RXR γ) sind Regulatoren in der postnatalen Entwicklung der Opsinexpression (Roberts et al. 2005, 2006). Die Pax8 $-/-$ Maus hat durch den Verlust des Pax8-Gens eine mißgebildete Schilddrüse, die kein Schilddrüsenhormon produzieren kann (Mansouri et al. 1998). In der vorliegenden Studie wurde die Auswirkung der postnatalen Hypothyreose von Pax8 $-/-$ auf die Entwicklung des Auges und der Retina im Alter von PWo 3 untersucht. Die Ergebnisse von Pax8 $-/-$ wurden mit Pax8 $+/-$ und $+/+$ Wurfgeschwistern verglichen. Die Hypothyreose von Pax8 $-/-$ wurde durch Messung der Schilddrüsenhormonwerte im Blut bestätigt. Die Augenparameter unterscheiden sich nicht zwischen Pax8 $-/-$ und den Kontrolltieren. Auch die Entwicklung der Retina ist bei allen drei Pax8-Genotypen gleich. Pax8 $-/-$ zeigt keine Veränderungen in der Schichtung der Retina sowie der Morphologie untersuchter Zelltypen. In allen drei Pax8-Genotypen konnten die Transkripte der S- und M-Opsine und des Stäbchenopsins nachgewiesen werden. Auch die Transkripte des TR $\beta 2$, der Deiodinase 2 und der Deiodinase 3 wurden ermittelt. Anhand dieser Ergebnisse kann die Aussage gemacht werden, daß die Hypothyreose von Pax8 $-/-$ keinen Einfluß auf die generelle postnatale Entwicklung des Auges und der Retina zeigt.

Zusammenfassung

Im Gegensatz dazu ist die Auswirkung der Hypothyreose auf die Ausprägung des S- und M-Zapfenmusters gravierend. Sie wurde durch Dichtezählungen der S- und M-Zapfen analysiert. Zunächst wurde das Zapfenmuster der wildtypischen Maus-Stämme C57, Sv129 und Pax8 +/+ untersucht. Alle drei Wildtypen zeigen im Alter von PWo 3 und PWo 22 (adult) ein vergleichbares Zapfenmuster mit gegenläufigem dorso-ventralem Gradienten der S- und M-Zapfen. Auch die heterozygote Pax8 +/- Maus zeigt das wildtypische Zapfenmuster. Pax8 -/- hingegen hat ein verändertes Zapfenmuster. Die S-Zapfendichten sind bei PWo 3 und PWo 22 über die gesamte Retina gleich, so daß kein Gradient ausgebildet ist. Die Veränderung im M-Zapfenmuster von Pax8 -/- ist bei PWo 3 deutlich zu sehen, während das adulte M-Zapfenmuster wieder wildtypisch erscheint, hier scheint also eine verzögerte normale Entwicklung vorzuliegen. Durch eine Substitution mit Thyroxin (T4) ab P2 kann bei Pax8 -/- das wildtypische Zapfenmuster erzeugt werden, somit ist das Schilddrüsenhormon für die Ausprägung des Zapfenmusters während der postnatalen Entwicklung verantwortlich. Weitere Versuche zeigen, daß die Opsinexpression während des ganzen Lebens plastisch und Schilddrüsenhormon-abhängig ist. Eine Unterbrechung der T4-Substitution ab PWo 4 führt bei Pax8 -/- zum Rückgang auf das hypothyreote Zapfenmuster. Auch wenn Pax8 -/- erst im adultem Alter mit T4 substituiert wird, ist eine Veränderung des Zapfenmusters sichtbar. Eine künstlich durch Methimazol erzeugte Hypothyreose in adulten C57-Mäuse führt ebenfalls zu einer Veränderung des Zapfenmusters, das dann mit dem Zapfenmuster von Pax8 -/- identisch ist.

Zusammenfassend erlauben die Ergebnisse den Schluß, daß das Schilddrüsenhormon über die Expression der Opsine die Ausprägung des Zapfenmusters sowohl während der Entwicklung reguliert, als auch für eine Aufrechterhaltung des Zapfenmusters während des ganzen Lebens benötigt wird.

Dieser Befund hat auch klinische Relevanz. Die nicht seltene Neugeborenen-Hypothyreose beim Menschen wird heute durch eine direkt nach der Geburt beginnende lebenslange Thyroxin-Substitution therapiert. Nach unseren Befunden bei der Maus könnte dies auch für die Aufrechterhaltung einer normalen Zapfenopsin-Expression und damit eines normalen Sehvermögens notwendig sein.

6. Literaturverzeichnis

- Adler, R. & Raymond, P.A. (2007) Have we achieved a unified model of photoreceptor cell fate specification in vertebrates? *Brain Res.*, **1192**, 134-50.
- Ahnelt, P.K. & Kolb, H. (2000) The mammalian photoreceptor mosaic-adaptive design. *Prog. Retin. Eye Res.*, **19**, 711-777.
- Alberts, B., Bray, D. Johnson, J. L., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (1998) Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. Wiley-Vch.
- Akasha, M. & Anderson, R.R. (1984) Thyroxine and triiodthyronine in milk of cows, goats, sheep, and guinea pigs. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **177**, 360-371.
- Applebury, M.L., Antoch, M.P., Baxter, L.C., Chun, L.L., Falk, J.D., Farhangfar, F., Kage, K., Krzystolik, M.G., Lyass, L.A., Robbins, J.T. (2000) The murine cone photoreceptor: a single cone type expresses both s and m opsins with retinal spatial patterning. *Neuron*, **27**, 513-523.
- Applebury, M. Farhangfar, F. Glösmann, M., Hashimoto, K., Kage, K., Robbins, J.T., Shibusawa, N., Wondisford, F.E., Zhang, H. (2007) Transient expression of thyroid hormone nuclear receptor TR β 2 sets s opsin patterning during cone photoreceptor Genesis. *Developmental Dynamics*, **236**, 1203-1212.
- Blanks, J.C. & Johnson, L.V. (1984) Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. A species comparison. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **25**, 546-557.
- Boenisch, T. (2003) Handbuch: Immunchemische Färbemethoden. DakoCytomation.
- Bouchard, M., Souabni, A., Busslinger, M. (2004) Tissue-specific expression of cre recombinase from the Pax8 locus. *Genesis*, **38**, 105-109.
- Browman, H.I. & Hawryshyn, C.W. (1994) The development trayectory of ultraviolet photosensitivity in rainbow trout is altered by thyroxine. *Vision Res.*, **34**, 1397-1406.
- Brown, D., Cai, L., Das, B., Marsh-Armstrong, N., Schreiber, A.M., Juste, R. (2005) Thyroid hormone controls multiple independent programs required for limb development in *Xenopus laevis* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102**, 12455-12458.
- Burrow, G. N., Delbert, A.F., Larsen, P.R. (1994) Maternal and fetal thyroid function. *New England Journal of Medicine*, **331**, 1072-1078.
- Chen, S., Wang, Q.L., Nie, Z., Sun, H., Lennon, G., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Zack, D.J. (1997) Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron*, **19**, 1017-1030.
- Chiu, M.I. & Nathans, J. (1994) Blue cones and cone bipolar cells share transcriptional specificity as determined by expression of human blue visual pigment-derived transgenes. *J. Neurosci.*, **14**, 3426-3436.
- Christ, S., Biebel, U.W., Hoidis, S., Friedrichsen, S., Bauer, K., Smolders, J.W.T. (2004) Hearing loss in athyroid Pax8 knockout mice and effects of thyroxine substitution. *Audiol. Neurootol.*, **9**, 88-106.

Literaturverzeichnis

- Corbo, J.C. & Cepko, C.L. (2005) A hybrid photoreceptor expressing both rod and cone genes in a mouse model of enhanced s-cone syndrome. *PLoS Genet.*, **1**, 1-14.
- Courtin, F., Zroui, H., Lamirand, A., Li, W.W., Mercier, G., Schumacher, M., Goascogne, C.L., Pierre, M. (2005) Thyroid hormone deiodinases in the central and peripheral nervous system. *Thyroid*, **15**, 931-942.
- D'Agati, P. & Cammarata, M. (2006) Comparative analysis of thyroxine distribution in ascidian larvae. *Cell Tissue Res.*, **323**, 529-35.
- Daniele, L.L., Lillo, C., Lyubarsky, A.L., Nikonov, S.S., Philp, N., Mears, A.J., Swaroop, A., Williams, D.S., Pugh, E.N., Jr. (2005) Cone-like morphological, molecular, and electrophysiological features of the photoreceptors of the Nrl knockout mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **46**, 2156-2167.
- Ding, Y.Q., Shigemoto, R., Takada, M., Ohishi, H., Nakanishi, S., Mizuno, N. (1996) Localization of the neuromedin K receptor (NK3) in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.*, **364**, 290-310.
- Dudel, J., Menzel, R., Schmidt, R.F., (1996) Neurowissenschaft. Springer.
- Ebrey, T. & Koutalos, Y. (2001) Vertebrate photoreceptors. *Prog. Ret. Eye Res.*, **20**, 49-94.
- Flamant, F., Pogue, A.L., Plateroti, M., Chassande, O., Gauthier, K., Streichenberger, N., Mansouri, A., Samarut, J. (2002) Congenital hypothyroid Pax8 (-/-) mutant mice can be rescued by inactivating the TR α gene. *Mol. Endocrinol.*, **16**, 24-32.
- Forrest, D. & Vennstrom, B. (2000) Functions of thyroid hormone receptors in mice. *Thyroid*, **10**, 41-52.
- Forrest, D, Reh, T.A., Rüsck, A. (2002) Neurodevelopmental control by thyroid hormone receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **12**, 49-56.
- Forrest, D. (2004) The developing brain and maternal thyroid hormone: finding the links. *Endocrinol.*, **145**, 4034-4036.
- Freund, C.L., Gregory-Evans, C.Y., Furukawa, T., Papaioannou, M., Looser, J., Ploder, L., Bellingham, J., Ng, D., Herbrick, J.A., Duncan, A., Scherer, S.W., Tsui, L.C., Loutradis-Anagnostou, A., Jacobson, S.G., Cepko, C.L., Bhattacharya, S.S., McInnes, R.R. (1997) Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. *Cell*, **91**, 543-553.
- Friedrichsen, S., Christ, S., Heuer, H., Schäfer, M.K., Mansouri, A., Bauer, K., Visser, T.J. (2003) Regulation of iodothyronine deiodinases in the Pax8^{-/-} mouse model of congenital hypothyroidism. *Endocrinology*, **144**, 777-784.
- Friedrichsen, S., Christ, S., Heuer, H., Schäfer, M.K., Parlow, A.F., Visser, T.J., Bauer, K. (2004) Expression of pituitary hormones in the Pax8^{-/-} mouse model of congenital hypothyroidism. *Endocrinology*, **145**, 1276-1283.
- Gamborino, M.J., Sevilla-Romero, E., Muñoz, A., Hernández-Yago, J., Renau-Piqueras, J., Pinazo-Durán, M.D. (2001) Role of thyroid hormone in craniofacial and eye development using a rat model. *Ophthalmic Res.*, **33**, 283-291.

Literaturverzeichnis

- Gehring, W.J. & Ikeo, K. (1999) Pax6 mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.*, **15**, 371-377.
- Glossmann, H. Pharmakologie Endokriner Systeme: Schilddrüse
<http://www.i-med.ac.at/ibp/pdf/schilddruese.pdf>
- Grabenstein, J. (2005) T3, the other thyroid hormone. *Clin. Cornerstone.*, **7**, S16-109.
- Haider, N.B., Demarco, P., Nystuen, A.M., Huang, X., Smith, R.S., McCall, M.A., Naggert, J.K., Nishina, P.M. (2006) The transcription factor Nr2e3 functions in retinal progenitors to suppress cone cell generation. *Vis. Neurosci.*, **23**, 917-929.
- Harpavat, S. & Cepko, C.L. (2003) Thyroid hormone and retinal development: an emerging field. *Thyroid*, **13**, 1013-1019.
- Harpavat, S. (2005) Roles of thyroid hormone in chick retinal development.
- Haverkamp, S. & Wässle, H. (2000) Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J. Comp. Neurol.*, **424**, 1-23.
- Haverkamp, S., Wässle, H., Duebel, J., Kuner, T., Augustine, G.J., Feng, G., Euler, T. (2005) The primordial, blue-cone color system of mouse retina. *J. Neuroscience*, **25**, 5438-5445.
- Hawryshyn, C.W., Martens, G., Allison, W.T., Anholt, B.R. (2003) Regeneration of ultraviolet-sensitive cones in the retinal cone mosaic of thyroxin-challenged post-juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.*, **206**, 2665-2673.
- Hennig, A.K., Peng, G.H., Chen, S. (2008) Regulation of photoreceptor gene expression by Crx-associated transcription factor network. *Brain. Res.*, **1192**, 114-133.
- Henning, W. (1998) Genetik. Springer.
- Hicks, D. & Molday, R.S. (1986) Differential immunogold-dextran labeling of bovine and frog rod and cone cells using monoclonal antibodies against bovine rhodopsin. *Exp. Eye Res.*, **42**, 55-71.
- Jacobs, G.H. (1993) The distribution and nature of colour vision among the mammals. *Biol. Rev.*, **68**, 413-471.
- Jacobs, G.H. & Rowe, M.P. (2004) Evolution of vertebrate colour vision. *Clin. Exp. Optom.*, **87**, 206-216.
- Jones, I., Srinivas, M., Ng, L., Forrest, D. (2003) The thyroid hormone receptor β gene: structure and functions in the brain and sensory systems. *Thyroid*, **13**, 1057-1068.
- Kandel, E., Schwartz, L.H., Jessel, T.M. (1996) Neurowissenschaften. Spektrum.
- Karlson, P., Doenecke, D., Koolman, J. (1994) Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Georg Thieme.
- Kelley, M.W., Turner, J.K., Reh, T.A. (1995) Ligands of steroid/thyroid receptors induce cone photoreceptors in vertebrate retina. *Development*, **121**, 3777-3785.
- Köhrle, J. (1999) Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **151**, 103-119.

Literaturverzeichnis

- Lanzerath, K., Bettendorf, M., Haag, C., Kneppo, C., Schulze, E., Grulich-Henn, J. (2006) Screening for Pax8 mutations in patients with congenital hypothyroidism in south-west Germany. *Horm. Res.*, **66**, 96-100.
- Lazar, M.A. (2003) Thyroid hormone action: a binding contract. *J. Clin. Invest.*, **112**, 497-499.
- Lee, E., Kim, H., Lim, E., Kim, I., Kang, W., OH, S., Rickman, D.W., Chung, J., Chun, M. (2004) All amacrine cells in the mammalian retina show disabled-1 immunoreactivity. *J. Comp. Neuro.*, **470**, 372-381.
- Liu, Y., Fu, L., Chen, D.G., Deeb, S.S. (2007) Identification of novel retinal target genes of thyroid hormone in the human WERI cells by expression microarray analysis. *Vision Res.*, **47**, 2314-2326.
- Liu, H., Etter, P., Hayes, S., Jones, I., Nelson, B., Hartman, B., Forrest, D., Reh, T.A. (2008) NeuroD1 regulates expression of thyroid hormone receptor 2 and cone opsins in the developing mouse retina. *J. Neurosci.*, **28**, 749-756.
- Lukats, A., Szabo, A., Röhlich, P., Vigh, B., Szel, A. (2005) Photopigment coexpression in mammals: comparative and development aspects. *Histology and Histopathology*, **20**, 551-574.
- Macchia, P.E., Lapi, P., Krude, H., Pirro, M.T., Missero, C., Chiovato, L., Souabni, A., Baserga, M., Tassi, V., Pinchera, A., Fenzi, G., Grüters, A., Buslinger, M., Di Lauro, R. (1998) Pax8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet.*, **19**, 83-86.
- Mansouri, A., Chowdhury, K., Gruss, P. (1998) Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat. Genet.*, **19**, 87-90.
- Marquardt, T. & Gruss, P. (2002) Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends. Neurosci.*, **25**, 32-38.
- Masland, R.H. (1996) Processing and encoding of visual information in the retina. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **6**, 467-474.
- Mey, J. (2006) Vitamin A im Gehirn: Die Bedeutung der Retinsäure-Signaltransduktion für das adulte Nervensystem. *Neuroforum*, **1**, 152-159.
- Milam, A.H., Rose, L., Cideciyan, A.V., Barakat, M.R., Tang, W.X., Gupta, N., Aleman, T.S., Wright, A.F., Stone, E.M., Sheffield, V.C., Jacobson, S.G. (2002) The nuclear receptor NR2E3 plays a role in human retinal photoreceptor differentiation and degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 473-478.
- Mirabella, G., Westall, C.A., Asztalos, E., Perlman, K., Koren, G., Rovet, J. (2005) Development of contrast sensitivity in infants with prenatal and neonatal thyroid hormone insufficiencies. *Pediatric Res.*, **57**, 902-907.
- Mittag, J., Friedrichsen, S., Heuer, H., Pölsfuss, S., Visser, T.J., Bauer, K. (2005) Athyroid Pax8^{-/-} mice cannot be rescued by the inactivation of thyroid hormone receptor TRα1. *Endocrinology*, **146**, 3179-3184.
- Mori, M., Ghyselinck, N.B., Chambon, P., Mark, M. (2001) Systematic immunolocalization of retinoid receptors in developing and adult mouse eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **42**, 1312-1318.

Literaturverzeichnis

- Morreale de Escobar, G., Obregon, M.J., Escobar del Rey, F. (2004) Role of thyroid hormone during early brain development. *Eur. J. Endocrinol.*, **151**, U25-U37.
- Müller, F. & Kaup, U.B., (1998) Naturwissenschaften. Springer-Verlag, **85**, 49-61.
- Munoz, A & Bernal, J. (1997) Biological activities of thyroid hormone receptors. *Eur. J. Endocrinol.*, **137**, 433-445.
- Ng, L., Hurley, J.B., Dierks, B., Srinivas, M., Salto, C., Vennstrom, B., Reh, T.A., Forrest, D. (2001) A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nat. Genet.*, **27**, 94-98.
- Nickle, B. & Robinson, P.R. (2007) The opsins of the vertebrate retina: insights from structural, biochemical, and evolutionary studies. *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**, 2917-2932.
- Pasca di Magliano, M., Di Lauro, R., Zannini, M. (2000) Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 13144-13149.
- Patricolo, E., Cammarata, M., D'Agati, P. (2001) Presence of thyroid hormones in ascidian larvae and their involvement in metamorphosis. *J. Exper. Zool.*, **290**, 426-430.
- Peichl, L. (1992) Prinzipien der Bildverarbeitung in der Retina der Säugetiere. *BIUZ*, **22**, 45-53.
- Peichl, L. (1997) Die Augen der Säugetiere: Unterschiedliche Blicke in die Welt. *BIUZ*, **27**, 96-105.
- Peichl, L. (2005) Diversity of mammalian photoreceptor properties: adaptations to habitat and lifestyle? *Ana. Rec. Part A*, **287**, 1001-1012.
- Peters, M.A. (2002) Patterning the neural retina. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **12**, 43-48.
- Pfeiffer-Guglielmi, B., Fleckenstein, B., Jung, G., Hamprecht, B. (2003) Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase isozymes in rat nervous tissues by using isozyme-specific antibodies. *J. Neurochem.*, **85**, 73-81.
- Pinazo-Duran, M.D., Iborra, J., Ponsa, S., Sevilla-Romero, E., Gallego-Pinazo, R., Munoz, A. (2005) Postnatal thyroid hormone supplementation rescues developmental abnormalities induced by congenital-neonatal hypothyroidism in the rat retina. *Ophthalmic. Res.*, **37**, 225-234.
- Pschyrembel (1986) Klinisches Wörterbuch. De Gruyter.
- Ramos, H.E. & Weiss, R.E. (2006) Regulation of nuclear coactivator and corepressor expression in mouse cerebellum by thyroid hormone. *Thyroid.*, **16**, 211-216.
- Roberts, M.R., Hendrickson, A., McGuire, C.R., Reh, T.A. (2005) Retinoid X receptor γ is necessary to establish the s-opsin gradient in cone photoreceptors of the developing mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **46**, 2897-2904.
- Roberts, M.R., Srinivas, M., Forrest, D., Morreale de Escobar, G., Reh, T.A. (2006) Making the gradient: thyroid hormone regulates cone opsin expression in the developing mouse retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. (PNAS)*, **103**, 6218-6223.
- Santisteban, P. & Bernal, J. (2005) Thyroid development and effect on the nervous system. *Rev. Endo. Met. Dis.*, **6**, 217-228.

Literaturverzeichnis

- Schmidt, R.F., Thews, G., Lang, F. (2000) *Physiologie des Menschen*. Springer.
- Schulte, D. & Bumsted- O'Brien, K.M. (2007) Molecular mechanisms of vertebrate retina development: implications for ganglion cell and photoreceptor patterning. *Brain Res.*, **1192**, 151-164.
- Sen, J., Harpavat, S., Peters, M., Cepko, C.L. (2005) Retinoic acid regulates the expression of dorsoventral topographic guidance molecules in the chick retina. *Development*, **132**, 5147-5159.
- Sendin, G., Bulankina, A.V., Riedel, D., Moser, T. (2007) Maturation of ribbon synapses in hair cells is driven by thyroid hormone. *J. Neurosci.*, **27**, 3163-3173.
- Sevilla-Romero, E., Munoz, A., Pinazo-Duran, M.D. (2002) Low thyroid hormone levels impair the perinatal development of the rat retina. *Ophthalmic Res.*, **34**, 181-191.
- Srinivas, M., Ng, L., Liu, H., Jia, L., Forrest, D. (2006) Activation of the blue opsin gene in cone photoreceptor development by retinoid-related orphan receptor β . *Mol. Endo.*, **20**, 1728-1741.
- Szel, A., Röhlich, P., Mieziowska, K., Aguirre, G., van Veen, T., (1993) Spatial and temporal differences between the expression of short- and middle-wave-sensitive cone pigments in the mouse retina: a development study. *J. Comp. Neurol.*, **331**, 564-577.
- Szel, A., Vigh, B., van Veen, T., Röhlich, P. (1998) Development of cone distribution patterns in mammals. *Development and Organization of the Retina*, Chalupa & Finlay, 43-59.
- van Wassenaer, A.G., Stulp, M.R., Valianpour, F., Tamminga, P., Stalpers, C.R., de Randamie, J.S.E., van Beusekom, C., de Vijlder, J.J.M. (2002) The quantify of thyroid hormone in human milk is too low to influence plasma thyroid hormone levels in the very preterm infant. *Clinical Endo.*, **56**, 621-627.
- Veldhoen, K., Allison, W.T., Veldhoen, N., Anholt, B.R., Helbing, C.C., Hawryshyn, W. (2006) Spatio-temporal characterization of retinal opsin gene expression during thyroid hormone-induced and natural development of rainbow trout. *Vis. Neurosci.*, **23**, 169-179.
- Vulsma, T., Gons, M.H., de Vijlder, J.J. (1989) Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid agenesis. *N. Engl. J. Med.*, **321**, 13-16.
- Wang, Y., Macke, J.P., Merbs, S.L., Zack, D.J., Klaunberg, B., Bennett, J., Gearhart, J., Nathans, J. (1992) A locus control region adjacent to the human red and green visual pigment genes. *Neuron*, **9**, 429-440.
- Wehner, R. & Gehring, W. (1995) *Zoologie*. Thieme.
- Yanagi, Y., Takezawa, S., Kato, S. (2002) Distinct functions of photoreceptor cell-specific nuclear receptor, thyroid hormone receptor β 2 and CRX in cone photoreceptor development. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**, 3489-3494.
- Yen, P.M. (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.*, **81**, 1097-1142.
- Yokoyama, S. (2000) Molecular evolution of vertebrate visual pigments. *Prog. Ret. Eye Res.*, **19**, 385-419.

Literaturverzeichnis

Zarrow, M.X., Yochim, J.M., McCarthy, J.L. (1964) Experimental endocrinology: a sourcebook of basic techniques. *London: Academic Press, Inc.*, 240-243.

Danksagung

Danksagung

Prof. Dr. Leo Peichl danke ich herzlichst für die Betreuung der Dissertationsarbeit. Ich möchte mich auch für die Unterstützung bei allen wissenschaftlichen Fragen und die nicht nur rein wissenschaftlichen Gespräche bedanken.

Prof. Dr. Manfred Kössl danke ich für die Begutachtung meiner Dissertationsarbeit.

Prof. Dr. Heinz Wässle danke ich für die Möglichkeit meine Dissertation in der neuroanatomischen Abteilung des Max-Planck-Instituts für Hirnforschung anfertigen zu können.

Dr. Martin Glösmann danke ich für die Betreuung meiner Dissertationsarbeit. Danke Martin, für die Möglichkeit an diesem spannenden Projekt zu arbeiten.

Prof. Dr. Karl Bauer und Dr. Heike Heuer möchte ich meinen besonderen Dank für die Gabe der Pax8 +/- Tiere zur eigenen Züchtung aussprechen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Driss Benzaid danke ich für die Hilfe bei der Bearbeitung der Abbildungen, die ansonsten nicht so exzellent wären.

Stefanie Heynck danke ich für die technische Unterstützung.

Für die freundliche Bereitstellung der Antikörper DAB 1, Glypho, Glyzin, JH 455 sowie JH 492, NK3-R und rho4D2 bedanken ich mich bei Brian Howell, Bernd Hamprecht, David Pow, Jeremy Nathans, Ryuichi Shigemoto und Robert S. Molday.

Den Mädels von Zimmer 515 möchte ich für die nette Arbeitsatmosphäre auf engstem Raum danken. Diana und Sriparna, danke für das gemeinsame Lachen, Weinen und Singen, ohne euch hätte die Arbeit nur halb soviel Spaß gemacht.

Für das stets freundliche Arbeitsklima danke ich allen Kollegen der Abteilung Neuroanatomie.

Caro, Jens, Norbert, Steffi und Thomas danke ich für ihre Freundschaft und Unterstützung.

Mama & Papa und meinen Geschwistern danke ich dafür, daß wir immer eine Familie sind.

Kai Lutterbeck, meinem bestem Freund und Ehemann, danke ich für seine Unterstützung in allen Lebenslagen, Geduld und Liebe.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Anika Glaschke, diese Doktorarbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Frankfurt, den 03.04.2008

Anika Glaschke

Curriculum Vitae

Anika GLASCHKE, Diplombiologin

Persönliche Daten

Vorname Anika
Nachname Glaschke
Geburtsdatum: 18. September 1980
Geburtsort: Hamm
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch
Adresse: Zum Hopfengarten 5
63303 Dreieich



E-Mail: anika.glaschke@bluehash.de

Ausbildung

- 04/2005 - 04/2008 Experimentelle Arbeiten zur Promotion, durchgeführt am Max-Planck-Institut für Hirnforschung Frankfurt/Main (Arbeitsgruppe von apl. Prof. Leo Peichl)
- 03/2005 Diplom in Biologie, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt/Main
'Vergleichende funktionell-histologische Untersuchung der Augen madagassischer Mungos (Galidinae, Herpestidae, Carnivora)'
Betreuer: Leo Peichl, Max-Planck-Institut für Hirnforschung
Manfred Kössl, Johann Wolfgang Goethe Universität
- 2000 - 2005 Biologiestudium, Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt/Main
Hauptfächer: Zoologie, Physiologie, Neurobiologie
- 2000 Abitur, Freiherr-vom-Stein Gymnasium, Hamm

Teilnahme an Konferenzen

- 2006 5th Forum of European Neuroscience (Fens), Wien, Österreich
2007 7th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Deutschland
2007 European Retina Meeting, Frankfurt/Main, Deutschland
2008 ARVO Annual Meeting, Ft. Lauderdale, Florida, USA

Publizierte Tagungs-Abstracts

Glaschke, A., Glösmann, M., Peichl, L. (2006) **Postnatal hypothyroidism differentially alters retinal S and L cone opsin expression in Pax8-deficient mice.** 5th Forum of European Neuroscience, *FENS Abstr.*, Vol.3, **A072.4.**

Glaschke, A., Glösmann, M., Peichl, L. (2007) **Altered retinal cone opsin expression in postnatally hypothyroid Pax8-deficient mice.** 7th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, **TS4-5A.**

Glaschke, A., Peichl, L., Glösmann, M. (2007) **Thyroid hormone controls cone opsin expression in mice postnatally.** European Retina Meeting, **S1-P07.**

Glaschke, A., Glösmann, M., Peichl, L. (2008) **The effect of postnatal hypothyroidism on cone opsin expression in mice.** ARVO Annual Meeting, **1257/A217.**

Auszeichnung

2007 Poster Award Winner, European Retina Meeting, Frankfurt/Main, Deutschland

Sprachkenntnisse

| | |
|-------------|------------------------------|
| Deutsch | Muttersprache |
| Englisch | fließend in Wort und Schrift |
| Französisch | Schulkenntnisse |
| Latein | kleines Latinum |

Technische Qualifikationen

- Licht- und Elektronenmikroskopie
- Anfertigung von Semidünnschnitten und Kryostatschnitten
- Immunzytochemische und histologische Färbemethoden
- In-situ-Hybridisierung
- Molekularbiologische Techniken: PCR-Technik, Western Blot
- Zucht und Haltung von Mäusen
- Pharmakologische Injektionen bei Mäusen
- Umgang mit Computerprogrammen
 - Bildbearbeitungsprogramme: Photoshop, AxioVision, Coral Draw, Delta Graph, ImageJ
 - Microsoft: Exel, Powerpoint, Word