

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

---

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

---

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

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

---

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