

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HUMANANATOMIE UND EMBRYOLOGIE
PROF. DR. ERNST RUDOLF TAMM
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
-BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN-
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DER EINFLUSS DES TGF- β SIGNALWEGS AUF DEN ONTOGENETISCHEN
ZELLTOD IN DER RETINA

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefan Matthias Pielmeier

2012

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HUMANANATOMIE UND EMBRYOLOGIE
PROF. DR. ERNST RUDOLF TAMM
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
-BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN-
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

DER EINFLUSS DES TGF- β SIGNALWEGS AUF DEN ONTOGENETISCHEN
ZELLTOD IN DER RETINA

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefan Matthias Pielmeier

2012

I. Dekan: **Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert**

1. Berichterstatter: *Prof. Dr. Ernst Rudolf Tamm*

2. Berichterstatter: *Prof. Dr. Olaf Strauß*

Tag der mündlichen Prüfung: *07.08.2012*

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
I.1	Entwicklung des Auges	1
I.2	Ontogenetischer Zelltod	3
I.3	Anatomie des Auges	4
I.3.1	Die äußere Augenhaut (Sklera und Kornea)	4
I.3.2	Die mittlere Augenhaut (Choroidea, Corpus ciliare und Iris)	5
I.3.3	Die Linse	6
I.3.4	Die Netzhaut (Retina)	6
I.3.5	Die Sehbahn	8
I.4	Physiologie des Sehens	9
I.5	Der TGF- β Signalweg	9
I.6	Netzhauterkrankungen	11
I.7	Das Cre/loxP System	12
I.8	Zielsetzung der Arbeit	12
I.8.1	Einfluss von TGF- β -R2 (T β RII) auf den ontogenetischen Zelltod in der Retina	12
I.8.2	Einfluss von Smad7 auf den ontogenetischen Zelltod in der Retina	13
II.	Material und Methoden	14
II.1	Materialliste	14
II.1.1	Reagenzienliste	14
II.1.2	Enzyme und Kits	16
II.1.2.1	Enzyme	16
II.1.2.2	Kits	16
II.1.3	Verbrauchsmaterialien und Geräte	16
II.1.3.1	Verbrauchsmaterialien	16
II.1.3.2	Geräte	17
II.1.4	Puffer, Lösungen, Gele	18
II.1.4.1	Puffer und Lösungen	18
II.1.4.2	Gele	21
II.1.5	Antikörper und Molekulargewichtsstandard	22
II.1.6	Oligonukleotidprimer	23
II.1.6.1	PCR-Primer	23
II.1.6.2	qPCR-Primer	23
II.2	Versuchstiere	24

II.3 Molekularbiologische Methoden	24
II.3.1 Isolierung von DNA aus Mäuseschwänzen	24
II.3.2 Genotypisierung der Versuchstiere	24
II.3.2.1 Cre-Rekombinase	24
II.3.2.2 T β RII	26
II.3.2.3 Smad7	26
II.4 RNA-Isolierung	27
II.5 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	28
II.6 Quantitative real-time PCR zur Bestimmung der relativen mRNA Expression	28
II.6.1 Herstellung von cDNA (complementary DNA)	28
II.6.2 Durchführung der quantitativen real-time PCR	29
II.7 Proteinbiochemische Methoden	31
II.7.1 Proteinisolierung nach der TRIzol $^{\circledR}$ -Methode	31
II.7.2 Western Blot	32
II.7.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
II.7.2.2 Semidry-Blotting	33
II.7.2.3 Nachweis spezifischer Proteinbanden	33
II.7.2.4 Coomassie-Färbung	34
II.8 Immunfärbungen	35
II.8.1 Paraffineinbettung und Herstellen von Paraffinschnitten	35
II.8.2 Herstellung von Gefrierschnitten	36
II.8.3 Immunhistochemische Färbungen	36
II.9 Detektion apoptotischer Zellen	38
II.9.1 TUNEL-Reaktion	38
II.9.2 Cell death detection (CDD) Kit	39
II.10 Phänotyp-Analyse	40
II.10.1 Eponeinbettung von Geweben und Anfertigen von Semidünn-schnitten	40
II.11 Tiere und Tierhaltung	40
II.12 Auswertung und Statistik	40
III. Ergebnisse	42
III.1 Überprüfung des konditionellen Knock-outs von T β RII	42
III.2 Phänotyp-Analyse des konditionellen Knock-outs von T β RII	44
III.3 Apoptose und ontogenetischer Zelltod bei T β RII-defizienten Mäusen	47

III.4 Überprüfung des konditionellen Knock-outs von Smad7	50
III.5 Phänotyp-Analyse des konditionellen Knock-outs von Smad7	51
III.6 Apoptose und ontogenetischer Zelltod bei Smad7-defizienten Mäusen	53
IV. Diskussion	55
IV.1 Konditioneller Knock-out des T β RII	55
IV.2 Konditioneller Knock-out von Smad7	59
IV.3 Ausblick	61
V. Zusammenfassung	63
VI. Anhang	64
VI.1 Literaturverzeichnis	64
VI.2 Abbildungsverzeichnis	69
VI.3 Tabellenverzeichnis	70
VI.4 Abkürzungsverzeichnis	71
VI.5 Danksagung	73
VI.7 Erklärung	74

I. Einleitung

I.1 Entwicklung des Auges

Bei der Entwicklung des Auges handelt es sich um einen komplexen Vorgang, an dem Zellen des Oberflächenektoderms, des Neuroektoderms und des Kopfmesenchyms, welches der Neuralleiste entspringt, beteiligt sind (vgl. Tabelle 1).

Neuroektoderm	Retina, Teile des Ziliarkörpers, Teile der Iris, N. opticus
Oberflächenektoderm	Augenlinse, Kornealepithel
Kopfmesenchym	Sklera, Teile der Kornea, Choroidea

Tabelle 1: Übersicht beteiligter Gewebe an Augenentwicklung, aus ^{1,2}

Des Weiteren ist ein exaktes Zusammenspiel von unzähligen Entwicklungs- und Einflussfaktoren nötig. Hier ist vor allem der Transkriptionsfaktor Pax 6 und andere Faktoren wie Sonic Hedgehog (Shh), Fibroblastenwachstumsfaktor-8 (FGF-8) und das Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4) zu nennen.¹

Zunächst kommt es beidseits zu je einer Ausstülpung des Diencephalons als Teil des Prosencephalons, welche als Augenbläschen bezeichnet werden. Durch den Kontakt mit dem Augenbläschen kommt es im darüber liegenden Oberflächenektoderm zur Ausbildung einer Verdickung, der Linsenplakode. Im Anschluss daran stülpt sich das Augenbläschen ein und bildet den zweischichtigen Augenbecher. Die innere Schicht differenziert sich zur Retina, während aus der äußeren Schicht das retinale Pigmentepithel entsteht. Gleichzeitig vergrößert sich die Linsenplakode, wandert in den Augenbecher ein und formt dadurch die Linsengrube. Die Linsenplakode wird von diesem Zeitpunkt an als Linsenbläschen bezeichnet. Da sich das Linsenbläschen vollständig vom umgebenden Oberflächenektoderm gelöst hat und in den Augenbecher eingewandert ist, werden die innere Schicht des Augenbechers und das Linsenbläschen von der *A. hyaloidea* versorgt, die an der Augenbecherspalte in den Augenbecher eindringt. Danach wandern Mesenchymzellen zwischen das Oberflächenektoderm und das vordere Epithel des Linsenbläschens ein. Diese Zellen bilden die innere Endothelschicht mit der Descemet-Membran und das korneale Stroma, welches hauptsächlich aus Keratinozyten besteht. Für die weitere Augenentwicklung ist es wichtig, dass sich die Linse von dem Endothel der sich entwickelnden Kornea ablöst und dadurch ein Raum entstehen kann.²⁻⁵ Der Augenbecher wächst mit der sog. *Pars caeca* an der Vorderwand der Linse entlang und bildet so Iris und Ziliarkörper, wodurch

der Raum in eine vordere und hintere Augenkammer getrennt wird. Das Stroma von Iris und Ziliarkörper entsteht durch Einwandern von Mesenchymzellen, welche auch an der Bildung des Trabekelwerks und des Schlemm'schen Kanals beteiligt sind.² Diese Strukturen sind nötig, um einen Abfluss des Kammerwassers zu gewährleisten und den intraokulären Druck konstant zu halten. Wie bereits erwähnt, entsteht die Retina aus der inneren Schicht des Augenbechers, während aus der äußeren Schicht das retinale Pigmentepithel gebildet wird. In der weiteren Entwicklung werden hier keine weiteren Zellkontakte ausgebildet, so dass die Retina auch im erwachsenen Auge nur dem retinalen Pigmentepithel aufliegt und dadurch Netzhautablösungen entstehen können.¹ Einzig im Bereich der *Pars caeca* sowie am Austritt des Sehnervens bestehen Verbindungen zwischen Retina und Pigmentepithel. Die *Pars optica* des Augenbechers nimmt durch Proliferation an Dicke zu und die Entwicklung der amakrinen Zellen, der Horizontalzellen, der Ganglienzellen, der Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen), der Müllerzellen und der Bipolarzellen beginnt zu unterschiedlichen Zeitpunkten.^{1, 6} Verschiedene Untersuchungen belegen, dass es bei der Differenzierung der Retina zu einem programmierten Zelltod über den Weg der Apoptose kommt.^{6, 7} R. W. Young (1984) beschrieb, zu welchem Zeitpunkt wie viele Zellen der Retina im Tiermodell Maus in Apoptose gehen. Er stellte dabei fest, dass im Bereich der inneren plexiformen Schicht ein Höhepunkt der Apoptose zwischen Tag 2 und Tag 5 auftritt.⁶ Dabei war es schwierig, eine genaue Unterscheidung zwischen amakrinen Zellen und Ganglienzellen zu treffen, da beide Zelltypen in dieser Schicht vorhanden sind.⁶ Der Zelltod von amakrinen Zellen erreicht seinen Höhepunkt zwischen Tag 3 und Tag 7, der von Ganglienzellen zwischen Tag 2 und Tag 4, während der von Bipolar – und Müllerzellen zwischen Tag 8 und Tag 10 seinen Höhepunkt erreicht.⁶ Zusätzlich zeigte er auf, dass Photorezeptorzellen an Tag 5 beginnen, durch die sich entwickelnde äußere plexiforme Schicht zu wandern und dabei um Tag 7 apoptotisch werden.⁶ 18 Tage nach der Geburt wurde an keiner Stelle der Retina Zelltod festgestellt.⁶ Zusammenfassend stellte Young fest, dass ca. 45% der amakrinen Zellen, der Ganglienzellen, der Bipolarzellen und der Müllerzellen versterben, während weniger als 5% der Photorezeptorzellen versterben.⁶ Nach der Arbeit von Young gibt es keine Hinweise darauf, ob Horizontalzellen überhaupt dem ontogenetischen Zelltod unterliegen.⁶

I.2 Ontogenetischer Zelltod

Glucksmann (1951) zeigte auf, dass es sich bei dem Zelltod während der Embryonalentwicklung um einen normalen und funktionellen Vorgang handelt.⁸ Er unterteilte den embryonalen Zelltod in phylogenetischen Zelltod, der zur Beseitigung rudimentärer Strukturen dient, in morphogenetischen Zelltod, der zu Veränderungen des äußeren Erscheinungsbildes führt und in histogenetischen Zelltod, der zur Differenzierung von Geweben und Organen nötig ist.⁸

Durch zahlreiche weitere Untersuchungen wurde festgestellt, dass es beim embryonalen Zelltod zu keiner Entzündung des Gewebes oder Schädigung umliegender Zellen kommt.^{6, 9} Es wurde beobachtet, dass der Vorgang der sog. Apoptose in zwei Schritten verläuft. Zunächst kommt es nach Kernpyknose und Verpackung der Zellorganellen zur Bildung von Apoptosekörperchen, die dann im Anschluss von benachbarten Zellen oder Histiozyten phagozytiert werden.^{6, 9}

Zeiss (2003) fasste zusammen, dass es einerseits durch verschiedene Rezeptoraktivierungen (extrinsicher Signalweg) andererseits durch Aktivierung von Mitochondrien (intrinsischer Signalweg) zur Apoptose kommen kann.¹⁰ Beide Signalwege sind aber auch ineinander verschachtelt (z.B. über Bid) und haben über die Caspasen -3, -6, -7 eine gemeinsame Endstrecke.¹⁰ Ein weiterer Signalweg führt über die Ansammlung von nonsens-Proteinen und Veränderungen der Ca²⁺-Homöostase im endoplasmatischen Retikulum zu einer Zunahme des Stresses im endoplasmatischen Retikulum und über die Caspasen -3, -6, -7 zum Zelltod (vgl. Abb.1).¹⁰ Des Weiteren kann über den Apoptose induzierenden Faktor (AIF), einem phylogenetisch sehr alten Signalweg, Caspase unabhängig Apoptose induziert werden.^{10, 11} Dieser Signalweg scheint großen Anteil an der Apoptose von Photorezeptorzellen zu haben.¹¹⁻¹³

Nach Freisetzung von AIF aus Mitochondrien in das Cytosol und in den Nukleus kommt es neben Verstärkung von klassischen Apoptosewegen wie Cytochrom c und Caspase -9 auch zu einer Caspase unabhängigen Initiierung der Apoptose.^{11, 12}

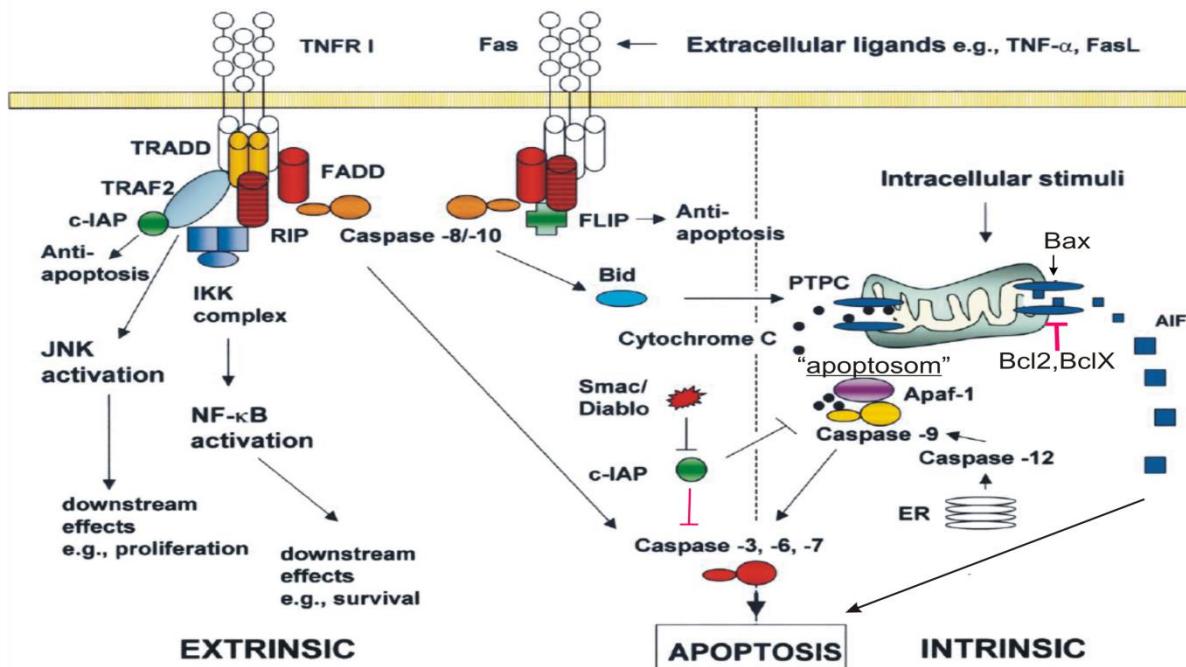


Abbildung 1: Wege der Apoptose, modifiziert, aus ¹⁰

Trotzdem können auch beim ontogenetischen Zelltod Hinweise auf Nekrose gefunden werden, allerdings in viel geringerem Ausmaß als Apoptose.^{10, 14}

I.3 Anatomie des Auges

Am Auge lassen sich lichtbrechende, lichtverarbeitende Teile und Hilfsstrukturen zur Verbesserung des Sehens unterscheiden. Während die Kornea und die Linse zum lichtbrechenden Teil gerechnet werden, wird die Retina zum lichtverarbeitenden Teil gezählt. Strukturen wie Iris und Ziliarkörper gehören zu den Hilfsstrukturen, die eine bessere Lichtverarbeitung ermöglichen und gleichzeitig auch am Schutz des Auges beteiligt sind. Darüber hinaus sind aber noch weitere Strukturen nötig, die am Aufbau des Auges beteiligt sind. Deren Funktion und Aufgabe soll kurz betrachtet werden.

I.3.1 Die äußere Augenhaut (Sklera und Kornea)

Die Sklera (Lederhaut) setzt sich aus drei Schichten zusammen. Die äußerste Schicht wird als *Lamina episcleralis* bezeichnet und besteht hauptsächlich aus lockerem Bindegewebe. Die Hauptschicht der Sklera ist die *Substantia propria* mit straffem Bindegewebe. Die Grenze zur Aderhaut wird durch die Pigmentschicht (*Lamina fusca sclerae*) gebildet. Im vorderen Anteil des Auges geht die Lederhaut am *Sulcus sclerae/Limbus cornea* in die Hornhaut (Kornea) über. Um eine gute Durchsichtigkeit der Kornea zu gewährleisten, ist diese besonders aufgebaut und besteht aus 5

Schichten. Die äußerste Schicht, das *Epithelium anterius*, ist ein unverhorntes, mehrschichtiges Plattenepithel (5-6 Lagen), das durch die Bowman-Membran (*Lamina limitans anterior*) vom *Stroma corneae* getrennt wird.¹⁵ Dieses besteht aus 200-250 übereinanderliegenden, etwa 2 µm dicken Lamellen, in die 20-60 nm dicke kollagene Fibrillen parallel eingelagert sind.¹⁵ Zwischen den kollagenen Fibrillen liegen Fibrozyten (Keratozyten) mit ihren Zellausläufern.¹⁵ Diese bilden ein zweidimensionales Netz, das zwischen den Kollagenlamellen liegt.¹⁵ Durch die Descemet-Membran (*Lamina limitans posterior*) wird die *Substantia propria* vom *Epithelium posterius* (Hornhautendothel, einschichtiges Plattenepithel) getrennt.¹⁵ Die gesunde Hornhaut wird nicht von Gefäßen versorgt, sondern von vorne über die Tränenflüssigkeit und von hinten durch das Kammerwasser befeuchtet. Diese Benetzung, insbesondere über die Tränenflüssigkeit, ist enorm wichtig, da die Hornhaut leicht uneben ist, was durch die Tränenflüssigkeit ausgeglichen werden kann.¹⁶ Gleichzeitig wird die Versorgung mit Nährstoffen gewährleistet. Bei der Hornhaut handelt es sich – neben der Linse – um einen lichtbrechenden Bestandteil des Auges, der einen konstanten Brechkraftanteil von +43 dpt aufweist.¹⁷

I.3.2 Die mittlere Augenhaut (Choroidea, Corpus ciliare und Iris)

Die Choroidea (Aderhaut) kann in 4 Schichten untergliedert werden.¹⁶ Das *Spatium perichoroidale* ist eine pigmentreiche verschiebbare Grenzschicht zur Lederhaut. In der *Lamina vasculosa* befinden sich die Blutgefäße, welche über die Kapillarschicht (*Lamina choroidocapillaris*) die Lichtsinneszellen der Retina über Diffusion ernähren. Als innerste Schicht ist die Bruch-Membran (*Lamina basalis*) identifizierbar, die aus der Basalmembran des Pigmentepithels der Retina und zahlreichen elastischen Fasern besteht.¹⁸ Diese elastischen Fasern stellen den Antagonisten des Ziliarmuskels dar.¹⁸ Der Ziliarkörper (*Corpus ciliare*) erstreckt sich von der *Ora serrata* bis zur Iriswurzel.¹⁸ Die Hauptfunktionen des Ziliarkörpers, die Beteiligung an der Akkommodation und der Produktion des Kammerwassers werden von unterschiedlichen Anteilen übernommen. Bei der Akkommodation kontrahiert sich der Ziliarmuskel und es kommt zu einer Erschlaffung der Zonulafasern, was mit einer Zunahme der Linsenkrümmung einhergeht. Dies führt zu einer Erhöhung der Brechkraft der Linse. Das Kammerwasser wird von den Ziliarzotten (*Procc. ciliares*) gebildet und ist wichtig für die Ernährung von Kornea und Linse und die Aufrechterhaltung des Augeninnendrucks.¹⁸ Die Iris (Regenbogenhaut) liegt vor der Linse und hat die Aufgabe, den Lichteinfall auf die Retina zu regulieren. Dazu besitzt sie in der Mitte die sog. Pupille, deren

Durchmesser zwischen 1,5 mm und 8 mm variieren kann.¹⁸ An der Rückseite der Iris befindet sich der peripherste Teil der Retina. An der Iris können der *M. sphincter pupillae*, welcher kreisförmig um die Pupille angeordnet ist und parasympathisch innerviert wird, und der *M. dilatator pupillae*, welcher radiär zur Pupille verläuft und sympathisch innerviert wird, unterschieden werden.

I.3.3 Die Linse

Bei der Linse handelt es sich um den zweiten lichtbrechenden Bestandteil des Auges. Die Brechkraft (19 dpt)¹⁷ der Linse kann durch Kontraktion des Ziliarmuskels zunehmen. Die Linse wird zusätzlich von einer sog. Linsenkapsel umgeben. Auf der Linsenvorderseite befindet sich einschichtiges, kubisches Epithel, auf der Rückseite die Lisenfasern.¹⁸ Diese Lisenfasern besitzen keinen Zellkern, kaum Organelle und proliferieren zeitlebens am Lisenäquator.¹⁸ Dadurch kommt es zu einem langsamem Lisenwachstum, was aber durch Schrumpfung der Lisenfasern im Liseninneren teilweise kompensiert wird.¹⁸ Hauptbestandteil der Linse sind eine Gruppe von strukturell sehr heterogenen Proteinen, die mit dem Überbegriff „Crystalline“ bezeichnet werden und auf den Brechkraftindex der Linse Einfluss nehmen. Weiterhin finden sich in der Linse Aktin und Vimentin.

Durch den Elastizitätsverlust der Linse im Alter kommt es zu einer Einschränkung der Akkommodationsbreite und damit zur Altersweitsichtigkeit (Presbyopie).

Eine Trübung der Linse wird grauer Star (Katarakt) genannt und kann angeboren (Röteln-, Herpes-simplex, Syphilis-Infektion) oder erworben sein (Alter, Diabetes mellitus, Bestrahlung, Kortison-Therapie).¹⁸

I.3.4 Die Netzhaut (Retina)

Die Retina entsteht aus dem Augenbecher und lässt sich in ein äußeres (retinales Pigmentepithel) und inneres Retinablatt (*Stratum nervosum*) unterteilen. Da wie unter I.1.1 beschrieben das retinale Pigmentepithel und das innere Retinablatt nur lose aufeinanderliegen und nur an der *Pars caeca* und im Bereich des *N.opticus* miteinander verbunden sind, kann dies im erwachsenen Auge zu einer *Ablatio retinae* (Netzhautablösung) führen.¹ Das retinale Pigmentepithel ist ein einschichtiges, kubisches und pigmentiertes Epithel, das mit seiner Basallamina der Bruch-Membran aufliegt.¹⁸ Zu den Hauptaufgaben des Pigmentepithels zählen die Phagozytose der abgebauten Stäbchen und Zapfen, die Barrierefunktion zwischen den Kapillaren der

Aderhaut und den Photorezeptorzellen (Blut-Retina-Schranke) und die Regeneration des all-trans Retinal zu 11-cis Retinal (Sehzyklus).^{17, 18}

Das innere Retinablatt kann in eine *Pars caeca* und eine *Pars optica* unterschieden werden. Die *Pars caeca* liegt im vorderen Bereich des Auges und bekleidet die Hinterwand der Iris und des Ziliarkörpers. Der Übergang der *Pars caeca* in die *Pars optica* wird *Ora serrata* genannt.

Die Retina wird in 10 Schichten unterteilt, wobei die äußerste Schicht das retinale Pigmentepithel darstellt (vgl. Tabelle 2)

1	<i>Stratum pigmentosum retinae</i> (retinales Pigmentepithel)	Einschichtiges, kubisches und pigmentiertes Epithel
2	<i>Stratum neuroepitheliale</i>	Fortsätze der Photorezeptoren
3	<i>Stratum limitans externum</i> (äußere Gliagrenzmembran)	
4	<i>Stratum nucleare externum</i> (äußere Körnerschicht)	Perikarien der Photorezeptoren
5	<i>Stratum plexiforme externum</i> (äußere Netzhautschicht)	Synapsen zwischen Rezeptorzellen und Bipolarzellen (2. Neuron)
6	<i>Stratum nucleare internum</i> (innere Körnerschicht)	Bipolarzellen, Horizontalzellen, amakrine Zellen und Müller-Zellen (Stützzellen, Gliazellen)
7	<i>Stratum plexiforme internum</i> (innere Netzhautschicht)	Synapsen zwischen Axonen des 2. und den Dendriten des 3. Neurons
8	<i>Stratum ganglionicum nervi optici</i> (Ganglienzellschicht)	Perikarien des <i>N. opticus</i> (3. Neuron)
9	<i>Stratum neurofibrarum</i> (Nervenfaserschicht)	Axone zum <i>Corpus geniculum laterale</i>
10	<i>Stratum limitans internum</i> (innere Gliagrenzmembran)	

Tabelle 2: Schichten der Retina, aus^{15, 16, 18}

Wie aus Tabelle 2 hervorgeht, sind viele unterschiedliche Zelltypen am Aufbau der Retina und der Signalverarbeitung beteiligt. Die Photorezeptoren lassen sich in Zapfen und Stäbchen gliedern. Die Zapfen sind für das photopische Sehen, d.h. für das Farbensehen und Bewegungen, zuständig und lassen sich in 3 Unterarten differenzieren. Jede Zapfenart ist dabei für einen bestimmten Farbbereich des Lichts

maximal empfindlich, R-Zapfen für langwelliges rotes Licht (Wellenlänge 560 nm), G-Zapfen für mittelwelliges grünes Licht (Wellenlänge 530 nm) und B-Zapfen für kurzwelliges blaues Licht (Wellenlänge 430 nm).¹⁸ In der Netzhaut sind 6 Millionen Zapfen lokalisiert.^{17, 18} Diese befinden sich hauptsächlich in der *Fovea centralis* und nehmen nach peripher in ihrer Anzahl ab.¹⁸

Die Stäbchen sind für das skotopische Sehen, d.h. für das Hell-Dunkel Sehen, verantwortlich. Ihre größte Dichte erreichen sie bei ca. 20° außerhalb der *Fovea centralis*, während sie in der *Fovea centralis* nicht vorkommen.¹⁸ Ihre Gesamtanzahl in der Retina beträgt 120 Millionen.^{17, 18}

Der histologische Aufbau von Zapfen und Stäbchen unterscheidet sich nur gering. Bei beiden kann ein Außensegment, ein Innensegment mit Ellipsoid und Myoid, ein Perikaryon und ein Axon unterschieden werden.¹⁸ Bei Stäbchen setzt sich das Außensegment aus ca. 1000 flachen Membranscheiben mit dem Sehfarbstoff Rhodopsin zusammen, während es sich bei den Zapfen um dicht gepackte Membran-einfaltungen mit unterschiedlichen Zapfenopsinen handelt.¹⁸ Insgesamt ist die Zapfenzelle kürzer und etwas dicker als die Stäbchenzelle aufgebaut.¹⁸

Die Bipolarzellen stellen als 2. Neuron die Schnittstelle zwischen Photorezeptoren und Ganglienzellen her. Dabei ist es möglich, dass eine Photorezeptorzelle durch eine Bipolarzelle mit einer Ganglienzelle verknüpft ist, was im Bereich der *Fovea centralis* der Fall ist. Dadurch wird eine sehr hohe Auflösung erreicht. Im äußeren Bereich der Retina fließen hingegen die Informationen mehrerer Stäbchenzellen zu einer/mehreren Bipolarzelle(n) und einer Ganglienzelle zusammen (= Konvergenz).¹⁸

Darüber hinaus sind an der Signalverarbeitung auch Horizontalzellen (verknüpfen Photorezeptorzellen) und amakrine Zellen (Synapsen sowohl mit Dendriten der Ganglienzellen als auch mit Axonen der Bipolarzellen) beteiligt.¹⁸ Bei den Müller-Zellen handelt es sich um Gliazellen, deren Ausläufer sich von der inneren bis zur äußeren Gliagrenzmembran ausdehnen. Die Zellkerne der Bipolarzellen, der Horizontalzellen, der amakrinen Zellen und der Müller-Zellen befinden sich alle in der inneren Körnerschicht.

I.3.5 Die Sehbahn

Die Axone der Ganglienzellen verlassen an der *Papilla n. optici* das Auge und verlaufen als *N. opticus* zum *Chiasma opticum*. Im *Chiasma opticum* kreuzen jeweils die Fasern der nasalen Retinahälfte zur Gegenseite, während die Fasern der temporalen Retinahälfte weiter ungekreuzt verlaufen und als *Tractus opticus* das *Corpus geniculum*

laterale erreichen. Dort erfolgt eine Verschaltung auf das 4. Neuron der Sehbahn, dessen Ausläufer als *Radiatio optica* zur primären Sehrinde (Area 17, V1) des Okzipitallappens ziehen. Von dort ziehen nach Umschaltung und Verarbeitung weitere Fasern zu höheren Assoziationsgebieten des Kortex (Area 18-21, V2-V5).¹⁷

I.4 Physiologie des Sehens

Trifft ein Lichtquant auf die Retina, muss er zunächst 8 Schichten der Retina durchqueren, um auf die Fortsätze der Photorezeptoren zu treffen. Bei den Stäbchen folgt innerhalb weniger Pikosekunden eine Umwandlung des Rhodopsins aus seiner 11-cis Form zur all-trans Form (Stereoisomerisation).¹⁷ Über Zwischenprodukte wie Prälumirrhodopsin, Lumirrhodopsin und Metarhodopsin I entsteht Metarhodopsin II, was zusammen mit GTP die Aktivierung von Transducin bewirkt.¹⁷ Transducin aktiviert die Phosphodiesterase, was zu einer Hydrolyse von cGMP zu 5'GMP führt und damit zu einer Schließung von cGMP abhängigen $\text{Na}^+ \text{-Ca}^{2+}$ -Kanälen und zur Hyperpolarisation (-30 mV auf -70 mV bei maximaler Reizung).¹⁷ Dadurch werden Stäbchenbipolarzellen erregt, die über Stäbchenamakrine on-Bipolare erregen und off-Bipolare hemmen (bei Erregung im Zentrum, umgekehrt bei Erregung im Umfeld).¹⁷

Bei Zapfen spielen sich die Vorgänge ähnlich ab, sie reagieren schneller, jedoch mit geringerer Empfindlichkeit.¹⁷ Das Signal wird an die off-Bipolaren durch erregende Synapsen gleichsinnig weitergegeben (als Hyperpolarisation), während hemmende Synapsen das Signal an die on-Bipolaren umkehren und als Depolarisation weitergeben (bei Erregung im Zentrum, umgekehrt bei Erregung im Umfeld).¹⁷

Durch die Verschaltung der retinalen Zellen entstehen sog. rezeptive Felder, die sich in ein Zentrum und Umfeld einteilen lassen und dadurch eine Kontrasterhöhung ermöglichen.¹⁷

I.5 Der TGF- β Signalweg

Bei Transforming Growth Factor β (TGF- β) handelt es sich um ein Zytokin, welches bei Säugetieren in 3 verschiedenen Isoformen als TGF- β 1, TGF- β 2 und als TGF- β 3 vorkommt.¹⁹⁻²¹ Bei Hühnern wurde eine vierte Isoform²², bei Fröschen eine fünfte Isoform²³ beschrieben, welche beide aber bei Säugern nicht vorhanden sind.²⁴

Zur TGF- β Superfamilie gehören mehr als 50 Mitglieder²⁵, so z.B. bone morphogenetic protein (BMP), Activin, Inhibin, glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) oder Transforming growth factor (TGF- β). Diese Moleküle werden als Präproteine

synthetisiert, die am N-Terminus ein Signalpeptid und einen Vorbereich enthalten, die beide für die Weiterverarbeitung des fertigen Proteins wichtig sind.^{25, 26} Nach Abtrennung dieser beiden Vorläuferbereiche entsteht ein Fragment mit 110-140 bp, das über Homo- oder Heterodimerisation seine biologische Funktion erlangt.²⁵ Den Mitgliedern der TGF- β Superfamilie ist gemeinsam, dass sie 7 Cystein Aminosäuren enthalten und über 2 Disulfidbrücken ein achteckiges Molekül bilden, das durch die 3. Disulfidbrücke durchstoßen wird.²⁵ Über das verbliebene Cystein kann eine intermolekulare Bindung mit einem anderen Molekül zustande kommen, so dass aus dem Monomer das biologisch aktive Dimer entsteht.^{25, 27}

Eine Übersicht über die Verwandtschaftsverhältnisse soll folgendes Dendrogramm nach M.Böttner et al. (2000) liefern:²⁵

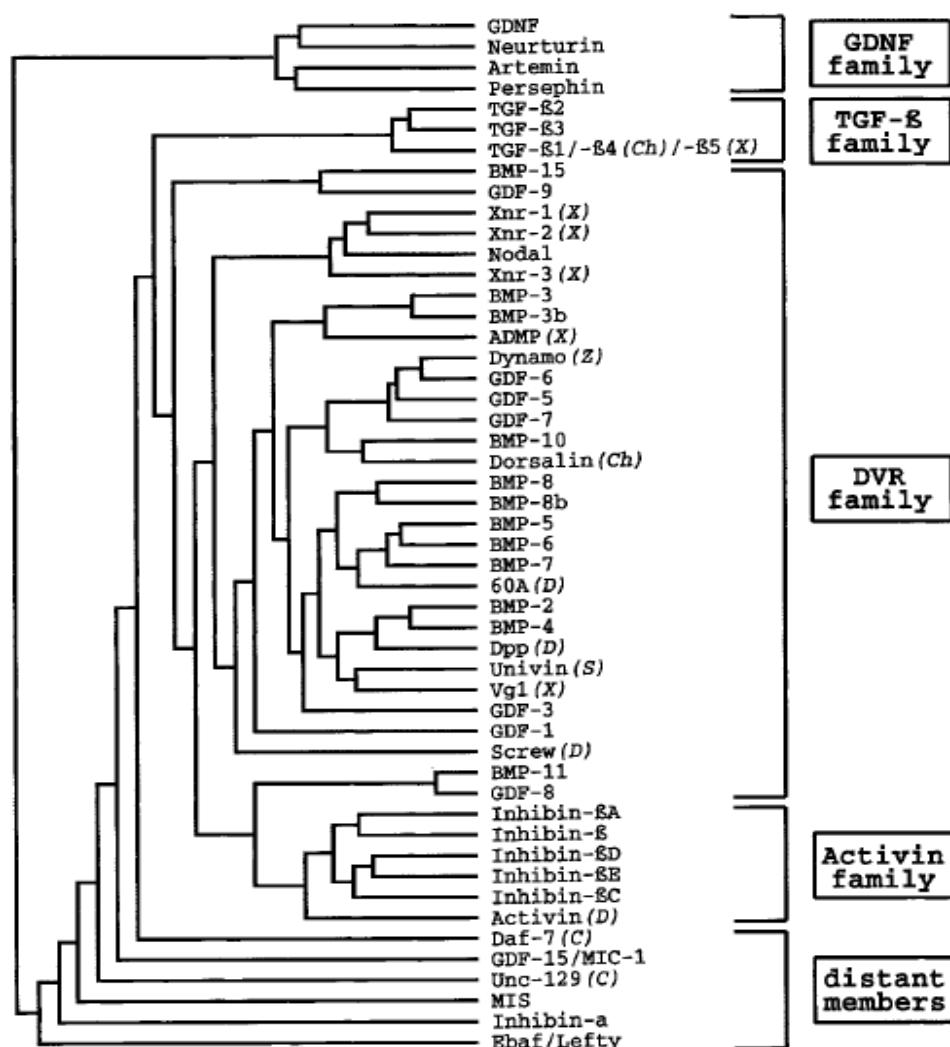


Abbildung 2: Dendrogramm der TGF- β -Superfamilie, aus²⁵

TGF- β kommt in unzähligen Geweben des Körpers wie Mesenchymzellen, Bindegewebe, Endothelzellen, Epithelzellen, Thrombozyten, B- und T-Lymphozyten und in Knochen vor.²⁵

TGF- β ist beteiligt an Vorgängen der Zellzykluskontrolle, der Regulation der frühen Entwicklung, der Differenzierung von Geweben, der Bildung von extrazellulärer Matrix, der Hämatopoiese, der Angiogenese, der Chemotaxis und weiteren Funktionen in der Immunabwehr.^{25, 28–30}

TGF- β übermittelt seine Signalwirkung über Ser-Thr Kinasen, wobei der Typ I Rezeptor durch den Typ II Rezeptor nach Bindung von TGF- β phosphoryliert wird.^{31–34} Diese Rezeptoreinheit besteht aus je zwei Typ I und zwei Typ II Rezeptoren (heterotetramere Rezeptoreinheit), von denen der Typ I Rezeptor nach Aktivierung die Signalweiterleitung über Smads wahnimmt.^{31–34} Smads werden in drei Gruppen eingeteilt: rezeptorregulierte „R-Smads“ (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5, Smad8), „Co-Smads“ (Smad4) und inhibitorische Smads „I-Smads“ (Smad6, Smad7).^{31–34} Beim TGF- β Signalweg werden Smad2 und Smad3 phosphoryliert, die dann zusammen mit Smad4 in den Zellkern wandern und dort auf DNA-Ebene nach Anlagerung an Promotoren bestimmter Zielgene deren Transkription regulieren.^{31–34} Zusätzlich werden auch alternative Signalwege, sog. „Mitogen activated protein kinase“ Signalwege wie p38, ERK und/oder JNK, aktiviert.³⁵ Die Steigerung der Transkription der inhibitorischen Smads über TGF- β führt zu einer Autoregulation der TGF- β Signalkaskade über Aktivierung der Ubiquitin Ligase Smurf1/2 oder Proteinphosphatase I (Inaktivierung des TGF β RI), durch Konkurrenz mit den R-Smads um eine Bindung an Smad4, durch Interferenz mit dem R-Smad/Co-Smad Rezeptorkomplex oder durch Interferenz mit dem Smad-DNA Komplex.^{32–34}

I.6 Netzhauterkrankungen

Bei degenerativen Netzhauterkrankungen, die häufig zur Erblindung führen, steht der Tod von retinalen Nervenzellen im Vordergrund. Bis jetzt ist es nur möglich, durch ein erhöhtes Angebot an neuroprotektiven Wachstumsfaktoren (z.B. ciliary neurotrophic factor (CNTF)) den Verlauf durch Abschwächung des Zelltodes zu verlangsamen.³⁶ Eine Therapie, die zur Heilung der Erkrankung führt, ist bei den meisten Formen noch nicht möglich. In den Industrieländern stellen hereditäre Netzhauterkrankungen die häufigste Ursache für eine Erblindung bei der erwerbsfähigen Bevölkerung dar.³⁷ Da der Krankheitsverlauf meist bereits in jungen Jahren schleichend beginnt und zwangsläufig zur Erblindung führt, stellt dies zusätzlich eine psychische Belastung für die betroffenen Personen dar. Die vorherrschende Form wird als *Retinopathia (Retinitis) pigmentosa* (RP) bezeichnet und führt zur Erblindung durch den zunehmenden Zelltod von Photorezeptoren.³⁸ Dabei sterben die Photorezeptorzellen durch Apoptose langsam

über mehrere Jahre.¹³ Es konnten bis heute unzählige Gene identifiziert werden, die eine *Retinopathia (Retinitis) pigmentosa* verursachen können.³⁹ Dabei lag meist ein monogenetischer Erbgang vor, wobei sowohl autosomal-dominante, autosomal-rezessive oder x-chromosomal Erbgänge beobachtet wurden.^{13, 39}

I.7 Das Cre/loxP System

Die Verwendung des Cre/loxP Systems ermöglicht es, nur in bestimmten Geweben Teile der Erbinformation zu entfernen. Dazu wird an jeder Seite des zu entfernenden Gens eine loxP-Sequenz gesetzt. Diese besteht aus einem 8 bp langen Mittelstück und wird von zwei 13 bp langen Seitenstücken flankiert (ATAACTTCGTATA – ATGTATGC – TATACGAAGTTAT). Das Enzym Cre-Rekombinase (38 kDa) schneidet nun die entsprechende Erbinformation nach entsprechender Verpaarung mit einer zweiten Mauslinie aus der DNA heraus. Um die Zelltypspezifität der Cre-Rekombinase zu gewährleisten, werden Mäuse verwendet, bei denen die Cre-Rekombinase mit einem zelltypspezifischen Promotoren gekoppelt ist. Ein solcher Promotor ist für die Retina z.B. der retinaspezifische α-Enhancer von Pax 6, der in transgenen α-Cre Mäusen die Transkription der Cre-Rekombinase steuert.⁴⁰

I.8 Zielsetzung der Arbeit

I.8.1 Einfluss von TGF-β-R2 (TβRII) auf den ontogenetischen Zelltod in der Retina

Um den Einfluss von TβRII auf den ontogenetischen Zelltod zu untersuchen, wurden α-Cre-Mäuse mit Mäusen verpaart, bei denen das Gen für den TβRII mit einer loxP-Sequenz flankiert ist und die wir aus der Gruppe von Hall Moses (Vanderbilt University, Tennessee) erhalten haben. Gekreuzt mit zelltypspezifischen Cre-Mäusen kommt es bei den Tieren zu einer zelltypspezifischen Inaktivierung des TGF-β-R2 Gens und damit zu einer kompletten Blockierung des TGF-β Signalwegs in retinalen Neuronen. Da TGF-β2 bzw. TGF-β-R2 defiziente Mäuse während der Schwangerschaft intrauterin an defekter Dottersackvaskularisation³⁰ oder Hämatopoese oder kurz nach der Geburt an kardiovaskulären Fehlbildungen versterben^{29, 41, 42}, wurde der Effekt von TGF-β auf den ontogenetischen Zelltod geborener/erwachsener Tiere bisher nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit immunhistochemischen Färbungen und Western Blot Analysen der erfolgreiche konditionelle Knock-out des TβRII bestätigt werden. Im Anschluss sollte durch TUNEL-Färbungen der Einfluss des konditionellen TβRII Knock-outs auf den ontogenetischen Zelltod von retinalen Neuronen mit dem von Wildtypen

(ohne konditionellen Knock-out) verglichen werden. Diese Daten sollten durch Anwendung eines ELISAs weiter bestätigt werden. Darüber hinaus sollte der lichtmikroskopische Phänotyp der Retina von α -Cre; TGF- β -R2 $^{flox/flox}$ Tieren mit dem von Wildtypen (TGF- β -R2 $^{+/+}$) verglichen werden.

I.8.2 Einfluss von Smad7 auf den ontogenetischen Zelltod in der Retina

Da Smad7 im Sinne einer negativen Rückkoppelung hemmend auf den TGF- β Signalweg wirkt, wurden α -Cre-Mäuse mit Mäusen verpaart, bei denen das Gen für Smad7 mit einer loxP-Sequenz flankiert ist (Arbeitsgruppe Ingo Kleiter/Andreas Steinbrecher (Neurologische Klinik der Universität Regensburg)).^{43, 44} Durch die Kreuzung mit zelltypspezifischen Cre-Mäusen kommt es bei diesen Tieren zu einer zelltypspezifischen Inaktivierung von Smad7 und damit zu einer Verstärkung des TGF- β Signalwegs in retinalen Neuronen.

In der vorliegenden Arbeit sollte mit Western Blot Analysen und quantitativer real-time PCR der konditionelle Knock-out von Smad7 bestätigt werden. Im Anschluss sollte durch TUNEL-Färbungen der Einfluss des verstärkten TGF- β Signalwegs auf den ontogenetischen Zelltod mit dem ontogenetischen Zelltod von Wildtypen (ohne konditionellen Knock-out) verglichen werden. Zusätzlich sollte eine lichtmikroskopische Phänotyp-Analyse durchgeführt werden, bei dem der Phänotyp von α -Cre; Smad7 $^{flox/flox}$ Mäusen mit dem Phänotyp von Wildtypen (Smad7 $^{+/+}$) verglichen wird.

II. Material und Methoden

II.1 Materialliste

II.1.1 Reagenzienliste

0,05% Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
10x PCR-Puffer	Qiagen, Hilden
Bioline - Puffer	Bioline USA Inc, Taunton
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidisulfat (APS), 10% (w/v)	Roth, Karlsruhe
BC Assay Reagenz A+B	Interchim, Wörgl, AUS
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie® Brilliant Blue R-250	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Deoxycholsäure	Roth, Karlsruhe
Diethylether	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
DL-Dithiothreitol, min. 99% Titration	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO	Roth, Karlsruhe
dNTPs	Qiagen, Hilden
Dodecylsulfat (Na_2 -Salz)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Essigsäure, glazial	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolute	Roth, Karlsruhe
Fluorescein	Qiagen, Hilden
Fluorescent Mounting Medium	DakoCytomation, Hamburg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Immobilon™Western HRP Substrat	Millipore Corporation, Billerica, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Ketamin	WDT, Garbsen

Magnesiumchlorid (25 mM)	Qiagen, Hilden
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
N,N,N',N"-Tetramethylethylenediamin, (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat- Monohydrat	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Protease-Inhibitor-Mix M	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamid - Stammlösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 37% (HCl)	Merck, Darmstadt
SYBR-Green I	Qiagen, Hilden
Tergitol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tissue-Tek®	Sakura, Zoeterwoude, NL
Tris Ultrapure, MB Grade	Usb Corporation, Cleveland, USA
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
TRIzol®-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Wasser Rotisolv (Rnase-frei)	Roth, Karlsruhe
Xylazin	Serumwerk Bernburg, Bernburg

Tabelle 3: Reagenzienliste

II.1.2 Enzyme und Kits

II.1.2.1 Enzyme

Taq Polymerase	Eigenproduktion
BioTaq™ DNA Polymerase	Bioline USA Inc, Taunton

Tabelle 4: Enzyme

II.1.2.2 Kits

iScript cDNA Synthesis Kit	BioRad Laboratories, München, Deutschland
HotStarTaq®DNA Polymerase	Qiagen, Valencia, CA
Cell death detection Elisa plus	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
TUNEL-Kit	Promega, Madison, Wisconsin, USA

Tabelle 5: Kits

II.1.3 Verbrauchsmaterialien und Geräte

II.1.3.1 Verbrauchsmaterialien

„Falcon“ Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht
3 MM Blotting ("Whatman")-Papiere	Neolab, Heidelberg
Biosphere Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser, 24 x 60 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Deckgläser, 18 x 18 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Dispomed Einmalspritze	Dispomed Witt oHG, Geinhausen
Ecoflo Perfusionsbesteck	Dispomed Witt oHG, Geinhausen
Glaswaren	Schott, Roth, VWR
Liquid Blocker PAP-Pen	SCI Science Services, München
Microseal® „B“ Film	Biorad, München
Multi-Reaktionsgefäße 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml	Roth, Karlsruhe
Omnifix sterile Einmalspritzen	B. Braun, Wertheim

Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PCR Plates, 96 well iCycler IQ	Biorad, München
Personna Rasierklingen	American Safety Razor Company, Verona, USA
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Powderfree Sempercare Handschuhe	Sempermed, Wien, AUS
PVDF-Western Blot Membran	Roche, Mannheim, Deutschland
Rotilabo 0,22 µm Spritzenfilter	Roth, Karlsruhe
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Sterican Einmal-Injektions-Kanüle	B. Braun, Wertheim
SuperFrost®Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
12-Well Platten	

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialen**II.1.3.2 Geräte**

Axiovert 40 CFL	Zeiss, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Inolab pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
IQ5 Multicolor Real-time PCR Detection System + iCycler	BioRad, München
Julabo SW20 Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach
Kern PJL 2100-2M Analysewaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
LAS 3000 Intelligent Dark Box	Fujifilm, Düsseldorf
Mastercycler gradient, personal	Eppendorf, Hamburg
Memmert Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Gießen
Microm HM 500 OM Kryostats	Microm International, Walldorf
Mikroskop Axio Imager Z1	Zeiss, Göttingen
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA

Model 45-101-i ClassII Electrophoresis System	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pipetman Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Polymax 1040 Schüttler	Heidolph, Kelheim
PowerShot G5 Digitalkamera	Canon, Krefeld
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Sunrise-Basic ELISA-Reader	Tecan Austria GmbH, Grodig, Austria
Systec V75 Autoklav	Systec GmbH, Wettenburg
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Zentrifuge 5415D, 5415R, 5804R, 5810R	Eppendorf, Hamburg
Gewebe – Infiltrationsautomat HMP 110	Microm International, Walldorf
Paraffin Ausgießstation MPS/P2	SLEE Medical, Mainz
Microtom Reichert Jung Supercut 2050	Cambridge Instruments, Nußloch

Tabelle 7: Geräte**II.1.4 Puffer, Lösungen, Gele****II.1.4.1 Puffer und Lösungen**

0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4	100 mL 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ mit 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ auf pH 7,4 auf 0,1 M mit dH ₂ O verdünnen
10x Elektrodenpuffer	250 mM Tris/HCl 400 mM Glycin 1% (w/v) SDS in dH ₂ O lösen; ad 1 L
Coomassie-Entfärbelösung	500 mL Methanol 10 mL Essigsäure mit dH ₂ O auffüllen, ad 1 L

Coomassie-Färbelösung	40 mL Methanol 2 mL Essigsäure 0,2 g Coomassie-Brilliant Blue R-250 mit dH ₂ O auffüllen, ad 100 mL
0,9% NaCl	0,9% (w/v) in dH ₂ O, autoklavieren
PBS, 10x, pH 7,4	80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid 4,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ mit dH ₂ O ad 1 L, autoklavieren
SDS-Lösung, 10% (w/v)	10 g SDS in dH ₂ O lösen; ad 100 mL
SDS-PAGE-Laupuffer, 10x	250 mM Tris/HCl 400 mM Glycin 1% (w/v) SDS in dH ₂ O lösen; ad 1 L
SDS-Probenpuffer, 4x	0,25 M Tris/HCl, pH 6,8 30% Glycerin 8% (w/v) SDS 0,02% (w/v) Bromphenolblau 0,3 M DTT bzw. 10% β-Mercaptoethanol
TBS, 10x, pH 7,4	30 g Tris 80 g Natriumchlorid 2 g Kaliumchlorid mit dH ₂ O ad 1 L, autoklavieren
TBST, 1x	100 mL 10x TBS 0,05% (v/v) Tween 20 mit dH ₂ O ad 1 L

Transferpuffer, 10x	5,8 g Tris 2,9 g Glycin 200 mL Methanol 3,7 mL 10% (w/v) SDS in dH ₂ O lösen, ad 1 L
Tris/HCl, 1,0 M, pH 6,8	121,14 g Tris in dH ₂ O lösen; pH einstellen; ad 1 L
Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8	181,71 g Tris in dH ₂ O lösen; pH einstellen; ad 1 L
Mausschwanzlyse-Puffer	50 mM KCl 10 mM Tris-HCl, pH 8,3 2 mM MgCl ₂ 0,1 mg/mL Gelatine 0,45% Nonidet P-40 0,45% Tween 20 Je 1 mL Lysispuffer wurden 500 µg Proteinase K vor Gebrauch frisch zugegeben.
Fixierlösung 1	40% Ethanol 10% Eisessig
Fixierlösung 2	30% Ethanol 6,8% Natriumacetat 0,2% Natrium-Thiosulfat, Pentahydrat

Tabelle 8: Puffer und Lösungen

II.1.4.2 Gele

	Sammelgel	Trenngel 10%	Trenngel 12%
dH₂O	0,68 mL	1,9 mL	1,6 mL
Rotiphorese® Gel 30	0,17 mL	1,7 mL	2,0 mL
Tris/HCl, 1 M, pH 6,8	0,13 mL	--	--
Tris/HCl, 1,5 M, pH 8,8	--	1,3 mL	1,3 mL
10% SDS	0,01 mL	0,05 mL	0,05 mL
10% APS	0,01 mL	0,05 mL	0,05 mL
TEMED	0,001 mL	0,001 mL	0,002 mL

Tabelle 9: Zusammensetzung Gele für Western Blot Analysen

10% Trenngele wurden für die T β RII Western Blot Analysen und 12% Trenngele bei den Smad7 Western Blot Analysen benutzt.

Für die Genotypisierung der Versuchstiere wurde ein 1% Agarosegel verwendet, welches folgendermaßen hergestellt wurde:

1% Agarosegel

100 mL 1x TBE-Puffer mit 1 g Agarosepulver mischen,
 5 min erhitzen, schwenken und nochmals 2 min erhitzen,
 nach Abkühlen 3 μ L EtBr dazugeben, schwenken
 in vorbereitete Gelschlitten gießen und Gelkämme einhängen

II.1.5 Antikörper und Molekulargewichtsstandard

Protein	Primärantikörper	Bezugsquelle
T β RII	TGF β RII (C16): sc-220 rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Smad7	Smad7 (P-20): sc-9183 goat	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
pSmad2/3	pSmad2/3 (Ser 423/424): sc-11769 goat	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
pSmad2/3	pSmad2/3 (Ser 423/424): sc-11769 rabbit	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

Tabelle 10: Übersicht Primärantikörper

Sekundärantikörper	Bezugsquelle
chicken anti-goat, HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
chicken anti-rabbit, HRP konjugiert	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
goat anti-rabbit, Alexa Fluor [®] 546 konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
chicken anti-goat, Alexa Flour [®] 488 konjugiert	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 11: Übersicht Sekundärantikörper

Die Tabellen 10 und 11 zeigen die für Western Blot Analysen und Immunofärbungen verwendeten Antikörper. Die Größenbestimmung der detektierten Banden erfolgte mit dem Proteinmolekulargewichtsmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (MBI Fermentas, St. Leon-Rot).

II.1.6 Oligonukleotidprimer

II.1.6.1 PCR-Primer

Primer	Spezies	Sequenz	Position	Produktgröße
α-Cre fwd	mm	5'-atgcttctgtccgttgccg-3'		270 bp
α-Cre rev	mm	5'-cctgtttgcacgttcacg-3'		270 bp
TGFβR ₂ GT fw	mm	5'-gcaggcatcaggaccaggatggatcc-3'	Exon 2	711 bp
TGFβR ₂ GT rev	mm	5'-agagtgaagccgtggtaggtgagctg-3'	Exon 2	711 bp
Smad7 RT fw	mm	5'-gtcaggttggatcaccatgcc-3'	Exon 1	568 bp
Smad7 RT rev	mm	5'-actgcctggagaagtgtgtcg-3'	Exon 1	568 bp

Tabelle 12: Übersicht Genotypisierungsprimer

II.1.6.2 qPCR-Primer

Primer	Spezies	Sequenz	Position	Produktgröße
m Smad6 fw	mm	5'-gttgcacccctaccacttc-3'		
m Smad6 rev	mm	5'-ggaggagacagccgagaata-3'		
m Smad7 ex1 fw	mm	5'-acccccatcaccttagtcg-3'	Exon 1	
m Smad7 ex1 rev	mm	5'-gaaaatccattggtatctgga-3'	Exon 1	
m GAPDH	mm	5'-tgtccgtcgatctgac-3'	763 - 781	75 bp
m GAPDH	mm	5'-cctgcttcaccacccctctg-3'	818 - 837	75 bp

Tabelle 13: Übersicht real-time PCR-Primer

Die Primer waren allesamt Intron umspannend. Sie wurden über die Firma Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

II.2 Versuchstiere

Für die *in vivo* Experimente wurden 3 verschiedene Mauslinien verwendet:

Linie	Genetischer Hintergrund	Veränderung
α -Cre ⁴⁵	FVB-N	Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Pax6 Promoters
TGF- β -R2 ^{f/f} 46	Black6	Exon2 des TGF- β -R2 Gens mit loxP Sites flankiert
Smad7 ^{f/f} 43	Black6	Exon1 des Smad7 Gens mit loxP Sites flankiert

Tabelle 14: Übersicht verwendete Mauslinien

II.3 Molekularbiologische Methoden

II.3.1 Isolierung von DNA aus Mäuseschwänzen (aus ⁴⁷)

Die Isolierung von genomischer DNA aus Mäuseschwänzen erfolgte mittels der „quick and dirty“ Methode⁴⁸. Dazu wurden ca. 0,5 cm Mausschwanz in 190 µL Mausschwanzlyse-Puffer und 10 µL (10 mg/mL) Proteinase K gegeben und über Nacht bei 55°C im Thermomixer unter starkem Schütteln (1200 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Proteinase K für 15 min bei 95°C inaktiviert. Nach Zentrifugieren für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit (13200 rpm) wurde der Überstand abgenommen, die Probe photometrisch vermessen und dann nach dem Ergebnis der Photometrie so verdünnt, dass 50 ng in die PCR eingesetzt werden konnten.

II.3.2 Genotypisierung der Versuchstiere

II.3.2.1 Cre-Rekombinase

Die Unterscheidung der Genotypen der Versuchstiere bezüglich der Cre-Rekombinase in Wildtypen und transgene Tiere erfolgte anhand der PCR. Nach Gewinnung der DNA und photometrischer Vermessung wurden 50 ng für die PCR Analyse eingesetzt und mit folgendem Mastermix zu einem Gesamtvolumen von 25 µL vermischt:

Mastermix Cre (für einen 25µL Ansatz)

10x Puffer	2,5 µL
α-Cre Primer fwd	0,5 µL
α-Cre Primer rev	0,5 µL
dNTP (10mM)	0,5 µL
MgCl ₂ (25mM)	0,7 µL
H ₂ O	17,8 µL
Taq (Eigenproduktion)	0,5 µL
verdünnte DNA	2,0 µL

Nach Vortexen der Proben wurden diese nochmals kurz abzentrifugiert und mit folgendem PCR-Programm in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg) amplifiziert:

PCR-Programm Cre

1. Schritt: T = 96°C 2 min
2. Schritt T = 94°C 30 sek
3. Schritt T = 59°C 30 sek
4. Schritt T = 72°C 1 min
5. Schritt gehe zu Schritt 2, 29 Wiederholungen
6. Schritt T = 72°C 2 min
7. Schritt T = 10°C ∞

Im Anschluss an die PCR wurden die Proben jeweils mit 5 µL 6x Orange Loading Dye vermischt und 10 µL auf ein zuvor vorbereitetes 1% Agarosegel in einer mit 1x TBE Puffer gefüllten Gelkammer aufgebracht. Für alle Gelelektrophoresen (Cre, TβRII, Smad7) wurden die Bedingungen 120 V, 500 mA, 150 W, 45 min ausgeführt. Als Standard zur Größenbestimmung der Produkte wurde ein 100 bp Standard (New England Biolabs) verwendet. Ein transgenes Tier lag vor, wenn auf der Höhe von 270 bp eine Bande erschien, ein Wildtyp, wenn keine Bande auf dieser Höhe erschien.

II.3.2.2 T β RII

Für die weitere Verwendung der Versuchstiere ist es nötig, dass auf beiden Allelen das Gen für den T β RII von loxP-Sites flankiert ist. Dies wurde unter Zuhilfenahme der PCR-Technik untersucht. Die Vorgehensweise entsprach dem unter II.3.2.1 Beschriebenen. Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

Mastermix T β RII (für einen 25 µL Ansatz)

10x Puffer Bioline	2,5 µL
Primer TGF β R ₂ GT fw	0,5 µL
Primer TGF β R ₂ GT rev	0,5 µL
dNTP (10mM)	0,5 µL
MgCl ₂ (25mM)	1,2 µL
H ₂ O	17,5 µL
Taq (Eigenproduktion)	0,5 µL
verdünnte DNA	2,0 µL

Nach Vermischen der Proben wurden diese nochmals kurz abzentrifugiert und mit folgendem PCR-Programm in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg) amplifiziert:

PCR-Programm T β RII

1. Schritt: T = 95°C 3 min
2. Schritt T = 95°C 30 sek
3. Schritt T = 61°C 45 sek
4. Schritt T = 72°C 1 min
5. Schritt gehe zu Schritt 2, 35 Wiederholungen
6. Schritt T = 72°C 5 min
7. Schritt T = 10°C ∞

Ein konditioneller Knock-Out lag vor, wenn eine Einzelbande auf Höhe von 711 bp erschien. (Bedingungen der Gelelektrophorese s. Punkt II.3.2.1)

II.3.2.3 Smad7

Ebenso wie bei der T β RII-Linie muss in der Smad7-Linie das Gen für Smad7 von loxP-Sites umgeben sein. Dies wurde mit der PCR-Technik untersucht. Die Vorgehensweise

entsprach dem unter II.3.2.1 Beschriebenen. Für die PCR wurde folgender Mastermix in einem Ansatz von 25 µL verwendet:

Mastermix Smad7 (für einen 25 µL Ansatz)

10x Puffer Bioline	2,5 µL
Primer Smad7 RT fw	0,5 µL
Primer Smad7 RT rev	0,5 µL
dNTP (10mM)	0,5 µL
MgCl ₂ (25mM)	1,2 µL
H ₂ O	17,5 µL
Taq (Eigenproduktion)	0,5 µL
verdünnte DNA	2,0 µL

Nach Vermischen der Proben wurden diese nochmals kurz abzentrifugiert und mit folgendem PCR-Programm in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg) amplifiziert:

PCR-Programm Smad7:

1. Schritt: T = 95°C 3 min
2. Schritt T = 95°C 30 sek
3. Schritt T = 61°C 45 sek
4. Schritt T = 72°C 1 min
5. Schritt gehe zu Schritt 2, 35 Wiederholungen
6. Schritt T = 72°C 5 min
7. Schritt T = 10°C ∞

Ein konditioneller Knock-Out lag vor, wenn eine Einzelbande auf Höhe von 568 bp erschien. (Bedingungen der Gelelektrophorese s. Punkt II.3.2.1)

Der Erfolg aller PCR's wurde mit der Anwendung einer positiv-Kontrolle, eine etwaige Verunreinigung der PCR unter Zuhilfenahme einer negativ-Kontrolle (23 µL Mastermix und 2 µL H₂O) überwacht.

II.4 RNA-Isolierung (aus ⁴⁷)

Die RNA aus den Retinae der Mäuse wurde nach der Methode von Chomczynski und Sacchi isoliert.⁴⁹ Zum Aufschluss der Zellen und dem Lösen der Zellkomponenten

wurde das TRIzol®-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Das TRIzol®-Reagenz ist eine einphasige Lösung mit Phenol und Guanidinethiocyanat. Mit Hilfe von Chloroform wurde das Homogenat in drei Phasen aufgetrennt. Die RNA wurde dann mit Isopropanol aus der wässrigen Phase ausgefällt. Im Einzelnen wurden folgende Schritte durchgeführt:

RNA-Isolation mit TRIzol®-Reagenz

500 µL TRIzol®-Reagenz auf Gewebe geben,
Gewebe mit Hilfe eines Power Gen 125 Homogenisators (Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) in Eppendorf - Reaktionsgefäß lysieren,
5 min bei Raumtemperatur inkubieren,
200 µL Chloroform pro mL TRIzol® zugeben, vortexen,
20 min auf Eis inkubieren,
20 min bei 4°C bei 13200 rpm zentrifugieren,
wässrige Phase in neues Reaktionsgefäß überführen,
(übrige Phasen für Proteinisolierung bei - 20°C lagern),
wässrige Phase 1:1 mit Isopropanol mischen, vortexen,
über Nacht bei – 20°C RNA ausfällen,
20 min bei 4°C bei 13200 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen,
Pellet in 500 µL 70% Ethanol aufnehmen, vortexen,
für 5 min bei 4°C bei 13200 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen,
Pellet je nach Größe in 10 - 20 µL RNase-freiem Wasser lösen,
bei – 80°C lagern.

II.5 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren (aus ⁴⁷)

Die Nukleinsäure-Konzentration wurde mit dem Biophotometer der Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland, bestimmt. Eine ausreichende Reinheit der Nukleinsäuren war gegeben, wenn der Quotient E260/280 bei 1,8 oder höher lag.

II.6 Quantitative real-time PCR zur Bestimmung der relativen mRNA Expression

II.6.1 Herstellung von cDNA (complementary DNA) (aus ⁴⁷)

Die reverse Transkription ermöglicht RNA in cDNA umzuwandeln. Dadurch sind die Informationen, die ursprünglich auf der RNA gespeichert waren, stabiler konserviert und

lassen sich mit PCR Techniken analysieren. Als Primer wurden oligo-dT-Ketten verwendet, um so hauptsächlich mRNA mit polyA-Schwanz zu transkribieren. Für die Durchführung der cDNA-Synthese wurde das „iScript cDNA Synthese Kit“ (BioRad, München) verwendet. Dabei kam eine reverse Transkriptase ohne RNase Aktivität zum Einsatz.

Um Verunreinigungen der RNA abschätzen zu können, wurden pro RNA-Probe zwei Ansätze, einmal mit reverser Transkriptase (+RT) und einmal ohne reverse Transkriptase (-RT), angesetzt. Pro „+RT“-Ansatz wurde 1 µg RNA mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 15 µL gebracht und mit 4 µL „5x iScript™ Reaction Mix“ und 1 µL „iScript™ Reverse Transcriptase“ zu einem Gesamtvolumen von 20 µL vermischt. Für einen „-RT“-Ansatz wurde 1µg RNA mit Nuclease-freiem Wasser auf ein Volumen von 20 µL gebracht. Die reverse Transkription wurde in einem Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Hamburg) nach folgendem Programm durchgeführt:

PCR-Programm für cDNA-Synthese:

1. Schritt: 25°C, 5 min
2. Schritt: 42°C, 30 min
3. Schritt: 85°C, 5 min
4. Schritt: 4°C, ∞

Die reverse Transkription erfolgte im 2. Schritt bei 42°C. Im 3. Schritt wurde die Reverse Transkriptase bei 85°C inaktiviert. Die fertige cDNA wurde bei - 20°C für quantitative real-time PCR-Analysen gelagert.

II.6.2 Durchführung der quantitativen real-time PCR (aus⁴⁷)

Die relative Genexpression der *in vivo* Versuche wurde auf mRNA-Ebene mit Hilfe der quantitativen real-time PCR bestimmt. Für die Analysen wurde ein iQ5 Multicolor real-time PCR Detection System (BioRad, München) verwendet.

cDNA diente als Ausgangsmaterial für die Polymerasenkettreaktion. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR-Green I detektiert. Für die relative Quantifizierung wurde das „Housekeeping“ Gen GAPDH zur Normierung herangezogen.

Jede cDNA-Probe („+RT“) wurde in dreifachen Ansätzen untersucht. Zusätzlich wurden ein dreifacher „-RT“-Ansatz und ein Ansatz mit RNase-freiem Wasser analysiert, um eine Kontamination auszuschließen.

Zuerst wurde jede Probe („+RT“, „-RT“ und RNase-freies Wasser (H_2O)) mit einem speziellen Master-Mix auf ein Volumen von 10 μL gebracht und in eine 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden je 5 μL Primer-Mix mit spezifischen Primern für das zu untersuchende Gen auf den „+RT“/-RT“/ H_2O -Master-Mix gegeben.

„+RT“/-RT“/ H_2O -Master-Mix (für einen Ansatz)

0,15 μL Probe („+RT“ bzw. „-RT“ oder RNase-freies Wasser)

1,50 μL 10 x PCR-Puffer

0,60 μL $MgCl_2$ (25 mM)

0,12 μL dNTPs

0,06 μL Taq DNA Polymerase (5 U/ μL)

0,19 μL SYBR-Green I (7,4% (v/v) in DMSO)

0,015 μL Fluorescein

7,37 μL RNase-freies Wasser

Primer-Mix (für einen Ansatz)

0,17 μL forward Primer (1 μM)

0,17 μL reverse Primer (1 μM)

4,66 μL RNase-freies Wasser

Mit Hilfe einer Klebefolie (Microseal[®] „B“ Film, BioRad, München) wurden die 96-Loch-Mikrotiterplatten daraufhin abgedichtet und die Proben kurz abzentrifugiert. Die Mikrotiterplatte wurde dann in das Gerät eingesetzt und das Schema der Probenanordnung auf der Platte sowie das PCR-Programm eingegeben. Die anschließende PCR lief nach folgendem Programm ab:

real-time PCR-Programm

1. Schritt: 95°C, 15 min

2. Schritt (40 x): 95°C, 10 s; 60°C 40 s

3. Schritt: 95°C, 1 min

4. Schritt: 55°C, 1 min

5. Schritt (81 x): 55°C + 0,5°C je Zyklus (für Schmelzkurve), 6 s

Die Daten wurden mit Hilfe der iQ Optical System Software Version 2.0 (Biorad, München) erhoben und darin die relative Expression nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet.⁵⁰

II.7 Proteinbiochemische Methoden

II.7.1 Proteinisolierung nach der TRIzol®-Methode (aus⁴⁷)

Diese Methode wurde angewendet, um Proteine im Anschluss an die RNA-Isolation mit TRIzol®, aus der verbleibenden Inter- und Phenol-Chloroform-Phase zu extrahieren.⁴⁹ Dabei wurde zuerst durch 100% Ethanol die DNA abgetrennt und dann das Protein mit Isopropanol präzipitiert. Die im Vorfeld durchgeführten Schritte der Homogenisierung, der Phasentrennung und der RNA-Isolation sind im Detail unter II.4 beschrieben.

Protein-Extraktion nach RNA-Isolation mit TRIzol®

0,3 mL 100% Ethanol pro ml TRIzol® zugeben und schütteln,
3 min bei Raumtemperatur (RT) inkubieren,
5 min bei 4°C und 2000 g zentrifugieren,
Pellet mit DNA verwerfen,
Überstand mit 1,5 mL Isopropanol pro mL TRIzol® mischen,
10 min bei RT inkubieren,
10 min und 4°C bei 12000 g zentrifugieren,
Überstand verwerfen, Proteinpellet dreimal waschen:
20 min bei RT mit 2 mL Waschpuffer pro mL TRIzol® inkubieren,
5 min bei 4°C und 7600 g zentrifugieren.
Pellet danach in 2 mL 95% Ethanol pro mL TRIzol® kräftig mischen,
20 min bei RT inkubieren,
5 min bei 4°C und 7600 g zentrifugieren,
Pellet trocknen,
je nach Pelletgröße in bis zu 300 µL 1% SDS aufnehmen,
Pellet bei 50°C bei 750 Upm über Nacht lösen,
10 min bei 4°C und 10000 g zentrifugieren,
Überstand mit Gesamtprotein abnehmen,
bei – 20°C bzw. – 80°C lagern.

II.7.2 Western Blot

II.7.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (aus⁴⁷)

Die Auftrennung der Proteine für die Western Blot Analysen wurde mittels Gel-elektrophorese bewerkstelligt. Die Gelelektrophorese sowie die Herstellung der Polyacrylamidgele wurden nach der Methode von Laemmli durchgeführt.⁵¹

Zum Gießen eines Geles wurde eine Apparatur der Firma peqlab Biotechnology GmbH (Erlangen) nach Anleitung aufgebaut. Danach wurde zuerst das Trenngel zwischen die beiden Glasplatten pipettiert und mit ca. 200 µL Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde der flüssige Überstand abgekippt und das Sammelgel auf das Trenngel gegeben. Außerdem wurde ein Plastikkamm in das flüssige Sammelgel gesteckt, um nach der Polymerisation Taschen für die Auftragung der Proteinproben zu erhalten.

Im so entstandenen Zwei-Phasen-Gel werden im Sammelgel, auf Grund der zum Trenngel unterschiedlichen Porengröße, des pH-Werts und der elektrophoretischen Beweglichkeit seiner Ionen, die Proteine aufkonzentriert. Im Trenngel findet hingegen eine Auftrennung nach Proteingröße statt. Das in den Gelen enthaltene SDS stellt denaturierende Bedingungen während der Elektrophorese sicher. Außerdem werden die Proteine durch SDS entsprechend ihrem Gewicht negativ geladen, was die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld nach der Größe ermöglicht.

Vor der Elektrophorese wurden die sich bei Raumtemperatur befindenden Proteinproben in 1% SDS mit 4x SDS Probenpuffer, der durch β-Mercaptoethanol bzw. DTT stets reduzierende Wirkung besaß, für 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Die Proben wurden anschließend kurz abzentrifugiert.

Das fertige Gel wurde nach Anleitung in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Puffertank mit 1x Laufpuffer aufgefüllt. Die Proben, die eine einheitliche Proteinmenge (je nach Versuch 10 µg - 20 µg Protein) besaßen, wurden zusammen mit 5 µL Proteinmolekulargewichtsmarker (Fermentas, St. Leon-Rot) in die Geltaschen geladen.

Die Auftrennung durch Gelelektrophorese erfolgte bei 20 mA (pro Gel) für 75 - 90 Minuten. Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und verworfen.

II.7.2.2 Semidry-Blotting (aus ⁴⁷)

Die aufgetrennten Proteine wurden aus dem Trenngel mittels „Elektroblotting“ auf eine Polyvinylfluorid (PVDF)-Membran (Roche, Mannheim) übertragen. Durchgeführt wurde dies in einer „Semidry Blotting“ Apparatur (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen).

Die PVDF-Membran wurde dazu auf die Größe des Trenngels gebracht und kurz mit Methanol getränkt. Anschließend wurde die Membran für 1 min in destilliertem Wasser geschüttelt und dann 5 min mit Transferpuffer äquilibriert. Die zusätzlich benötigten Whatman-Papiere wurden ebenfalls mit Transferpuffer angefeuchtet. Der Blot wurde folgendermaßen zusammengebaut:

Aufbau Semidry Blot:

Kathode (-)

3 Lagen Whatman-Papier

Trenngel mit Proteinen

PVDF-Membran

2 Lagen Whatman-Papier

Anode (+)

Dabei wurde darauf geachtet, dass sich zwischen Membran und Gel keine Luftblasen befanden. Die Proteine wurden für 90 min bei 25 V auf die PVDF-Membran geblottet.

II.7.2.3 Nachweis spezifischer Proteinbanden (aus ⁴⁷)

Zum Nachweis der spezifischen Proteinbanden wurde ein Primärantikörper gegen das gesuchte Protein hinzugefügt. Dieser Antikörper reagierte mit dem entsprechenden Antigen. Der gebildete Antikörper-Antigen-Komplex wurde dann von einem, für den Primärantikörper spezifischen, Sekundärantikörper gebunden. Durch die Koppelung des Sekundärantikörpers mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP) konnte dieser, bei Zugabe von Luminol, durch ein Chemilumineszenz-Signal detektiert werden. Durch die Meerrettich-Peroxidase wird die Umwandlung von Luminol in seine oxidierte Form katalysiert und dabei ein Lumineszenzsignal ausgesendet.

Die Membranen wurden nach dem Semidry-Blot zunächst 1h bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurde der Primärantikörper über Nacht bei 4°C zugegeben und anschließend dreimal für je 10 min mit TBST gewaschen.

Protein	Blockierungslösung	Primärantikörper	Sekundärantikörper
T β RII	4% Blotto	TGF β RII (C16): sc-220 rabbit	chicken anti-rabbit, HRP konjugiert
Smad7	5% BSA	Smad7 (P-20): sc-9183 goat	chicken anti-goat, HRP konjugiert
pSmad2/3	5% BSA	p-Smad2/3 (Ser 423/424): sc-11769 rabbit	chicken anti-rabbit, HRP konjugiert

Tabelle 15: Übersicht nachgewiesene Proteine und Verwendung der spezifischen Antikörper

Der HRP konjugierte Sekundärantikörper wurde ebenfalls für 1h bei Raumtemperatur zugegeben. Daraufhin wurde dreimal für 10 min mit TBST gewaschen. Bei allen Schritten wurden die Membranen in den Lösungen geschüttelt. Zur Detektion über die Meerrettich-Peroxidase wurden die Membranen nach dem letzten Waschschritt mit 1 mL HRP Substrate Luminol Reagent und HRP Peroxidase Solution (1:1 gemischt) (Millipore Corporation, Billerica, USA), eingeschlagen in eine Folie, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Chemilumineszenz-Signal wurde mit dem LAS 3000 (Fujifilm, Düsseldorf) digital aufgenommen und entsprechend in Graustufen umgesetzt. Die Analyse und Quantifizierung der Chemilumineszenz-Signale wurde mit der Software Aida Advanced Image Data Analyzer Version 4.06 (Raytest, Straubenhardt) bewerkstelligt.

II.7.2.4 Coomassie-Färbung (aus ⁴⁷)

Mittels Coomassie-Färbung⁵² wurden Proteine auf PVDF-Membranen nachgewiesen. Die Färbung der PVDF-Membranen erfolgte nach dem Nachweis spezifischer Proteinbanden zur Ladungskontrolle.

Für die Coomassie-Färbung wurden die PVDF-Membranen in die Coomassie-Färbelösung gegeben und bei Raumtemperatur für mindestens 60 min inkubiert. Dann wurde die Färbelösung abgegossen und mit Entfärbelösung über Nacht unter ständigem Schütteln gewaschen. Die Membranen bzw. Gele wurden anschließend getrocknet und mit Hilfe der LAS 3000 Intelligent Dark Box (Fujifilm, Düsseldorf) fotografiert.

II.8. Immunofärbungen

II.8.1 Paraffineinbettung und Herstellen von Paraffinschnitten

Für die Einbettung in Paraffin wurden die Augen nach Tötung der Tiere bei 12 Uhr brandmarkiert, schonend aus der Orbita enukleiert und üN in 4% PFA-Lösung fixiert. Am nächsten Morgen wurden die Augen minuciert, dreimal für 20 min in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen, in 50% Isopropanol für 1h und 70% Isopropanol für 1h gespült. Für die Aufbewahrung der Augen wurde nochmals der 70% Isopropanol gewechselt.

Die Paraffineinbettung erfolgte nach folgendem Programm in einem Gewebe-Infiltrationsautomat HMP 110 (Microm International, Walldorf):

Einbettprogramm:

70% Isopropanol	1h
80% Isopropanol	1h
96% Isopropanol I	1h
96% Isopropanol II	2h
100% Isopropanol I	1h
100% Isopropanol II	1h
100% Isopropanol III	2h
Xylol I	1h
Xylol II	1,5h
Paraffin I	2h
Paraffin II	8h

Nach diesem Vorgang wurden die Präparate mit Hilfe einer Paraffin Ausgießstation MPS/P2 ausgebettet (SLEE Medical, Mainz) und auf Haltevorrichtungen für den Paraffinschnitt eingebracht. Die Paraffinschnitte wurden an einem Microtom Reichert Jung Supercut 2050 (Cambridge Instruments, Nußloch) durchgeführt, in ein Wasserbad überführt und dann auf Objektträger (SuperFrost®Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgenommen. Dabei wurde darauf geachtet, die Schnitte in der Mitsagittalebene mit geöffneter Linse und Papille auszuführen.

II.8.2 Herstellung von Gefrierschnitten (aus⁴⁷)

Für die Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Augen sofort in Tissue-Tek® (Sakura, Zoeterwoude, NL) eingebettet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die fertigen Gefrierblöcke wurden mit Tissue-Tek® auf Metallblöcken fixiert und Gefrierschnitte hergestellt.

Mit Hilfe des Microm HM 500 OM Kryostats (Microm International, Walldorf) wurden die Schnitte angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte auf Objekträger (SuperFrost®Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgenommen und mit einem Fön angetrocknet. Das Einbettmedium wurde durch fünfminütige Inkubation mit 0,1 M Phosphatpuffer entfernt. Die Gewebeschnitte wurden nach dem Abklopfen der Flüssigkeit mit einem hydrophoben PAP-Stift (Liquid Blocker PAP-Pen, SCI Science Services, München) abgegrenzt, um später eine gezielte immunhistochemische Färbung zu ermöglichen.

II.8.3 Immunhistochemische Färbungen (aus⁴⁷)

Mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung können bestimmte Proteine in Geweben lokalisiert werden. Für die bei der Arbeit verwendete indirekte Immunfluoreszenz wurden ein Primärantikörper und ein Sekundärantikörper verwendet. Der Primärantikörper bindet an das gesuchte Antigen, während sich der Sekundärantikörper, der mit dem Fluorochrom (Alexa 488 (grüne Immunfluoreszenz), Alexa 546 (rote Immunfluoreszenz)) gekoppelt ist, an ein Epitop des Primärantikörpers anlagert.

Neben der indirekten Immunfluoreszenz kam für die direkte Markierung der DNA des Zellkerns der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI zum Einsatz. Mit Hilfe der Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mit Licht entsprechender Wellenlänge (Alexa 546: 546 nm, Alexa 488: 488 nm, DAPI: 381 nm) wurde die Lage der Antikörperkomplexe bzw. des interkalierenden Farbstoffs sichtbar gemacht. Dabei wurde das emittierte Licht durch einen entsprechenden, für die spezifische Wellenlänge durchlässigen, Filter unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager.Z1, Zeiss, Göttingen) betrachtet.

Für die Herstellung von immunhistochemischen Färbungen für den Nachweis von pSmad2/3 wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

immunhistochemischer Nachweis von pSmad2/3

Herstellung von Gefrierschnitten (vgl. II.8.2)

5 min 0,1 M Phosphatpuffer

45 min Blockierlösung (0,2% (v/v) BSA (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 0,1 M Phosphatpuffer mit 0,01% (v/v) NaN₃) mit Proteaseinhibitor-Mix (1:1000)
120 min Primärantikörper gegen pSmad 2/3 (goat pSmad 2/3, 1:50 in 0,2% BSA/0,1 M Phosphatpuffer)
2x 5 min 0,1 M Phosphatpuffer
60 min Sekundärantikörper (chicken anti-goat IgG 1:1000 in 0,2% BSA/0,1 M Phosphatpuffer), gekoppelt mit Flourochrom (Alexa 488)
3x 5 min 0,1 M Phosphatpuffer
1:10 DAPI eindeckeln

Für den immunhistochemischen Nachweis des TβRII wurde auf Paraffinschnitte zurückgegriffen, die zunächst einer Entparaffinierung unterzogen wurden:

Entparaffinierung:

2x 10 min Xylol
2x 10 min Isopropanol 100%
2x 5 min Isopropanol 96%
2x 5 min Isopropanol 80%
2x 5 min Isopropanol 70%
1x 5 min Isopropanol 50%

Im Anschluss wurden die Schnitte kurz mit aqua bidest gespült, Citratpuffer (pH 6,0) aufgekocht und die Schnitte zweimal mit kochendem Citratpuffer inkubiert. Die weitere Vorgehensweise entsprach folgendem Schema:

mit aqua bidest spülen
mit 0,1 M Phosphatpuffer spülen
im Citratpuffer abkühlen lassen
Blockierlösung 3% (v/v) BSA (Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 0,1 M Phosphatpuffer und 0,1% Triton über Nacht bei 4°C
120 min Primärantikörper gegen TβRII (rabbit, 1:50 in 0,2% BSA/0,1 M Phosphatpuffer)
3x 5 min 0,1 M Phosphatpuffer
60 min Sekundärantikörper (goat anti-rabbit IgG 1:1000 in 0,2% BSA/0,1 M Phosphatpuffer), gekoppelt mit Flourochrom (Alexa 546)

3x 5 min 0,1 M Phosphatpuffer
1:10 DAPI eindeckeln

Abschließend wurden die gewaschenen Schnitte auf den Objektträgern mit DAPI-haltigem Medium (10% (v/v) Vectashield DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, USA) in Fluorescent Mounting Medium (DakoCytomation, Hamburg)) eingedeckelt und bis zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung bei 4°C gelagert. Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (Axio Imager.Z1, Zeiss, Göttingen) wurden Bilder der einzelnen Färbungen aufgenommen, die mit dem Bildbearbeitungs- und Analysesystem Axiovision 3.0 (Carl Zeiss, Göttingen) zu einem Bild mit verschiedenen Ebenen zusammengefügt wurden.

II.9 Detektion apoptotischer Zellen

II.9.1 TUNEL-Reaktion

Die TUNEL-Methode eignet sich zur Detektion von apoptotischen Zellen. Zur Verwendung kam das DeadEnd™ Fluorometric TUNEL-System der Firma Promega. Dabei markiert das Enzym TdT (Terminal desoxynucleotidyl transferase) freiwerdende Hydroxylgruppen mit dNTP's, die im Anschluss durch Floureszenzmikroskopie sichtbar gemacht wurden. Dazu ist es nötig, die Paraffinschnitte zu entparaffinieren (vgl. II.8.3). Im Anschluss daran wurden die Schnitte kurz mit aqua bidest gespült und folgende weiteren Schritte durchgeführt:

TUNEL-Färbung

5 min 0,85% NaCl
2x 5 min 1x PBS
15 min 4% PFA
2x 5 min 1x PBS
8 min Proteinase K (1:500 in 1x PBS) 35µL pro Schnitt
2x 5 min 1x PBS
5 min 4% PFA
2x 5 min 1x PBS
10 min Equilibration buffer
60 min, 37°C rTdT-Inkubation (22,5 µL Equilibration buffer + 2,5 µL Nucleotide Mix + 0,5 µL rTdT pro Schnitt)
15 min 2x SSC

2x 5 min 1x PBS

1:10 DAPI eindeckeln

Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (Axio Imager.Z1, Zeiss, Göttingen) wurden Mosaik-Bilder in den Färbungen DAPI und GFP aufgenommen, die mit dem Bildbearbeitungs- und Analysesystem Axiovision 3.0 (Carl Zeiss, Göttingen) zu einem Bild zusammengefügt wurden. Die Auszählung der TUNEL-positiven Zellen erfolgte mit dem Zählsystem KatiKati und wurde dann auf die mm² der Retina bezogen, welche mit dem Bildbearbeitungs- und Analysesystem Axiovision 3.0 (Carl Zeiss, Göttingen) vermessen wurde.

II.9.2 Cell death detection (CDD) Kit

Durch Apoptose werden Nukleosome aus dem Zellkern freigelegt, welche über den Cell death detection ELISA Kit PLUS (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) quantifiziert wurden. Grundlage hierfür ist eine Antigen-Antikörper Reaktion. Zunächst wurden die Puffer nach Herstellerangaben hergestellt. Im Anschluss daran wurden beide Retinae eines Tieres in 500 µL Lysis-Puffer aufgenommen, im Ultraturax zerkleinert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte für 10 min bei 13200 rpm das Abzentrifugieren. Die Proben wurden im Nano-drop 1000 (Peqlab, Erlangen, Germany) vermessen und 6 µg gelöst in Incubation-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 40 µL gebracht und mit 160 µL Immunoreagent vermischt. Die Proben wurden zu je 100 µL auf zwei Wells verteilt und als negativ Kontrolle zwei Wells mit jeweils 20 µL Incubation-Puffer und 80 µL Immunoreagent hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 120 min bei Raumtemperatur wurden die Proben entfernt und es folgten 3 Waschschritte von jeweils 5 min Dauer. Nun wurde jeweils 100 µL ABTS Solution hinzugegeben und bei 250 rpm auf einem Schüttler bei RT inkubiert, bis ein Farbumschlag einsetzte. Zum Abschluss wurde jeweils 100 µL ABTS-Stop-Solution hinzugegeben und die Absorption bei 405 nm in einem Sunrise-Basic ELISA-Reader (Tecan Austria GmbH, Grodig, Austria) bestimmt.

Die Werte wurden nach Abzug der negativ-Kontrolle in einer EXCEL-Tabelle statistisch ausgewertet.

II.10 Phänotyp-Analyse (aus⁴⁷)

II.10.1 Eponeinbettung von Geweben und Anfertigen von Semidünnschnitten

Für die Einbettung in Epon wurden die enukleierten Augen in einer modifizierten Fixierung nach Ito und Karnovsky⁵³ (2,5% Paraformaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer) für mindestens 12 h immersionsfixiert und in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,4) mehrfach für mehrere Stunden gespült. Die Augen wurden in 1% Osmiumferrocyanid nachfixiert, das Osmium wurde mit aqua bidest ausgewaschen und die Augen in aufsteigender Alkoholreihe (Ethanol 70%, 80%, 90%, 100%) entwässert. Die Einbettung in Epon (Araldite 502, Ted Pella, Redding, USA) erfolgte mit Hilfe eines Einbettautomaten (EM-TP, Leica, Nussloch, Deutschland) über Propylenoxid nach Standardmethoden: Propylenoxid/Epon 2:1; Propylenoxid/Epon 1:1; Propylenoxid/Epon 1:2; 100% Epon; Aushärten im Brutschrank 24 h bei 60°C. Die Stammlösung A der Eponlösung bestand aus 62 mL Glycidether 100 gemischt mit 100 mL DDSA; die Stammlösung B aus 100 mL Glycidether 100 gemischt mit 89 mL MNA (Serva, Heidelberg, Deutschland). Für die Einbettung wurden diese Stammlösungen (Verhältnis 1:1) mit 2% Beschleuniger DMP-30 verwendet. Mit einem Reichert Ultramikrotom wurden von den Augen Semidünnschnitte in der Mittsagittalebene angefertigt. Die Semidünnschnitte der Augen wurden anschließend nach Richardson⁵⁴ gefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden daraufhin mit einem Zeiss Lichtmikroskop (Zeiss, Göttingen) betrachtet und Mosaik-Aufnahmen der Gewebe aufgenommen.

II.11 Tiere und Tierhaltung

Die in den Versuchen verwendeten Tiere wurden alle in demselben Raum unter standardisierten Bedingungen (Temperatur 23°C ± 2°C, relative Luftfeuchtigkeit 55% ± 5%, Futter und Wasser ad libitum) bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Tiere wurden möglichst zur gleichen Uhrzeit durch zervikale Dislokation getötet und im Anschluss daran wurden die Augen schonend aus der Orbita präpariert.

II.12 Auswertung und Statistik

Zur Auswertung der numerischen Daten sowie deren graphische Darstellung wurde die Software Microsoft® EXCEL (Microsoft® Corporation, Redmond, USA) herangezogen. Für die statistische Analyse der Versuche kam der „Student’s“ T-Test zum Einsatz. Statistisch signifikante Unterschiede wurden für p<0,05 und statistisch hoch signifikante

Unterschiede für $p < 0,01$ angenommen. In den Diagrammen wurde dies mit * ($p < 0,05$) bzw. ** ($p < 0,01$) vermerkt.

III. Ergebnisse

III.1 Überprüfung des konditionellen Knock-outs von T β RII

Mit Hilfe eines immunhistochemischen Nachweises des TGF- β Typ II Rezeptors (T β RII) sollte nachgewiesen werden, ob mit Hilfe des angewendeten Cre/loxP-Systems sein konditioneller Knock-out in der Netzhaut möglich ist. Tatsächlich konnte bei α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tieren ein deutlich geringeres Signal im Vergleich zu TGF- β -R2^{+/+} Tieren beobachtet werden (Abb. 3 A). Wie erwartet, konnte T β RII vor allem in der Membran der retinalen Neurone nachgewiesen werden. Auffällig war dabei, dass die Signalstärke bei α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tieren zwar in allen Schichten der Retina verringert war, besonders aber eine starke Abnahme in der inneren Körnerschicht (INL) und äußeren plexiformen Schicht (OPL). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass pSmad2/3 in der Retina von α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tieren in geringerem Ausmaße als bei TGF- β -R2^{+/+} Tieren vorhanden war, wobei die Färbung vorwiegend zytoplasmatisch lokalisiert war. pSmad2/3 konnte dabei vorwiegend in der Ganglienzellschicht (GCL) nachgewiesen werden. (Abb. 3 B).

Der immunhistochemische Nachweis des konditionellen Knock-out des T β RII wurde durch Western Blot Analysen bestätigt. Bei TGF- β -R2^{+/+} Tieren wurde eine Bande auf Höhe von 70 kDa für T β RII nachgewiesen, während bei α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tieren eine schwächere Bande auf Höhe von 70 kDa für T β RII bei gleicher Menge an Proteinen (siehe Ladungskontrolle GAPDH) sichtbar wurde (Abb. 4 A). Des Weiteren wurde im Western Blot das Vorhandensein von pSmad2 und pSmad3 als intrazelluläre Signalmoleküle des TGF- β Signalwegs überprüft. Dabei wurde bei TGF- β -R2^{+/+} Tieren sowohl auf Höhe von 58 kDa (pSmad2) als auch auf Höhe von 52 kDa (pSmad3) eine gleichmäßige Bande detektiert. Bei α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tieren wurde nur eine Bande auf Höhe von 58 kDa (pSmad2) und keine Bande für pSmad3 (52 kDa) vorgefunden (Abb. 4 B). Insgesamt zeigten die Befunde, dass es bei α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tieren zu einer deutlichen Verringerung von T β RII in retinalen Neuronen kommt, die wiederum zu einer Verringerung der Signalaktivität von TGF- β führt.

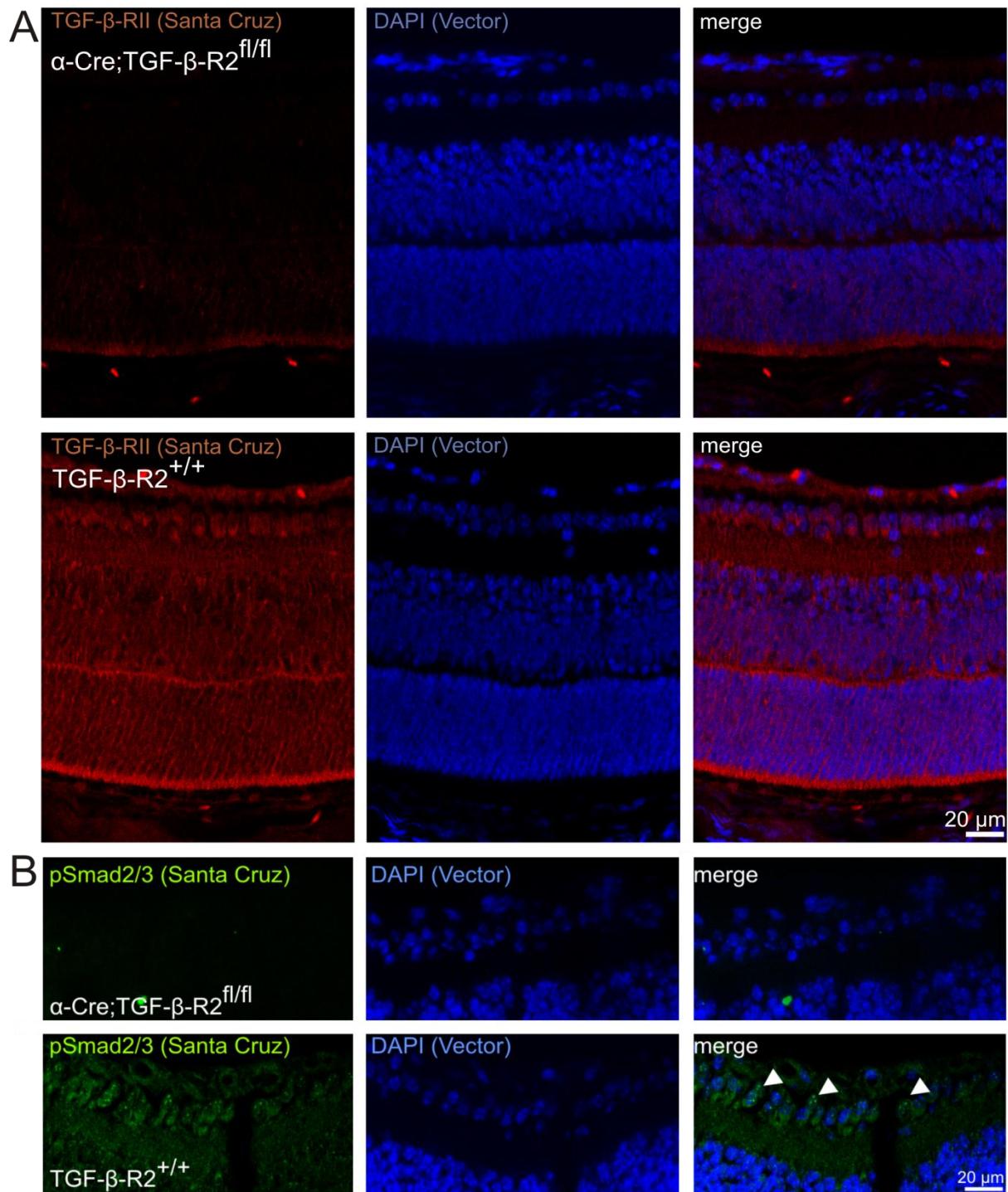


Abbildung 3: Nachweis des konditionellen Knock-out von T β RII (Vergr. 40x) bzw. pSmad2/3 (Vergr. 40x) in der Retina durch immunhistochemische Färbung; Blau Kernfärbung

(A) Bei α -Cre; TGF- β -R2^{fl/fl} Tieren kommt es in der immunhistochemischen Färbung in der Retina zu einem deutlichen Signalverlust im Vergleich zu TGF- β -R2^{+/+} Tieren. (B) α -Cre; TGF- β -R2^{fl/fl} Tiere weisen weniger pSmad2/3 in der Retina auf als TGF- β -R2^{+/+} Tiere.

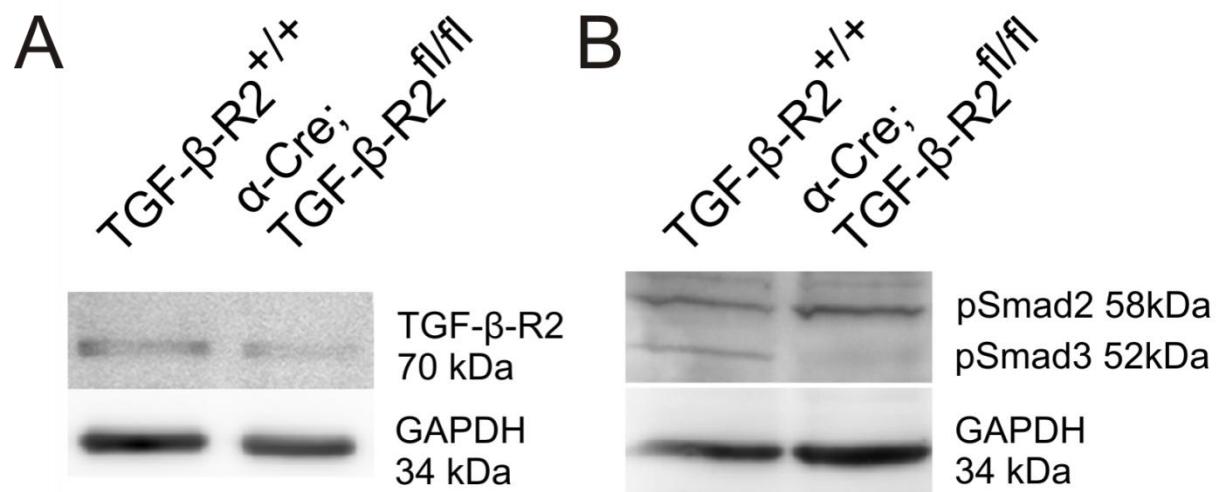


Abbildung 4: Nachweis des konditionellen Knock-out von $\text{T}\beta\text{RII}$ (A) bzw. pSmad2/3 (B) durch SDS-PAGE und Western Blot Analyse von retinalen Proteinen.

III.2 Phänotyp-Analyse des konditionellen Knock-outs von $\text{T}\beta\text{RII}$

Der Phänotyp von $\alpha\text{-Cre; TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl}/\text{fl}}$ Tieren wurde mit dem von $\text{TGF-}\beta\text{-R2}^{+/+}$ Tieren am 15. Tag (d 15) nach Geburt verglichen. In der Panoramaaufnahme der gesamten Retina konnten keine strukturellen Veränderungen von $\alpha\text{-Cre; TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl}/\text{fl}}$ Tieren im Vergleich zu $\text{TGF-}\beta\text{-R2}^{+/+}$ Tieren beobachtet werden (Abb. 5 A und 6 A). Auch im Bereich des Ziliarkörpers wurden keine offensichtlichen Veränderungen vorgefunden. Ebenso der Übergang von *Pars optica* zu *Pars caeca* im Bereich der *Ora serrata* zeigte beim Vergleich von $\alpha\text{-Cre; TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl}/\text{fl}}$ Tieren mit $\text{TGF-}\beta\text{-R2}^{+/+}$ Tieren keinen Unterschied (Abb. 5 B und 6 B). Auch am Austritt des Sehnervs an der Papille konnten keine Veränderungen zwischen $\alpha\text{-Cre; TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl}/\text{fl}}$ und $\text{TGF-}\beta\text{-R2}^{+/+}$ Tieren festgestellt werden. Das Gleiche war für den Sehnerv (Abb. 5 C und 6 C) und den Aufbau der Retina von $\alpha\text{-Cre; TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl}/\text{fl}}$ Tieren und $\text{TGF-}\beta\text{-R2}^{+/+}$ Tieren der Fall (Abb. 5 D und 6 D).

Da in immunhistochemischen Färbungen und in der TUNEL-Analyse (s.u.) die innere Körnerschicht (INL) am stärksten von der $\text{T}\beta\text{RII}$ -Expression bzw. Apoptose betroffen war, wurde im Anschluss die Dicke der Schicht der Außensegmente der Photorezeptoren und der innere Körnerschicht (INL) am Meridionalschnitt zum Zeitpunkt d 15 nach Geburt zusätzlich vermessen.

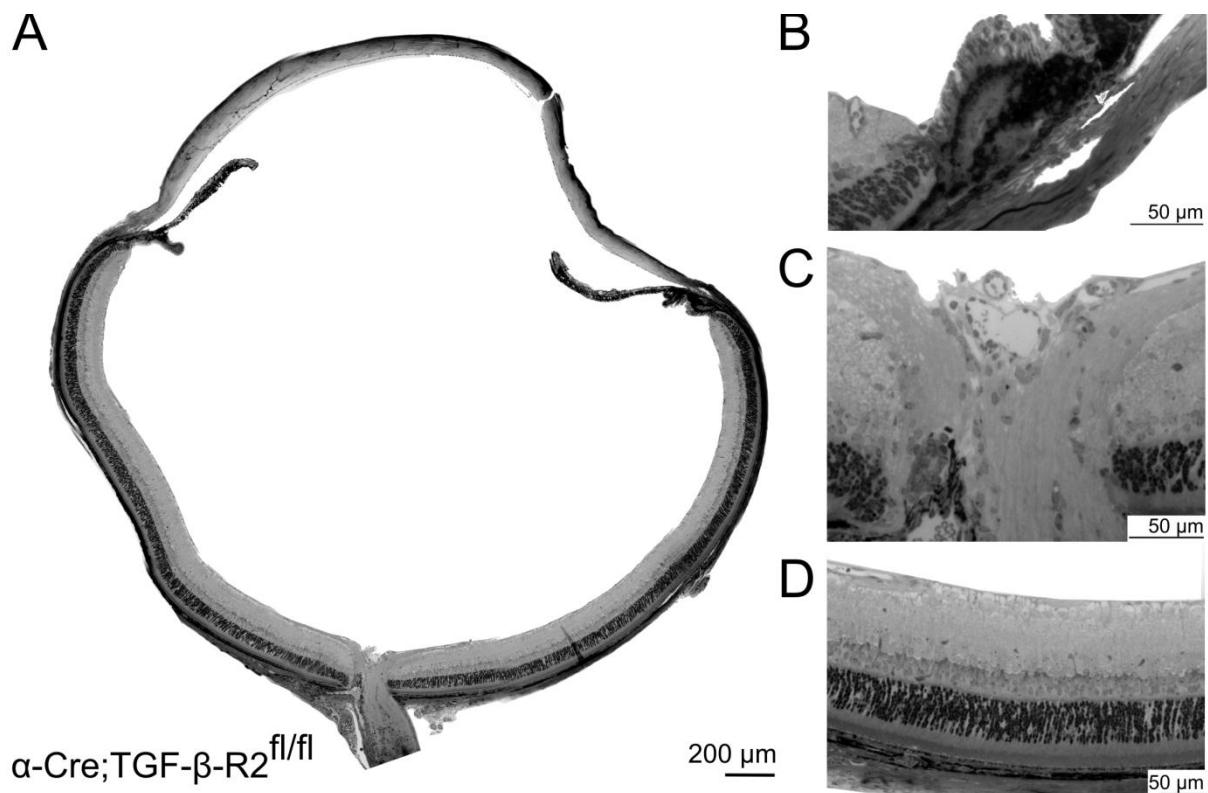


Abbildung 5: Phänotyp $\alpha\text{-Cre}; \text{TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl/fl}}$, d 15

(A) Panoramalaufnahme (Vergrößerung 10x), (B) Ziliarkörper (Vergrößerung 20x), (C) Papille (Vergrößerung 20x), (D) Retina (Vergrößerung 20x)

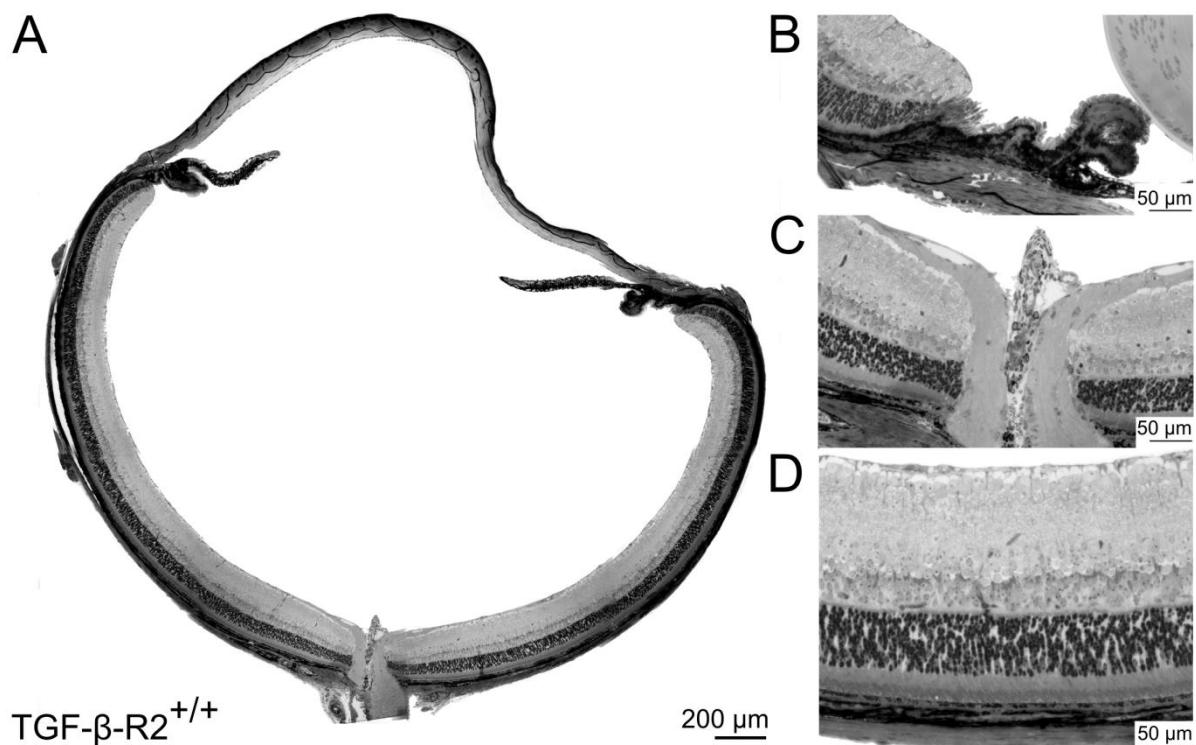


Abbildung 6: Phänotyp $\text{TGF-}\beta\text{-R2}^{+/+}$, d 15

(A) Panoramalaufnahme (Vergrößerung 10x), (B) Ziliarkörper (Vergrößerung 20x), (C) Papille (Vergrößerung 20x), (D) Retina (Vergrößerung 20x)

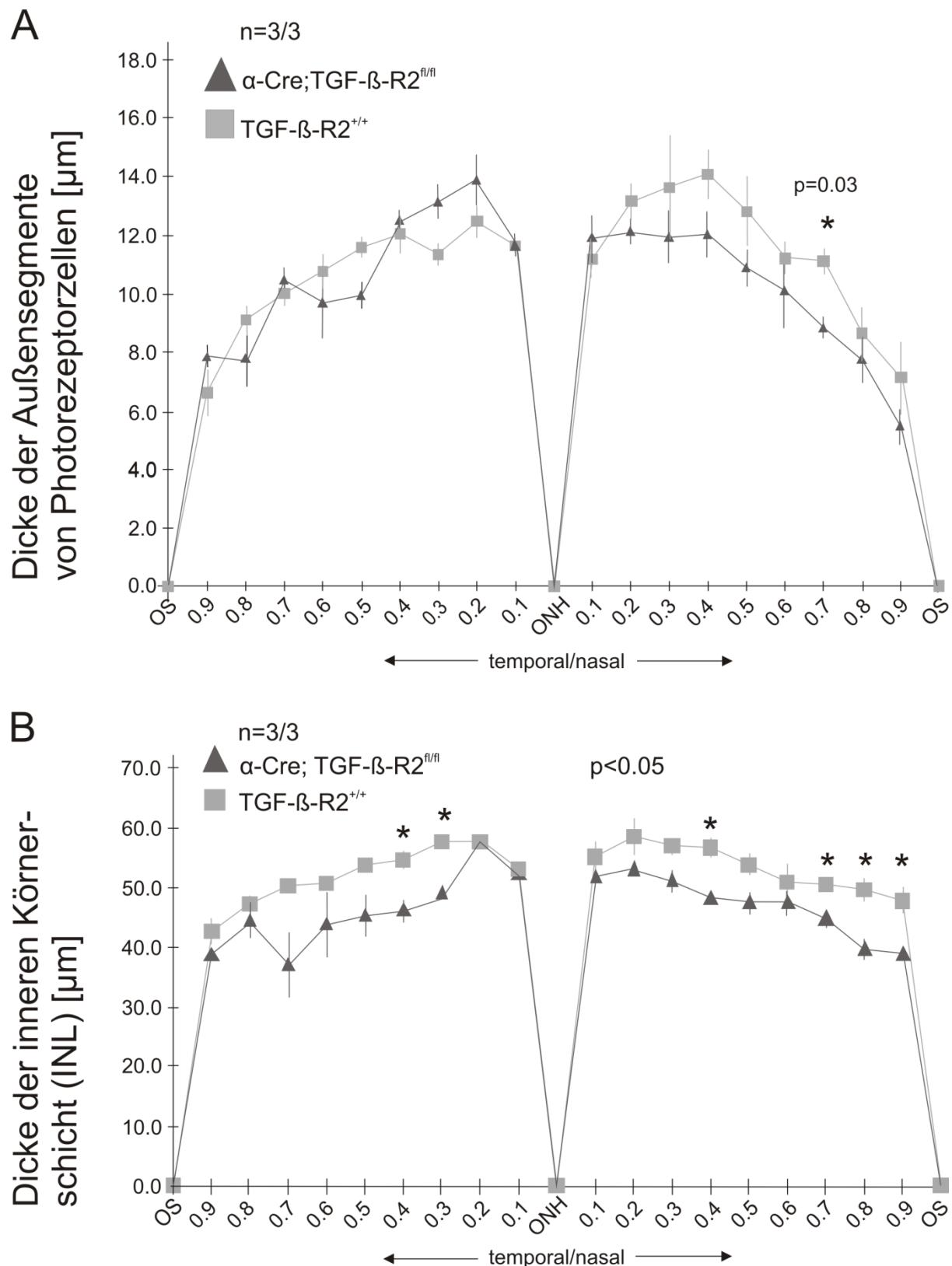


Abbildung 7: (A) Vermessung der Außensegmente der Photorezeptoren bei $\alpha\text{-Cre; TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl/fl}}$ und $\text{TGF-}\beta\text{-R2}^{+/+}$, d 15, p=0,03, SEM (B) Vermessung der inneren Körnerschicht (INL) bei $\alpha\text{-Cre; TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl/fl}}$ und $\text{TGF-}\beta\text{-R2}^{+/+}$, d 15, p<0,05, SEM

Zunächst erfolgte die Vermessung der Außensegmente der Photorezeptoren von $\alpha\text{-Cre; TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl/fl}}$ Tieren im Vergleich zu $\text{TGF-}\beta\text{-R2}^{+/+}$ Tieren. Dabei wurde nur an einer

Stelle (0,7 nasal) eine signifikant dünner Schicht von Außensegmenten zwischen beiden Vergleichsgruppen festgestellt, obwohl eine Tendenz zu kürzeren Außensegmenten bei α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tieren zu erkennen war (Abb. 7 A).

Für die innere Körnerschicht (INL) wurde temporal bei 0,3 und 0,4 und nasal bei 0,4; 0,7; 0,8 und 0,9 bei α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tieren im Vergleich zu TGF- β -R2^{+/+} Tieren eine signifikant dünner INL vorgefunden ($p<0,05$). Auch in den anderen Bereichen war die INL bei α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tieren im Vergleich zu TGF- β -R2^{+/+} Tieren tendenziell dünner, wenn auch kein signifikanter Unterschied erreicht wurde (Abb. 7 B).

III.3 Apoptose und ontogenetischer Zelltod bei T β RII-defizienten Mäusen

Die Untersuchung der Apoptose von retinalen Neuronen während der Phase des ontogenetischen Zelltodes mit Hilfe von TUNEL-Färbungen zeigte bei α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tieren im Vergleich zu TGF- β -R2^{+/+} Tieren eine Zunahme von TUNEL-positiven Zellen. Dabei zeigte sich während der untersuchten Zeitpunkte d 4, d 7 und d 10 apoptotischer neuronaler Zelltod vor allem in der INL und nur vereinzelt in den anderen Schichten der Retina (Abb. 8). In allen TUNEL-Analysen zeigte sich, dass α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tiere im Vergleich zu TGF- β -R2^{+/+} Tieren signifikant mehr Apoptose aufwiesen. Dabei stieg die jeweilige relative Apoptoserate von 1,49 an d 4 über 1,64 an d 7 auf 1,87 an d 10 an, wobei die letzten beiden Zeitpunkte mit $p=0,007$ an d 7 und $p=0,009$ an d 10 hoch signifikant waren (Abb. 9). Zur Bestätigung der TUNEL-Daten wurde zum Zeitpunkt d 10 nach Geburt ein ELISA zur Detektion freier Nukleosomen (Cell death detection) durchgeführt. Dabei wurden signifikant ($p=0,035$) mehr freie Nukleosomen bei α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tieren im Vergleich zu TGF- β -R2^{+/+} Tieren detektiert und damit in einem weiteren unabhängigen Experiment bestätigt, dass es bei α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tieren im Vergleich zu TGF- β -R2^{+/+} Tieren zu einer gesteigerten Apoptose kommt (Abb. 10).

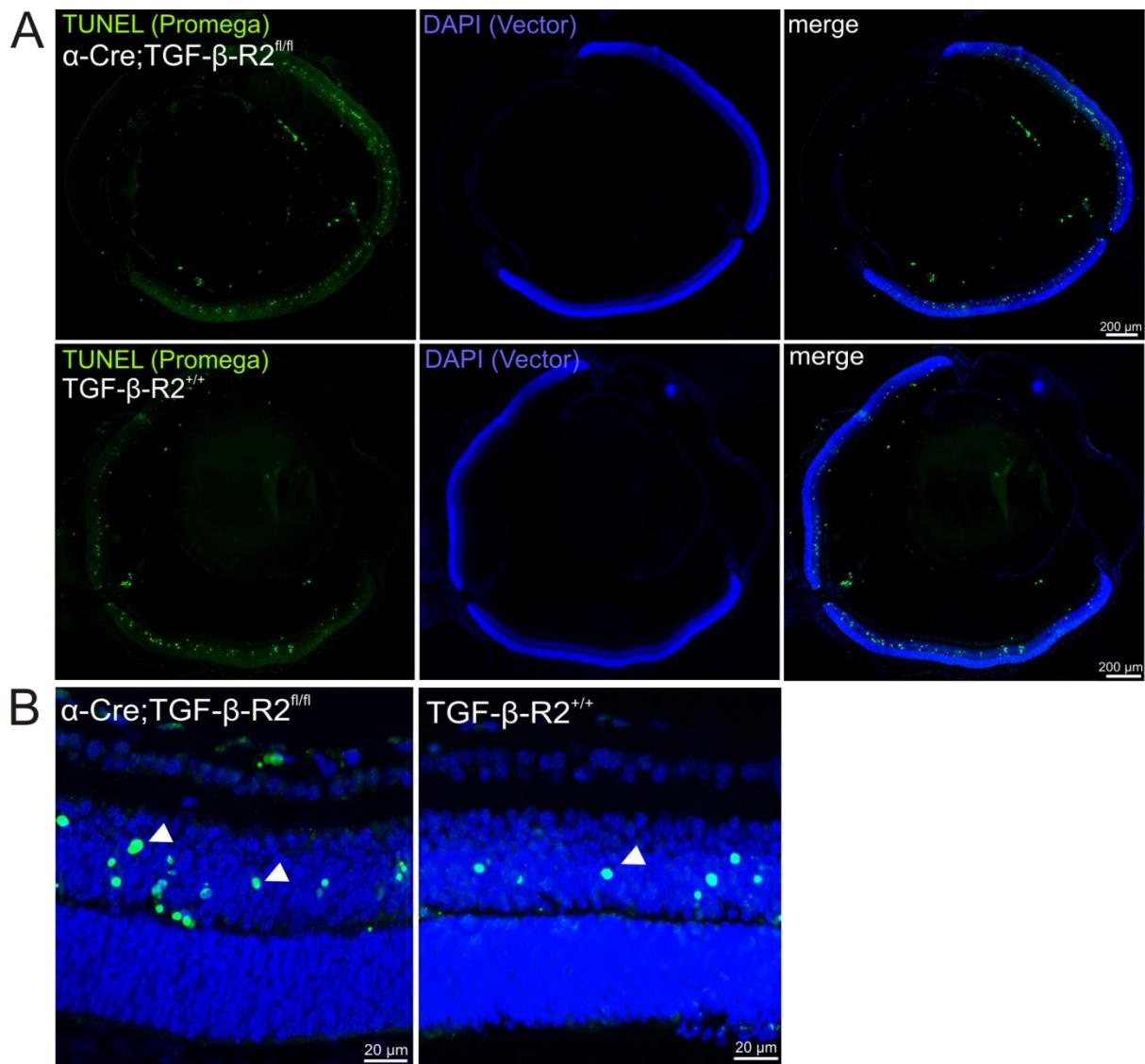


Abbildung 8: (A) Übersichtsaufnahme von α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} und TGF- β -R2^{t/t} TUNEL-Bildern, beide d 7 (Vergrößerung 5x) (B) Detailaufnahme Retina von α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} und TGF- β -R2^{t/t} TUNEL-Bildern, beide d 7 (Vergrößerung 40x)

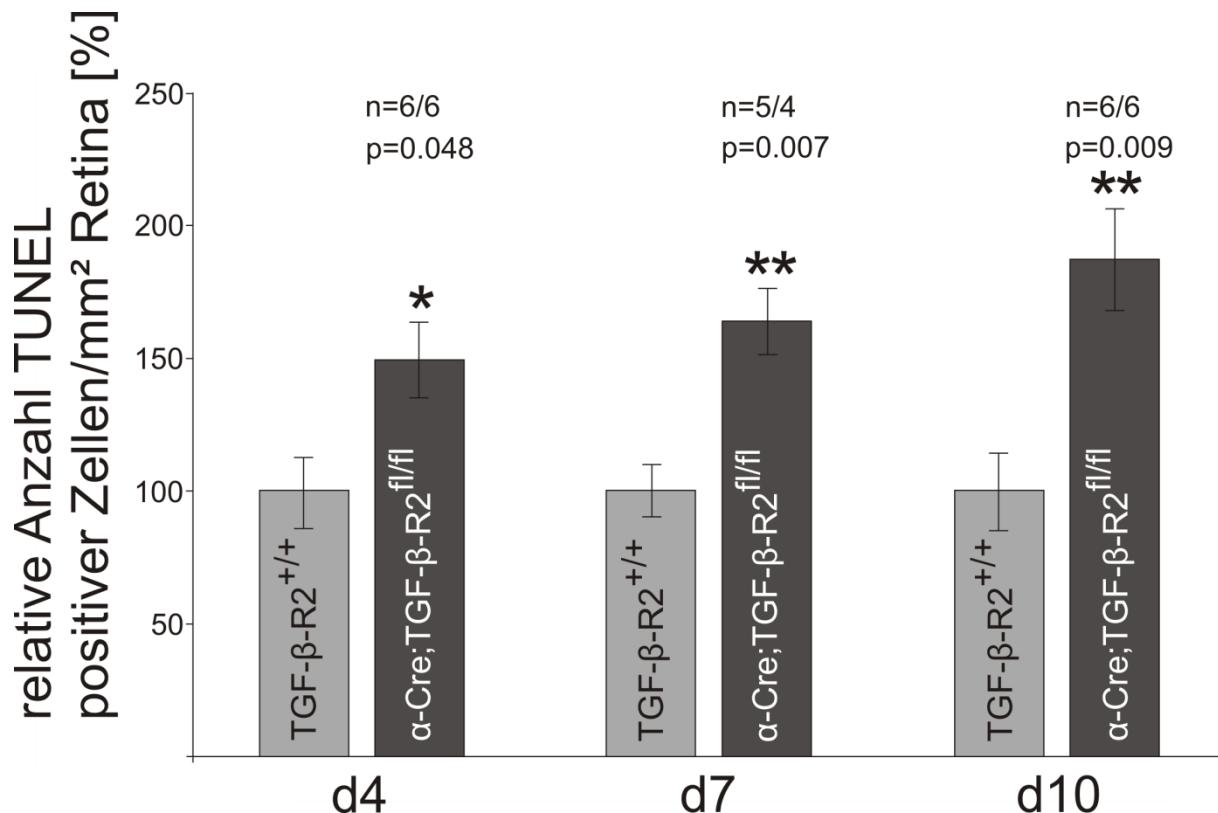


Abbildung 9: relative Anzahl TUNEL-positiver Zellen auf mm^2 Retina, d 4: n=6/6, p=0,048; d 7: n=5/4, p=0,007; d 10: n=6/6, p=0,009, relative Mittelwerte und SEM dargestellt

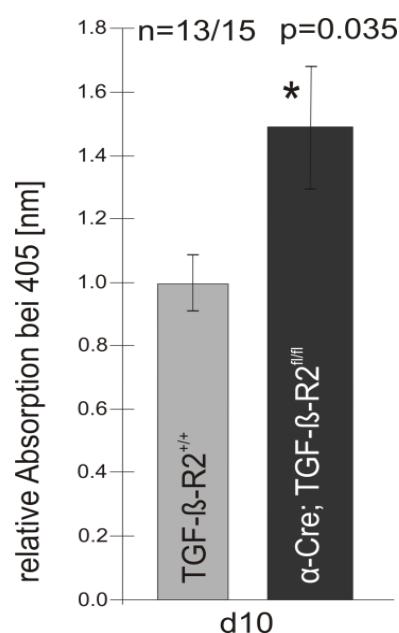


Abbildung 10: relative Absorption bei 405 [nm] bei Cell death detection, Vergleich von $\alpha\text{-Cre; TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl}/\text{fl}}$ mit $\text{TGF-}\beta\text{-R2}^{+/+}$, d 10, p=0,035, n=13/15, relative Mittelwerte und SEM dargestellt

III.4 Überprüfung des konditionellen Knock-outs von Smad7

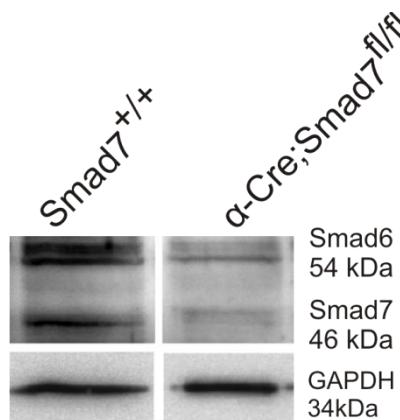


Abbildung 11: Nachweis des konditionellen Knock-out von Smad7 durch Western Blot Analysen

Der konditionelle Knock-out von Smad7 wurde mit Hilfe von Western Blot Analysen bestätigt. So kam es bei α -Cre; Smad7^{fl/fl} Tieren zu einem Verlust der Smad7 Bande auf Höhe von 46 kDa, während auf Höhe von 54 kDa (Smad6) weiterhin eine Bande sichtbar blieb (Abb. 11). Bei Smad7^{+/+} Tieren konnten sowohl auf Höhe von 46 kDa für Smad7 als auch bei 54 kDa für Smad6 Banden detektiert werden.

Um den konditionellen Knockout von Smad7 auf mRNA-Ebene zu bestätigen, wurden quantitative real-time PCRs durchgeführt. Zunächst wurde untersucht, ob die Expression von Smad7 auf mRNA Ebene reduziert ist.

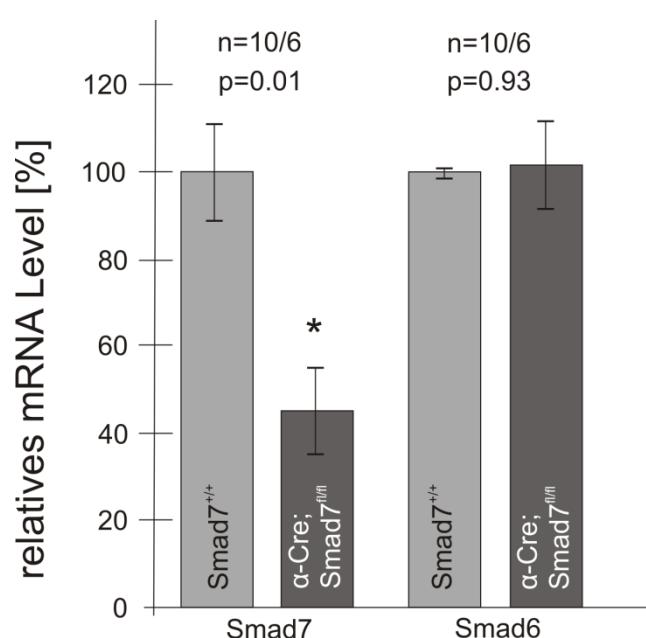


Abbildung 12: relatives mRNA Level von Smad7 bzw. Smad6 [%], n=10/6, p=0,01, d 4 für Smad7; n=10/6, p=0,93, d 10 für Smad6, alle Standardabweichungen in SEM dargestellt

Es konnte gezeigt werden, dass die relative mRNA Expression von Smad7 bei α -Cre; Smad7^{fl/fl} im Vergleich zu Smad7^{+/+} auf 45% signifikant reduziert ist ($p=0,01$) (Abb. 12).

Zusätzlich wurde eine quantitative real-time PCR für Smad6 durchgeführt, wobei sich kein Unterschied zwischen dem relativen mRNA Level von Smad6 bei α -Cre; Smad7^{fl/fl} im Vergleich zu dem von Smad7^{+/+} ($p=0,93$) zeigte (Abb. 12).

III.5 Phänotyp-Analyse des konditionellen Knock-outs von Smad7

Um festzustellen, ob die geringere Apoptoserate von α -Cre; Smad7^{fl/fl} im lichtmikroskopischen Phänotyp in Erscheinung tritt, wurden die Phänotypen von α -Cre; Smad7^{fl/fl} Tieren mit dem von Smad7^{+/+} Tieren an d 15 nach Geburt miteinander verglichen. Sowohl im Ziliarkörper (Abb. 13 B und 14 B) als auch im Bereich der Papille (Abb. 13 C und 14 C) konnten keine offensichtlichen Veränderungen verzeichnet werden. Auch der Sehnerv selbst (Abb. 13 C und 14 C) zeigte keine offensichtlichen Veränderungen. In der Retina (Abb. 13 D und 14 D) konnten alle 10 Schichten nachgewiesen werden, ohne dass es zu nachweisbaren Veränderungen im Bereich der INL kam.

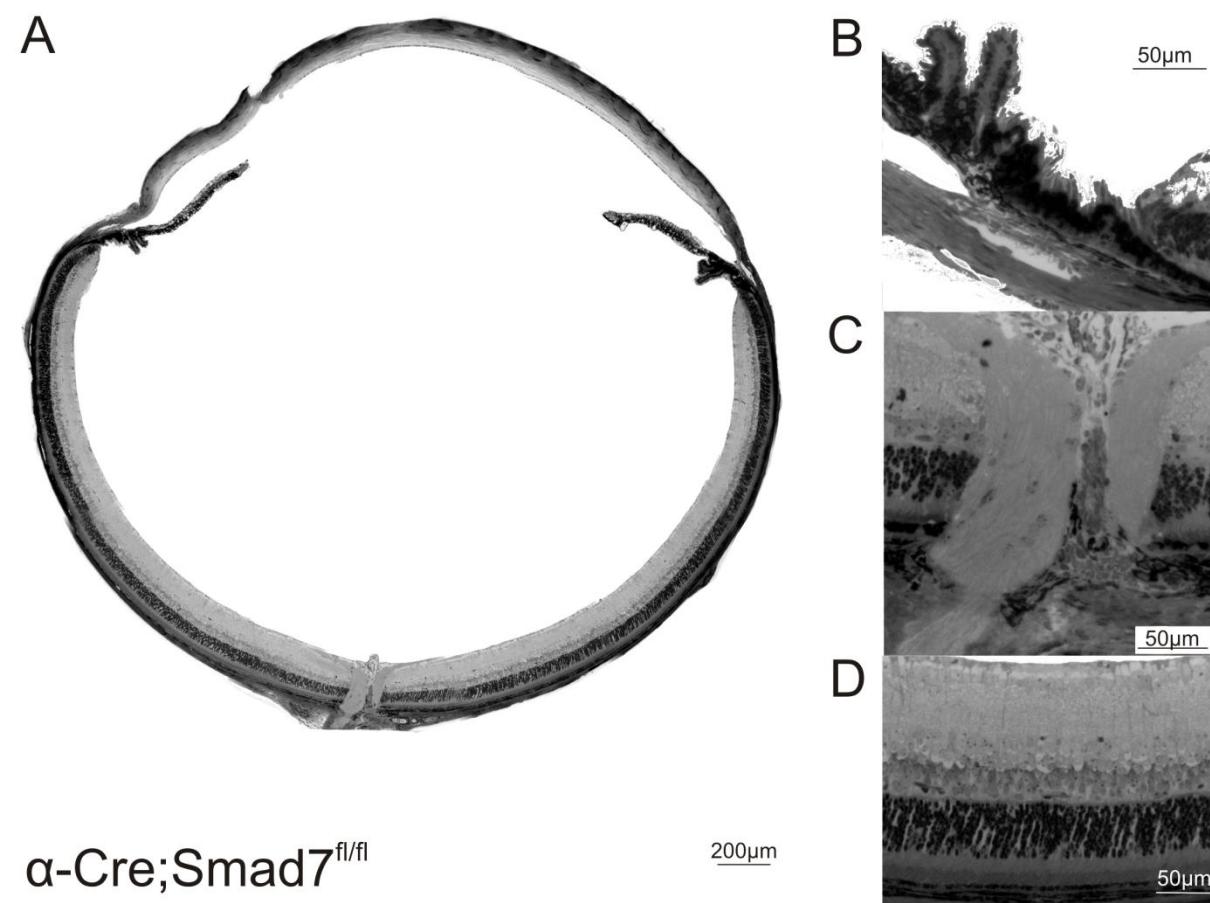


Abbildung 13: Phänotyp α -Cre; Smad7^{fl/fl}, d 15

(A) Panoramaaufnahme (Vergrößerung 10x), (B) Ziliarkörper (Vergrößerung 20x), (C) Papille (Vergrößerung 20x), (D) Retina (Vergrößerung 20x)

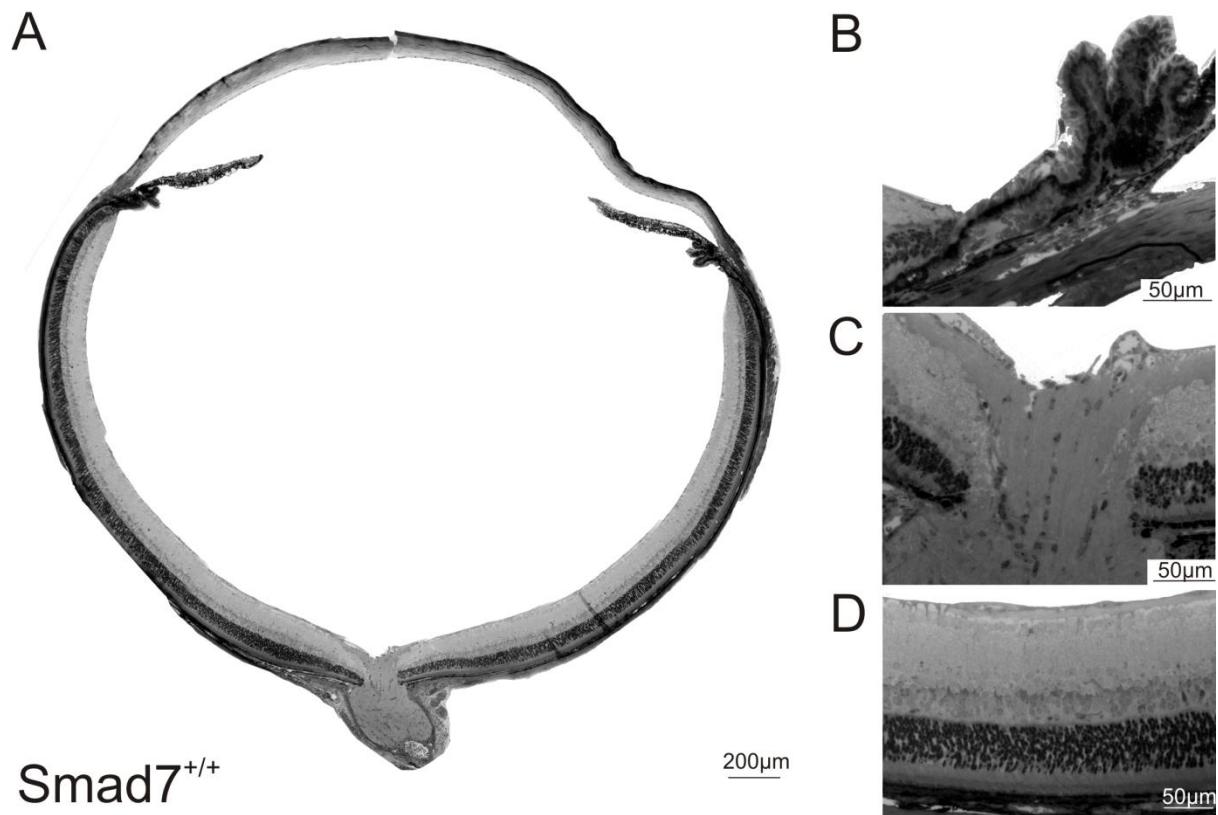


Abbildung 14: Phänotyp Smad7^{+/+}, d 15

(A) Panoramaaufnahme (Vergrößerung 10x), (B) Ziliarkörper (Vergrößerung 20x), (C) Papille (Vergrößerung 20x), (D) Retina (Vergrößerung 20x)

III.6 Apoptose und ontogenetischer Zelltod bei Smad7-defizienten Mäusen

Beim Vergleich von TUNEL-Färbungen von α -Cre; Smad7^{fl/fl} Tieren und Smad7^{+/+} Tieren in Abb. 15 A konnte man erkennen, dass es bei α -Cre; Smad7^{fl/fl} Tieren sowohl am d 7 als auch am d 10 zu einer geringeren Apoptose kam als bei Smad7^{+/+} Tieren. Wieder wurde Apoptose vor allem im Bereich der INL beobachtet (Abb.15 B).

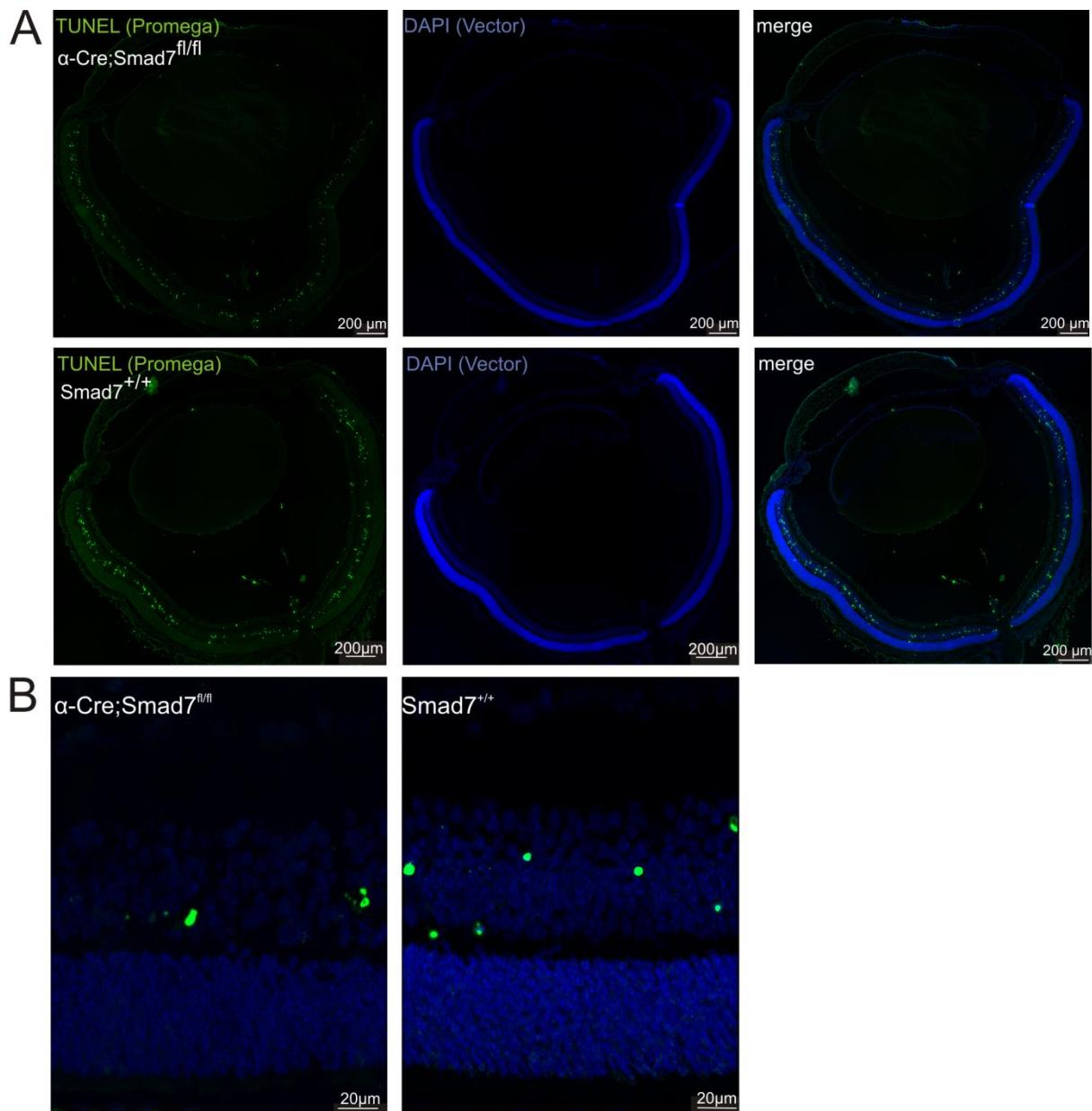


Abbildung 15: (A) Übersichtsaufnahme von α -Cre; Smad7^{fl/fl} und Smad7^{+/+} TUNEL Bildern, beide d 10 (Vergrößerung 5x) (B) Detailaufnahme Retina von α -Cre; Smad7^{fl/fl} und Smad7^{+/+} TUNEL Bildern, beide d 10 (Vergrößerung 40x)

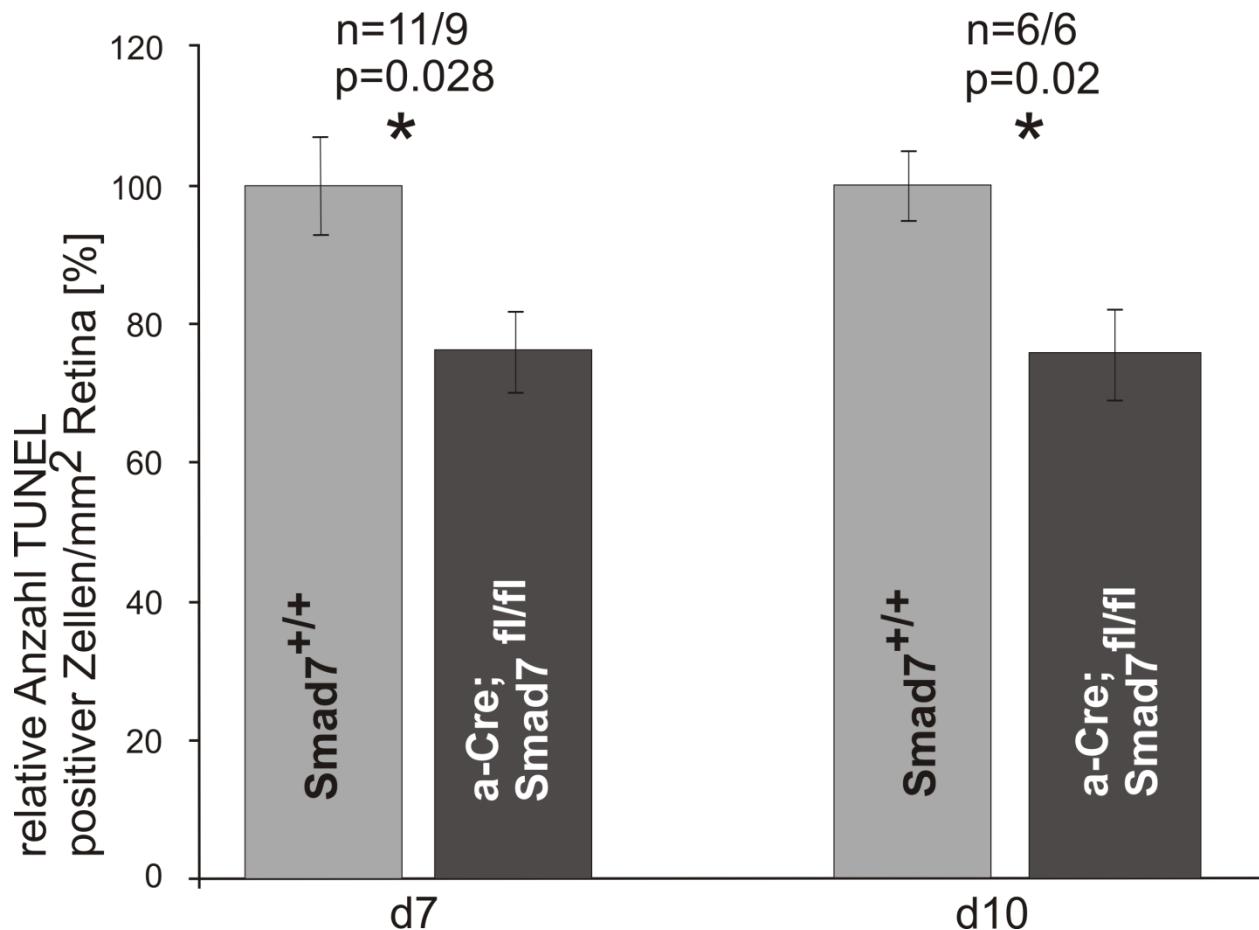


Abbildung 16: relative Anzahl TUNEL-positiver Zellen bezogen auf mm² Retina, d 7: n=11/9, p=0,028; d 10: n=6/6, p=0,02, relative Mittelwerte und SEM dargestellt

Die quantitative Auswertung ergab sowohl an d 7 als auch d 10 bei α -Cre; Smad7^{fl/fl} Mäusen eine geringere Apoptoserate als bei Smad7^{+/+} Kontrolltieren. An d 7 sank die Apoptoserate von α -Cre; Smad7^{fl/fl} auf 76% im Vergleich zu Smad7^{+/+} mit p=0,028 und an d 10 bei α -Cre; Smad7^{fl/fl} ebenfalls auf 76% im Vergleich zu Smad7^{+/+} mit p=0,02.

IV. Diskussion

IV.1 Konditioneller Knock-out des T β RII

Da ein systemischer Knock-out von TGF- β 2 mit einer Letalität in der Embryonalentwicklung bzw. kurz nach Geburt aufgrund von gestörter Dottersackvaskularisation, Herzfehler und damit verbundener Zyanose und/oder defekter Blutbildung einhergeht⁴¹, war es bis jetzt nicht möglich, den Einfluss des TGF- β Signalwegs auf den ontogenetischen Zelltod in der Retina *in vivo* zu untersuchen. Daher wurde in bisherigen Untersuchungen mit komplettem systemischem Knock-out von TGF- β (mit oben genannten Problem der Frühletalität) oder mit Antikörpern *in vivo/in vitro* gearbeitet, die einen systemischen Knock-out ermöglichen. Antikörper haben allerdings keinen Einfluss auf den ontogenetischen Zelltod und damit auf die Entwicklung, da sie erst ab einem gewissen Zeitpunkt nach Geburt verabreicht werden können. Zudem muss festgestellt werden, dass durch die Gabe von Antikörpern zwar die entsprechenden Moleküle neutralisiert werden können, aber der Signalweg mit seinen Rezeptoren erhalten bleibt und somit auch andere - eventuell bis dato unbekannte Moleküle - als funktionelle Agonisten oder Antagonisten am Rezeptor fungieren bzw. Aufgaben übernehmen können.

Der konditionelle Knock-out des T β RII wurde durch das Verpaaren von α -Cre Mäusen mit Mäusen, deren Gen für den T β RII mit einer loxP-Sequenz flankiert ist, bewerkstelligt. Durch die Cre-Rekombinase wurde zelltypspezifisch nur in retinalen Neuronen der TGF- β Signalweg komplett gehemmt. Da in der Retina außer den Neuronen auch andere Zellpopulationen lokalisiert sind, wie zum Beispiel Astrozyten, Müller-Glia-Zellen oder Endothelzellen, erklärt sich, weswegen in den Western Blot Analysen, beziehungsweise quantitativer real-time PCR bei den Knockout Retinagewebe-Lysaten keine komplette „Nullantwort“ gezeigt werden kann. Da der TGF- β Signalweg auch noch mit zahlreichen anderen nachgeschalteten Signalwegen interagiert^{34, 35}, ist es möglich, dass ein Verlust des TGF- β Signalwegs in einem Zelltyp zu einer Up-Regulation aber in einem anderen Zelltyp zu einer Down-Regulation eines anderen Signalwegs führt.

Es wurde ein konditioneller Knock-out des T β RII durchgeführt, der gewebsspezifisch nur in der Retina zu einem Verlust des T β RII führt und in allen anderen Organen zu keinem Verlust des T β RII führt. Daher konnten in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zum Phänotyp an d 15 nach Geburt, Untersuchungen zur Dicke der Außensegmente der Photorezeptoren und der inneren Körnerschicht (INL) an d 15 nach

Geburt und TUNEL-Analysen an d 4, d 7 und d 10 nach Geburt durchgeführt werden, um Aussagen über den Einfluss des TGF- β Signalwegs auf den ontogenetischen Zelltod in der Retina treffen zu können.

Nachdem Mäuse mit einem konditionellen Knock-out (α -Cre; TGF- β -R2^{f/f}) mit Hilfe der Cre-Rekombinase generiert waren, wurde untersucht, ob sich der konditionelle Knock-out auch in immunhistochemischen Färbungen nachweisen lässt. Zunächst wurde eine Färbung auf T β RII durchgeführt, die eine klare Signalabnahme im Bereich der inneren Körnerschicht (INL) und retinalen Ganglienzellschicht aufwies. In der nachfolgenden Färbung auf pSmad2/3 wurde eine Signalabnahme vor allem im Bereich der retinalen Ganglienzellen verzeichnet und dargestellt, dass pSmad2/3 als Signalmolekül intrazellulär lokalisiert ist und außerdem in den Zellkern transloziert, wo es die Transkription von Zielgenen ermöglicht.

Auch in Western Blot Analysen konnte der konditionelle Knock-out des T β RII belegt werden. Auffällig war, dass es bei den nachgeschalteten Signalmolekülen zwar zu einem Verlust der Bande für pSmad3 kam, die Bande für pSmad2 aber unverändert stark zu detektieren war. Dies kann dadurch erklärt werden das Smad2 sowohl durch T β RII als auch durch den ActRII oder ActRIIb (Activin Signalweg) phosphoryliert wird, während Smad3 nur durch den T β RII phosphoryliert wird.³⁴ Yanagisawa et al. hoben 1998 in ihrer Arbeit hervor, dass sowohl Smad2 als auch Smad3 in der Lage sind, Apoptose auszulösen, wobei Smad3 eine höhere Fähigkeit besitzt, Apoptose zu induzieren.^{28, 55} Es wäre denkbar, dass Smad2 durch den Verlust an Smad3 die Funktion von Smad3 teilweise übernehmen kann.

In der Phänotyp Analyse zeigten sich keine offensichtlichen Unterschiede zwischen α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tieren und TGF- β -R2^{+/+} Tieren. Da es aber in TUNEL-Aufnahmen zu einer verstärkten Apoptose bei α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tieren im Bereich der inneren Körnerschicht (INL) kam, wurde die innere Körnerschicht (INL) vermessen und dabei festgestellt, dass es teilweise zu einer signifikant dünneren inneren Körnerschicht (INL) bei α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} im Vergleich zu TGF- β -R2^{+/+} Tieren kam. Dies lässt sich durch eine gesteigerte Apoptose von retinalen Neuronen erklären.

In TUNEL-Analysen wurde an d 4, d 7 und d 10 überwiegend in der inneren Körnerschicht (INL) Apoptose detektiert, was den Befunden von Young et al. (1984) entspricht, dass annähernd 45% der Ganglienzellen, Bipolarzellen, amakrinen Zellen und Müllerzellen einem ontogenetischen Zelltod unterliegen.⁶ Von den retinalen Ganglienzellen abgesehen, befinden sich die Zellkerne von Bipolarzellen, amakrinen Zellen und Müllerzellen in der inneren Körnerschicht (INL). Zusätzlich wandern ab d 5 nach Geburt

Kerne der Photorezeptorzellen durch die sich entwickelnde äußere plexiforme Schicht (OPL) und gehen dabei teilweise zu Grunde.⁶ Dadurch kommt es ab d 7 nach Geburt zu einem Anstieg der Apoptose, die neben den Photorezeptoren auch den amakrinen Zellen und Bipolar- und Müllerzellen zugerechnet werden muss.⁶

Einerseits wurde in der Literatur beschrieben, dass ab d 18 nach Geburt keine apoptotischen Zellen mehr detektiert werden konnten⁶, andererseits gibt es Hinweise, dass im Bereich der Photorezeptoren (äußere Körnerschicht, ONL) ab d 10 nach Geburt bis zum d 26 nach Geburt Apoptose auftritt.⁵⁶ Insbesondere in den TUNEL-Analysen ab d 10 konnten vereinzelte apoptotische Zellen im Bereich der äußeren Körnerschicht im Übergangsbereich zur äußeren plexiformen Schicht (OPL) festgestellt werden. Dies deckt sich wiederum mit Literaturangaben, dass nur ca. 5% der Photorezeptoren einem ontogenetischen Zelltod unterliegen.^{6, 7}

Bis jetzt wurde dem TGF- β Signalweg überwiegend apoptotische Funktion^{28, 57, 58} zugeschrieben, allerdings gibt es auch Hinweise auf eine anti-apoptotische Funktion.^{29, 59, 60}

Auch in der vorliegenden Arbeit weisen die Ergebnisse eindeutig auf eine protektive Funktion von TGF- β während des ontogenetischen Zelltodes in der Retina hin. Zum ersten Mal konnte der ontogenetische Zelltod in der Retina und seine Auswirkungen auch an adulten Tieren untersucht werden, da es bei einem kompletten Knock-out von TGF- β zu diversen Fehlbildungen mit einem frühen Tod (teilweise in der Embryonalperiode bzw. kurz nach Geburt) kam.^{29, 30, 41, 42} Dieses Problem wurde bislang entweder durch die Verwendung eines Antikörpers⁶¹ oder durch einen Knock-out einer einzelnen TGF- β Isoform umgangen.⁵⁷ Bei der Verwendung eines Antikörpers wurden nur einzelne TGF- β Isoformen vor Rezeptorbindung abgefangen. Durch die Verwendung eines Antikörpers *in vivo* kann nur schlecht auf die einzelnen Entwicklungsstadien Einfluss genommen werden. Seine Wirkung ist zusätzlich konzentrationsabhängig, d.h. es muss immer ausreichend Antikörper vorhanden sein um alle TGF- β Moleküle, die ständig produziert werden, abzufangen. Nicht zuletzt muss ein Antikörper injiziert werden, was ein zusätzliches Gewebstrauma darstellt. Die Immunreaktion hierauf könnte wiederum die Bildung von protektiven aber auch apoptotischen Faktoren fördern und somit eine mögliche Aussage der TGF- β Antikörperbehandlung verfälschen. Auch bei einem Knock-out einer TGF- β Isoform bleibt der Signalweg von TGF- β unangetastet. Aufgrund der Komplexität und Interaktionen des TGF- β Signalwegs wäre es durchaus vorstellbar, dass durch strukturähnliche Signalmoleküle der TGF- β Superfamilie eine Rezeptoraktivierung ausgelöst werden kann oder es intrazellulär zu einer Kompensation kommt.⁵⁷ In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal auch

ein Mausmodell verwendet werden, bei dem spezifisch nur die Neurone der Retina vom Knock-out betroffen waren. Wie bereits Gold et al. 1999 zeigten, vermag TGF- β in epithelialen Zellen eine Wachstumsinhibition, in mesenchymalen Zellen jedoch eine Wachstumsstimulation auszulösen.⁶² Die früheren Ergebnisse zum ontogenetischen Zelltod in der Retina beruhen auf der Anwendung von Antikörpern^{57, 58}, dem Knock-out des TGF- β Gens⁵⁷, dem ontogenetischen Zelltod bei TGF- β 2 und TGF- β 3 Knock-Out Mäusen in der Embryonalperiode (E14,5)⁵⁷ oder auf der Untersuchung in vitro mittels Zellkultur.⁵⁸ In der Zellkultur kann allerdings die komplexe Interaktion von TGF- β mit neurotrophen Wachstumsfaktoren oder die Übernahme der Funktion von TGF- β durch andere Signalmoleküle nur unzureichend abgebildet werden.

Des Weiteren wurde entdeckt, dass für die optimale Wirkung von neurotrophen Faktoren wie fibroblast growth factor-2 (FGF-2), ciliary neurotrophic factor (CNTF), glial cell derived neurotrophic factor (GDNF), nerv growth factor (NGF) oder NT-3 (Neurotrophin 3) der TGF- β Signalweg nötig ist.^{63, 64}

Ishihara et al. konnten bereits 1994 zeigen, dass TGF- β 1 und TGF- β 2 für das Auswachsen von Neuriten und das Längenwachstum von Axonen nötig sind.⁶⁵ Zhang et al. (1997) fanden in Untersuchungen heraus, dass für die Ausbildung von synaptischen Verbindungen durch Serotonin der TGF- β Signalweg nötig ist.⁶⁶ Interessanterweise besagt die Grundidee zur Apoptose beim ontogenetischen Zelltod, dass eben die Nervenzellen zugrunde gehen, die nicht in der Lage sind, sich mit ihren Nachbarzellen zu verknüpfen.⁶⁷

Durch einen Verlust des TGF- β Signalwegs durch einen konditionellen Knock-out des T β RII wäre vorstellbar, dass es durch eine verminderte Wirkung von neurotrophen Faktoren und einer schlechteren Ausbildung von Synapsen innerhalb der retinalen Neuronen zu einer gesteigerten Apoptose kommt.

2009 zeigten Walshe et al. auf, dass TGF- β für die vaskuläre Barrierefunktion auf Ebene der Blut-Retina Schranke, dem endothelialen Überleben und der Homöostase der Mikrovaskularisation bei erwachsenen Tieren nötig ist.²⁹ Das Fehlen von TGF- β führte in Endothelzellen zu einer verminderten Synthese von NO (Stickstoffmonoxid) und auf der Ebene der Blut-Retina-Schranke zu einer Veränderung im Bereich der Tight-junction-Proteine zo-1 und Occludin.²⁹ Deren absolute Konzentration war nicht verringert, sondern es fand keine Interaktion dieser beiden Proteine statt.²⁹ Auch auf Ebene von Proteinen retinaler Neurone könnte es zu einer solchen Interaktions-einschränkung aufgrund des Fehlens von TGF- β kommen und damit eine verstärkte Apoptose hervorgerufen werden.

In Strukturanalysen der Retina wurde zusätzlich festgestellt, dass es durch Neutralisierung von TGF- β zu einer gesteigerten Apoptose von Ganglienzellen und retinalen Neuronen im Bereich der inneren Körnerschicht (INL) und äußeren Körnerschicht (ONL) bei adulten Tieren/Zellen kommt.²⁹

Durch die vielschichtigen Funktionen von TGF- β mit einerseits apoptotischen Funktionen^{28, 57, 58}, andererseits auch anti-apoptotischen Effekten^{29, 59, 60}, stellt sich die Frage, über welchen der verschiedenen Apoptosewege der ontogenetische Zelltod bei konditionellem Knock-out des T β RII verläuft.

IV.2 Konditioneller Knock-out von Smad7

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss des TGF- β Signalwegs auf den ontogenetischen Zelltod untersucht werden. Dies geschah einerseits durch den konditionellen Knock-out des T β RII und damit einem Abschalten des TGF- β Signalwegs. Andererseits sollte auch untersucht werden, welche Auswirkungen eine verstärkte Aktivierung des TGF- β Signalwegs durch einen konditionellen Knock-out von Smad7 auf den ontogenetischen Zelltod in der Retina hat.

Beim TGF- β Signalweg handelt es sich um einen sehr vielschichtigen Signalweg, der Einfluss auf zahlreiche andere Signalwege hat.^{34, 35} Daher ist es schwierig, eine genaue Wirkung auf bestimmte Zelltypen vorauszusagen. So hat eventuell eine Beeinflussung des TGF- β Signalwegs in einem Zelltyp eine gegensätzliche Wirkung wie auf einen anderen Zelltyp, z.B. durch unterschiedliche Aktivierung anderer Signalwege oder Signalmoleküle. So zeigten Yamamura et al. (2000), dass eine Überexpression von Smad7 *in vitro* zu einer Abschwächung der TGF- β vermittelten Apoptose führt.^{28, 68}

In quantitativen real-time PCR Analysen wurde für Smad7 auf mRNA Ebene eine Abnahme des mRNA Levels auf 45% festgestellt und dadurch der konditionelle Knock-out bestätigt. Anschließend wurde der konditionelle Knock-out von Smad7 mit Hilfe von Western Blot Analysen bestätigt. Prinzipiell stellte sich die Frage, ob die Funktion von Smad7 durch Smad6 kompensiert werden kann. Auf Proteinebene wurde festgestellt, dass der verwendete Primärantikörper zusätzlich zur Smad7 Bande (46 kDa) ein weiteres Signal bei 55 kDa detektierte. Recherchen ergaben, dass dies die zu erwartende Größe für Smad6 (54 kDa) ist und zudem eine mögliche Kreuzreaktivität des Antikörpers mit Smad6 aufgrund der großen Strukturhomologie beschrieben wurde. Es kam im Western Blot zu keiner Änderung der Bandenintensität für Smad6 beim konditionellen Smad7 Knock-out. Zusätzlich wurde der relative mRNA Gehalt für Smad6

mittels quantitativer real-time PCR überprüft, wobei dieser keiner Veränderung unterlag. Daher kann davon ausgegangen werden, dass Smad6 nicht die Funktion von Smad7 durch eine Up-Regulation übernimmt. Eine Null-Antwort für quantitative real-time PCR Analysen konnte nicht erwartet werden, da es sich wie bei IV.1 beschrieben, bei den präparierten Retinae um Mischgewebe handelt.

In der Phänotyp Analyse zeigten sich keine offensichtlichen Unterschiede zwischen α -Cre; Smad7^{fl/fl} und Smad7^{+/+} Tieren. Im Bereich der inneren Körnerschicht (INL) kam es zu keiner Hyperzellularität, wie z.B. durch eine geringere Apoptose zu erwarten wäre.

In TUNEL-Analysen zeigte sich, dass es bei α -Cre; Smad7^{fl/fl} Tieren im Vergleich zu Smad7^{+/+} Tieren sowohl an d 7 als auch an d 10 zu einer geringeren Apoptose kam, die sich wiederum hauptsächlich im Bereich der inneren Körnerschicht (INL) abspielte. Dieser Befund kann so interpretiert werden, dass durch eine verstärkte Aktivierung des TGF- β Signalwegs auch neurotrophe Faktoren wie fibroblast growth factor-2 (FGF-2), ciliary neurotrophic factor (CNTF), glial cell derived neurotrophic factor (GDNF), nerv growth factor (NGF) oder NT-3 (Neurotrophin 3) besser wirken können bzw. geringere Konzentrationen von neurotrophen Faktoren nötig sind. Für ihre Wirkung benötigen sie aber den TGF- β Signalweg.^{63, 64}

Durch eine verstärkte Aktivierung des TGF- β Signalwegs ist außerdem vorstellbar, dass es zu einer verstärkten oder besseren Synapsenbildung durch Serotonin, das für seine Wirkung den TGF- β Signalweg benötigt, kommt und es zu einem gesteigerten Aus sprossen von Neuriten und/oder Längenwachstum von Axonen kommt.^{65, 66} Durch eine gute synaptische Verschaltung mit anderen retinalen Neuronen ist es für die einzelne Zelle leichter, Wachstumsreize oder auch Wachstumsfaktoren zu erhalten. Dadurch sinkt durch den niedrigeren Selektionsdruck und den besseren Lebensbedingungen auch die Apoptoserate.

Durch Inhibierung des TGF- β Signalwegs zeigten Walshe et al. 2009 die Bedeutung von TGF- β für die vaskuläre Barrierefunktion auf Ebene der Blut-Retina Schranke, dem endothelialen Überleben und der Homöostase der Mikrovaskularisation bei erwachsenen Tieren auf.²⁹ Interessant war hierbei die Beobachtung, dass die Tight-junction-Proteine zo-1 und Occludin in ihrer Konzentration unbeeinträchtigt blieben, aber in ihrer Interaktion gestört waren.²⁹ Durch Verstärkung des TGF- β Signalwegs wäre es durchaus vorstellbar, dass Interaktionen auf Proteinniveau retinaler Neurone verstärkt oder hervorgerufen werden, die ein Überleben retinaler Neurone ermöglichen, die ohne diesen Schutz nicht überleben und durch Apoptose zu Grunde gehen würden.

Ebenso wie bei der Blockierung des TGF- β Signalweg ist es bei der verstärkten Aktivierung des TGF- β Signalwegs von Interesse, auf welchem Weg die Apoptose verläuft und auf welcher Ebene bzw. durch welche Moleküle eine Inhibierung der Apoptose bei konditionellem Knock-out von Smad7 vermittelt wird.

IV.3 Ausblick

In weiteren Versuchen wird der Frage nachgegangen werden müssen, welcher Apoptoseweg durch den konditionellen Knock-out des T β RII beschritten wird, ob es bei adulten Tieren zu einer Funktionseinschränkung der Retina kommt, sich die Anzahl der Axone im Bereich des *N. opticus* verändert und in Schadensmodellen die Verletzbarkeit/Regenerationsfähigkeit der Retina durch den konditionellen Knock-out des T β RII beeinträchtigt ist. Des Weiteren sollen Versuche auf Zellkultur-Ebene durchgeführt werden, um Aussagen zum Einfluss des TGF- β Signalwegs auf die neuronale Plastizität treffen zu können.

Weiterhin wäre es wichtig zu untersuchen, ob eine verstärkte Aktivierung des TGF- β Signalwegs durch den konditionellen Knock-out von Smad7 zu einer Protektion retinaler Neurone führt. Dazu werden Untersuchungen bezüglich der Verletzbarkeit/Regenerationsfähigkeit in Schadensmodellen durchgeführt werden müssen. Zusätzlich wäre es interessant *in vitro* den Einfluss des TGF- β Signalwegs auf die Ausbildung von Synapsen und Neuriten zu untersuchen.

Bei TGF- β handelt es sich um ein Zytokin, das die vielfältigsten Funktionen im Bereich der Zellzykluskontrolle, der Regulation der frühen Entwicklung, der Differenzierung von Geweben, der Bildung von extrazellulärer Matrix, der Hämatopoiese, der Angiogenese, der Chemotaxis und weitere Funktionen in der Immunabwehr wahrnimmt.^{25, 28–30} Seine Bedeutung in der Medizin ist weitreichend und spannt einen Bogen vom kardialen Remodelling nach Herzinfarkt und bei Kardiomyopathie⁶⁹ über die Fibrosierung bei diabetischer Nephropathie⁷⁰ hin zur Pathogenese der proliferativen Vitreoretinopathie oder anderen Fibrosierungsprozessen im Auge, z.B. nach Katarakt-Operationen.⁷¹

Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass in der Pathogenese der *Retinitis (Retinopathia) pigmentosa* noch unklar ist, über welchen Weg der Apoptose es zu einem Untergang der Photorezeptorzellen kommt.¹³ Bisherige pharmakologische Versuche, den klassischen Weg der Apoptose zu inhibieren oder die Gabe neuroprotektiver Faktoren, verzögern zwar den Krankheitsfortschritt, führen aber zu keiner Heilung.^{13, 38, 72}

Bei allen neurodegenerativen Erkrankung, sei es die *Retinopathia (Retinitis) pigmentosa* oder die *Encephalitis disseminata (Multiple Sklerose)*, ist es von Interesse, ob die Gabe von neuroprotektiven Faktoren den Krankheitsverlauf verzögern oder sogar aufhalten kann.^{13, 38, 72, 73} Da neuroprotektive Faktoren aber für ihre Wirkentfaltung den TGF- β Signalweg benötigen^{63, 64}, ist es wichtig, mehr über dieses Zusammenspiel des TGF- β Signalwegs mit neuroprotektiven Faktoren zu erfahren.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal der ontogenetische Zelltod in der Retina bei Mäusen auch an älteren Tieren untersucht werden, da bei einem vollständigen Knock-out des T β RII die Tiere bereits intrauterin bzw. kurz nach Geburt an diversen Miß- oder Fehlbildungen versterben.^{29, 30, 41, 42} Dies erfolgte durch den konditionellen Knock-out des T β RII, von dem nur bestimmte Zellen der Retina betroffen sind. Zusätzlich wurde eine verstärkte Aktivierung des T β RII Signalwegs durch einen konditionellen Knock-out von Smad7 und seine Auswirkung auf den ontogenetischen Zelltod in der Retina untersucht.

Nach Bestätigung des konditionellen Knock-out für den T β RII durch immunhistochemische Färbungen, Western Blot Analysen und in TUNEL-Analysen wurde gezeigt, dass es durch das Fehlen des TGF- β Signalwegs zu einer gesteigerten Apoptose im Bereich der inneren Körnerschicht (INL) an d 4, d 7, d 10 kam. Diese TUNEL-Daten wurden durch die Detektion freier Histone (ELISA) an d 10 nochmals validiert. Auch wenn kein offensichtlicher Phänotyp bei α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tieren im Vergleich zu TGF- β -R2^{+/+} Tieren in Erscheinung trat, so war die innere Körnerschicht (INL) an d 15 nach Geburt bei α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tieren tendenziell dünner und erreichte an manchen Stellen signifikantes Niveau. Im Bereich der Außensegmente der Photorezeptoren zeigte sich bei α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} an d 15 nach Geburt auch eine Tendenz zu dünneren Außensegmenten, allerdings wurde nur an einer Stelle ein signifikantes Niveau erreicht, was auch zu erwarten war, da die Photorezeptoren kaum am ontogenetischen Zelltod teilnehmen.⁶

Der konditionelle Knock-out von Smad7 konnte in Western Blot Analysen und quantitativer real-time Analysen bestätigt werden. Der Phänotyp von α -Cre; Smad7^{f/f} Tieren wurde mit dem von Smad7^{+/+} an d 15 nach Geburt miteinander verglichen, wobei keine Unterschiede festgestellt wurden. Im Bereich der inneren Körnerschicht (INL) kam es zu keiner Hyperzellularität bei α -Cre; Smad7^{f/f} Tieren. In TUNEL-Analysen an d 7 und d 10 konnte gezeigt werden, dass es bei einem konditionellen Knock-out von Smad7 zu einer signifikant verminderter Apoptose im Bereich der inneren Körnerschicht (INL) kommt.

Entgegen der bisherigen Meinung zum ontogenetischen Zelltod in der Retina wurde herausgearbeitet, dass TGF- β einen protektiven Effekt auf die Neurone während des ontogenetischen Zelltodes in der Retina darstellt.

VI. Anhang

VI.1 Literaturverzeichnis

1. Moore, K.L. & Persaud, T.V. *Embryologie Entwicklungstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik.* (Elsevier: München, 2007).
2. Cvekl, A. & Tamm, E.R. Anterior eye development and ocular mesenchyme: new insights from mouse models and human diseases. *Bioessays* **26**, 374-386 (2004).
3. Kidson, S.H., Kume, T., Deng, K., Winfrey, V. & Hogan, B.L. The forkhead/winged-helix gene, Mf1, is necessary for the normal development of the cornea and formation of the anterior chamber in the mouse eye. *Dev. Biol* **211**, 306-322 (1999).
4. Reneker, L.W., Silversides, D.W., Xu, L. & Overbeek, P.A. Formation of corneal endothelium is essential for anterior segment development - a transgenic mouse model of anterior segment dysgenesis. *Development* **127**, 533-542 (2000).
5. Flügel-Koch, C., Ohlmann, A., Piatigorsky, J. & Tamm, E.R. Disruption of anterior segment development by TGF-beta1 overexpression in the eyes of transgenic mice. *Dev. Dyn* **225**, 111-125 (2002).
6. Young, R.W. Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J. Comp. Neurol* **229**, 362-373 (1984).
7. Cepko, C.L., Austin, C.P., Yang, X., Alexiades, M. & Ezzeddine, D. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**, 589-595 (1996).
8. Glücksmann, A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.* **26**, 59-86 (1951).
9. Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239-257 (1972).
10. Zeiss, C.J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet. Pathol* **40**, 481-495 (2003).
11. Candé, C. u. a. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* **84**, 215-222 (2002).
12. Hisatomi, T. u. a. Relocalization of apoptosis-inducing factor in photoreceptor apoptosis induced by retinal detachment in vivo. *Am. J. Pathol* **158**, 1271-1278 (2001).
13. Sancho-Pelluz, J. u. a. Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Mol. Neurobiol* **38**, 253-269 (2008).
14. Chautan, M., Chazal, G., Cecconi, F., Gruss, P. & Golstein, P. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Curr. Biol* **9**, 967-970 (1999).
15. Kühnel, W. *Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie.* (Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1950).

16. Lippert, H. *Lehrbuch Anatomie*. (Urban&Fischer: München,Jena, 1982).
17. Klinke, R., Pape, H.-C. & Silbernagl, S. *Physiologie*. (Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 1994).
18. Welsch, U. *Lehrbuch Histologie*. (Urban&Fischer: München,Jena, 2003).
19. Ohta, M., Greenberger, J.S., Anklesaria, P., Bassols, A. & Massagué, J. Two forms of transforming growth factor-beta distinguished by multipotential haematopoietic progenitor cells. *Nature* **329**, 539-541 (1987).
20. Derynck, R. u. a. A new type of transforming growth factor-beta, TGF-beta 3. *EMBO J* **7**, 3737-3743 (1988).
21. Madisen, L. u. a. Transforming growth factor-beta 2: cDNA cloning and sequence analysis. *DNA* **7**, 1-8 (1988).
22. Jakowlew, S.B., Dillard, P.J., Sporn, M.B. & Roberts, A.B. Complementary deoxyribonucleic acid cloning of a messenger ribonucleic acid encoding transforming growth factor beta 4 from chicken embryo chondrocytes. *Mol. Endocrinol* **2**, 1186-1195 (1988).
23. Kondaiah, P. u. a. Identification of a novel transforming growth factor-beta (TGF-beta 5) mRNA in Xenopus laevis. *J. Biol. Chem* **265**, 1089-1093 (1990).
24. Sporn, M.B. & Roberts, A.B. TGF-beta: problems and prospects. *Cell Regul* **1**, 875-882 (1990).
25. Böttner, M., Kriegstein, K. & Unsicker, K. The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J. Neurochem* **75**, 2227-2240 (2000).
26. Kingsley, D.M. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* **8**, 133-146 (1994).
27. McDonald, N.Q. & Hendrickson, W.A. A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* **73**, 421-424 (1993).
28. Schuster, N. & Kriegstein, K. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* **307**, 1-14 (2002).
29. Walshe, T.E. u. a. TGF-beta is required for vascular barrier function, endothelial survival and homeostasis of the adult microvasculature. *PLoS ONE* **4**, e5149 (2009).
30. Oshima, M., Oshima, H. & Taketo, M.M. TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol* **179**, 297-302 (1996).
31. Attisano, L. & Wrana, J.L. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* **296**, 1646-1647 (2002).
32. Itoh, S. & ten Dijke, P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol* **19**, 176-184 (2007).
33. Ross, S. & Hill, C.S. How the Smads regulate transcription. *Int. J. Biochem. Cell Biol* **40**, 383-408 (2008).
34. Massagué, J. TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem* **67**, 753-791 (1998).

35. Moustakas, A. & Heldin, C.-H. Non-Smad TGF-beta signals. *J. Cell. Sci* **118**, 3573-3584 (2005).
36. Cayouette, M. & Gravel, C. Adenovirus-Mediated Gene Transfer of Ciliary Neurotrophic Factor Can Prevent Photoreceptor Degeneration in the Retinal Degeneration (rd) Mouse. *Human Gene Therapy* **8**, 423-430 (1997).
37. Farrar, G.J., Kenna, P.F. & Humphries, P. On the genetics of retinitis pigmentosa and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention. *EMBO J* **21**, 857-864 (2002).
38. Hartong, D.T., Berson, E.L. & Dryja, T.P. Retinitis pigmentosa. *Lancet* **368**, 1795-1809 (2006).
39. Daiger, S.P., Bowne, S.J. & Sullivan, L.S. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* **125**, 151-158 (2007).
40. Kroeber, M. u. a. Reduced expression of Pax6 in lens and cornea of mutant mice leads to failure of chamber angle development and juvenile glaucoma. *Hum. Mol. Genet* **19**, 3332-3342 (2010).
41. Sanford, L.P. u. a. TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* **124**, 2659-2670 (1997).
42. Pepper, M.S. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* **8**, 21-43 (1997).
43. Kleiter, I. u. a. Inhibition of Smad7, a negative regulator of TGF-beta signaling, suppresses autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol* **187**, 61-73 (2007).
44. Kleiter, I. u. a. Smad7 in T cells drives T helper 1 responses in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* **133**, 1067-1081 (2010).
45. Marquardt, T. u. a. Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* **105**, 43-55 (2001).
46. Chytil, A., Magnuson, M.A., Wright, C.V.E. & Moses, H.L. Conditional inactivation of the TGF-beta type II receptor using Cre:Lox. *Genesis* **32**, 73-75 (2002).
47. Paper, W. Untersuchungen zur molekularen Funktion der Olfactomedin-Proteine Myocilin und Pancortin im Auge. (2009).
48. Laird, P.W. u. a. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* **19**, 4293 (1991).
49. Chomczynski, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* **15**, 532-534, 536-537 (1993).
50. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
51. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
52. Maniatis, T., Frisch, E. & Sambrook, J. *Molecular cloning : a laboratory manual*. (1989).

53. Ito, S. & Karnovsky, M. Formaldehyde-glutaraldehyde fixatives containing trinitrocompounds. *J Cell Bio* **39**, 168-9
54. Richardson, K.C., Jarett, L. & Finke, E.H. Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol* **35**, 313-323 (1960).
55. Yanagisawa, K. u. a. Induction of apoptosis by Smad3 and down-regulation of Smad3 expression in response to TGF-beta in human normal lung epithelial cells. *Oncogene* **17**, 1743-1747 (1998).
56. Mervin, K. & Stone, J. Developmental death of photoreceptors in the C57BL/6J mouse: association with retinal function and self-protection. *Exp. Eye Res* **75**, 703-713 (2002).
57. Dünker, N. & Krieglstein, K. Reduced programmed cell death in the retina and defects in lens and cornea of Tgfbeta2(-/-) Tgfbeta3(-/-) double-deficient mice. *Cell Tissue Res* **313**, 1-10 (2003).
58. Beier, M., Franke, A., Paunel-Görgülü, A.N., Scheerer, N. & Dünker, N. Transforming growth factor beta mediates apoptosis in the ganglion cell layer during all programmed cell death periods of the developing murine retina. *Neurosci. Res* **56**, 193-203 (2006).
59. Lei, X., Wang, L., Yang, J. & Sun, L.-Z. TGFbeta signaling supports survival and metastasis of endometrial cancer cells. *Cancer Manag Res* **2009**, 15-24 (2009).
60. Lei, X., Yang, J., Nichols, R.W. & Sun, L.-Z. Abrogation of TGFbeta signaling induces apoptosis through the modulation of MAP kinase pathways in breast cancer cells. *Exp. Cell Res* **313**, 1687-1695 (2007).
61. Dünker, N., Schuster, N. & Krieglstein, K. TGF-beta modulates programmed cell death in the retina of the developing chick embryo. *Development* **128**, 1933-1942 (2001).
62. Gold, L.I. The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog* **10**, 303-360 (1999).
63. Krieglstein, K., Strelau, J., Schober, A., Sullivan, A. & Unsicker, K. TGF-beta and the regulation of neuron survival and death. *J. Physiol. Paris* **96**, 25-30 (2002).
64. Krieglstein, K., Farkas, L. & Unsicker, K. TGF-beta regulates the survival of ciliary ganglionic neurons synergistically with ciliary neurotrophic factor and neurotrophins. *J. Neurobiol* **37**, 563-572 (1998).
65. Ishihara, A., Saito, H. & Abe, K. Transforming growth factor-beta 1 and -beta 2 promote neurite sprouting and elongation of cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res* **639**, 21-25 (1994).
66. Zhang, F., Endo, S., Cleary, L.J., Eskin, A. & Byrne, J.H. Role of transforming growth factor-beta in long-term synaptic facilitation in Aplysia. *Science* **275**, 1318-1320 (1997).
67. Rager, G. & Rager, U. Systems-matching by degeneration. I. A quantitative electron microscopic study of the generation and degeneration of retinal ganglion cells in the chicken. *Exp Brain Res* **33**, 65-78 (1978).
68. Yamamura, Y., Hua, X., Bergelson, S. & Lodish, H.F. Critical role of Smads and AP-1 complex in transforming growth factor-beta -dependent apoptosis. *J. Biol. Chem* **275**, 36295-36302 (2000).

69. Bujak, M. & Frangogiannis, N.G. The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res* **74**, 184-195 (2007).
70. Hills, C.E. & Squires, P.E. TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and therapeutic intervention in diabetic nephropathy. *Am. J. Nephrol* **31**, 68-74 (2010).
71. Saika, S. TGFbeta pathobiology in the eye. *Lab. Invest* **86**, 106-115 (2006).
72. Shintani, K., Shechtman, D.L. & Gurwood, A.S. Review and update: current treatment trends for patients with retinitis pigmentosa. *Optometry* **80**, 384-401 (2009).
73. Vana, A.C. u. a. Platelet-derived growth factor promotes repair of chronically demyelinated white matter. *J. Neuropathol. Exp. Neurol* **66**, 975-988 (2007).

VI.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wege der Apoptose, modifiziert, aus ¹⁰	S.4
Abbildung 2: Dendrogramm der TGF- β Superfamilie, aus ²⁵	S.10
Abbildung 3: Nachweis des konditionellen Knock-out von T β RII (Vergr. 40x) bzw. pSmad2/3 (Vergr. 40x) in der Retina durch immunhisto-chemische Färbung	S.43
Abbildung 4: Nachweis des konditionellen Knock-out von T β RII (A) bzw. pSmad 2/3 (B) durch SDS-PAGE und Western Blot Analysen	S.44
Abbildung 5: Phänotyp α -Cre; TGF- β -R2 ^{f/f} , d 15	S.45
Abbildung 6: Phänotyp TGF- β -R2 ^{+/+} , d 15	S.45
Abbildung 7: (A) Vermessung der Außensegmente der Photorezeptoren bei α -Cre; TGF- β -R2 ^{f/f} und TGF- β -R2 ^{+/+} (B) Vermessung der inneren Körnerschicht (INL) bei α -Cre; TGF- β -R2 ^{f/f} und TGF- β -R2 ^{+/+}	S.46
Abbildung 8: (A) Übersichtsaufnahme von α -Cre; TGF- β -R2 ^{f/f} und TGF- β -R2 ^{+/+} TUNEL Bildern, beide d 7 (Vergrößerung 5x) (B) Detailaufnahme Retina von α -Cre; TGF- β -R2 ^{f/f} und TGF- β -R2 ^{+/+} TUNEL Bildern, beide d 7 (Vergrößerung 40x)	S.48
Abbildung 9: relative Anzahl TUNEL-positiver Zellen bezogen auf mm ² Retina	S.49
Abbildung 10: relative Absorption bei 405 [nm] bei Cell death detection	S.49
Abbildung 11: Nachweis des konditionellen Knock-out von Smad7 durch Western Blot Analysen	S.50
Abbildung 12: relatives mRNA Level von Smad7 bzw. Smad6 [%]	S.51
Abbildung 13: Phänotyp α -Cre; Smad7 ^{f/f} , d 15	S.51
Abbildung 14: Phänotyp Smad7 ^{+/+} , d 15	S.52

Abbildung 15: (A) Übersichtsaufnahme von α -Cre; Smad7^{f/f} und Smad7^{+/+} TUNEL Bildern, beide d 10 (Vergrößerung 5x)
 (B) Detailaufnahme Retina von α -Cre; Smad7^{f/f} und Smad7^{+/+} TUNEL Bildern, beide d 10 (Vergrößerung 40x) S.53

Abbildung 16: relative Anzahl TUNEL-positiver Zellen bezogen auf mm²
 Retina S.54

VI.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht beteiligter Gewebe an Augenentwicklung, aus ^{1, 2}	S.1
Tabelle 2:	Schichten der Retina, aus ^{15, 16, 18}	S.7
Tabelle 3:	Reagenzienliste	S.14/15
Tabelle 4:	Enzyme	S.16
Tabelle 5:	Kits	S.16
Tabelle 6:	Verbrauchsmaterialen	S.16/17
Tabelle 7:	Geräte	S.17/18
Tabelle 8:	Puffer und Lösungen	S.18-20
Tabelle 9:	Zusammensetzung Gele für Western Blot Analysen	S.21
Tabelle 10:	Übersicht Primärantikörper	S.22
Tabelle 11:	Übersicht Sekundärantikörper	S.22
Tabelle 12:	Übersicht Genotypisierungsprimer	S.23
Tabelle 13:	Übersicht real-time PCR Primer	S.23
Tabelle 14:	Übersicht verwendete Mauslinien	S.24
Tabelle 15:	Übersicht nachgewiesene Proteine und Verwendung der spezifischen Antikörper	S.34

VI. 4 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampere
ad	zu
α	alpha oder anti
APS	Ammoniumperoxidisulfat
β	beta
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
cDNA	komplementäre DNA (complementary)
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Δ	Delta
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
fwd	vorwärts (Primer)
g	Gramm
h	Stunde
hm	human
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
IgG	Immunglobulin G
kDa	Kilodalton
L	Liter
m	milli (10^{-3}), Meter
M	molar
min	Minute
mm	Mus musculus
mRNA	messenger RNA
μ	mikro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PAGE	Polyacrylamid-Gelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction)
qPCR	quantitative PCR / real-time RT-PCR
rev	rückwärts (Primer)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur / reverse Transkription
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	tris buffered saline

TEMED	N-N-N'-N'-Tetramethylenmethylen diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
üN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
W	Watt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
∞	unendlich

VI.5 Danksagung

In diesem Abschnitt bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

An erster Stelle möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Ernst Tamm** für die Vergabe des Themas und sein Interesse, seine Diskussionsbereitschaft, seine Hilfsbereitschaft und Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Herrn Prof. Dr. Olaf Strauß danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Meiner Betreuerin **Frau Dr. Barbara Braunger** danke ich für die excellente Betreuung, die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und auch für das gute Arbeitsklima und die aufmunternden Worten nicht nur im Labor.

Herrn **Dr. Walter Paper** danke ich für die praktischen Tipps und Hilfestellung während der Arbeit im Labor.

Herrn Dr. Marcus Koch danke ich für die Hilfsbereitschaft und die kurzweiligen Stunden im Labor.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Humananatomie und Embryologie bedanken. Hier seien insbesondere die MTA's **Frau Margit Schimmel, Angelika Pach, Elke Stauber** und **Silvia Babl** genannt, die durch ihre tatkräftige Unterstützung und ihr Fachwissen zum Gelingen der Arbeit beitrugen.

Herrn Dr. Andreas Neueder danke ich für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Meinen **Eltern** und **Großeltern** danke ich für ihre großzügige Unterstützung nicht nur während der Laborzeit sondern während des gesamten Medizinstudiums und ihre oftmals ermunternden Worten. Meinen **Eltern** danke ich darüber hinaus für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Meiner Ehefrau **Veronika** danke ich für ihre Geduld und ihre Ablenkungen außerhalb des Labors, für die gemeinsamen Unternehmungen und für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

VI.7 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Straubing, 09.08.2012

Pielmeier, Stefan