

Der Einfluss des TGF- β -Signalweges auf das Überleben lichtgeschädigter Photorezeptoren



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanmedizin (Dr. med.)
der naturwissenschaftlichen Fakultät III
-Biologie und Vorklinische Medizin-
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Daniela Kawall
aus Regensburg

Regensburg, 2015

Diese Arbeit wurde angeleitet und betreut von PD Dr. Dr. Barbara M. Braunger am Lehrstuhl für Humanmedizin und Embryologie der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht im Juli 2015

Prüfungsausschuss:

1. Gutachter: PD Dr. Dr. Barbara M. Braunger
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Charlotte Wagner

I. EINLEITUNG	1
I.1. ANATOMISCHE GRUNDLAGEN DES AUGES	1
I.1.1. Äußere Augenhaut	2
I.1.2. Uvea/ Mittlere Augenhaut	2
I.1.3. Innere Augenhaut	3
I.1.4. Weitere Strukturen des Auges	5
I.1.5. Die Sehbahn	6
I.2. VISUELLE WAHRNEHMUNG - PHOTOTRANSDUKTION	7
I.3. RPE65 (RETINAL PIGMENT EPITHELIUM 65)	8
I.4. DER TGF-B-SIGNALWEG	9
I.5. CRE/LOX-SYSTEM	11
I.6. APOTOSE – DER PROGRAMMIERTE ZELLTOD	14
I.7. LICHTSCHADEN	16
I.8. RETINOPATHIEN UND DYSTROPHIEN	16
I.8.1. <i>Retinopathia pigmentosa</i>	16
I.8.2. <i>Makuladegeneration</i>	17
I.9. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	18
II. MATERIAL UND METHODEN	20
II.1. MATERIALLISTE	20
II.1.1. Reagenzienliste	20
II.1.2. Enzyme und Kits	21
II.1.2.1. Enzyme	21
II.1.2.2. Kits	21
II.1.3. Verbrauchsmaterialien und Geräte	21
II.1.3.1. Verbrauchsmaterialien	21
II.1.3.2. Geräte	22
II.1.4. Lösungen und Puffer	23
II.1.5. Oligonukleotide	24
II.2. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	25
II.2.1. Isolierung von DNA aus Mausschwanzbiopsien	25
II.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Photometer	25
II.2.3. Genotypisierung der Versuchstiere mittels PCR	26
II.2.3.1. Nachweis der Cre-Rekombinase	26

II.2.3.2. Nachweis der loxP-Sequenzen TGF- β -R2.....	27
II.2.4. Aufreinigung von DNA	29
II.2.5. Restriktionsverdau von DNA.....	30
II.2.6. Agarose-Gelelektrophorese	31
II.3. HISTOLOGISCHE TECHNIKEN	32
II.3.1. Immunfärbung.....	32
II.3.1.1. Paraffineinbettung.....	32
II.3.1.2. Herstellung von Paraffinschnitten	33
II.3.2. Immunhistologische Methode – TUNEL	33
II.3.3. Phänotyp-Analyse.....	36
II.3.3.1. Epon-Einbettung	36
II.3.3.2 Semidünnschnitte	37
II.4. TIERE UND TIERHALTUNG	38
II.5. LICHTINDUIZIERTE SCHÄDIGUNG DER PHOTOREZEPTOREN.....	38
II.6. ERG (ELEKTRORETINOGRAMM)-ANALYSE	39
II.6.1. Vorbereitung der Versuchstiere für die ERG-Untersuchung	40
II.6.2. Ablauf der ERG-Messungen.....	41
II.7. AUSWERTUNG.....	42
II.7.1. Allgemeine Auswertung	42
II.7.2. ERG-Auswertung	43
III. ERGEBNISSE	44
III.1. NACHWEIS DES KONDITIONELLEN KNOCKOUTS VON TGF- β -R2 DURCH WESTERN BLOT ANALYSE	44
III.2. BESTÄTIGUNG DER RPE65-L450-VARIATION	45
III.3. PHÄNOTYPANALYSE DER UNBELICHTETEN A-CRE;TGF- β -R2 ^{FL/FL} MÄUSE.....	47
III.3.1. Morphologie	47
III.3.2. Dickenmessung der Retina.....	48
III.3.3. ERG-Ergebnisse	51
III.4. LICHTINDUIZIERTE SCHÄDIGUNG DER PHOTOREZEPTOREN.....	55
III.4.1. Analyse der Photorezeptorzellschädigung anhand von Semidünnschnitten	56
III.4.2. Detektion phototoxierter Zellapoptose mittels TUNEL-Untersuchung	57
IV. DISKUSSION	60
V. ZUSAMMENFASSUNG	67

VI. ANHANG.....	68
VI.1. LITERATURVERZEICHNIS	68
VI.2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	75
VI.3. TABellenVERZEICHNIS	76

I. Einleitung

I.1. Anatomische Grundlagen des Auges

Das Auge ist eines der bedeutendsten Sinnesorgane in unserem Organismus. Allein die Sehsinneszellen machen 70% der Gesamtsinneszellen des Menschen aus. [12] Das Auge besteht einerseits aus dem Augapfel (*Bulbus oculi*) und andererseits den Augenanhangsgebilden (*Adnexae oculi*). Die grobe Unterteilung des Augapfels ist in Abbildung 1 dargestellt. [12] [7]

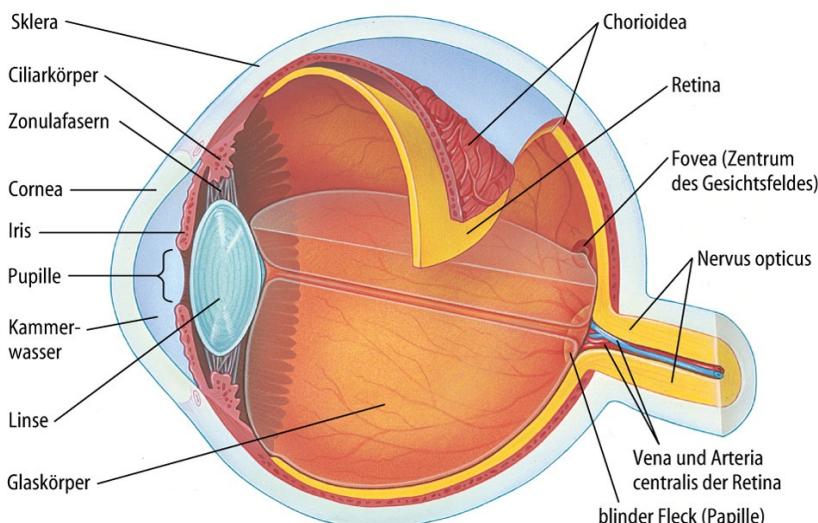


Abbildung 1: Aufbau des Wirbeltierauges

Dargestellt ist ein Längsschnitt durch den Augapfel eines Wirbeltieres. Der Augapfel ist von der Sklera umgeben, welche aus einem harten, weißen Bindegewebe besteht. Darunter befindet sich die Chorioidea. Die Retina mit den Photorezeptoren befindet sich auf der Innenseite der Chorioidea. Die Signale der retinalen Ganglienzellen werden über den *Nervus opticus* in das Gehirn weitergeleitet. Die Fovea ist die Stelle mit der höchsten Dichte an Photorezeptoren. Unter dem Begriff Uvea (*Tunica vasculosa bulbi*) fasst man klinisch die Iris, den Ziliarkörper und die Chorioidea zusammen. [7] [12]

Hierbei ist zu erkennen, dass sich der Augapfel in drei Schichten gliedert: Die äußere Augenhaut, bestehend aus Sklera und Cornea, die mittlere Haut, die sich aus Chorioidea, Ziliarkörper und Iris zusammensetzt, und die innere Augenhaut, bestehend aus der Retina. Ebenso erkennbar sind der Glaskörper und die Linse.

I.1.1. Äußere Augenhaut

Die äußere Augenhaut setzt sich aus der Sklera und der Kornea zusammen und umschließt vom Rand der Kornea bis zur *Dura mater* des *Nervus opticus* den Augapfel. Die Sklera setzt sich vorwiegend aus einer derben kollagenen Bindegewebsschicht mit einzelnen elastischen Fasern zusammen und dient mit ihrer Bindegewebsschicht den äußeren Augenmuskeln als Ansatzpunkt. [7] Histologisch lässt sich die Sklera in drei Schichten unterscheiden:

- *Lamina episcleralis*
- *Substantia propria*
- *Lamina fusca sclerae*

Bei der *Lamina episcleralis* handelt es sich um die äußere gefäßreiche Schicht mit viele Kollagenfibrillen und elastischen Fasern. Vereinzelt kommen hier Lymphozyten und Makrophagen vor. Die gefäßarme *Substantia propria* der Sklera besteht aus Kollagenfibrillen und wird durch den Augeninnendruck von ca. 15-18 mmHG gespannt. Das Hauptmerkmal der *Lamina fusca* ist die Pigmentierung dieser Schicht, hervorgerufen durch Melanozyten. Diese sehr dünne Schicht liegt der Choroidea direkt auf und geht ohne definierte Grenzen in diese über. Die Kornea ist der von Tränenflüssigkeit benetzte, vordere gewölbte Anteil der äußeren Augenhaut. In ihrer Funktion als „Fenster“ des Augapfels ist die Durchsichtigkeit unentbehrlich und über das nicht Vorhandensein von Gefäßen gewährleistet. Die Kornea wird mit Nährstoffen über Diffusion des Kammerwassers versorgt. [7] Der Beitrag zur Brechkraft der Kornea beträgt ca. 40 Dioptrien und macht 2/3 der Gesamtbrechkraft aus. [28]

I.1.2. Uvea/ Mittlere Augenhaut

Die Uvea ist die Gefäßschicht des Augapfels und ist wegen ihres hohen Melanozytengehalts dunkel gefärbt. Klinisch fasst man unter dem Begriff Uvea die Iris, den Ziliarkörper und die Choroidea zusammen. Zu ihren Funktionen gehören die

Akkomodation, die Adaption und die Versorgung der darunter liegenden Retina und Linse mit Nährstoffen über die chorioidalen Gefäße [34]. Im hinteren Bereich des Augapfels befindet sich die gefäßreiche Choroidea mit folgender Schichtung: [7]

- *Lamina suprachoroidea*
- *Lamina vasculosa*
- *Lamina choroidocapillaris*
- *Lamina basalis* (Bruch-Membran – keine Blutgefäße und Nerven)

Der Ziliarkörper wölbt sich von innen in Form eines Ringwulstes von hinten an die Linse. Am Scheitelpunkt des Ringwulstes ragen Ziliarfortsätze hervor, an denen die Zonulafasern entspringen. Diese Zonulafasern sind radiär an der Linse befestigt. Der Ziliarkörper dient der Aufhängung der Linse und ihrer Akkomodation. Außerdem ist er an der Produktion des Kammerwassers beteiligt. Für die Akkomodation kommt es zur Kontraktion des Ziliarmuskels und somit zu einer Erschlaffung der Zonulafasern. Dies hat wiederum zur Folge, dass die Linsenkrümmung zunimmt, was eine Erhöhung der Brechkraft zur Folge hat. [34] Die Iris als letzter Bestandteil der mittleren Augenhaut trennt den Bereich zwischen Kornea und Linse in die vordere und hintere Augenkammer. Die Iris ist durch ihre Pigmentierung für die individuelle Augenfarbe verantwortlich und reguliert über die Größe der Pupille den Lichteinfall in das Auge. Die Regulation der Pupillenweite erfolgt vegetativ über den *M. sphincter pupillae* und den *M. dilatator pupillae*. [7]

I.1.3. Innere Augenhaut

Die innere Augenhaut besitzt einen blinden/ lichtunempfindlichen (*Pars caeca retinae*) und einen lichtempfindlichen (*Pars optica retinae*) Anteil. Die *Pars caeca retinae* ist der blinde Bereich der Netzhaut und wird unterteilt in einen *Pars ciliaris retinae* und *Pars iridica retinae*. [7] Die *Pars optica retinae* kleidet von innen den Augapfel aus und lässt sich unterteilen in das Pigmentepithel (*Stratum pigmentosum*) und die Sinnesnervenschicht (*Stratum nervosum*) [71]. Da die *Pars optica retinae*

und die *Pars caeca retinae* abrupt ineinander übergehen, wird der Bereich des Übergangs aufgrund des gezackten Randes auch *Ora serrata* genannt. [7] Beide Schichten, *Stratum pigmentosum* und *nervosum*, liegen demnach einander auf und sind nur im Bereich der *Ora serrata* und an der *Papilla Nervi optici* miteinander verwachsen. Sie bilden an den nicht verwachsenen Strukturen eine funktionelle Einheit. Die zehn Schichten der Retina setzen sich aus den 9 Schichten der Sinnesnervenschicht und dem einschichtigen, kubischen Pigmentepithel zusammen (siehe Abb. 2). [71]

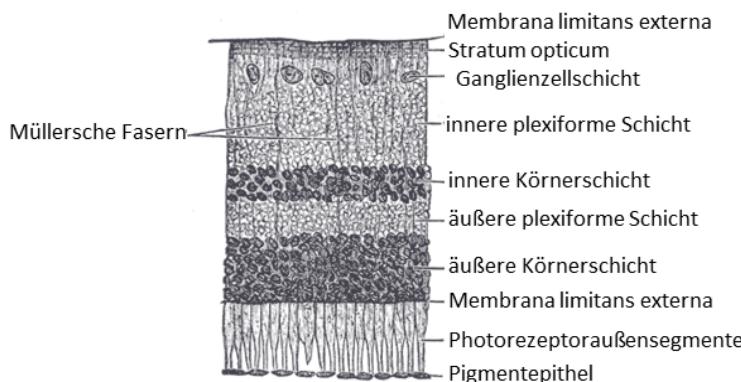


Abbildung 2: Schnitt durch die Netzhaut.

Die Netzhaut gliedert sich unter dem Mikroskop in klar trennbare Schichten abwechselnd heller (zellkernärmer) und dunkler (zellkerneicher) Färbung. Die Schichten in der Reihenfolge des Lichtweges lauten: *Membrana limitans interna*, *Stratum opticum*, Ganglienzellschicht, innere plexiforme Schicht, innere Körnerschicht, äußere plexiforme Schicht, äußere Körnerschicht, *Membrana limitans externa*, die Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren und das Pigmentepithel. Die Verarbeitung des Signals geschieht in der umgekehrten Reihenfolge. (verändert nach [22])

Dem retinalen Pigmentepithel schließen sich die Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren an. Auf diese folgt die äußere Gliagrenzschicht (*Membrana limitans externa*) und die äußere Körnerschicht, welche die Perikaryen der Photorezeptoren beinhaltet. Dieser Schicht schließen sich die äußere plexiforme Schicht, die innere Körnerschicht mit den Zellkernen der Amakrin-, Horizontal-, Bipolar- und Müllerzellen und die innere plexiforme Schicht an. Im weiteren Verlauf schließt sich die Ganglienzellschicht an, gefolgt von der Nervenfaserschicht und der inneren Gliagrenzschicht (*Membrana limitans interna*). [7] Die lichtsensiblen Zellen der Retina

sind die Zapfen und Stäbchen der Photorezeptoren. Diese Zellen wandeln eintreffendes Licht in Nervenimpulse um. Von den Photorezeptoren, welche das 1. Neuron in der Sehbahn bilden, wird das Signal zu dem 2. Neuron, den Bipolarzellen weitergeleitet. Eine laterale Signalweiterleitung erfolgt über Interneurone, die Horizontalzellen und die amakrinen Zellen. Anschließend wird das Signal zum 3. Neuron weitergeleitet, den retinalen Ganglienzellen. Die Axone der retinalen Ganglienzellen bilden den *N. opticus*, über den der Seheindruck dann weiter über die Sehbahn im Gehirn weitergeleitet wird. [34]

I.1.4. Weitere Strukturen des Auges

Weitere wichtige anatomische Strukturen des Auges sind die Linse, der Glaskörper, die vordere und die hintere Augenkammer. Die Linse liegt zwischen der Iris und dem Glaskörper. Sie ist bikonvex, in der Form einer Sammellinse, gekrümmmt. Über die Kontraktion des Ziliarmuskels und die gleichzeitige Erschlaffung der Zonulafasern kann die Krümmung der Linse reguliert werden. Diesen Vorgang nennt man Akkommodation. [34] Der Glaskörper (*Humor vitreus*) schließt sich direkt an die Hinterseite der Linse an. Dieser setzt sich zu 98 % aus Wasser und zu 2 % aus Hyaluron zusammen. Die Linse befindet sich in der hinteren Augenkammer, die zwischen der Iris und dem Glaskörper lokalisiert ist. Die vordere Augenkammer liegt demnach vor der Iris und hinter der Kornea. Hier befindet sich der Kammerwinkel mit dem Trabekelwerk, in dem der Abfluss des Kammerwassers erfolgt. [7]

I.1.5. Die Sehbahn

Die Sehbahn umfasst die neuronale Verschaltung des optischen Reizes vom Auge bis zum Gehirn. Nachdem das Licht die Strukturen wie Kornea, Linse und Glaskörper passiert hat, muss es die Retinaschichten von innen nach außen durchdringen, um auf die Photorezeptoren zu treffen. Die Perikaryen der Photorezeptoren befinden sich in der äußereren Körnerschicht und stellen das erste Neuron in der Verschaltung des Sinnesreizes dar. Die Weiterleitung des Signals muss nun von außen nach innen erfolgen. Über das erste Neuron gelangen die Reize zum zweiten Neuron (Bipolarzellen in der inneren Körnerschicht), gefolgt vom dritten Neuron, den retinalen Ganglienzellen. Diese drei Projektionsneurone befinden sich in der Retina. Von der inneren Ganglienzellschicht ziehen die Axone Richtung Papille zum *Nervus opticus*, laufen durch den *Canalis opticus* zum *Chiasma opticum*, um dann größtenteils unter Kreuzung von Fasern der nasalen Netzhautbereiche zum vierten Neuron im *Corpus geniculatum laterale* zu gelangen. Die Axone des vierten Neurons projizieren in die *Area striata* im Okzipitallappen und sind für die Sehwahrnehmung zuständig. Die restlichen Axone, die nicht zum *Corpus geniculatum laterale* ziehen, enden im *Colliculus superior*, dem *Ncl. suprachiasmaticus*, der *Area pretectalis*, den *Ncl. terminales tractus optici*, dem *Pulvinar*, den *Ncl. vestibulares* und dem *Ncl. parvocellularis*. [67]

I.2. Visuelle Wahrnehmung - Phototransduktion

Die visuelle Wahrnehmung umfasst das Auftreffen von Licht auf das Auge und die Weiterverarbeitung der Nervenimpulse im Gehirn. Der biochemische Prozess, der das Sehen ermöglicht, wird Phototransduktion genannt. Die Phototransduktion wird ausgelöst, wenn elektromagnetische Strahlung in dem Wellenlängenbereich von 400-700 nm auf die Retina trifft. [75] Die Photonen treffen auf die Retina, wo sie in den Außensegmenten der Photorezeptoren durch den Sehfarbstoff Rhodopsin absorbiert werden. Rhodopsin besteht aus Opsin und dem Chromophor 11-cis-Retinal. Opsin, der Proteinanteil des Rhodopsins, gehört zur Familie der 7 Transmembran(TM)-Rezeptoren. Die Absorption der Photonen von Rhodopsin führt zu einer Stereoisomerisation von 11-cis- nach all-trans-Retinal. Über verschiedene intermediäre Zustände, wie Prälumirrhodopsin, Lumirrhodopsin und Metarhodopsin I, entsteht Metarhodopsin II. Rhodopsin ist mit einem G-Protein gekoppelt, das für die Weiterleitung des Signals sorgt. Das mit Rhodopsin gekoppelte G-Protein bezeichnet man als Transducin. Metarhodopsin II veranlasst die α -Untereinheit des Transducins, GDP gegen GTP auszutauschen. Die darauffolgende Aktivierung der cGMP-Phosphodiesterase durch die α -Untereinheit des Transducins hat die Spaltung von cGMP zu 5'GMP zur Folge. Der sinkende cGMP-Spiegel hemmt den Kationen-Einstrom in die Zelle und es kommt zur Hyperpolarisation der ansonsten dauerpolarisierten Rezeptorzelle. Diese Hyperpolarisation führt dann zur Übertragung eines Nervenimpulses. Die Phototransduktion läuft in den Zapfen ähnlich ab, sie reagieren bei geringerer Lichtempfindlichkeit schneller auf einen Reiz. Damit dieser Prozess erneut ablaufen kann muss all-trans-Retinal in 11-cis Retinal umgewandelt werden. Dieser Regenerationsprozeß wird Sehzyklus genannt und findet in den Außensegmenten der Interphotorezeptormatrix und dem retinalen Pigmentepithel statt. Zur Verdeutlichung ist der Sehzyklus in Abbildung 3 abgebildet.

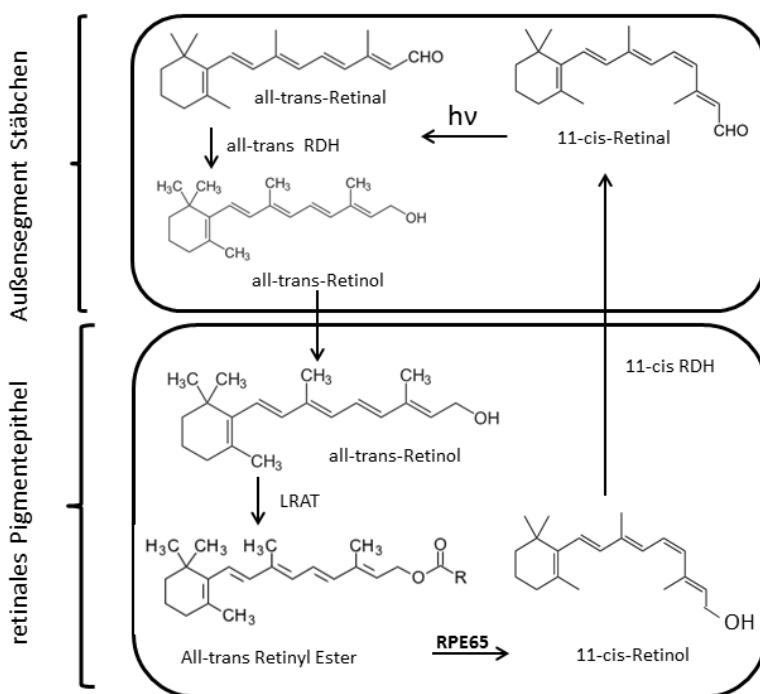


Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung des Sehzyklus.

Der Chromophoranteil des Rhodopsins, das 11-cis Retinal, macht durch die Absorption von Photonen eine Konformationsänderung zu all-trans-Retinal durch. Die Retinol Dehydrogenase (RDH) katalysiert die Reduktion von all-trans-Retinal zu all-trans-Retinol. Das All-trans-Retinol gelangt nun vom Außensegment der Stäbchen in das retinale Pigmentepithel. Dort wird es durch die Lecithin Retinol Acyltransferase verestert und es entsteht all-trans Retinylester. Mit Hilfe des Enzyms RPE65 wird das all-trans Retinylester in das 11-cis Retinol umgewandelt. Dieses wird in 11-cis Retinal oxidiert und wandert zurück in das Außensegment der Stäbchen. [42], [32]

Im Außensegment der Stäbchen wird all-trans-Retinal zu all-trans-Retinol reduziert. All-trans-Retinol wird im retinalen Pigmentepithel mithilfe des Proteins RPE65 in 11-cis-Retinol überführt. Aus 11-cis-Retinol kann sich nun wieder 11-cis-Retinal bilden und der Zyklus erneut ablaufen.

I.3. RPE65 (Retinal pigment epithelium 65)

Das Protein RPE65 ist ein 65 kDa schweres Protein und im retinalen Pigmentepithel lokalisiert. [49] Das Protein ist an der Umwandlung von all-trans-Retinol zu 11-cis Retinol beteiligt und sorgt somit dafür, dass 11-cis-Retinal für einen weiteren Durchgang durch den Sehzyklus zur Verfügung steht (siehe Abb. 3). Es gibt von diesem Protein eine genetische Variation, die zu einem erhöhten Umsatz von all-trans-Retinol führt. Bei dieser genetischen Variante (RPE65-Leu450) ist an Position

450 des Proteins die Aminosäure Methionin durch Leucin ersetzt. [58] Diese Mutation hat zur Folge, dass 11-cis-Retinal schneller wieder zur Verfügung steht und der Sehzyklus schneller und öfter durchlaufen werden kann. Tiere mit RPE65-Leu450 Mutation wurden aufgrund der erhöhten Lichtempfindlichkeit für die vorliegende Arbeit benutzt, um einen lichtinduzierten Photorezeptorschaden zu setzen.

I.4. **Der TGF- β -Signalweg**

Als Teil der TGF-Superfamilie hat der Transforming Growth Factor- β (TGF- β) viele unterschiedliche Aufgaben und ist in den unterschiedlichsten Geweben und Zellen zu finden. So ist das Protein beispielsweise an der Regulation der Embryonalentwicklung, Apoptose, Zelldifferenzierung, der Differenzierung von Gewebe, der Hämatopoiese, der Chemotaxis, der Immunabwehr und der Angiogenese beteiligt. [9, 50, 69] Zur TGF- β -Superfamilie gehören über 50 Proteine, wie zum Beispiel die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Activin, Inhibin oder Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor (GDNF). Eine Übersicht über die TGF- β -Superfamilie ist in Abbildung 4 zu sehen. [35]

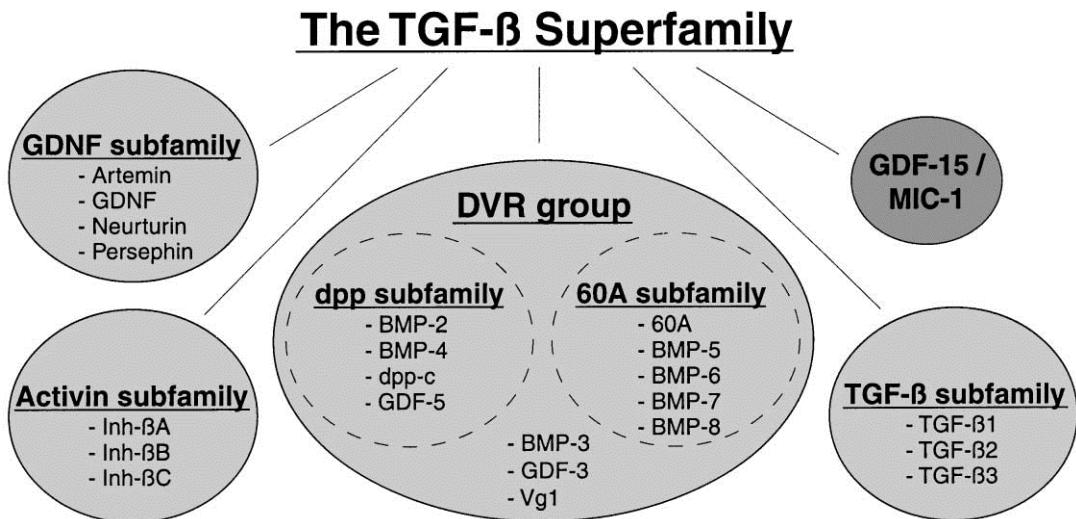


Abbildung 4: Repräsentative Mitglieder der TGF-β Superfamilie.

Die TGF-β Superfamilie untergliedert sich in Activin-, TGF-β-, GDNF (Glial cell line-derived neurotrophic factor)-Unterfamilie und die DVR (decapentaplegic-Vg-related)-Gruppe mit der dpp (decapentaplegic)- und 60A-Unterfamilie. Weitere Mitglieder sind GDF-15 (growth/differentiation factor-15)/MIC-1 (macrophage inhibitory cytokine-1). Die Untergliederung erfolgte aufgrund der Ähnlichkeiten in der Proteinsequenz. Nach [35, 66]

Bei den Mitgliedern der TGF-β-Familie handelt es sich um strukturell verwandte, dimere Proteine. Diese Proteine wirken als lokale Mediatoren über Enzymgekoppelte Rezeptoren. Die Signalübertragung von TGF-β wird über zwei Klassen der Rezeptor-Serin-Threonin-Kinasen vermittelt. Beide Typen (Typ I und Typ II) sind für die Signalübertragung notwendig. Typischerweise bindet TGF-β zuerst an den TGF-β-Rezeptor II, aktiviert diesen und rekrutiert den TGF-β-Rezeptor I unter Phosphorylierung, wobei sich ein aktiver tetramerer Rezeptorkomplex bildet (siehe Abb.5). Intrazellulär bindet an den aktivierte Typ-I-Rezeptor das Genregulatorprotein Smad 2 oder Smad 3 der Smad-Familie und wird phosphoryliert. Nach der Phosphorylierung löst sich das so aktivierte Regulatorprotein vom Rezeptor und bindet an Smad 4.

Dieser Regulatorkomplex wandert in den Zellkern und reguliert nach Anlagerung an spezifische Promotoren die Transkription bestimmter Zielgene. [4], [27]

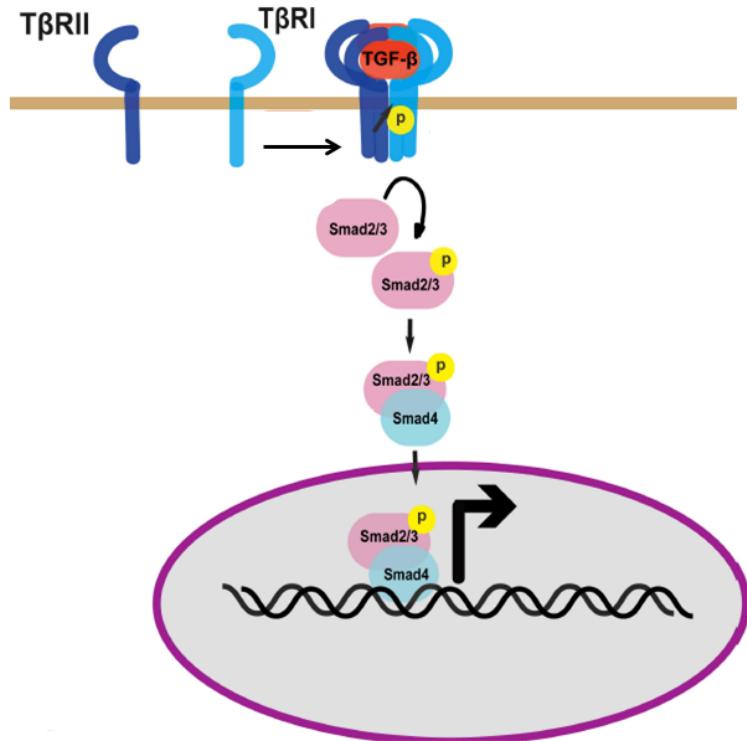


Abbildung 5: Schematische Darstellung des TGF- β Signalweges.

Die Bindung eines Liganden, in diesem Fall durch TGF- β , an den TGF- β Rezeptor II führt zur Bildung eines tetrameren Komplexes mit dem TGF- β Rezeptor I. TGF- β RII phosphoryliert und aktiviert TGF- β RI. Der TGF- β RI phosphoryliert Smad2/3, welche hierdurch aktiviert werden und mit Smad4, einem Co-Smad, einen Komplex bilden. Diese Komplexbildung ermöglicht den Eintritt in den Zellkern, wo der Smad2/3-Smad4-Komplex die Transkription von Zielgenen reguliert. Nach [30], [62]

Die Smad-Proteine können in drei Gruppen unterteilt werden. Es lassen sich rezeptorregulierte R-Smads (Smad 1, 2, 3, 5, 8), mitwirkende Co-Smads (Smad 4) und inhibitorische I-Smads (Smad 6 und 7) unterscheiden. [57]

I.5. Cre/Lox-System

Rekombination kommt in allen Organismen vor und ist ein durch spezielle Enzyme katalysierter Prozess. Hierbei werden DNA-Segmente gespalten, neu verknüpft und so die genetische Diversität und Reparaturen von Mutationen ermöglicht. Die Cre-Rekombinase ist ein 38 kDa schweres Enzym, welches erstmalig von Sauer & Henderson beschrieben wurde und aus dem Bakteriophagen P1 stammt. [60] [61]

Dieses Enzym katalysiert die Rekombination zwischen zwei Erkennungssequenzen, den sogenannten loxP-Sequenzen (engl. locus of crossover P1). [60]

Die loxP-Sequenz setzt sich zusammen aus einem 8 bp langen zentralen Hauptstück, welches von zwei palindromischen Sequenzen flankiert wird. Die Sequenz des 8 bp langen Hauptstückes lautet 5'-gcatacat-3', die der beiden Flankenstücke jeweils 5'-ataacttcgtata-3'. [47] Die loxP-Sequenzen können in der DNA unterschiedlich orientiert sein. Von dieser Orientierung der loxP-Sequenzen hängt das Ergebnis der Rekombination ab (Abb. 6). Haben beide loxP-Sequenzen die gleiche Orientierung, schneidet die Cre-Rekombinase den Genbereich zwischen den beiden flankierenden loxP-Sequenzen heraus und lässt dabei eine loxP-Sequenz im Genom zurück (sog. Exzision, siehe Abb. 6D).

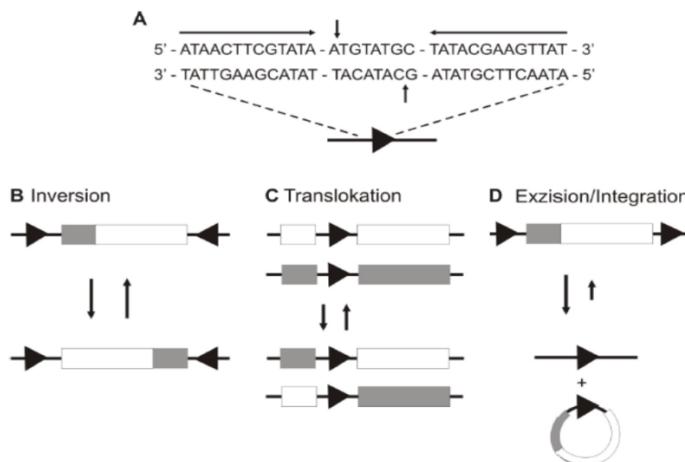


Abbildung 6: Das Ergebnis der Cre-lox-Rekombination ist durch die Orientierung und Position der flankierenden loxP-Sequenzen festgelegt.

(A) Darstellung der loxP-Sequenz. Die waagerechten Pfeile markieren die palindromische Sequenz und die senkrechten Pfeile kennzeichnen die Stellen, an denen die Cre-Rekombinase schneidet. (B) Wenn die loxP-Sequenzen in entgegengesetzten Richtungen orientiert sind, dann bewirkt die Cre-vermittelte Rekombination eine Inversion des geflochtenen Bereichs. (C) Befinden sich die loxP-Sequenzen auf unterschiedlichen Chromosomen, kommt es zu einer chromosomal Translokation. (D) Wenn die loxP-Sequenzen in derselben Richtung auf dem gleichen chromosomal Segment orientiert sind, kommt es zu einer Exzision des geflochtenen Abschnitts. Bei der Exzision eines Genabschnitts verbleibt eine loxP-Sequenz in der DNA. Der herausgeschnittene DNA Abschnitt liegt zirkulär vor und wird in der Zelle abgebaut.

(verändert nach [2] [64])

Diese Funktionsweise der Rekombinase macht man sich bei der Generierung gewebespezifischer Knockout-Mäuse zunutze.

Die Cre/loxP-Gendeletion erhält man, indem man zwei unterschiedliche Mauslinien miteinander verpaart (Abb. 7).

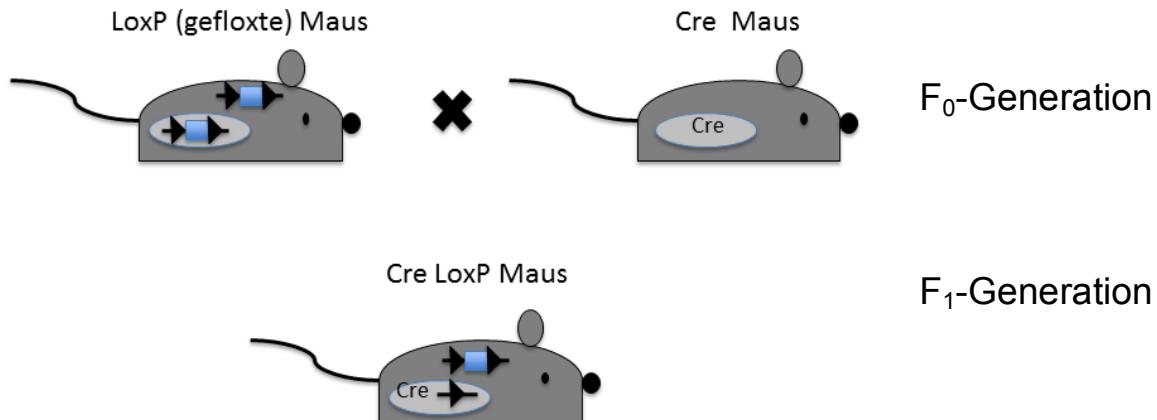


Abbildung 7: Gewebespezifische Cre-lox Rekombination.

In der F_0 -Generation wird eine Maus, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors exprimiert, mit einer Maus verkreuzt, bei welcher das Gen, das ausgeschaltet werden soll, gefloxt ist. Bei den Nachkommen dieser beiden Elterntiere kommt es zu einer gewebespezifischen Deletion des geflochtenen Genabschnitts. Steht die Expression der Cre-Rekombinase zum Beispiel unter der Kontrolle eines Augen-spezifischen Promotors, wird das geflochte Gen nur im Auge ausgeschnitten und somit dort nicht mehr exprimiert. [47] [40]

Dabei trägt eine Mauslinie den loxP-flankierten Genabschnitt, während die andere Mauslinie Cre selektiv in dem zu untersuchenden Gewebe exprimiert. [40] [47] Die selektive Expression der Cre-Rekombinase steht unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Versuchstieren stand Cre unter der Kontrolle des retinaspezifischen α -Enhancers des Pax6 Promoters, der bereits embryonal im Auge exprimiert wird und in retinalen Neuronen und Müllerzellen exprimiert wird. [70] Nach der Verpaarung Cre-exprimierender Mäuse mit geflochtenen Mäusen erhält man in der Nachkommenschaft, durch Exzision des markierten Genabschnitts, den Gen-Knockout in den Zellen, welche die Cre-Rekombinase exprimieren. Im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit tragen die Versuchsmäuse ($TGF-\beta-R2^{fl/fl}$) die loxP-Sequenzen beidseits homozygot am Exon 2 des $TGF-\beta-R2$ -Gens. [14]

I.6. Apoptose – der programmierte Zelltod

Wie unter Punkt I.3 beschrieben, kann der TGF- β -Signalweg dazu führen, dass in der Zelle Apoptose ausgelöst wird. Unter dem Begriff Apoptose versteht man den durch kontrollierte Genexpression induzierten Zelltod. Dabei kann es sich um pathologisch veränderte Zellen, aber auch um physiologisch gesunde Zellen handeln, die dem programmierten Zelltod unterliegen. [56] Nicht zu verwechseln ist der programmierte Zelltod mit einem nekrotischen Zugrundegehen einer Zelle. Bei der Nekrose liegt eine akute Entzündung in der Zelle vor, die dazu führt, dass die Zelle anschwillt, platzt und so zerstört wird. Bei der Apoptose geht die Zelle zwar auch zugrunde, es kommt aber zu keiner nekrotischen Entzündungsreaktion. Die apoptotische Zelle schrumpft und verdichtet sich, schüttet ihren zytoplasmatischen Inhalt aber nicht in ihre Umgebung aus, sondern wird über Makrophagen phagozytiert. Auf diese Weise führt der apoptotische Vorgang zu keiner Ausbreitung einer Entzündungsreaktion, da das Immunsystem nicht von der sterbenden Zelle aktiviert wird. [71] Ein Beispiel für Apoptose tritt bei der Metamorphose von der Kaulquappe zum Frosch auf, bei der die Kaulquappe in der Entwicklung zum Frosch über Apoptose ihren Schwanz verliert. [4]

Apoptose wird durch proteolytische Enzyme, die sog. Caspase, vermittelt. Caspase lösen den kontrollierten Zelltod aus, indem sie bestimmte Proteine im Zytoplasma und im Zellkern spalten. In allen Zellen liegen die Caspase als inaktive Vorläufer vor, die durch Spaltung anderer Caspase aktiviert werden. Hierbei entsteht eine proteolytische Caspase-Kaskade. Der Aktivierungsvorgang wird entweder durch extrazelluläre oder durch intrazelluläre Signale eingeleitet.

Vorneweg lässt sich Apoptose in eine Initiations- und Effektorphase einteilen. In der Initiationsphase unterscheidet man den extrinsischen vom intrinsischen Weg, die beide in die gemeinsame Effektorphase münden und die gleichen Caspase aktivieren. [56] Bei der extrinsisch induzierten Apoptose erfolgt die Aktivierung der Caspase durch ligandenabhängige Bindung an einen transmembranen Rezeptor wie zum Beispiel den Fas/CD95- oder TNF α -Rezeptor. Die Aktivierung solcher Todesrezeptoren mündet in der Spaltung der Procaspsase 8 in Caspase 8. Die aktive

Caspase 8 löst ihrerseits die Caspase-Kaskade aus, wodurch in einer signalverstärkenden Rückkopplung weitere Caspase-8-Moleküle aktiviert werden. [4] Bei dem intrinsischen Weg wird die Apoptose durch eine Permeabilitätserhöhung der Mitochondrienmembran für Cytochrom c ermöglicht. Für diesen Vorgang wird die Aktivierung eines Todesrezeptors zur Einleitung der Apoptose nicht benötigt. Die genauen Mechanismen, die zur Freisetzung von Cytochrom c führen, sind noch nicht vollständig bekannt. Cytochrom c bindet im Zytosol an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) und bewirkt damit eine Konformationsänderung von Apaf-1. Hierdurch wird die Caspase-Rekrutierungs-Domäne (CARD) von Apaf-1 für die Procaspsase-9 zugänglich, was zur Aktivierung der Caspase-9 führt. Die aktive Caspase-9 initiiert dann die Caspase-Kaskade analog zur Caspase-8 im extrinsisch induzierten Apoptoseweg. [56] Neben den beiden beschriebenen Wegen kann über den sog. stressinduzierten Weg Apoptose eingeleitet werden. Hierbei erfolgt die Apoptose über das endoplasmatische Retikulum. Ausschlaggebend hierfür sind beispielsweise deregulierte Entleerung der Ca^{2+} -Speicher des endoplasmatischen Retikulums, Glukosemangel oder falsch gefaltete Proteine. Dieser Weg aktiviert über die Caspasen 12 und 9 den Apoptoseprozess. [78]

Daneben kann noch zusätzlich über den Apoptose-induzierende-Faktor (AIF) Caspase-unabhängig Apoptose eingeleitet werden. AIF ist eine konservierte Oxidoreduktase, die im Membranzwischenraum der Mitochondrien lokalisiert ist. [41] Es spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von oxidativen Prozessen. Bei Anwesenheit von bestimmten Apoptose auslösenden Stimuli wird AIF aus den Mitochondrien freigesetzt und verlagert sich in den Zellkern. Es wird angenommen, dass AIF im Kern Endonukleasen aktiviert oder rekrutiert, so dass die DNA kondensiert wird und in 50 kb große Fragmente gespalten wird. [41], [29] Über diesen Signalweg kann die Apoptose in den Photorezeptoren stattfinden. [29], [59] Alle oben genannten Möglichkeiten der Initiationsphase der Apoptose führen zur Effektorphase. Die Effektorcaspasen (Caspase 3,6 und 7) vermitteln den apoptotischen Tod der Zelle. Diese Caspasen bewirken den Abbau der Kernlamina und von Teilen des Zytoskeletts. Weiterhin werden DNasen aktiviert, die zur Spaltung der genomischen DNA führen. Die Zelle schnürt sich in kleinen Vesikeln ab, welche durch Phagozyten aufgenommen werden.

I.7. Lichtschaden

In der vorliegenden Arbeit wurden Lichtschadensversuche zur experimentellen Induktion von Photorezeptorapoptose durchgeführt. Lichtschadensversuche sind seit jeher fester Bestandteil augenärztlicher Forschung und wurden zum ersten Mal von Noell WK et al. beschrieben. [48] So konnte beispielsweise in klinischen Studien nachgewiesen werden, dass sich der klinische Verlauf der Erkrankung *Retinopathia pigmentosa* durch Sonnenlichtexposition verschlechtert. [55]

I.8. Retinopathien und Dystrophien

Nachdem im vorausgegangenen Abschnitt der Prozess der Apoptose beschrieben wurde, werden im Folgenden zwei retinale Erkrankungen erläutert, bei denen die Apoptose von Photorezeptoren eine zentrale Rolle in der Pathogenese spielt. Die Entstehung dieser retinalen Erkrankungen basiert auf spontanen Mutationen und genetischer Disposition der betroffenen Patienten.

I.8.1. Retinopathia pigmentosa

Mit einer Prävalenz von 1:5000 ist diese Erkrankung kein seltenes Krankheitsbild. [6] Bei der *Retinopathia pigmentosa* handelt es sich nicht, wie die veraltete Bezeichnung vermuten lässt, um eine entzündliche Krankheit. Die Erkrankung ist durch einen langsam voranschreitenden Verlauf gekennzeichnet, der sich bereits im Jugend- bzw. im mittleren Lebensalter manifestieren kann. [19] Der Verlauf der Erkrankung vollzieht sich im Regelfall von der Peripherie bis zur Makula. Hierbei führt das Absterben der Stäbchen in der Peripherie zu Nachtblindheit und progredienten Gesichtsfeldausfällen. Im vorangeschrittenen Verlauf der Erkrankung sind auch die Zapfen von der Krankheit betroffen und sterben ab. Für den Patienten kommt es dann zusätzlich zu Farbsinnesstörungen und Visusverlust. Im Endstadium kann es zu einem sich weiter verengenden Tunnelblick und schließlich zur vollständigen Erblindung kommen. [25] Typische klinische Zeichen in der Fundusuntersuchung

sind Verengung der retinalen Gefäße, abgeblasste Papille, Knochenkörperchen und fleckige Alterationen des retinalen Pigmentepithels. [4]

Die einzelnen Verlaufsstadien sind zur Verdeutlichung in Abbildung 8 dargestellt.



Abbildung 8: Netzhaut von Patienten mit Retinopathia pigmentosa.

(A) Frühes Stadium. (B) Mittleres Stadium. Pigmentablagerungen und retinale Atrophie sind am äußeren Rand sichtbar. Die retinalen Blutgefäße sind verengt. (C) Endstadium. Pigmentablagerungen sind über die gesamte Retina verteilt sichtbar. Die retinalen Blutgefäße sind sehr dünn und die Papille ist blass. (verändert nach Hamel) [25]

Derzeit gibt es keinen kurativen Heilungsansatz, der das Voranschreiten der Krankheit verhindert oder die Sehkraft im Endstadium wiederherstellt. Es besteht aber die Möglichkeit den Erkrankungsprozess zu verlangsamen und die Komplikationen der Krankheit zu behandeln. Bei einigen Arten der *Retinopathia pigmentosa* ist durch klinische Studien nachgewiesen worden, dass sich der Krankheitsverlauf durch Sonnenlichtexposition verschlechtert. [55] Generell wird Patienten mit fortgeschrittener *R. pigmentosa* geraten dunkle Sonnengläser zu tragen. Ebenso wird eine Nahrungsergänzung durch Vitamin A und E diskutiert, die sich positiv durch anti-oxidative Effekte auf die Retinazellen auswirken sollen. [26]

I.8.2. Makuladegeneration

Die *Macula lutea* (gelbe Fleck) ist der Bereich der menschlichen Retina, in der sich die höchste Dichte an Sehsinneszellen ausmachen lässt. Anatomisch befindet sich der gelbe Fleck zentral auf der Retina, temporal von der Papille gelegen. Im Zentrum des gelben Fleckes befindet sich die *Fovea centralis*, in der ausschließlich Zapfen, zuständig für die Farbwahrnehmung, lokalisiert sind. Im äußeren Makulabereich befinden sich zusätzlich Stäbchen, die für das skotopische Nacht- und

Dämmerungssehen verantwortlich sind. Kommt es im Bereich des gelben Flecks zu degenerativen Prozessen, die die Funktionseinschränkung bzw. den –verlust einschließen, fasst man diese Prozesse unter dem Begriff der Makuladegeneration zusammen. Man unterscheidet bei der Makuladegeneration eine seltene juvenile Degeneration, meist hereditär erworben, von der senilen Degenerationsform unterschiedlicher Genese. Ausgangspunkt der Krankheit ist ein Defekt des retinalen Pigmentepithels, welcher vermutlich durch Bluthochdruck, Rauchen oder genetischer Disposition ausgelöst werden kann. Ebenso kann Myopie Dystrophien im Pigmentepithel und der Bruchmembran verursachen. Auch lichtinduzierter Stress wird als Ursache für Degenerationen im retinalen Pigmentepithel angesehen. [33] Diese Defekte entstehen durch vermehrte Ansammlung und Ablagerung, den sog. Drusen im Retinalem Pigmentepithel (RPE), die zum Absterben der Pigmentepithelzellen führen. [45] Die Bruch-Membran als gefäß- und nervenloser Anteil der Choroidea liegt direkt unter dem RPE und stellt zusammen mit den Basalmembranen von *Lamina choroidocapillaris* und dem Pigmentepithel die physiologische Blut-Retinaschranke dar. [7] Durch die degenerativen Prozesse im Bereich des RPEs und Bruch-Membran kommt es zu einer Störung der Blut-Retinaschranke und im Weiteren zu choroidalen Neovaskularisationen in die Retina mit darauffolgender Anhebung der Retina. [45]

I.9. Zielsetzung der Arbeit

In vorangegangenen Arbeiten wurden mittels Cre-LoxP System Mäuse mit einer konditionellen Deletion des TGF- β -Rezeptors II in retinalen Neuronen und Müllerzellen generiert. In der vorliegenden Arbeit wird zunächst der retinale Phänotyp mithilfe von Semidünnsschnitten beurteilt und zur genaueren Charakterisierung Dickenmessungen der Retina von wildtypischen Geschwistermäusen und Mäusen mit einer konditionellen Deletion des TGF-beta Rezeptor II durchgeführt. Die retinale Funktion wird durch Elektroretinogram (ERG)-Untersuchungen bestimmt. Anschließend soll geklärt werden, ob sich die Mäuse im RPE65 Leu450-Genhintergrund befinden. Dann werden Lichtschadensexperimente

durchgeführt und analysiert, ob die Deletion des TGF- β -R2 in retinalen Neuronen und Müllerzellen einen Einfluß auf die lichtschadeninduzierte Apoptoserate und Degeneration der Photorezeptoren hat. Um die Photorezeptordegeneration zu quantifizieren wird mithilfe von Semidünnschnitten die verbleibende Photorezeptorschichtdicke der Wildtypen und Mäusen mit einer konditionellen Deletion des TGF- β -Rezeptors II nach Lichtschaden miteinander verglichen und Spiderdiagramme hergestellt.. Apoptotische Vorgänge werden mittels TUNEL-Färbungen sichtbar gemacht und durch Zellzählung der apoptotischen Zellen quantifiziert.

II. Material und Methoden

II.1. Materialliste

II.1.1. Reagenzienliste

100bp Plus DNA Ladder GeneRulerTM	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
10x NH4 Reaction Puffer Bioline	Bioline GmbH, Luckenwalde
10x Q-Puffer	Qiagen, Hilden
1x PBS	Invitrogen, Karlsruhe
dNTPs (10mM)	Qiagen, Hilden
H2O Rotisolv (Rnase-frei)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
HCl (1N)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Isopropanol	Merck KgaA, Darmstadt
MgCl2 (25mM)	Qiagen, Hilden
NaCl (0,85%)	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Paraffin Paraplast Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen
PFA (4%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris/HCl	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Xylol	Merck KgaA, Darmstadt
Mydriaticum Stulln;	Pharma Stulln, Stulln, Germany

Tabelle 1: Reagenzienliste

II.1.2. Enzyme und Kits**II.1.2.1. Enzyme**

BioTaq TM DNA Polymerase	Bioline GmbH, Luckenwalde
Proteinase K	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Taq Polymerase	Eigenproduktion
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs

Tabelle 2: Enzyme**II.1.2.2. Kits**

DeadEnd TM Fluorometric TUNEL System	Promega, Madison, Wisconsin, USA
---	----------------------------------

Tabelle 3: Kits**II.1.3. Verbrauchsmaterialien und Geräte****II.1.3.1. Verbrauchsmaterialien**

“Falcon” Reaktionsgefäß 15ml	Sarstedt, Nümbrecht
Deckgläser, 18x18mm	Menzel – Gläser, Braunschweig
Deckgläser, 24x40mm	Menzel – Gläser, Braunschweig
Deckgläser, 24x50mm	Menzel – Gläser, Braunschweig
Einmalspritze 1 ml	Henry Schein Inc., Melville, New York, USA

Glaswaren	Schott AG, Mainz/ Karlsruhe/ International GmbH, Darmstadt	Carl Roth VWR
Liquid Blocker PAP-Pen		SCI Science Services, München
Multi-Reaktionsgefäße 0,2ml, 1,5ml, 2,0ml	Sarstedt, Nümbrecht	
Pasteurpipetten		VWR International GmbH, Darmstadt
Personna Rasierklingen		Electron Microscopy Sciences, Hatfield, England
Pipettenspitzen 20µl, 200µl, 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht	
rotiprotect Latex Handschuhe	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe	
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht	
SuperFrost®Plus Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig	

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

II.1.3.2. Geräte

Elektrophorese Netzgerät E835	Consort, Turnhout, Belgien
Gewebeeinbettungsautomat Leica EM TP	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Gewebeinfiltrationsautomat Microm HMP 110	Microm International, Walldorf
IDA Gel Documentation System	raytest GmbH, Straubenhardt
Inolab pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim
Kern Präzisionswaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Mastercycler gradient/ -personal	Eppendorf, Hamburg
Mettler AE 163 Feinwaage	Mettler Toledo, Gießen
Mikropipetten "pipetman"	Gilson Inc., Middleton, USA
Mikroskop Axio Imager Z1	Zeiss, Göttingen
Mikrotom Reichert Jung Supercut 2050	Cambridge Instruments GmbH, Nussloch

RETI-Port	RolandConsult, Brandenburg, Germany		
Ganzfeld QC450 SCX	Roland Consult, Brandenburg, Germany		
MilliQ Plus PF Reinwasseranlage	Millipore Corporation, Billerica, USA		
Paraffin Ausgießstation MPS/P2	SLEE Medical GmbH, Mainz		
PerfectBlue Gelsystem Mini L	PEQLAB	Biotechnologie	GmbH, Erlangen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg		
Ultramikrotom Reichert Jung Ultracut E	Cambridge Instruments GmbH, Nussloch		
UV-Vis Spectrophotometer NanoDrop 2000c	Thermo Fischer	Scientific	GmbH, Schwerte
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., New York, USA		

Tabelle 5: Geräte

II.1.4. Lösungen und Puffer

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
0,85% NaCl	0,85 % (w/v) in dH ₂ O, autoklavieren
1x TBE-Puffer	9 l H ₂ O bidest. 1 l 10x TBE-Puffer
5% Blottolösung	Sucofin Magermilchpulver in 0,1 M Phosphatpuffer
6x Orange Loading Dye	7,5g Ficoll400 wenig Orange G dye auf 50ml auffüllen mit dH ₂ O
Epon-Stammlösung	45 g Glycid Ether 30g DDSA Härter 20 g MNA Härter 1,5 g DMP-30 Beschleuniger

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
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
PFA-Lösung (4%)	4% Paraformaldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4
Richardson Färbelösung	1% Azur II 1% Methylenblau dH ₂ O
Tris-HCl, 0,05 M, pH 7,3 - 7,4	24 g Tris in dH ₂ O lösen; pH einstellen mit HCl; auf 0,05 M verdünnen mit dH ₂ O

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

II.1.5. Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Verwendung
α-Cre fwd	5'-atgcttctgtccgttgccg-3'	Genotypisierungs-PCR
α-Cre rev	5'-cctgtttgcacgttcacg-3'	Genotypisierungs-PCR

TGF- β -R2 fwd	5'-gcaggcatcaggaccaggatcc-3'	Genotypisierungs-PCR
TGF- β -R2 rev	5'-agagtgaagccgtggtaggtgagcttgg-3'	Genotypisierungs-PCR
MWOI fwd	5'-cactgtggctctgctatcttc-3'	Genotypisierungs-PCR
MWOI rev	5'-ggtgcagttccacttcagtt-3'	Genotypisierungs-PCR

Tabelle 7: Oligonukleotide

II.2. Molekularbiologische Methoden

II.2.1. Isolierung von DNA aus Mausschwanzbiopsien

Genomische DNA für den Einsatz in der Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde nach Mullis K., et al. aus Mausschwanzbiopsien gewonnen. [46] Die etwa 5 mm lange Biopsie des Mausschwanzes wurde dazu in ein Gemisch von 190 μ l Mausschwanzlysebuffer und 10 μ l Proteinase K überführt. Der Ansatz wurde über Nacht im Thermomixer unter Schütteln (1200 rpm) inkubiert. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte am nächsten Tag für 15 min bei 95°C ebenfalls im Thermomixer unter Schütteln. Die Proben wurden dann bei maximaler Geschwindigkeit (14000 rpm) für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und nach geeigneter Verdünnung in die PCR eingesetzt.

II.2.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels Photometer

Die Konzentration der doppelsträngigen DNA wurde photometrisch durch die Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Auskunft über die Reinheit gab dabei der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm. Bei einer Wellenlänge von 280 nm liegt das Absorptionsmaximum von gelösten Proteinen. Bei einem Ergebnis $A_{260/280} \geq 1,8$ wurde die isolierte DNA in nachfolgenden Experimenten weiterverwendet, da die Probe nur geringfügig durch Proteine kontaminiert war.

II.2.3. Genotypisierung der Versuchstiere mittels PCR

Die PCR (Polymerasekettenreaktion) dient der Amplifizierung kleinsten Mengen spezifischer DNA-Fragmente. Der zu amplifizierende Bereich wird durch Verwendung von Oligonukleotidprimern definiert, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden. Voraussetzung dafür ist die Kenntnis der flankierenden Nukleotidsequenzen des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts. Der Einsatz einer thermostabilen DNA-Polymerase erlaubt die exponentielle Vermehrung der DNA im PCR-Thermocycler. Als Template wurde, wie unter Abschnitt II.2.1. beschrieben, die isolierte genomische DNA aus Mausschwanzbiopsien verwendet. Nach thermischer Denaturierung der doppelsträngigen Ausgangs-DNA (95°C) paaren unter Hybridisierungsbedingungen (60°C) die Primer an die komplementären Sequenzen. Die DNA-Polymerase synthetisiert die restliche komplementäre Sequenz an die 3'-Hydroxylgruppen des Primers. Die entstandenen PCR Produkte werden bei 95°C denaturiert, bevor ein neuer Amplifikationszyklus mit der Hybridisierung von Oligonukleotidprimern und DNA-Strang-Synthese beginnt. Dieser Prozess wurde dreißig- bis fünfunddreißigmal wiederholt und führte zur exponentiellen Vermehrung der Ausgangs-DNA. [46] PCR-Ansätze wurden in 200 µl Reaktionsgefäß auf Eis angesetzt, wobei ein Standardansatz ein Reaktionsvolumen von 25 µl umfasste. Je nach dem Ergebnis der Photometrie wurden die DNA-Proben verdünnt und jeweils etwa 40 ng DNA in die PCR eingesetzt.

II.2.3.1. Nachweis der Cre-Rekombinase

Zur Unterscheidung zwischen Wildtypen und konditionellen Knockout Mäusen wurde eine PCR durchgeführt, bei welcher der für die Cre-Rekombinase kodierende Genbereich amplifiziert wurde. Es wurde folgender Mastermix und das dazugehörige PCR-Programm verwendet.

Mastermix Cre	Gesamtvolumen 25µl
10x Q-Puffer	2,5µl
α-Cre Primer fwd	0,5µl
α-Cre Primer rev	0,5µl
dNTPs (10mM)	0,5µl
MgCl ₂ (25mM)	0,7µl
H ₂ O	17,8µl
Taq (Eigenproduktion)	0,5µl
DNA (verdünnt)	2,0µl

Tabelle 8: Mastermix Cre-PCR für einen Ansatz

Die Proben wurden anschließend gevortext, abzentrifugiert und nach dem folgenden PCR-Programm behandelt.

	Schritt	Temperatur	Zeit	
1	Denaturierung	96°C	2 min	
2	Denaturierung	94°C	30 sec	
3	Annealing	59°C	30 sec	
4	Extension	72°C	1 min	
5	Extension	72°C	2 min	
6	Aufbewahrung	10°C	∞	

Tabelle 9: Mastermix Cre-PCR für einen Ansatz

II.2.3.2. Nachweis der loxP-Sequenzen TGF-β-R2

Es wurden Polymeraseketten-Reaktionen durchgeführt, um nachzuweisen, dass der Gen-Bereich, welcher für den TGF-β Rezeptor 2 kodiert, auf beiden Seiten mit loxP-Sequenzen flankiert ist. Das Vorgehen sowie die verwendeten Geräte entsprachen

denen bei der Cre-PCR (siehe II.2.3.1.). Im Folgenden ist ein Gesamtansatz für den Mastermix aufgeführt.

Mastermix TGF- β -R2	Gesamtvolumen 25 μ l
10x Puffer Bioline	2,5 μ l
TGF- β -R2 Primer fwd	0,5 μ l
TGF- β -R2 Primer rev	0,5 μ l
dNTPs (10mM)	0,5 μ l
MgCl ₂ (25mM)	1,2 μ l
H ₂ O	17,5 μ l
Taq (Bioline)	0,3 μ l
DNA (verdünnt)	2,0 μ l

Tabelle 10: Mastermix TGF- β -R2 PCR für einen Ansatz

Das sich anschließende PCR-Programm für Mäuse mit TGF- β -R2-Genhintergrund lautet wie folgt.

	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	95°C	3 min
2	Denaturierung	95°C	30 sec
3	Annealing	61°C	45 sec
4	Extension	72°C	1 min
5	Extension	72°C	5 min
6	Aufbewahrung	10°C	∞

Tabelle 11: PCR-Programm TGF- β -R2

II.2.3.3. Nachweis der RPE65 Leucin450Methionin-Variante**II.2.4. Aufreinigung von DNA**

Für die Leucin-Methionin Analysen wurde die DNA nach der Mausschwanzbiopsie mit dem Aufreinigungskit der Firma Biosell isoliert.

Polymeraseketten-Reaktionen wurden vorgenommen, um die Versuchstiere auf den für die Schadensversuche notwendigen RPE65-Leucin450Methionin-Genvariationshintergrund zu testen. Der Gesamtansatz setzt sich wie folgt zusammen (Tabelle 12).

Mastermix TGF- β -R2	Gesamtvolumen 48 μ l
10x Puffer Bioline	5,0 μ l
RPE65 – Leu450Met Primer fwd MWO	2,0 μ l
RPE65 – Leu450Met Primer rev MWO	2,0 μ l
dNTPs (10mM)	2,0 μ l
MgCl ₂ (25mM)	3,0 μ l
H ₂ O	29,0 μ l
Taq (Bioline)	1,0 μ l
DNA (verdünnt)	4,0 μ l

Tabelle 12: Mastermix RPE65 - LEU450Met PCR für einen Ansatz

Das PCR-Protokoll ist Tabelle 13 zu entnehmen.

	Schritt	Temperatur	Zeit	
1	Denaturierung	94°C	2 min	
2	Denaturierung	94°C	30 sec	
3	Annealing	55°C	45 sec	34 Wdh.
4	Extension	72°C	1 min	
5	Extension	72°C	10 min	
6	Aufbewahrung	10°C	∞	

Tabelle 13: PCR-Programm zum Nachweis der RPE65–Leu450Met Variante.

II.2.5. Restriktionsverdau von DNA

Beim Restriktionsverdau kommen sogenannte Restriktionsendonukleasen zum Einsatz. Diese Enzyme werden aus verschiedenen prokaryotischen Systemen gewonnen. In der Molekularbiologie nutzt man Restriktionsendonukleasen, die nur spezifische, in den meisten Fällen palindromische DNA-Sequenzen erkennen und die Phosphodiesterbindungen an diesen Stellen spalten. Alle Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Restriktionspuffer wurden von der Firma NEB bezogen. Die Restriktionshydrolysen wurden gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei sich die Bedingungen je nach verwendetem Enzym in Temperatur, Puffer und Inkubationszeit unterschieden.

Folgender Standard-Restriktionsansatz wurde verwendet:

1	PCR-Produkt	12 µl
2	H2O	5,7 µl
3	MWO I	0,3 µl
4	NEB Puffer 3	2

Tabelle 14: Standard-Restriktionsansatz RPE65–Leu450Met Variante

II.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld in einem Agarosegel aufgetrennt. DNA-Moleküle bewegen sich aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste in Richtung der Anode. Die Gelelektrophorese dient der Reinheitsprüfung, Identifizierung, Größenbestimmung und Trennung von Restriktions- und PCR-Fragmenten.

Hierfür wurden 1%ige Agarose-Gele gegossen. Dazu wurde zuerst 1 g Agarosepulver auf der Feinwaage abgewogen, zu 100 ml 1xTBE-Pulver gegeben und durch Schwenken gut vermischt. Dieses Gemisch wurde im Anschluss in der Mikrowelle erhitzt und zum Kochen gebracht. Nach Abkühlen des Gemisches wurden 3 µl Ethidiumbromid dazugegeben, vermengt und in vorbereitete Gelschlitten gegossen. In diese gefüllten Gelschlitten wurden noch die dafür vorgesehenen Gelkämme gesteckt, um die Befüllungstaschen während der Aushärtungsphase von ca. 30 min zu bilden. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid, das zwischen den Basenpaaren der großen Furche der DNA interkaliert, kann die DNA unter UV-Licht identifiziert werden. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine mit 1x TBE-Puffer gefüllte Kammer überführt. Die zu untersuchende DNA wurde mit 6x Auftragspuffer versetzt und in die dafür vorgesehenen Taschen pipettiert. Als Referenz diente der 100 bp Ladder. Die Auftrennung erfolgte bei einer Stromspannung von 120V für 45 min.

II.3. Histologische Techniken

II.3.1. Immunofärbung

II.3.1.1. Paraffineinbettung

Nachdem die Versuchstiere durch Genickbruch getötet worden waren, wurden beide Augen vor der vorsichtigen Entnahme der Augen mit einer 12 Uhr Brandmarkierung versehen. Die enukleierten Augen wurden über Nacht in 4 % PFA-Lösung fixiert, um anschließend minuciert und je dreimal für 20 min in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen zu werden. Dieser Waschphase schloss sich eine jeweils einstündige Spülphase in 50 % Isopropanol und 70 % Isopropanol an. Die Augen wurden nach der Spülung in frischem 70 % Isopropanol aufbewahrt.

Die Paraffineinbettung erfolgte nach folgendem Programm:

		Reagenz	Zeit
1	70%	Isopropanol	1 h
2	80%	Isopropanol	1 h
3	96%	Isopropanol I	1 h
4	96%	Isopropanol II	2 h
5	100%	Isopropanol I	1 h
6	100%	Isopropanol II	1 h
7	100%	Isopropanol III	2 h
8		Xylol I	1 h
9		Xylol II	1,5 h
10		Paraffin I	2 h
11		Paraffin II	8 h

Tabelle 15: Einbettprogramm Paraffin

II.3.1.2. Herstellung von Paraffinschnitten

Nachdem das unter II.3.1.1. beschriebene Einbettprogramm abgeschlossen war, wurden die Präparate mittels Paraffin Ausgießstation ausgebettet und auf Haltevorrichtungen platziert. Die Paraffinschnitte aus den Paraffinblöcken wurden an einem Mikrotom angefertigt, in ein beheiztes Wasserbad überführt und mit einem Objektträger aufgenommen. Bei der Anfertigung der Schnitte wurde besonders darauf geachtet, das Auge sagittal, mit Fokus auf die Papille und mit eröffneter Linse anzuschneiden.

II.3.2. Immunhistologische Methode – TUNEL

Die TUNEL-Methode dient der Detektion und Quantifizierung von apoptotischen Zellen. Verwendet wurde das DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System der Firma Promega. Bei dieser Methode werden fragmentierte DNA- Teile in den apoptotischen Zellen an ihren freien 3'-OH-Enden mit Fluorescein-12-dUTP versehen. Katalysiert wird dies durch das Enzym Terminal Desoxynucleotidyl Transferase (TdT) nach dem TUNEL-Prinzip (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling). Die mit Fluorescein-12-dUTPs versehene DNA kann direkt durch Fluoreszenzmikroskopie bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm sichtbar gemacht werden. [20] (Für diese Methode ist es notwendig die Paraffinschnitte zu entparaffinieren. Die Prozedur der Entparaffinierung ist im Anschluss dargestellt.

	Reagenz	Zeit
1	Xylol I	10 min
2	Xylol II	10 min
3	100% Isopropanol	10 min
	I	
4	100% Isopropanol	10 min
	II	
5	96% Isopropanol	5 min
6	96% Isopropanol	5 min
7	80% Isopropanol	5 min
8	80% Isopropanol	5 min
9	70% Isopropanol	5 min
10	50% Isopropanol	5 min

Tabelle 16: Abfolge der Entparaffinisierung

Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte mit H₂O bidest gespült und die TUNEL-Färbung angeschlossen:

Schritt	Reagenz		Durchführung	Zeit
1	0,85%	NaCl		5 min
2, 3	1x	PBS	2x	5 min
4	4%	PFA		15 min
5, 6	1x	PBS	2x	5 min
7	Proteinase K (1:500 in 1x PBS)			8 min
8, 9	1x	PBS	2x	5 min
10	4%	PFA		5 min
11, 12	1x	PBS	2x	5 min
13	Equilibration buffer			10 min
14	rTdT-Inkubation bei 37°C (22,5 µl Equilibration buffer + 2,5 µl Nukleotide Mix + 0,5 µl rTdT pro Schnitt)			60 min
15	2x	SSC		15 min
16, 17	1x	PBS	2x	5 min

Tabelle 17: TUNEL-Reaktion

Die gefärbten Präparate wurden mit DAPI (1:10 in Fluorescent Mounting Medium) eingedeckelt und anschließend mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Hierbei wurde die DNA im Zellkern der Zellen durch die DAPI-Färbung bei einer Anregungswellenlänge von 358 nm sichtbar gemacht und die apoptotischen Zellen durch die Fluorescein-12-dUTPs bei einer Anregungswellenlänge von 495 nm. Die erhaltenen Einzelaufnahmen wurden mittels Bildbearbeitungs- und Analysesystems übereinander gelegt. Apoptose positive Zellen konnten mit dem Zählprogramm katikati2 ausgezählt werden. Die gezählten Zellen wurden auf die Fläche der äußeren Körnerschicht der Retina in mm² bezogen.

II.3.3. Phänotyp-Analyse

II.3.3.1. Epon-Einbettung

Die Epon-Einbettung kann man in drei Teilphasen unterteilen. In der ersten Vorbereitungsphase wurden die enukleierten Augen in einem Gemisch aus Formaldehyd (2,5%), Glutaraldehyd (2,5%), Caco-Puffer (0,2 M; pH 7,6) und H₂O bidest. über mindestens 12 Stunden fixiert und anschließend mehrfach mit Caco-Puffer gespült. [3] Die Augen wurden im Anschluss in 1 % Osmiumferrocyanid nachfixiert. Das Osmium wurde mit H₂O bidest ausgewaschen und die Augen wurden dann in der Entwässerungsphase der aufsteigenden Alkoholreihe unterzogen.

Schritt	Reagenz	Temperatur	Durchführung	Zeit
1, 2	25% Ethanol	15°C	2x	15 min
3, 4	35% Ethanol	15°C	2x	15 min
5, 6	50% Ethanol	15°C	2x	15 min
7, 8	60% Ethanol	20°C	2x	15 min
9	70% Ethanol I	20°C		60 min
10	70% Ethanol II	20°C		75 min
11	70% Ethanol III	20°C		10 min
12, 13	80% Ethanol	20°C	2x	40 min
14, 15, 16	90% Ethanol	20°C	3x	40 min
17	100% Ethanol I	20°C		20 min
18	100% Ethanol II	20°C		40 min
19	100% Ethanol III	20°C		60 min

Tabelle 18: Entwässerung zur Eponeinbettung

Der Entwässerung schloss sich die Epon-Einbettung an:

Schritt	Reagenz	Verhältnis	Durchführung	Zeit
1,2	Prophylenoxid		2x	20 min
3	Prophylenoxid / Epon	02:01		120 min
4	Prophylenoxid / Epon	01:01		120 min
5	Prophylenoxid / Epon	01:02		120 min
6	Epon			ü.N.

Tabelle 19: Eponeinbettung

Die eingebetteten Augen härteten im Brutschrank bei 60°C für 24 Stunden aus.

II.3.3.2 Semidünnschnitte

Bevor von den eingebetteten Augen Semidünnschnitte angefertigt werden konnten, wurden die zu bearbeitenden Eponblöcke mit einer Rasierklinge zugetrimmt. Mit einem Ultramikrotom wurden von den Augen Semidünnschnitte in der Horizontalebene mit Schnittführung durch die Papille angefertigt. Durch die im Vorfeld durchgeführte Markierung der Augen befindet sich die Schnittebene in der temporal – nasalen Achse. Diese Schnitte wurden auf Objektträger überführt und nach Richardson gefärbt. Die gefärbten Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop betrachtet und in Form von Einzelbildern, die dann zu einem Gesamtbild zusammengesetzt wurden, aufgenommen.

II.4. Tiere und Tierhaltung

Die folgenden Mauslinien wurden für die *in vivo* Experimente benutzt:

- α-Cre Mäuse in FVB-N Hintergrund
- TGF-β-R2^{f1/f1} Mäuse im Black6 Hintergrund [Arbeitsgruppe Hall Moses, Vanderbilt University, Tennessee]

Die verwendeten Versuchstiere waren unter Standardbedingungen (Bedingungen (Temperatur $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, relative Luftfeuchtigkeit, $55\% \pm 5\%$, Futter und Wasser ad libitum) im selben Raum untergebracht und unterlagen einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus.

II.5. Lichtinduzierte Schädigung der Photorezeptoren

Lichtschadensversuche sind seit langer Zeit fester Bestandteil augenärztlicher Forschung und wurden zum ersten Mal von Noell WK et al. 1966 beschrieben. [48] Vor den Lichtschadensversuchen wurden die Versuchstiere auf retinale phänotypische Unterschiede untersucht, um sicherzustellen, dass morphologisch gleiche Voraussetzungen für die Schadensexperimente gelten (siehe II.3.3). Die Wahl des zu verwendenden Lichtes fiel auf weißes Licht. Dieses Licht wurde verwendet, weil es vom Emissionsspektrum dem Tageslicht ähnelt und als mitverursachender Faktor für Retinopathia pigmentosa und altersabhängiger Makuladegeneration gilt. [72] Vermittelt wird lichtinduzierte Apoptose über das Vorhandensein von Rhodopsin. [48] [23] Das Ausmaß des Lichtschadens hängt allerdings von unterschiedlichen Faktoren ab. Zu diesen Faktoren gehören zum Beispiel die Expositionsdauer, die Lichtintensität, die Wellenlänge, die Dauer der Dunkeladaptation oder der genetische Hintergrund. [21] Vor den Experimenten wurden die Versuchstiere 5 Tage in speziellen luftdurchlässigen Boxen dunkeladaptiert, bei denen eine Belichtung unter 100 Lux gewährleistet war. 24 Stunden vor der Belichtung wurden die Tiere bei völliger Dunkelheit gehalten.

Unmittelbar (ca. 30 min) vor dem Schadensexperiment wurden die Pupillen der pigmentierten Versuchstiere mit mydriatischen Augentropfen bei eingeschalteter Rotlichtlampe weitgetropft. Die anschließende Belichtung fand in einer speziellen reflektierenden Lichtschadensbox statt. Der Nacht-Tages-Rhythmus der Tiere wurde bei den Lichtschadensversuchen berücksichtigt. So wurde bereits von Vaughan et al. 2002 bewiesen, dass die Schadensempfindlichkeit im Nachtrhythmus höher ist als zum Tagesrhythmus. Der Tagesrhythmus umfasst das Zeitfenster von 09:00 bis 17:00 Uhr. [68] Es wurde strikt darauf geachtet, dass die Belichtungen in den Lichtschadensexperimenten vor 09:00 Uhr abgeschlossen waren. Nach dem Experiment wurden die Tiere bei geöffneten Boxen in halbdunkler Umgebung gehalten. Als Belichtungsdauer wurde für die TUNEL-Analysen eine Expositionszeit von 30 min gewählt. Die Belichtungsintensität betrug 14500 Lux. Diesen Tieren wurden 30 Stunden nach dem Experiment getötet und die Augen enukleiert und anschließend auf Apoptose-positive Zellen untersucht. Für die Semidünnschnittanalysen wurde eine hohe Belichtungsintensität von 14500 Lux gewählt, da es sich bei den Versuchstieren um pigmentierte Tiere handelt. So wurde sichergestellt, dass die Photorezeptoren geschädigt werden können. [74] Versuchstiere, die in die Semidünnschnittanalyse einflossen, wurden 60 min bei 14500 Lux belichtet. Beim Ablauf der Schadensexperimente wurde strikt darauf geachtet, dass die Versuche immer unter den gleichen Versuchsbedingungen abliefen.

II.6. ERG (Elektroretinogramm)-Analyse

Die ERG-Untersuchungen der Versuchstiere wurden mit freundlicher Unterstützung in der Arbeitsgruppe um Prof. Herbert Jägle an der Universitätsklinik Regensburg durchgeführt. Das nichtinvasive Elektroretinogramm bietet, als wichtiger Bestandteil ophthalmologischer Untersuchungen, die Möglichkeit die Funktionen der retinalen Neurone zu untersuchen. [6] Trifft Licht auf die Retina, löst dies in der Retina mehrere Einzelsignale aus, die in gebündelter Form, über das ERG abgeleitet werden können. Die gebündelten Einzelsignale lassen sich, nachdem sie von der Retina über den Glaskörper zur Kornea abgeschwächt weitergeleitet wurden, auf der

Kornea mit Elektroden ableiten. Den ERG-Untersuchungen dieser Arbeit liegt das Ganzfeld-ERG zugrunde. Mit dem Einsatz von Mydriatikum und der gleichmäßigen Belichtung der Netzhaut durch das Ganzfeld-ERG kann ein Reiz auf die gesamte Retina appliziert werden, woraus sich in der Summe der Einzelsignale der Nervenfasern ein Summenpotenzial ergibt. Das Summenpotenzial ergibt den ERG-typischen Verlauf. Hierbei repräsentieren die unterschiedlichen Wellen und der Verlauf des ERG die unterschiedlichen Antworten der Zelltypen der Retina auf den Reiz.

II.6.1. Vorbereitung der Versuchstiere für die ERG-Untersuchung

Die Versuchstiere waren vor dem Experiment 12 Stunden dunkeladaptiert und wurden unmittelbar vor der Messung mit Ketamin/ Xylazin intraperitoneal narkotisiert. Zur genauen gewichtsabhängigen Dosierung der Narkose wurden die Tiere vor der Dunkeladaptation gewogen. Nach der Narkotisierung wurden die Pupillen des jeweiligen Versuchstieres mit Mydriatikum behandelt. Zusätzlich wurde auf beide Augen Corneregel appliziert um die Augen zu befeuchten und eine gute Leitfähigkeit für die Elektroden zu gewährleisten. Bei vollständiger Narkose wurden 2 ringförmige Ableitungselektroden auf die beiden Augen des Versuchstieres platziert. Eine Referenzelektrode wurde über den Nasenrücken in der Haut der Maus fixiert. Die Erdung der Maus wurde über eine weitere Referenzelektrode in der Schwanzwurzel sichergestellt. Diese Vorarbeit fand auf einer beweglichen, beheizten Unterlage vor dem Ganzfeldsimulator statt. Nach Beendigung der Vorbereitung wurde die Unterlage mit dem narkotisierten Versuchstier so in den Ganzfeldsimulator geschoben, dass sich der Kopf des Versuchstieres zentral im Simulator befand und somit sichergestellt wurde, dass beide Augen simultan ausgeleuchtet werden konnten.

II.6.2. Ablauf der ERG-Messungen

Die technischen Eckdaten der ERG-Messungen sind im Folgenden beschrieben. Der Ablauf wurde gemäß dem Protokoll des Papers “TGF- β signaling protects retinal neurons from ontogenetic cell death during development” [8] durchgeführt. Die dunkeladaptierten (skotopisch) Versuchstiere wurden mit Einzel-Blitz-Reizen versehen, deren Reizintensität von -3,5 bis 1,0 cd s/m² reichte. Das Reizintervall wurde für den Lichtstimulus von 2 bis 20 Sekunden für die höchste Intensitätsstufe aufgezeichnet. Die Beurteilung der temporalen Retinaeigenschaften erfolgte durch die Aufzeichnung von Flickerreizen mit einer Reizintensität von 0.5 log cd s/m² und Hz-Frequenzen von 4 bis 25 Hz. Für das helladaptierte (photopische) Einzel-Blitz-ERG wurden die Versuchstiere 10 Minuten einer weißen Hintergrundbeleuchtung (25 cd s/m²) ausgesetzt, um die Stäbchen soweit abzusättigen, dass eine ausschließliche Beurteilung der Zapfen möglich ist. Die helladaptierten Versuchstiere wurden Einzel-Blitz-Reizen mit drei Xenon-Blitz-Intensitäten (1, 2 und 3 log cd s/m²) ausgesetzt. Für die Flicker-Reiz-Antwort wurde die Fourier-Analyse eingesetzt. Bei dieser Analyse wird automatisch über eine ganze Gipfelreihe gemittelt. [38] Hierbei gehen nur signifikante Werte in die Analyse ein, um die Reizantwort auf die Amplitude und Antwortphase zu untersuchen.

II.7. Auswertung

II.7.1. Allgemeine Auswertung

Zur Retinadickenmessung in Form von sog. Spiderdiagrammen wurde zunächst die Gesamtlänge der Retina nasal und temporal vermessen. Hierfür wurde das Programm AxioVision verwendet. Die nasale bzw. temporale Gesamtlänge wurde in 10 Bereiche untergliedert. In diesen Bereichen wurde jeweils die Dicke der inneren und äußeren Körnerschicht der Retina gemessen. Die so erhaltenen Daten wurden verwendet, um sogenannte Spider-Diagramme mit Hilfe des Programmes Excel zu erstellen. Für die statistische Analyse der Versuche wurde der „Student's“ T-Test herangezogen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden für $p<0,05$ und statistisch hoch signifikante Unterschiede für $p<0,01$ angenommen. In den Diagrammen ist dieses durch * (für $p<0,05$) bzw. ** (für $p<0,01$) gekennzeichnet. Die Fehlerbalken sind als Standardfehler (SEM) dargestellt.

II.7.2. ERG-Auswertung

Die Auswertung der ERG-Ergebnisse erfolgte in der Ausmessung der Amplituden und der Gipfelzeiten der a-/ und b-Welle. Diese Messergebnisse wurden in Abhängigkeit der Lichtintensität aufgetragen und ergaben so Amplituden-, Intensitäten- und Gipfelzeiten-Intensitäten-Funktionen. [6]

Die Art der Ausmessung der Amplitude und der Gipfelzeit ist in Abb. 9 aufgezeigt.

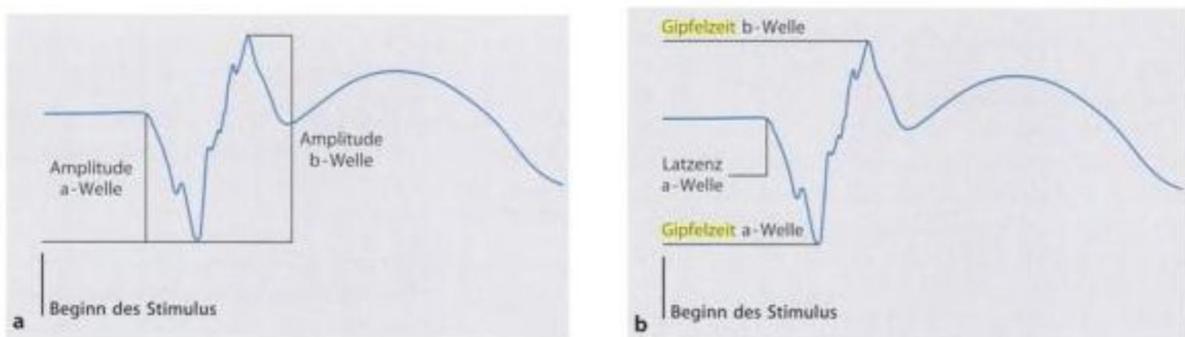


Abbildung 9: Vermessung der Amplitude und der Gipfelzeit für die a- und b-Welle.

Die Amplitude der a- und b-Welle wurde wie unter a) gezeigt vermessen. Die Amplitude der a-Welle wird von der Nulllinie bis zum maximalen negativen Ausschlag der a-Welle gemessen. Für die Vermessung der Amplitude der b-Welle wird der Abstand zw. des maximal negativen Wertes der a-Welle bis zum maximal positiven Wert der b-Welle als Messdatenpunkt gewertet. Die Bemessung der Gipfelzeit beider Wellen ist unter b) gezeigt. Die a-Wellen-Gipfelzeit wird von dem Zeitpunkt des Lichtstimulus bis zur maximalen Amplitude der a-Welle gemessen. Das gleiche Procedere gilt für die Gipfelzeit der b-Welle. [6]

Die Analysen und Auswertungen wurden mit R 2.14.2 und ggplot 0.9.1. durchgeführt.

III. Ergebnisse

III.1. Nachweis des konditionellen Knockouts von TGF- β -R2 durch Western Blot Analyse

In unserer Arbeitsgruppe konnten im Rahmen der Veröffentlichung zum Thema „TGF- β signaling protects retinal neurons from ontogenetic cell death during development“ Mäuse mit einem konditionellen Knockout des TGF- β Rezeptor 2 (α -Cre;TGF- β -R2^{f/f} Tiere) generiert werden. Diese Tiere exprimieren zum einen die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des α -Enhancers-Elements des Promoters von Pax6 und besitzen flankierende loxP-Sequenzen für das TGF- β -R2 kodierende Gen. Zur bestätigung der Tgfbr2 Deletion wurde in Vorarbeiten mit Western Blot Analysen die Proteinexpression von TGF- β -R2, pSmad2 und pSmad3 in Retinaextrakten von Mäusen mit einer konditionellen Deletion des TGFbr2 (im folgenden: α -Cre;TGF- β -R2^{f/f} Mäuse genannt) und wildtypischen Geschwistertieren (TGF- β -R2^{f/f} im folgenden TGF- β -R2^{+/+} genannt) überprüft (siehe Abb. 10). [52] [8]

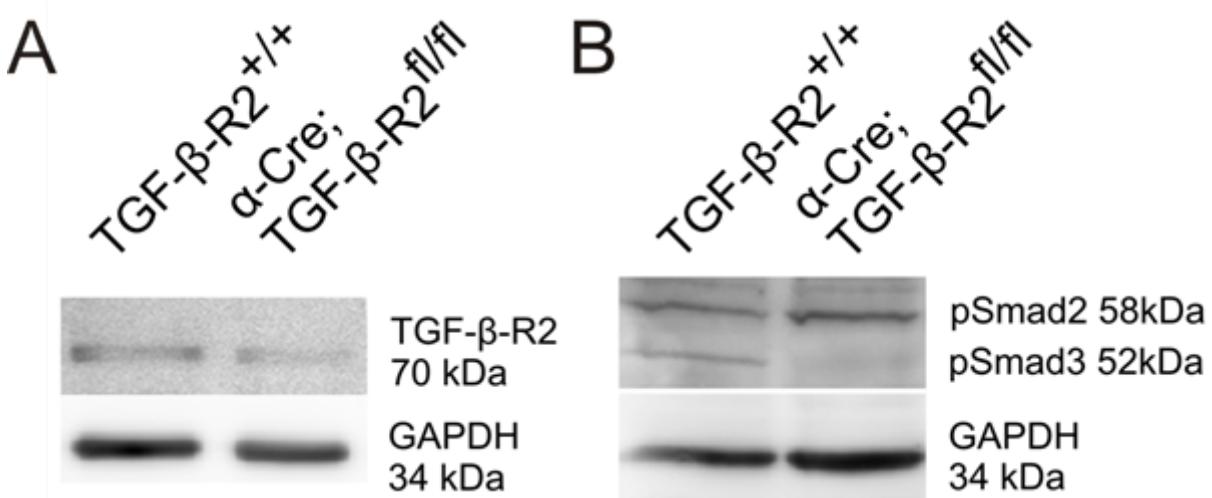


Abbildung 10: Western Blot zum Nachweis von TGF-β-R2, pSmad2 und pSmad3 in der Netzhaut von α-Cre;TGF-β-R2^{fl/fl} und TGF-β-R2^{+/+} Mäusen.

Die gleichmäßige Beladung wurde bei beiden Western Blots (A und B) über die Ladungskontrolle von GAPDH sichergestellt. Das Molekulargewicht der GAPDH beträgt 34 kDa. (A) Bei TGF-β-R2^{+/+} Tieren ist eine Bande auf der Höhe von 70 kDa zu sehen. Dies entspricht dem Molekulargewicht des TGF-β R2. Bei α-Cre;TGF-β-R2^{fl/fl} ist eine deutlich schwächere Bande auf Höhe von 70 kDa sichtbar. (B) Das Protein pSmad2 ist bei Wildtyp und Knockout auf einer Höhe von 58 kDa sichtbar. Das Protein pSmad 3 ist bei TGF-β-R2^{+/+} Tieren auf einer Höhe von 52 kDa detektierbar, jedoch nicht bei den α-Cre;TGF-β-R2^{fl/fl} Tieren. Die Western Blot Analysen wurden von Stefan Pielmeier im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt und ähnlich unter Erstautorin PD Dr. Dr. Barbara Braunger im Journal of Neuroscience publiziert. [52] [8]

III.2. Bestätigung der RPE65-L450-Variation

Das Protein RPE65 (retinal pigment epithelium 65) wird im retinalen Pigmentepithel exprimiert und katalysiert die Umwandlung von all-trans-Retinol in das 11-cis-Retinol. Es existieren zwei natürlich vorkommende Varianten des RPE65-Gens. Diese Varianten kodieren entweder ein Methionin oder ein Leucin an der Aminosäureposition 450. [49]

Es konnte gezeigt werden, dass sich Mäuse mit der Met450 Variante des RPE65 Gens langsamer vom Photobleichen erholen als Mäuse mit der Leu450 Variante. Photorezeptoren der Mäuse mit der Leu450 Variante sind somit schneller wieder empfindlich gegenüber Lichteinwirkung. [49] Zur Durchführung der Lichtschadensexperimente war es nötig die Versuchstiere auf die RPE65-Variationen hin zu untersuchen. Hierfür wurden Polymerasekettenreaktionen mit anschließendem Restriktionsverdau durchgeführt. Ein exemplarisches Ergebnis für ein Agarosegelbild

ist unter Abbildung 11 dargestellt. In diesem sind drei verschiedene Tierproben aufgetragen, welche die drei verschiedenen genetischen Möglichkeiten der RPE65-Varianten repräsentieren.

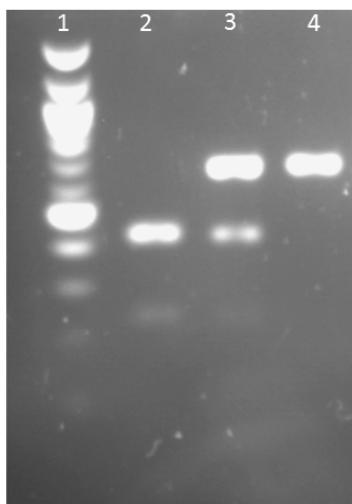


Abbildung 11: Repräsentatives Beispiel einer PCR zum Nachweis der möglichen RPE-65 Genvarianten.

Als Größenstandard ist in der ersten Spur der 100bp Plus DNA ladder aufgetragen. In Spur 2 sind zwei DNA-Fragmente auf den Höhen von 236 bp und 437 bp erkennbar, welche das Restriktionsmuster für die RPE65-Leu450 Variante repräsentieren. In Spur 3 sind 3 DNA-Fragmente bei einer Höhe von 674 bp, 437 bp und 236 bp erkennbar. Dies repräsentiert das Ergebnis eines heterozygoten Tieres für beide RPE65-Varianten. In Spur 4 ist eine Bande auf der Höhe von 674 bp detektierbar. Dies repräsentiert ein Tier, das die RPE65-Met450 Variante im Genom trägt.

Bei der RPE65-spezifischen PCR entsteht ein 674 bp großes Fragment. Wenn bei den getesteten Mäusen die Methionin-Variante des RPE65 Gens vorliegt, kann das Restriktionsenzym MWO 1 das Fragment nicht spalten, da keine Erkennungssequenz vorhanden ist. Somit gibt eine einzelne DNA- Bande auf der Höhe von 674 bp an, dass es sich bei dem getesteten Tier um eine Tier mit der RPE65-Met450 Variante handelt (Abb.11/Spur 4). In Spur 2 der Abb 18 entstehen zwei DNA- Fragmente auf den Höhen 236 bp und 437 bp. Tiere, die dieses Muster nach dem Retsriktionsverdau zeigen, besitzen die RPE65-Leu450 Variante. Durch den Basenaustausch von A nach C entsteht anstelle von Methionin (ATG) die Aminosäure Leucin (CTG). Dies hat zur Folge, dass bei den Leu450-Tieren die Erkennungssequenz für MWO1 vorhanden ist und das Enzym an dieser Stelle das DNA-Fragment spalten kann. Somit entstehen nach der PCR und dem Restriktionsverdau diese zwei Banden.

Weiterhin ist es möglich, dass es sich bei den Mäusen um heterozygote Tiere handelt. Bei diesem genetischen Hintergrund liegt auf einem Schwesternchromosom das Allel für die Leu450-Variante vor und auf dem anderen das Allel für die Met450-Variante. Wenn dies der Fall ist treten nach dem Restriktionsverdau 3 Banden bei den Größen 674 bp, 437 bp und 236 bp auf (siehe Spur 3 von Abb. 11). Mithilfe des 100bp Plus DNA ladder konnten die entstandenen DNA-Fragmente ihrer entsprechenden Größe zugeordnet werden. Für die Lichtschadensexperimente wurden TGF- β -R2^{+/+} Wildtypen und α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tiere mit der RPE65-Leu450-Variante verwendet.

III.3. Phänotypanalyse der unbelichteten α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Mäuse

III.3.1. Morphologie

Die Augen von 8 Wochen alten adulten α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tiere wurden mit TGF- β -R2^{+/+} Wildtypen morphologisch anhand von Semidünnschnitten verglichen. Von den Semidünnschnitten wurden Panoramaaufnahmen angefertigt. (s. Abb. 12)

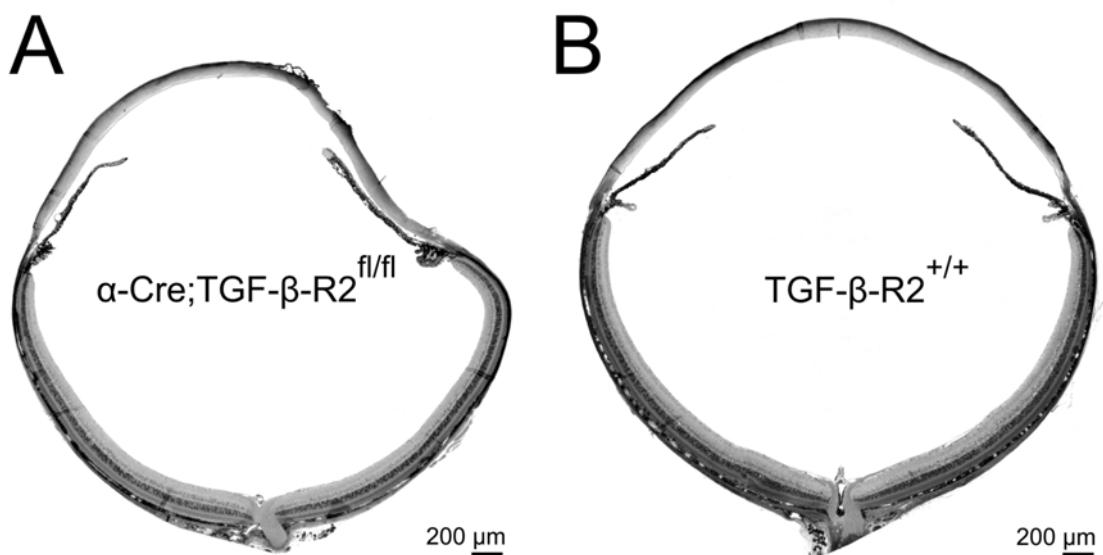


Abbildung 12: Panoramabilder der Semidünnschnitte von unbelichteten α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} und TGF- β -R2^{+/+} Tieren.

Dargestellt ist jeweils ein sagittaler Semidünnschnitt durch ein Auge eines α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tieres (A) und eines TGF- β -R2^{+/+} Wildtypen (B).

Unter A in der Abbildung 12 ist der sagittale Schnitt durch das Auge eines transgenen α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tieres zu sehen. B zeigt den Schnitt durch ein Auge eines TGF- β -R2^{+/+} Wildtypen. In dem Übersichtsbild ist kein morphologischer Unterschied feststellbar. In Abb.13 ist die Retina mit einer stärkeren Vergrößerung dargestellt und zusätzlich sind die Schichten der Retina ausgewiesen.

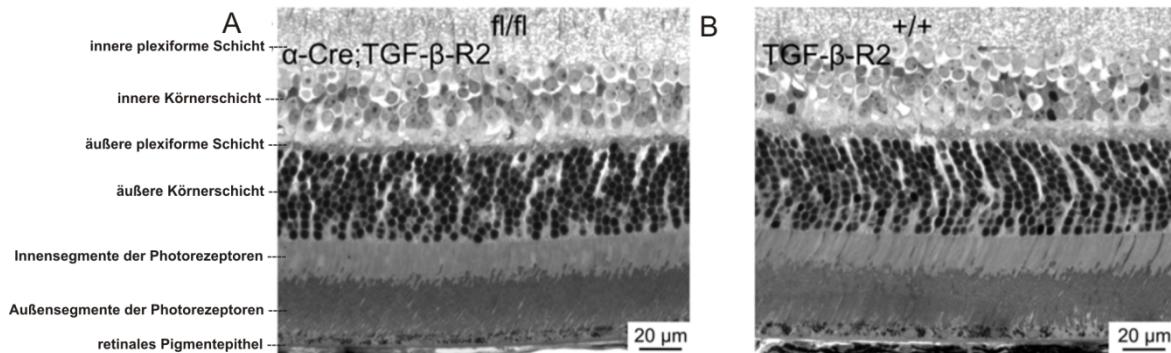


Abbildung 13: Vergrößerte Aufnahme der Retinae von unbeflockten α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} und TGF- β -R2^{+/+} Tieren.

Die vergrößerten Schichten der Retina sind unter (A) für ein α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tier und unter (B) für ein TGF- β -R2 Wildtypen dargestellt. Gut erkennbar ist die zellreiche, dunkelgefärbte äußere Körnerschicht mit den Perikaryen der Photorezeptoren. Darüber etwas heller gefärbt, ist die innere Körnerschicht mit den amakrinen Zellen, den Bipolar- und Horizontalzellen gelegen. Die innen- und Außensegmente der Photorezeptoren befinden sich unterhalb der äußeren Körnerschicht.

Auch in der Vergrößerung ist kein struktureller Unterschied im Phänotyp beider Tiere detektierbar. Die einzelnen Retinaschichten beider Augen sind gut gegeneinander abgrenzbar und erscheinen morphologisch unauffällig.

III.3.2. Dickenmessung der Retina

Zur Quantifizierung des Phänotyps wurden zusätzlich Vermessungen der Retinadicke vorgenommen. Dazu wurde die Retina in ihrer Gesamtlänge in einem ersten Schritt von der temporalen *Ora serrata* bis zum Rand der Papille des *N. opticus* ausgemessen. Die Vermessung erfolgte ebenso von der nasalen *Ora serrata* zum Rand der Papille. Die temporale und nasale Gesamtlänge wurde anschließend jeweils in 10 gleiche Bereiche unterteilt. An diesen Markierungen wurde daraufhin die Dicke der inneren und äußeren Körnerschicht vermessen. Abbildung 14 zeigt die

Ergebnisse für die Vermessung der inneren Körnerschicht. Auf der x-Achse ist die prozentuale Entfernung vom *Nervus opticus* und auf der y-Achse die Dicke der inneren Körnerschicht in μm .

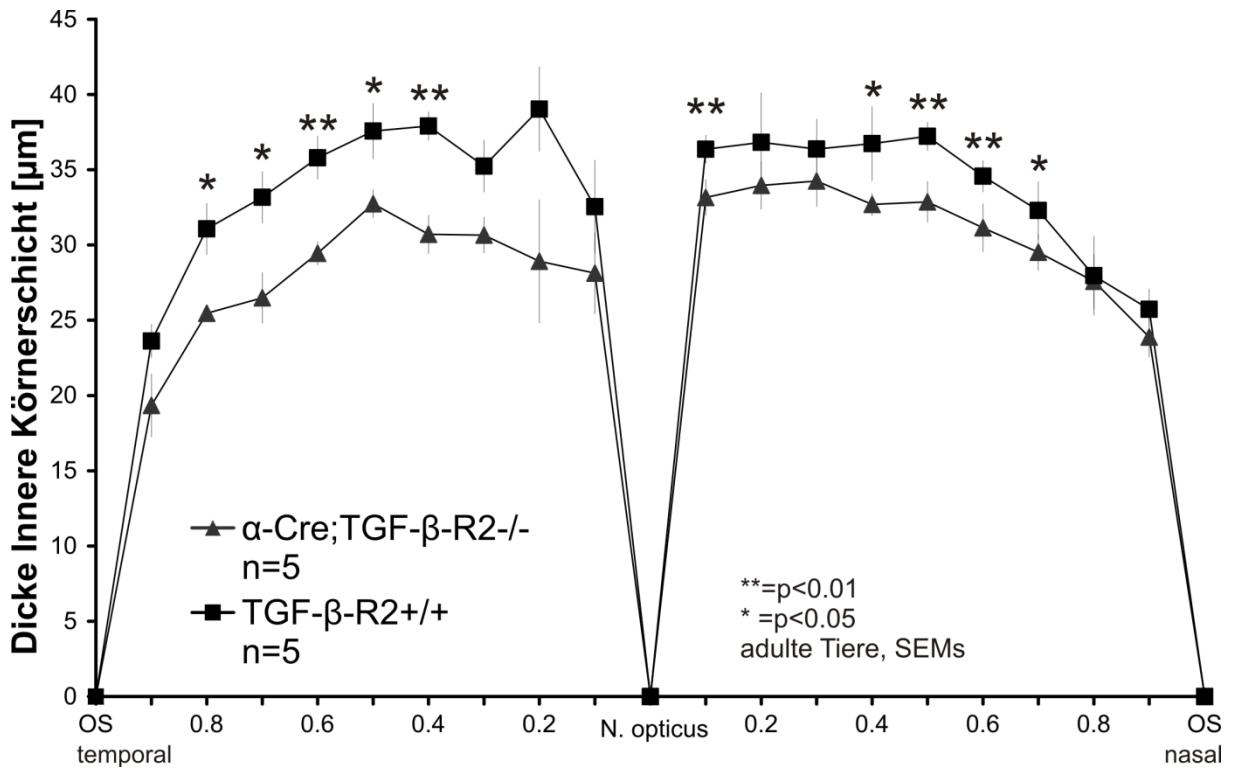


Abbildung 14: Dickenmessung der inneren Körnerschicht für $\alpha\text{-Cre;TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl/fl}}$ und $\text{TGF-}\beta\text{-R2}^{+/+}$ Tieren.

Die Ergebnisse der Dickenmessung sind in Form eines Spiderdiagrammes zusammengefasst. Horizontal ist der Verlauf, untergliedert in 10% Schritten, der Retina von der temporalen *Ora serrata* über die Papille zur nasalen *Ora serrata* dargestellt. Vertikal ist die Dicke der inneren Körnerschicht in μm aufgetragen. Die Dicke der inneren Körnerschicht ist für $\alpha\text{-Cre;TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl/fl}}$ Tiere deutlich dünner als die von $\text{TGF-}\beta\text{-R2}^{+/+}$ Tieren. Datenpunkte, die mit einem Sternchen markiert wurden, sprechen für signifikante Unterschiede in den Dickenmessungen. N=5, * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Für die innere Körnerschicht lassen sich durch die Vermessung 5 (*) signifikante Punkte sowohl auf der temporalen als auch auf der nasalen Seite der Retina finden. Die Dicke beider Retinaseiten der unbelichteten $\alpha\text{-Cre;TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl/fl}}$ transgenen Tiere ist in diesen 5 Punkten signifikant dünner als die der unbelichteten $\text{TGF-}\beta\text{-R2}^{+/+}$ Wildtypen. In den restlichen Punkten ist die Dicke der $\alpha\text{-Cre;TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl/fl}}$ transgenen Tiere auch dünner als die der $\text{TGF-}\beta\text{-R2}^{+/+}$ Wildtypen, allerdings erreichen diese Datenpunkte der Dickenmessungen nicht die Signifikanzgrenze. Für die äußere

Körnerschicht wurde sowohl für den Wildtyp als auch für den Knockout die gleiche Vermessung vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

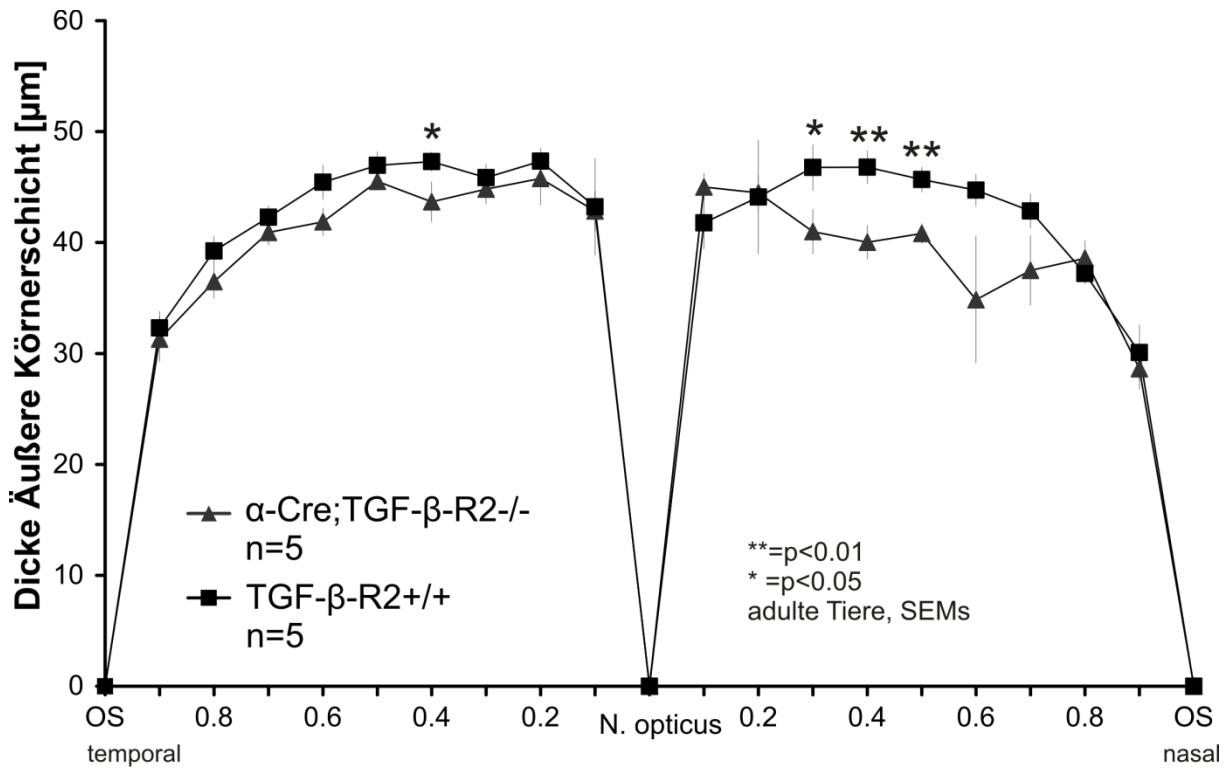


Abbildung 15: Dickenmessung der äußeren Körnerschicht für α -Cre;TGF- β -R2 $^{fl/fl}$ und TGF- β -R2 $^{+/+}$ Tieren.

Den Ergebnissen der Vermessung der äußeren Körnerschicht liegt ebenfalls das Spider-Diagramm zugrunde. Für die äußere Körnerschicht der α -Cre;TGF- β -R2 $^{fl/fl}$ Tiere konnten nur vereinzelt signifikante Messergebnisse für die Dicke der äußeren Körnerschicht der TGF- β -R2 $^{+/+}$ Tiere detektiert werden. N=5, *p<0.05, **p<0.01.

Für die Dicke der äußeren Körnerschicht der unbelichteten α -Cre;TGF- β -R2 $^{fl/fl}$ Tiere und TGF- β -R2 $^{+/+}$ Wildtypen konnten statistisch signifikante Unterschiede in der Dicke der Retina festgestellt werden. Diese Unterschiede treten auf der nasalen Seite der Retina für die Dicke der äußeren Körnerschicht auf. Diese ist bei α -Cre;TGF- β -R2 $^{fl/fl}$ Tiere in einigen Punkten dünner als TGF- β -R2 $^{+/+}$ Wildtypen. Temporal nähert sich die äußere Körnerschicht der transgenen Tiere der äußeren Körnerschicht der Wildtypen an. Sie ist jedoch geringfügig dünner als die äußere Körnerschicht der Wildtypen, auch wenn kein signifikanter Unterschied besteht.

III.3.3. ERG-Ergebnisse

Nachdem die Dickenmessungen der Retinae des Wildtyps und Knockouts durchgeführt worden waren und sich hierbei deutliche Unterschiede für die Dicke der inneren Körnerschicht ergaben, wurden zusätzlich ERG-Experimente durchgeführt. Diese Experimente wurden vorgenommen um zu überprüfen, ob die Unterschiede der Dicke der inneren Körnerschicht Auswirkungen auf die physiologischen Funktionen dieser Schicht haben.

Zunächst wurde mit den dunkeladaptierten Einzelblitz-Elektroretinogrammen begonnen, da sich die Versuchstiere vor den Experimenten in einer 12 stündigen Dunkeladaptation befanden. Das dunkeladaptierte ERG ist bei geringen Lichtintensitäten durch Stäbchensignale gekennzeichnet. [6] Bei zunehmenden Lichtintensitäten ergeben sich kombinierte Stäbchen-Zapfen-Signale. Die Stäbchensignale äußern sich im ERG in der negativen a-Welle, welche bei den geringeren Lichtintensitäten die positive b-Welle überlagert. Diese Überlagerung kommt deshalb zustande, da die abgeleiteten Signale als Summenpotenzial vieler verschiedener Signale zu verstehen sind. So kommt es dazu, dass bei geringer Intensität die negative a-Welle von der positiven b-Welle überlagert wird und erst bei höheren Intensitäten vor der b-Welle erscheint. [6] In Abbildung 16 sind die Auswertungen der dunkeladaptierten ERGs für den Wildtyp und den Knockout dargestellt. Unter A befinden sich die Ergebnisse für die Amplitude der a- und b-Welle. B zeigt die Gipfelzeit beider Wellen. Sowohl die Amplitude als auch die Gipfelzeit wurden auf die Lichtintensität bezogen.

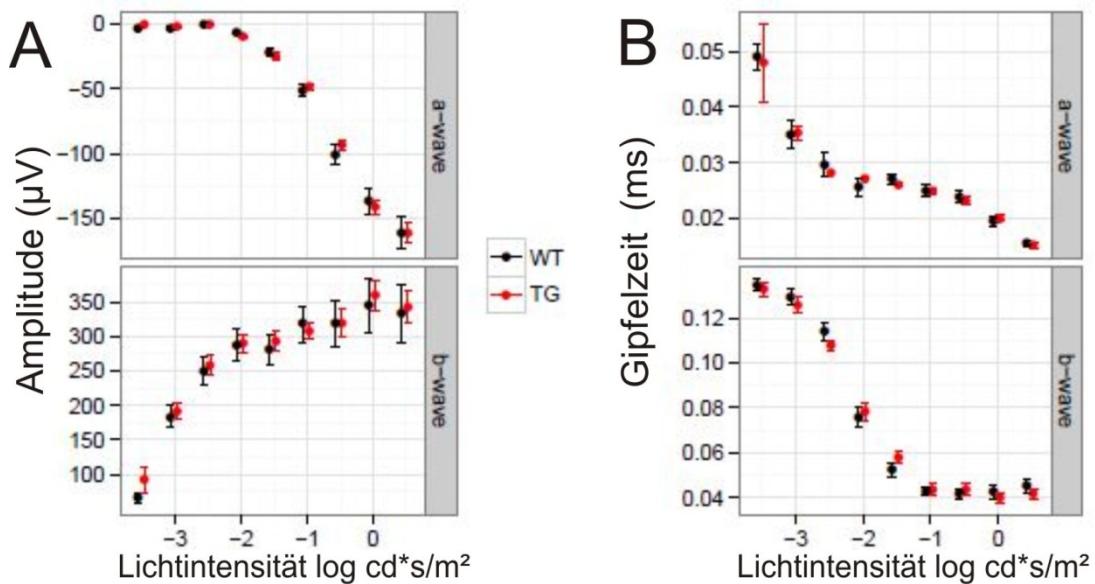


Abbildung 16: Auswertung der Elektroretinogramme.

Unter Abbildung A ist der Ausschlag der Amplitude in Abhängigkeit von der Lichtintensität für die a-Welle und die b-Welle aufgetragen. Unter B wurde die Gipfelzeit auf die Lichtintensität bezogen und diese Daten sowohl für die a- als auch die b-Welle dargestellt. Die Durchführung und Auswertung erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Herbert Jägle an der Universitätsklinik Regensburg [8]

Für die Amplitude der a/b-Welle konnte kein Unterschied zwischen α-Cre;TGF-β-R2^{fl/fl} Tieren und TGF-β-R2^{+/+} Wildtypieren detektiert werden. Ähnliches gilt auch für die Gipfelzeit der a/b-Welle. Es konnte ebenso kein Unterschied zwischen den beiden Genotypen festgestellt werden.

Das dunkeladaptierte Einzelblitz-Elektroretinogramm gibt, wie oben beschrieben, Aufschluss über die Stäbchen-Zapfen-Antwort auf einen Lichtreiz. Um die Funktion der Zapfen näher zu untersuchen, wurde zusätzlich ein helladaptiertes Einzelblitz-ERG durchgeführt. Hierbei wird durch eine ständige Hintergrundbeleuchtung die Funktion der Stäbchen gesättigt, so dass ausschließlich die Funktion der Zapfen untersucht werden kann. [38] In Abbildung 17 sind die Ergebnisse für die helladaptierten ERGs dargestellt.

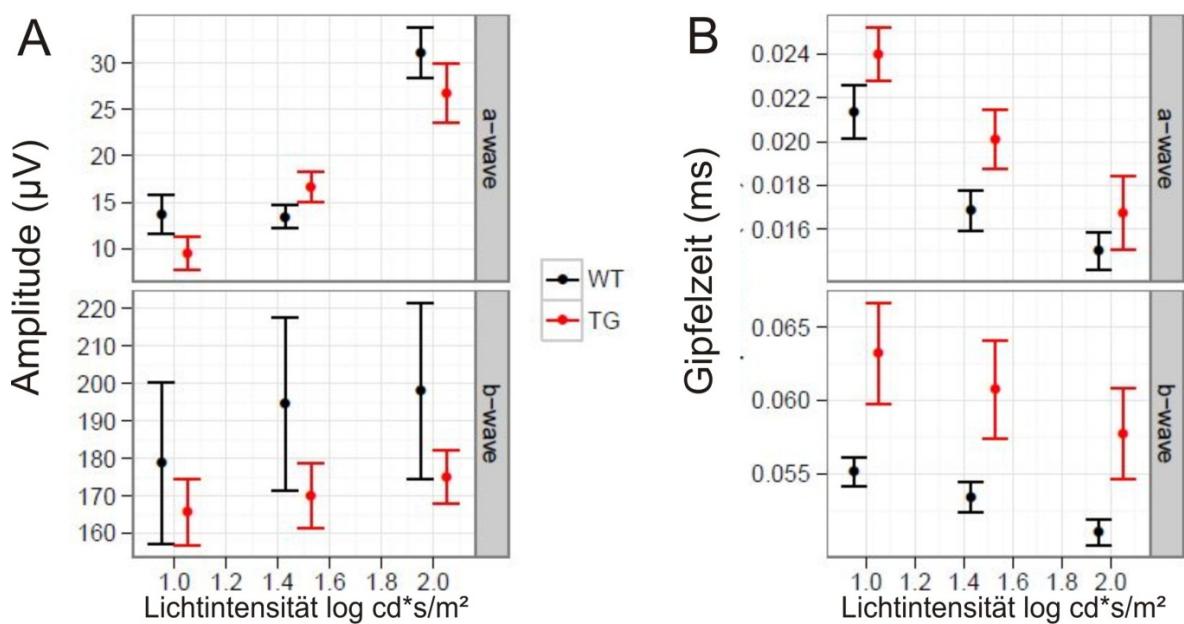


Abbildung 17: Auswertung des helladaptierten Einzelblitz-ERGs für die Zapfen.

Unter A ist der Ausschlag der Amplitude und unter B die Gipfelzeit für die a-/b-Welle in Abhängigkeit von der Lichtintensität aufgetragen. Die Amplituden und die Gipfelzeiten wurden jeweils auf die Lichtintensität bezogen. Die Durchführung und Auswertung erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Herbert Jägle an der Universitätsklinik Regensburg [8]

Die Werte der Amplituden und der Gipfelzeiten des Wildtyps und des Knockouts wurden auf die Lichtintensität bezogen. Für die helladaptierten Einzelblitz-Elektroretinogramme ergab sich zwischen α -Cre;TGF- β -R2^{f/f} Tieren und TGF- β -R2^{+/+} Wildtypieren für die Amplituden von a- und b-Welle keine Unterschiede. Die Gipfelzeiten sind für die a-Welle der α -Cre;TGF- β -R2^{f/f} Tiere verlängert. Deutlich verlängert sind die Gipfelzeiten für die b-Welle der α -Cre;TGF- β -R2^{f/f} Tiere im Vergleich zu den Wildtypen.

Neben den beiden Experimenten für dunkel-/helladaptierte Einzelblitz-Elektroretinogramme wurde zusätzlich noch 15Hz-Elektroretinogramme abgeleitet. Hierbei wird dunkeladaptiert ein Flickersignal von 15Hz mit steigender Intensität dargeboten. Dieses ERG gibt weiter Aufschluss über die Funktion der inneren Netzhaut und untersucht den langsamen und schnellen Signalübertragungsweg der Stäbchen. [65] In Abbildung 18 ist die dazugehörige Auswertung der ERGs dargestellt.

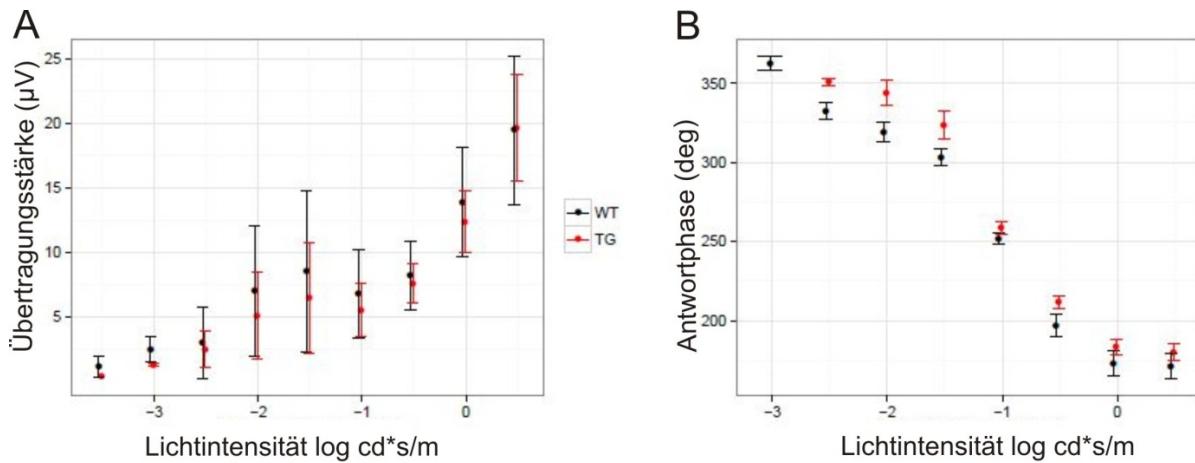


Abbildung 18: Auswertung der 15 Hz - ERGs.

Unter A sind die Amplituden in Abhängigkeit von der Lichtintensität für $\alpha\text{-Cre;TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl/fl}}$ Tiere und $\text{TGF-}\beta\text{-R2}^{+/+}$ Wildtyptiere für das 15Hz-ERG dargestellt. Die Antwortphasen in Abhängigkeit von der Lichtintensität sind für das 15Hz-ERG unter B zusammengefasst. Die Auswertung erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Herbert Jägle an der Universitätsklinik Regensburg [8]

Die Amplituden für $\alpha\text{-Cre;TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl/fl}}$ Tiere waren im Vergleich zu $\text{TGF-}\beta\text{-R2}^{+/+}$ Wildtyptiere bei geringen Intensitäten etwas schwächer ausgeprägt und glichen sich bei steigenden Lichtintensitäten wieder an (dargestellt unter A der Abbildung 18). Die Antwortphase (siehe Abbildung 18 unter B) bei niedrigeren Intensitäten für $\alpha\text{-Cre;TGF-}\beta\text{-R2}^{\text{fl/fl}}$ Tiere ist verlängert. Bei höheren Intensitäten normalisiert sich die Antwortphase des Wildtyps/ Knockouts und nimmt in etwa den gleichen Verlauf.

III.4. Lichtinduzierte Schädigung der Photorezeptoren

In der vorangegangenen Arbeit von S. Pielmeier ist die Bedeutung des konditionellen Knockouts von TGF- β -R2 auf den ontogenetischen Zelltod während der Postnatalphase untersucht worden. Dabei stellte sich heraus, dass besonders die Zellpopulation der inneren Körnerschicht der Versuchstiere von ontogenetischem Zelltod betroffen war. [52] Die morphometrischen Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Dickenmessungen der inneren Körnerschicht (Abbildung 14) bestätigen diesen Befund. Die Photorezeptoren der äußeren Körnerschicht waren in der Postnatalphase kaum apoptotisch betroffen. Dies deckt sich auch mit der Tatsache, dass nur 5 % der Photorezeptoren dem ontogenetischen Zelltod unterliegen. [13] Wiedrum bestätigen die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Analysen der äußeren Körnerschicht den Befund (Abbildung 15). Zum gezielten Auslösen der Apoptose in den Photorezeptorzellen hat sich das etablierte phototoxische Schadensmodell bewährt. [68] [63] In den lichtinduzierten Schadensversuchen wurden 6 Wochen alte TGF- β -R2^{+/+} Wildtypen und α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tiere für 60 min mit weißem Licht (Belichtungsstärke von 14500 Lux) bestrahlt. Die Versuchstiere wurden 5 Tage vor den Experimenten dunkeladaptiert. 24 Stunden vor dem Versuch unterlagen die Tiere absoluter Dunkeladaptation. Ca. 30 min vor dem eigentlichen Experiment wurden die Pupillen der Versuchstiere (TGF- β -R2^{+/+} Wildtypen und α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tiere) bei Rotlicht mit Mydriatikum weitgetropft. Nach den Experimenten wurden die Tiere in den offenen Aufbewahrungsboxen bei ca. 100 Lux gehalten. 14 Tage nach den Versuchen wurden die Augen nach vorangegangenem Genickbruch herauspräpariert und konserviert. Zur Kontrolle des Lichtschadens dienten jeweils ein unbelichteter Wildtyp und ein unbelichtetes α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tier.

III.4.1. Analyse der Photorezeptorzellschädigung anhand von Semidünnschnitten

In Abbildung 19 ist ein Semidünnschnitt eines belichteten α -Cre;TGF- β -R2^{f/f} Tieres dargestellt.

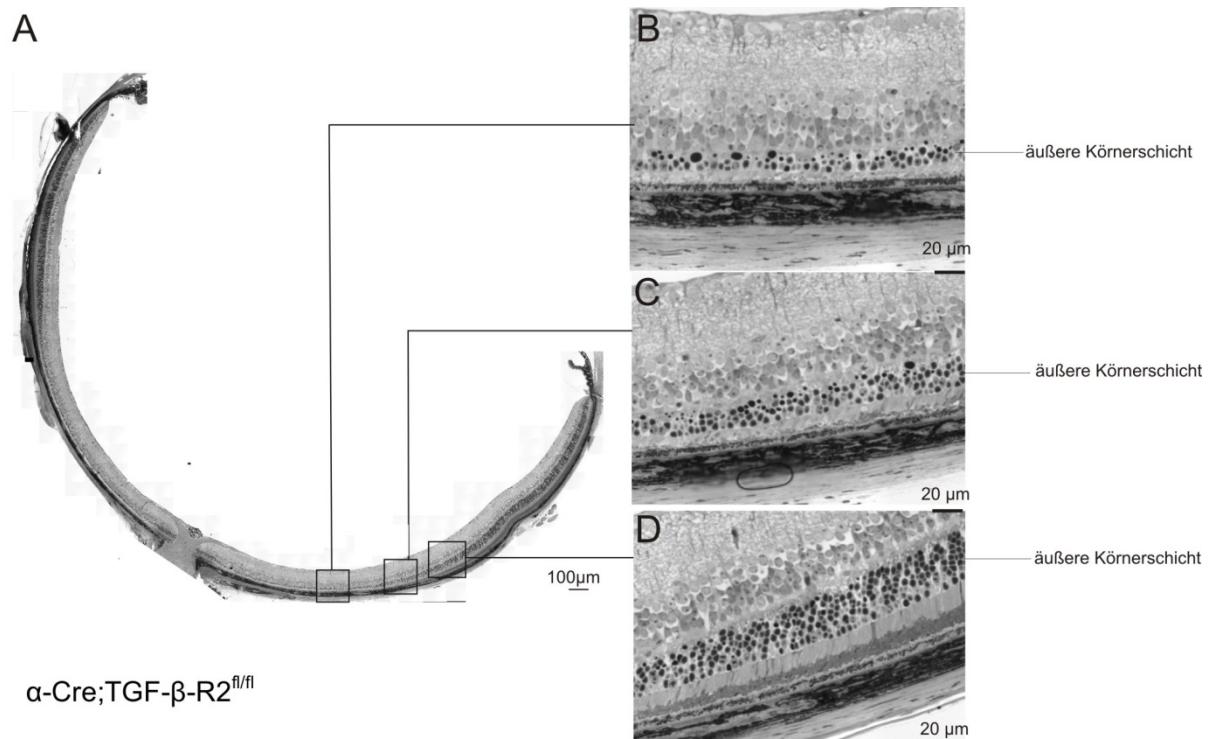


Abbildung 19: Panoramaaufnahme eines durch Lichtschaden veränderten Auges eines α -Cre;TGF- β -R2^{f/f} Tieres mit Vergrößerungen der Retina an verschiedenen Stellen.

Unter A ist eine Panoramaaufnahme eines α -Cre;TGF- β -R2^{f/f} Tieres nach dem Lichtschadensexperiment dargestellt. Unter B/C/D sind Vergrößerungen von papillär nach peripher der nasalen Retina abgebildet. Ein deutlicher Dickenunterschied in der äußeren Körnerschicht ist besonders zw. B und D zu finden.

Neben der Übersichtsaufnahme ist zusätzlich noch eine Vergrößerung der papillennahen Retina abgebildet, die die Retinaschichten im lichtgeschädigten Zustand zeigt. Die äußere Körnerschicht wurde durch die Lichtexposition geschädigt. Um die Ausprägung des gesetzten Schadens von Wildtyp und Knockout verifizieren zu können, wurde jeweils die Dicke der äußeren Körnerschichten von TGF- β -R2^{+/+} Tieren und α -Cre;TGF- β -R2^{f/f} Tieren vermessen. Die Vermessungsdaten sind in Form eines Spider-Diagrammes dargestellt. (s. Abb. 18)

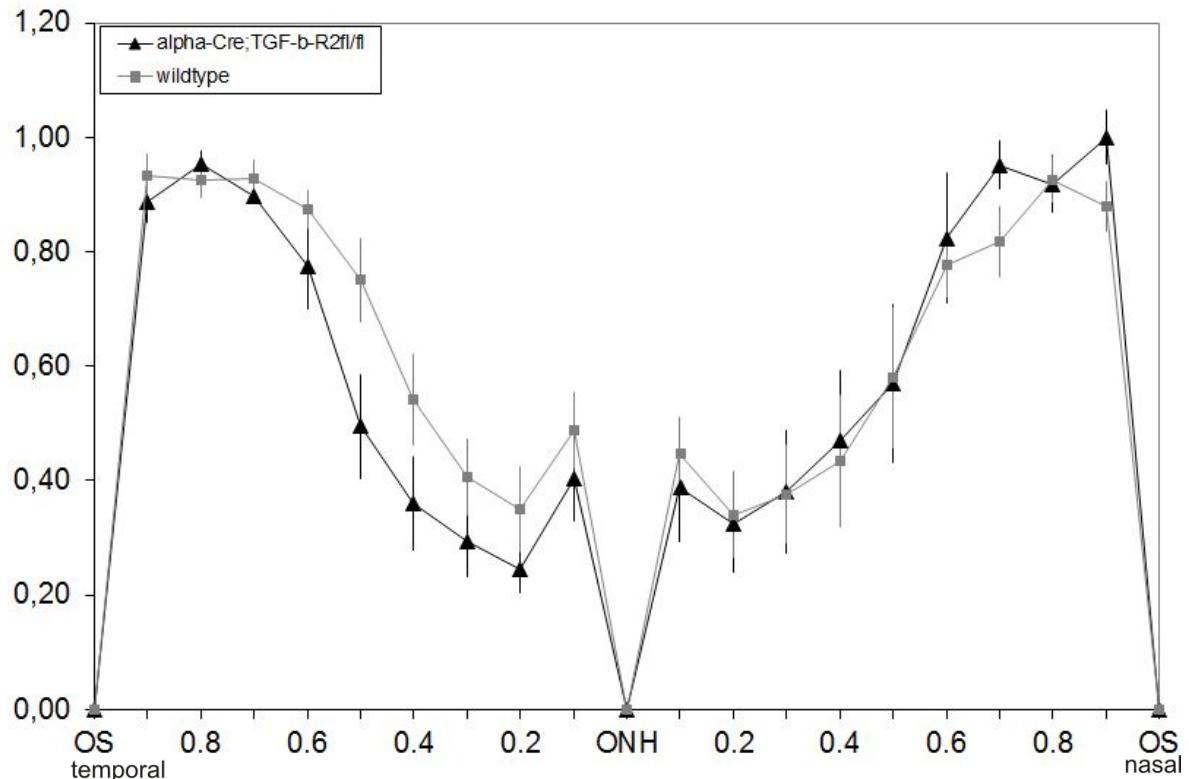


Abbildung 20: Dickenmessung der äußeren Körnerschicht für phototoxierte α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} und TGF- β -R2^{+/+} Tieren.

In dem Spiderdiagramm sind die Messergebnisse der Retinadicke für phototoxierte α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} und TGF- β -R2^{+/+} Tiere aufgetragen. Dabei ist zu erkennen, dass die temporale Seite der Retina von α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tieren deutlich dünner ist als die der TGF- β -R2^{+/+} Tiere. Nasal sind die Retinae des Wildtyps und des knockouts gleich stark geschädigt worden.

Die temporale Seite der Retina ist bei den α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tieren stärker geschädigt als die der TGF- β -R2^{+/+} Tieren. An einem Meßpunkt wurde ein signifikanter Unterschied für eine signifikante Retinaschädigung der α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tiere festgestellt. Die nasalen Seiten der Retinae von Wildtyp und Knockout sind in etwa gleich stark geschädigt.

III.4.2. Detektion phototoxiertes Zellapoptose mittels TUNEL-Untersuchung

Zur Detektion apoptosepositiver Zellen wurde den belichteten Versuchstieren 30 Stunden nach Lichtschaden die Augen entnommen und in Paraffin eingebettet. Apoptosepositive Zellen wurden mittels TUNEL-Färbung sichtbar gemacht. In

Abbildung 21 ist in der oberen Reihe die TUNEL-Färbung für α -Cre; TGF- β -R2^{fl/fl} gezeigt. Das erste Bild dieser Reihe zeigt das bei einer Wellenlänge von 495 nm angeregte GFP (green fluorescent protein) Fluorophor, welches an den DNA-Fragmenten apoptotischer Zellen hängt. Die DNA im Zellkern wurde mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht und ist im zweiten Bild der oberen Reihe in blau dargestellt. Im sich anschließenden dritten Bild ist die Überlagerung beider vorangegangenen Bilder abgebildet. Für die untere Reihe gilt die gleiche Reihenfolge und stellt die TUNEL-Färbung für ein TGF- β -R2^{+/+} Tier dar. Für α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tiere können im Vergleich zu TGF- β -R2^{+/+} vermehrt apoptotische Zellen detektiert werden. (s. Abb. 22) Bei der Auszählung konnte festgestellt werden, dass sich die TUNEL-positiven Zellen ausschließlich in der äußeren Körnerschicht befinden. Es handelt es sich folglich um apoptotische Photorezeptoren in der äußeren Körnerschicht.

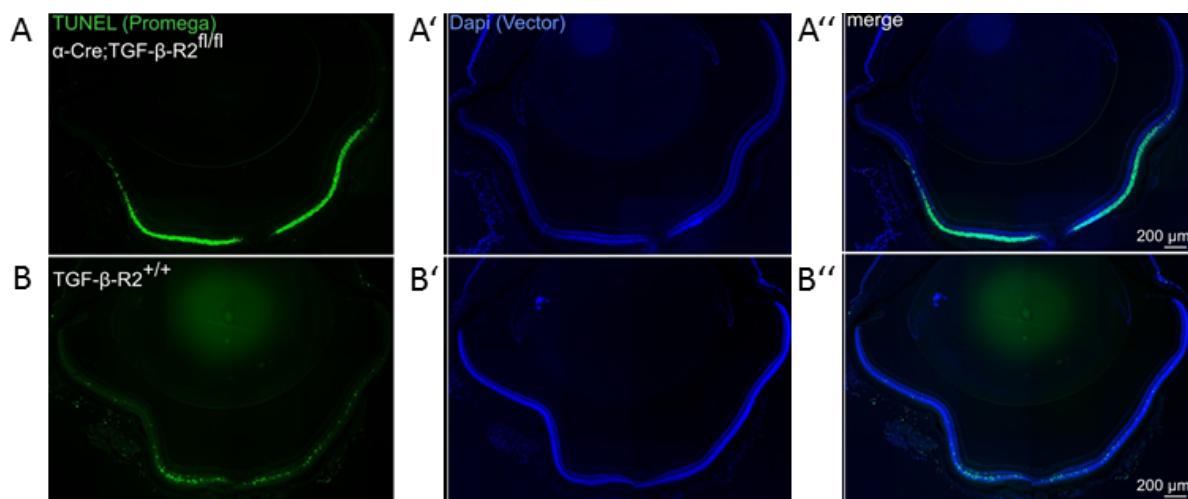


Abbildung 21: TUNEL-Färbung von α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} und TGF- β -R2^{+/+} Tieren. In der erste Reihe sind die Ergebnisse für α -Cre;TGF- β -R2^{fl/fl} Tiere abgebildet (A-A''). (A) Die TUNEL-Färbung zeigt eine starke Anreicherung in den Photorezeptoren der äußeren Körnerschicht. (A') Zusätzlich zur TUNEL-Färbung wurde eine Dapi-Färbung durchgeführt. Dadurch konnte die DNA der Zellen sichtbar gemacht werden. (A'') Überlagerung von (A) und (A'). In der zweiten Reihe sind die Ergebnisse für TGF- β -R2^{+/+} Tiere abgebildet (B-B''). Die Färbungen sind in derselben Reihenfolge wie unter (A-A'') dargestellt. (B) Es sind einige apoptotische Zellen in der äußeren Körnerschicht detektierbar.

Zur Quantifizierung der vermehrten Apoptose für α -Cre; TGF- β -R2^{fl/fl} Tiere wurden für eine statistische Analyse die apoptotischen Zellen mit dem katikati2-Zählprogramm für den Wildtyp und den Knockout ausgezählt. Außerdem wurde die

Gesamtfläche der äußeren Körnerschicht mittels AxioVison vermessen. Diese beiden Datenpunkte wurden ins Verhältnis zueinander gesetzt, woraus sich der Wert TUNEL positiver Zellen/mm² Retina ergab (Abb.22).

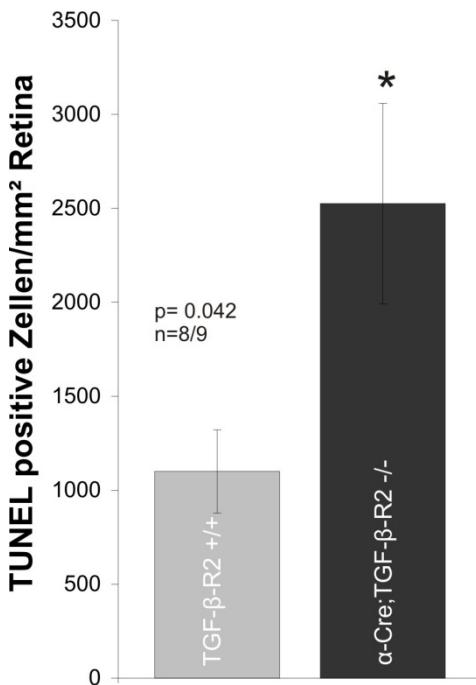


Abbildung 22: Quantitative Auszählung TUNEL-positiver Zellen von belichteten von α -Cre; TGF- β -R2^{fl/fl} und TGF- β -R2^{+/+} Tieren.

Die Quantifizierung TUNEL positiver Zellen/mm² ergibt eine signifikant höhere Apoptoserate von Zellen in der Retina von α -Cre; TGF- β -R2^{fl/fl} Tieren, im Vergleich mit TGF- β -R2^{+/+} Tieren. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, n=8/9, *p<0.05

Wie aus Abbildung 22 eindeutig hervorgeht, zeigen α -Cre; TGF- β -R2^{fl/fl} Tiere eine signifikant höhere Apoptoserate als TGF- β -R2^{+/+} Tiere. Der Wert für TUNEL positive Zellen/mm² Retina bei α -Cre; TGF- β -R2^{fl/fl} Tieren ist mehr als doppelt so hoch im Vergleich zu den TGF- β -R2^{+/+} Tieren.

IV. Diskussion

Im Verlauf dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Bedeutung der TGF- β -Signalweg bei lichtinduzierter Schädigung der Photorezeptoren von adulten Mäusen hat. Hierzu wurden an konditionellen TGF- β -R2 Mäusen Lichtschadensexperimente vorgenommen.

Für die vorliegende Arbeit wurden α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäuse verwendet, bei denen die gewebespezifische Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Pax6-Promotors exprimiert wird und das Gen für TGF- β -R2 mit zwei flankierenden loxP-Sequenzen vorliegt. Für Versuchstiere mit dem konditionellen Knockout für TGF- β -R2 hatte dies zur Folge, dass keine Proteinexpression von TGF- β -R2 in den Neuronen und den Müllerglia der Retina stattfindet. Die übrigen Organsysteme sind von dem Knockout nicht betroffen. S.Pielmeier führte in seiner Doktorarbeit Western Blot Analysen durch, um den konditionellen Knockout von TGF- β -R2 nachzuweisen. Hierbei fiel jedoch auf, dass bei den α -Cre;TGF- β -R2^{f/f} Tieren ein schwaches Signal für TGF- β -R2 zu erkennen ist (siehe Abbildung 9). Diese schwache Bande bei den α -Cre;TGF- β -R2^{f/f} Tieren kann dadurch erklärt werden, dass in einigen Zellen der Retina der Pax6-Promotor nicht aktiviert wird und die Cre-Rekombinase in diesen Zellen nicht exprimiert wird. Somit kommt es in diesen Zellen zu keinem konditionellen Knock out von TGF- β -R2 und der Rezeptor wird weiterhin exprimiert. Zu diesen Zellen zählen zum Beispiel Astrozyten und Endothelzellen. [52] Neben dem Nachweis von TGF- β -R2 wurde im Rahmen der Western Blot Analysen auch das Vorhandensein von den intrazellulären Signalproteinen pSmad 2 und pSmad 3 untersucht. Nachdem TGF- β an die TGF- β -Rezeptoren gebunden hat, wird Smad 2/3 von den Rezeptoren phosphoryliert. Nach der Phosphorylierung löst sich das aktivierte Regulatorprotein vom Rezeptor und bindet an Smad 4. Dieser Regulatorkomplex wandert in den Zellkern und reguliert die Expression von verschiedenen Zielproteinen. Smad2/3 leiten das TGF- β -Signal also intrazellulär weiter. Für TGF- β -R2^{+/+} Mäuse ergab sich ein Signal für pSmad 2 auf einer Höhe von 58kDa und für pSmad 3 bei 52 kDa. Bei α -Cre;TGF- β -R2^{f/f} Mäusen konnte jedoch nur ein Signal für pSmad 2 bei 58 kDa detektiert werden. Das Signal für pSmad 3 konnte nur sehr schwach nachgewiesen

werden. Das Signalprotein pSmad 2 kommt neben dem TGF- β -Signalweg auch noch in dem Activin-Signalweg vor. [39] Der Activin-Signalweg ist während der postnatalen Entwicklung aktiviert und bewirkt die korrekte Differenzierung der retinalen Vorläuferzellen in Photorezeptoren. [17] Das positive Signal von pSmad 2 bei dem α -Cre;TGF- β -R2^{f/f} Tier stammt demnach wahrscheinlich von der Aktivierung des Activin-Signalweges. [52] Das intrazelluläre Signalprotein pSmad 3 wird nur während des TGF- β -Signalweges aktiviert und zeigt bei dem konditionellen Knockout somit kaum Signal. [39] [52] Versuchstiere, mit dem soeben beschriebenen konditionellen Knockout, wurden für diese Arbeit verwendet.

In einem ersten Schritt wurden Analysen bezüglich der Phänotypen der ausgewachsenen α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäuse und der TGF- β -R2^{+/+} Wildtypen anhand von Semidünnschnitten durchgeführt, um die Morphologie beider Genotypen auf Unterschiede zu untersuchen. Dabei konnte in den Panoramaaufnahmen (siehe Abbildung 12) kein offensichtlicher Unterschied zwischen den Genotypen detektiert werden. Anschließend wurden morphometrische Analysen sowohl der inneren als auch der äußeren Körnerschicht der Netzhaut von Wildtyp und Knockout gemäß ihrer Dicke durchgeführt. Für die innere Körnerschicht, bestehend aus den Perikaryen der Bipolar-, Müller- und amakrinen Zellen, ließen sich für α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäuse signifikant unterschiedliche Messdatenpunkten auf der nasalen und temporalen Seite der inneren Körnerschicht erfassen. Die innere Körnerschicht dieser Tiere ist signifikant dünner als die der Wildtypen. Diese Beobachtung repräsentiert das Ergebnis vorangegangener Arbeiten, die belegen, dass die innere Körnerschicht der α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Tiere während der Embryonal- und Postnatalphase vermehrter Apoptose unterliegen. Durch den konditionellen Knockout von TGF- β -R2 kann der TGF- β -Signalweg in den retinalen Neuronen nicht angesteuert werden und somit fällt die neuroprotektive Funktion von TGF- β weg. [79] [52] In der vorliegenden Arbeit wurde nun gezeigt, dass sich dieses Ergebnis auch bei ausgewachsenen adulten Tieren widerspiegelt. Neben der morphologischen Untersuchung der inneren Körnerschicht von Wildtyp und Knockout wurde zusätzlich über ERG-Experimente die Funktionalität der inneren Körnerschicht untersucht, um herauszufinden, ob die dünneren Körnerschicht der α -Cre; TGF- β -

$R2^{fl/fl}$ Mäuse auch Einbußen auf funktionaler Ebene hat. [8] Der zu untersuchende Parameter des ERGs ist hierbei die b-Welle, da sie die Antwort auf den Lichtreiz darstellt, die von den Stäbchenbipolarzellen ausgeht, die sich in der inneren Körnerschicht befinden. [75] Für das dunkeladaptierte Einzelblitz-ERG konnte zw. den α -Cre; TGF- β -R2 $^{fl/fl}$ Mäusen und den TGF- β -R2 $^{+/+}$ Wildtypen kein Unterschied festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist insoweit nicht beunruhigend, weil das Ergebnis nur auf ein intaktes Stäbchensystem hinweist und keine Aussage über quantitative Unterschiede der Genotypen in der inneren Körnerschicht zulässt. Ein normaler Verlauf der b-Welle des dunkeladaptierten Einzelblitz-ERGs bei geringen Intensitäten weist lediglich darauf hin, dass die Stäbchen ON-Bipolarzellen von den Stäbchen angesteuert werden und dieses System somit intakt und funktionsfähig ist. [38] Bei stärkeren Intensitäten mischen sich Zapfenantworten zu den Stäbchenantworten auf den Lichtreiz. Aus diesem Grund wurden neben den dunkeladaptierten Einzel-ERGs noch helladaptierte Einzel-ERGs durchgeführt, die direktere Rückschlüsse auf das Zapfensystem zulassen. Über die ständige Hintergrundbeleuchtung ist das Stäbchensystem abgesättigt und die b-Welle spiegelt somit eine reine Zapfenantwort wieder. Zum Zapfensystem ist noch zu ergänzen, dass es in diesem System neben den depolarisierenden ON-Bipolarzellen auch noch sog. hyperpolarisierende OFF-Bipolarzellen gibt. [67] In dem Ausschlag der Amplitude ergab sich kein Unterschied zw. α -Cre; TGF- β -R2 $^{fl/fl}$ Mäusen und den TGF- β -R2 $^{+/+}$ Wildtypen und erlaubt somit einen Rückschluss auf eine intakte Zapfenfunktion. Für die Gipfelzeiten des helladaptierten Einzel-ERGs ergaben sich jedoch deutliche Unterschiede in der b-Welle von α -Cre; TGF- β -R2 $^{fl/fl}$ Mäusen und den TGF- β -R2 $^{+/+}$ Wildtypen. Die Gipfelzeiten waren zu allen Lichtintensitäten bei α -Cre; TGF- β -R2 $^{fl/fl}$ Mäusen deutlich verlängert, was auf eine Verschiebung der aktivierten ON-/ OFF-Bipolarzellen zurückzuführen ist. [8] Um diesen Aspekt weiter zu untersuchen, wurden dunkeladaptierte 15Hz-ERGs mit steigender Lichtintensität durchgeführt. Bei hohen Intensitäten ergab sich, dass Amplitude und Antwortphase von α -Cre; TGF- β -R2 $^{fl/fl}$ Mäusen und den TGF- β -R2 $^{+/+}$ sich nicht unterschieden. Bei schwächeren Lichtintensitäten fiel auf, dass sowohl die Amplitude flacher als auch die Antwortphase kürzer bei den α -Cre; TGF- β -R2 $^{fl/fl}$ Mäusen ausfiel. Diese Tatsache

ist auch auf Veränderungen der retinalen Signalweiterleitung in den aktivierten Zellen zurückzuführen. [8]

Bei der Vermessung der äußeren Körnerschicht, bestehend aus den Perikaryen der Photorezeptoren, des Wildtyps bzw. des Knockouts konnte festgestellt werden, dass die temporalen Seiten für beide Typen in etwa den gleichen Verlauf nehmen und sich annähern. Die temporalen Seiten der äußeren Körnerschicht von α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäusen ist auch hier dünner als die der Wildtypen und zeigen in einem Datenpunkt Signifikanz. Für die nasalen Seiten der äußeren Körnerschicht ergeben sich größere Unterschiede zwischen den transgenen Tieren und den Wildtypen. So konnten nasal drei Signifikanzpunkte erfasst werden, in denen die äußere Körnerschicht der α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäuse signifikant dünner ist als die der Wildtypen. Betrachtet man die beiden Ausläuferseiten (Papille und nasale *Ora Serrata*) der nasalen Retina, ist ersichtlich, dass sich beide Schichten wieder annähern. Die Photorezeptoren in der äußeren Körnerschicht machen in etwa 70 % der Gesamtsinneszellen aus. [77] [18] In der Literatur ist bekannt, dass etwa 5% der Photorezeptoren in der äußeren Körnerschicht während der Entwicklungsphase dem ontogenetischen Zelltod unterliegen. [13] [76] Somit stirbt nur ein vernachlässigbarer Anteil an Photorezeptoren während der Entwicklungsphase ab, was den geringen Unterschied zwischen der Dicke der äußeren Körnerschicht zwischen adulten α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäusen im Vergleich zu den adulten TGF- β -R2^{+/+} Mäusen erklärt.

Dem TGF- β -Signalweg wird in der Literatur sowohl eine apoptotische als auch eine nicht-apoptotische Funktion zugesprochen. [35] [62] [69] In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte bewiesen werden, dass sich der TGF- β -Signalweg in der Embryonal- und Postnatalphase neuroprotektiv auf die Entwicklung der Zellen der retinalen Ganglienzellen und Neurone der inneren Körnerschicht auswirkt. [52] Da nur 5% der Photorezeptoren in der äußeren Körnerschicht embryonaler/postnataler Apoptose unterliegen, wurden Lichtschadensexperimente mit adulten α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäusen und den TGF- β -R2^{+/+} Wildtypen durchgeführt, um den Einfluss des TGF- β -Signalweges auf die Photorezeptoren zu untersuchen. [13] [76] Starke Lichtexposition kann Apoptose in den Photorezeptoren der Retina verursachen. [1] Das Schadensmodell, bei dem die Versuchstiere kaltem,

weißem Licht ausgesetzt sind, ist in der Literatur weitläufig bekannt dafür, gute Ergebnisse bei der lichtinduzierten Schädigung der Photorezeptoren zu erzielen. [51] [37] [11] Der Grad der Photorezeptorschädigung durch Lichtschadensexperimente hängt neben der Lichtart und -stärke auch noch von weiteren Faktoren ab. [16] Zu diesen Faktoren gehört beispielsweise die Pigmentierung der Iris, der genetische Hintergrund, der Stresspegel, die zirkadiane Rhythmus und auch die Belichtungsdauer. [16] [54] [36] [73] [68] Für die Lichtschadensexperimente konnte für die α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäuse und die TGF- β -R2^{+/+} Wildtypen gezeigt werden, dass sich die Versuchstiere im RPE65 Leu450-Hintergrund befanden (siehe Abschnitt III.3.1). Diese Variante von RPE65 ermöglicht ein schnelleres Erholen vom Photobleichen, indem all-trans Retinol schneller in 11-cis-Retinal umgesetzt wird, so dass der Sehzyklus erneut ablaufen kann und ein Lichtreiz wieder an die Photorezeptoren wirken kann. [49] Die verwendeten Versuchstiere wurden 14 Tage nach den Lichtexperimenten abpräpariert. Laut Literatur sollte dies genügen, um eine deutlich reduzierte Zellanzahl in der äußeren Körnerschicht zu entwickeln. [21] In den Lichtschadensexperimenten konnte für die α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäuse ein stärkerer Lichtschaden auf der temporalen Seite der äußeren Körnerschicht festgestellt werden. Für die nasalen Seiten gleichen sich die Schädigungen der α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäuse und die TGF- β -R2^{+/+} Wildtypen an, in drei Datenpunkten ist der gesetzte Schaden der TGF- β -R2^{+/+} Wildtypen allerdings höher als in den α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäusen. Aus der Literatur geht hervor, dass die temporale Seite der Retina aufgrund der anatomischen Verhältnisse empfänglicher für das Setzen eines Lichtschadens ist. [53] [43] Damit kann das unterschiedliche Schadensniveau der nasalen und temporalen Seite erklärt werden. Eine weitere Erklärung für den generell verhältnismäßig geringen Schaden an den Photorezeptoren der α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäuse und dem ähnlichen Schadensverlauf des Wildtyps und Knockouts besteht in der Pigmentierung der Versuchstiere. [75] [24] Trotz hoher Belichtungsstärke von 14500 Lux konnte in den Semidünnschnitten nicht der Schadensumfang gesetzt werden, von dem angenommen wurde, dass man ihn bei den Experimenten mit α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäusen, die die RPE65 450Leu Variante besaßen, erreichen würde. Anscheinend schützt die Pigmentierung der Iris, trotz medikamentös induzierter Mydriasis, bei den vorgenommenen Belichtungen die Photorezeptoren

stärker, als angenommen. Bei den TUNEL Analysen stellt sich dieser Sachverhalt anders dar. Bei einer Wellenlänge von 495 nm wurde das GFP Fluorophor angeregt, welches an DNA-Fragmenten Apoptose-positiver Zellen eingebaut wurde. Die DNA wurde mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Unter Abbildung 21 ist jeweils die Flourescein- und DAPI-Färbung für ein α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Versuchstier zu sehen. Im Vergleich zum TGF- β -R2^{+/+} Wildtypen ist ein deutlicher Unterschied in der Apoptoserate der Photorezeptoren in der äußeren Körnerschicht sichtbar. Um die Apoptoserate weiter quantifizierbar zu machen, wurden die Apoptose-positiven Zellen mit einem Zählprogramm ausgezählt. Hierbei konnte bestätigt werden, dass der TGF- β -Signalweg neuroprotektiv auf adulte äußere Körnerschicht wirkt, die lichtinduziert geschädigt wurden. Bei der Auszählung konnte gezeigt werden, dass die α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäuse signifikant doppelt so viele Apoptose-positive Zellen aufweisen als die TGF- β -R2^{+/+} Wildtypen. (Abbildung 22) Das nicht so stark ausgeprägte Ergebnis bei den Ausmessungen der Semidünnschnitte kann damit erklärt werden, dass die TUNEL-Reaktionen die sensitivere Nachweismethode ist oder es eventuell durch die Belichtung zu Reparatur- oder Kompensationsmechanismen kam und sich somit 14 Tage nach Lichtschädigung keine meßbaren strukturellen Unterschiede fanden. [39] [52] [44]

Das Protein TGF- β erfüllt viele unterschiedliche Aufgaben und ist in den unterschiedlichsten Geweben und Zellen vertreten. So übernimmt das Protein die Regulation der Embryonalentwicklung, der Apoptose, der Zelldifferenzierung, der Differenzierung von Gewebe, der Hämatopoese, der Chemotaxis, der Immunabwehr und der Angiogenese. [9] [50] [69] In der medizinischen Forschung nimmt TGF- β eine bedeutende Rolle ein, weil dem Zytokin eine pathophysiologische Rolle bei der Tumorgenese [39] [5] und der Entstehung von kardialen Krankheitsbildern [10] zugesprochen wird. TGF- β rückt somit in den therapeutischen Fokus, um klinisch bei Therapieansätzen zur Vorbeugung und Verhinderung oder Verzögerung von Erkrankungen eingesetzt zu werden. Sog. neurotrophe Faktoren, die laut Kriegelstein et al. auf den TGF- β -Signalweg angewiesen sind, werden bereits eingesetzt um den Krankheitsfortschritt der Retinopathia pigmentosa zu verzögern. [26] In der vorliegenden Arbeit wurde versucht die neuroprotektive Wirkung von TGF- β an

lichtgeschädigten Photorezeptoren zu beweisen. Wegen den schwierig zu induzierenden Schäden bei pigmentierten Tieren, könnten die Lichtschadensexperimente mit Albino-Versuchstieren wiederholt werden, um die neuroprotektive Wirkung von TGF- β zu bekräftigen. In nachfolgenden Arbeiten könnte außerdem versucht werden, über einen konditionellen Knockout von Smad 7 in der Retina, die inhibierende Wirkung von Smad 7 auf TGF in der Signalkaskade aufzuheben und somit eine Verstärkung des TGF- β -Signalweges zu erreichen. Über Smads wird in der TGF- β -Signalkaskade das intrazelluläre Signal weitergeleitet. Smad 7 und 6 gehören zu den sog. inhibierenden Smads, die die Signalkaskade von TGF- β dämpfen. [57] [31] Über an diesen Tieren durchgeführten Lichtschadensexperimente könnte nun die neuroprotektive Wirkung von TGF- β indirekt bewiesen werden, indem es durch den Ausfall von Smad 7 zu einer Signalverstärkung von TGF- β käme. Ebenso könnte in der Zellkultur die Wirkung von TGF- β auf Neurone untersucht werden, um den protektiven Effekt von TGF- β zu bekräftigen.

V. Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war es, im Rahmen von Lichtschadensexperimenten die Funktion des TGF- β -Signalweges in den Photorezeptoren zu untersuchen. Dazu wurden Versuchstiere verwendet, die in allen Zellen der Retina, die vom inneren Blatt des Augenbechers abstammen, einen konditionellen Knockout für TGF- β -Rezeptor-2 aufwiesen und sich zusätzlich im RPE65 Leu-Hintergrund befanden. In morphometrischen Analysen unbehandelter Tieren konnte über Semidünnschnittanalyse festgestellt werden dass die innere Körnerschicht der adulten α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäuse signifikant dünner ist als die innere Körnerschicht der TGF- β -R2^{+/+} Wildtypen als Folge der gesteigerten embryonalen/ postnatalen Apoptoserate. [79] [52]

Der TGF- β -Signalweg wird bezüglich seiner apoptotischen bzw. antiapoptotischen Funktion in der Literatur gegensätzlich diskutiert. [35] [62] [69] In Bezug auf die Photorezeptoren konnte in den TUNEL-Analysen der vorliegenden Arbeit eine eindeutige protektive Wirkung für den TGF- β -Signalweg nach Lichtschaden festgestellt werden. Hierbei wiesen die konditionellen Knockoutmäuse, α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäuse, eine doppelt so hohe Apoptoserate der Photorezeptoren auf als die TGF- β -R2^{+/+} Wildtypen. In den morphometrischen Analysen der Semidünnschnitte nach Lichtschaden konnte dieser Beweis nicht eindeutig erbracht werden. Hierbei war die temporale äußere Körnerschicht der α -Cre; TGF- β -R2^{f/f} Mäuse zwar dünner als die der Wildtypen, allerdings lagen die Werte nicht im signifikant unterschiedlichen Bereich. Für die nasale Seite ergab sich ein ähnlicher Verlauf. Dies ist unter Umständen auf die Pigmentierung der Versuchstiere zurückzuführen und die damit einhergehende höhere Resistenz gegenüber Lichtschaden.

VI. Anhang

VI.1. Literaturverzeichnis

- [1] Abler AS., Chang CJ., Ful J, Tso MO., Lam TT. (1996) Photic injury triggers apoptosis of photoreceptor cells. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 92:177–189.
- [2] Abremski K, Hoess R (1984) Bacteriophage P1 site-specific recombination. Purification and properties of the Cre recombinase protein. *J. Biol. Chem.* 259:1509–1514.
- [3] Ainsworth SK., Ito S, Karnovsky MJ. (1972) Alkaline bismuth reagent for high resolution ultrastructural demonstration of periodate-reactive sites. *J. Histochem. Cytochem.* 20:995–1005.
- [4] Alberts B (2011) Molekularbiologie der Zelle, 5th edn. Wiley-VCH, Weinheim.
- [5] Attisano L, Wrana JL. (2002) Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 296:1646–1647.
- [6] Augustin AJ. (2007) Augenheilkunde. Mit 144 Tabellen, 3rd edn. Springer, Berlin ;, Heidelberg, New York, NY.
- [7] Aumüller G (2010) Anatomie. 208 Tabellen ; [mit DVD zum Präp.-Kurs], 2nd edn. Thieme, Stuttgart.
- [8] Barbara M. Braunger Stefan Pielmeier Cora Demmer Victoria Landstorfer Daniela Kawall Ingo Kleiter Dietmar Fischer Herbert Jägle and Ernst R. Tamm (2013) TGF- β signaling protects retinal neurons from ontogenetic cell death during development. *J. Neurosci.* 28;33(35):14246-58. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0991-13.2013.
- [9] Böttner M, Kriegstein K, Unsicker K (2000) The transforming growth factor-betas: structure, signaling, and roles in nervous system development and functions. *J. Neurochem.* 75:2227–2240.
- [10] Bujak M, Frangogiannis NG. (2007) The role of TGF-beta signaling in myocardial infarction and cardiac remodeling. *Cardiovasc. Res.* 74:184–195.

- [11] Bush RA., Remé CE., Malnoë A (1991) Light damage in the rat retina: the effect of dietary deprivation of N-3 fatty acids on acute structural alterations. *Exp. Eye Res.* 53:741–752.
- [12] Campbell NA., Reece JB., Markl J (2003) Biologie, 6th edn. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg [u.a.].
- [13] Cepko CL., Austin CP., Yang X, Alexiades M, Ezzeddine D (1996) Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:589–595.
- [14] Chytil A, Magnuson MA., Wright CV. E., Moses HL. (2002) Conditional inactivation of the TGF-beta type II receptor using Cre:Lox. *Genesis* 32:73–75.
- [15] Cortina MSoledad, Gordon WC., Lukiw WJ., Bazan NG. (2003) DNA repair in photoreceptor survival. *Mol. Neurobiol.* 28:111–122.
- [16] Danciger M, Lyon J, Worrill D, Hoffman S, Lem J, Reme CE., Wenzel A, Grimm C (2004) New retinal light damage QTL in mice with the light-sensitive RPE65 LEU variant. *Mammalian Genome* 15:277–283.
- [17] Davis AA., Matzuk MM., Reh TA. (2000) Activin A promotes progenitor differentiation into photoreceptors in rodent retina. *Mol. Cell. Neurosci.* 15:11–21.
- [18] Dräger UC., Olsen JF. (1980) Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *J. Comp. Neurol.* 191:383–412.
- [19] Eagle RC. (2011], ©2011) Eye pathology. An atlas and text, Second edition. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- [20] Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. (1992) Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119:493–501.
- [21] Gordon WC., Casey DM., Lukiw WJ., Bazan NG. (2002) DNA damage and repair in light-induced photoreceptor degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43:3511–3521.
- [22] Gray H, Clemente CD. (1985) Anatomy of the human body, 30th edn. Lea & Febiger, Philadelphia.

- [23] Grimm C, Remé CE., Rol PO., Williams TP. (2000) Blue light's effects on rhodopsin: photoreversal of bleaching in living rat eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41:3984–3990.
- [24] Guo Y, Yao G, Lei B, Tan J (2008) Monte Carlo model for studying the effects of melanin concentrations on retina light absorption. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 25:304–311.
- [25] Hamel C (2006) Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis* 1:40.
- [26] Hartong DT., Berson EL., Dryja TP. (2006) Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368:1795–1809.
- [27] Heldin C, Moustakas A (2012) Role of Smads in TGF β signaling. *Cell Tissue Res.* 347:21–36.
- [28] Hick C, Hartmann J (2006) Intensivkurs Physiologie, 5th edn. Elsevier, Urban & Fischer, München [u.a.].
- [29] Hisatomi T, Sakamoto T, Murata T, Yamanaka I, Oshima Y, Hata Y, Ishibashi T, Inomata H, Susin SA., Kroemer G (2001) Relocalization of apoptosis-inducing factor in photoreceptor apoptosis induced by retinal detachment in vivo. *Am. J. Pathol.* 158:1271–1278.
- [30] Huang F, Chen Y (2012) Regulation of TGF- β receptor activity. *Cell Biosci* 2:9.
- [31] Itoh S, Dijke P ten (2007) Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19:176–184.
- [32] Jin M, Li S, Moghrabi WN., Sun H, Travis GH. (2005) Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium. *Cell* 122:449–459.
- [33] Kernt M, Thiele S, Hirneiss C, Neubauer AS., Lackerbauer C, Ulbig MW., Kampik A (2011) Altersbedingte Makuladegeneration: die Rolle von Licht bei der Entstehung degenerativer Veränderungen im menschlichen RPE und möglicher Zell-Schutz durch Minocyclin. *Klin Monbl Augenheilkd* 228:892–899.
- [34] Klinke R, Silbernagl S (2010) Physiologie, 6th edn. G. Thieme, Stuttgart.
- [35] Kriegstein K, Strelau J, Schober A, Sullivan A, Unsicker K (2002) TGF-beta and the regulation of neuron survival and death. *J. Physiol. Paris* 96:25–30.
- [36] LaVail MM., Gorin GM. (1987) Protection from light damage by ocular pigmentation: analysis using experimental chimeras and translocation mice. *Exp. Eye Res.* 44:877–889.

- [37] LaVail MM., Gorrin GM., Repaci MA., Yasumura D (1987) Light-induced retinal degeneration in albino mice and rats: strain and species differences. *Prog. Clin. Biol. Res.* 247:439–454.
- [38] M. Bach UKellner Elektrophysiologische Diagnostik in der Ophthalmologie. *Der Ophthalmologe* 2000:898–920.
- [39] Massagué J (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 67:753–791.
- [40] Metzger D Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr Opin Biotechnol.* 1999:470-6.
- [41] Miramar MD., Costantini P, Ravagnan L, Saraiva LM., Haouzi D, Brothers G, Penninger JM., Peleato ML., Kroemer G, Susin SA. (2001) NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J. Biol. Chem.* 276:16391–16398.
- [42] Moiseyev G, Chen Y, Takahashi Y, Wu BX., Ma J (2005) RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:12413–12418.
- [43] Montalbán-Soler L, Alarcón-Martínez L, Jiménez-López M, Salinas-Navarro M, Galindo-Romero C, Bezerra Sá F de, García-Ayuso D, Avilés-Trigueros M, Vidal-Sanz M, Agudo-Barriuso M, Villegas-Pérez MP. (2012) Retinal compensatory changes after light damage in albino mice. *Mol. Vis.* 18:675–693.
- [44] Moustakas A, Heldin C (2005) Non-Smad TGF-beta signals. *J. Cell. Sci.* 118:3573–3584.
- [45] Mullins RF., Russell SR., Anderson DH., Hageman GS. (2000) Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J.* 14:835–846.
- [46] Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1:263–273.
- [47] Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99–109.

- [48] Noell WK., Walker VS., Kang BS., Berman S (1966) Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol* 5:450–473.
- [49] Nusinowitz S, Nguyen L, Radu R, Kashani Z, Farber D, Danciger M (2003) Electrotoretinographic evidence for altered phototransduction gain and slowed recovery from photobleaches in albino mice with a MET450 variant in RPE65. *Exp. Eye Res.* 77:627–638.
- [50] Oshima M, Oshima H, Taketo MM. (1996) TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol.* 179:297–302.
- [51] Penn JS., Williams TP. (1986) Photostasis: regulation of daily photon-catch by rat retinas in response to various cyclic illuminances. *Exp. Eye Res.* 43:915–928.
- [52] Pielmeier S Der Einfluss des TGF-beta Signalwegs auf den ontogenetischen Zelltod in der Retina [Diss.]. [Regensburg]: Universität Regensburg; 2012.
- [53] Raad S de, Szczesny PJ., Munz K, Remé CE. (1996) Light damage in the rat retina: glial fibrillary acidic protein accumulates in Müller cells in correlation with photoreceptor damage. *Ophthalmic Res.* 28:99–107.
- [54] Rapp LM., Williams TP. (1980) The role of ocular pigmentation in protecting against retinal light damage. *Vision Res.* 20:1127–1131.
- [55] Remé CE. (2005) The dark side of light: rhodopsin and the silent death of vision the proctor lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46:2671–2682.
- [56] Remé CE., Grimm C, Hafezi F, Wenzel A, Williams TP. (2000) Apoptosis in the Retina: The Silent Death of Vision. *News Physiol. Sci.* 15:120–124.
- [57] Ross S, Hill CS. (2008) How the Smads regulate transcription. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40:383–408.
- [58] Samardzija M, Wenzel A, Naash M, Remé CE., Grimm C (2006) Rpe65 as a modifier gene for inherited retinal degeneration. *Eur. J. Neurosci.* 23:1028–1034.
- [59] Sancho-Pelluz J, Arango-Gonzalez B, Kustermann S, Romero F Javier, van Veen T, Zrenner E, Ekström P, Paquet-Durand F (2008) Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Mol. Neurobiol.* 38:253–269.

- [60] Sauer B, Henderson N (1989) Cre-stimulated recombination at loxP-containing DNA sequences placed into the mammalian genome. *Nucleic Acids Res.* 17:147–161.
- [61] Sauer B, Henderson N (1990) Targeted insertion of exogenous DNA into the eukaryotic genome by the Cre recombinase. *New Biol.* 2:441–449.
- [62] Schuster N, Kriegstein K (2002) Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res.* 307:1–14.
- [63] Shahinfar S, Edward DP., Tso MO. (1991) A pathologic study of photoreceptor cell death in retinal photic injury. *Curr. Eye Res.* 10:47–59.
- [64] Sternberg N, Hamilton D (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J. Mol. Biol.* 150:467–486.
- [65] Stockman A, Sharpe LT., Zrenner E, Nordby K (1991) Slow and fast pathways in the human rod visual system: electrophysiology and psychophysics. *J Opt Soc Am A* 8:1657–1665.
- [66] Strelau J, Böttner M, Lingor P, Suter-Cazzolara C, Galter D, Jaszai J, Sullivan A, Schober A, Kriegstein K, Unsicker K (2000) GDF-15/MIC-1 a novel member of the TGF-beta superfamily. *J. Neural Transm. Suppl.*:273–276.
- [67] Trepel M (2011) *Neuroanatomie. Struktur und Funktion - mit Zugang zum Elsevier-Portal*, 5th edn. Urban & Fischer in Elsevier, München.
- [68] Vaughan DK., Nemke JL., Fliesler SJ., Darrow RM., Organisciak DT. (2002) Evidence for a circadian rhythm of susceptibility to retinal light damage. *Photochem. Photobiol.* 75:547–553.
- [69] Walshe TE., Saint-Geniez M, Maharaj AS. R., Sekiyama E, Maldonado AE., D'Amore PA. (2009) TGF-beta is required for vascular barrier function, endothelial survival and homeostasis of the adult microvasculature. *PLoS ONE* 4:e5149.
- [70] Walther C, Gruss P (1991) Pax-6, a murine paired box gene, is expressed in the developing CNS. *Development* 113:1435–1449.
- [71] Welsch U (2010) *Lehrbuch Histologie*, 3rd edn. Elsevier, Urban & Fischer, München.

- [72] Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, Remé CE. (2005) Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 24:275–306.
- [73] Wenzel A, Reme CE., Williams TP., Hafezi F, Grimm C (2001) The Rpe65 Leu450Met variation increases retinal resistance against light-induced degeneration by slowing rhodopsin regeneration. *J. Neurosci.* 21:53–58.
- [74] Williams RA., Howard AG., Williams TP. (1985) Retinal damage in pigmented and albino rats exposed to low levels of cyclic light following a single mydriatic treatment. *Curr. Eye Res.* 4:97–102.
- [75] Wu J, Seregard S, Algvere PV. (2006) Photochemical damage of the retina. *Surv Ophthalmol* 51:461–481.
- [76] Young RW. (1984) Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J. Comp. Neurol.* 229:362–373.
- [77] Young RW. (1985) Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse. *Brain Res.* 353:229–239.
- [78] Zeiss CJ. (2003) The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet. Pathol.* 40:481–495.
- [79] Demmer Cora. (2012) Programmierter Zelltod in der Retina von α -Cre;TGF- β -R2fl/fl und α -Cre;Smad7fl/fl Mäusen während ihrer Embryonalentwicklung. [Diss.]. [Regensburg]: Universität Regensburg; 2012.

VI.2. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: AUFBAU DES WIRBELTIERAUGES	1
ABBILDUNG 2: SCHNITT DURCH DIE NETZHAUT.....	4
ABBILDUNG 3: VEREINFACHTE DARSTELLUNG DES SEHZYKLUS.....	8
ABBILDUNG 4: REPRÄSENTATIVE MITGLIEDER DER TGF-B SUPERFAMILIE.....	10
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES TGF-B SIGNALWEGES.....	11
ABBILDUNG 6: DAS ERGEBNIS DER CRE-LOX-REKOMBINATION IST DURCH DIE ORIENTIERUNG UND POSITION DER FLANKIERENDEN LOXP-SEQUENZEN FESTGELEGT.....	12
ABBILDUNG 7: GEWEBESPEZIFISCHE CRE-LOX REKOMBINATION.	13
ABBILDUNG 8: NETZHAUT VON PATIENTEN MIT RETINOPATHIA PIGMENTOSA.....	17
ABBILDUNG 9: VERMESSUNG DER AMPLITUDE UND DER GIPFELZEIT FÜR DIE A-UND B-WELLE.	43
ABBILDUNG 10: WESTERN BLOT ZUM NACHWEIS VON TGF-B-R2, pSMAD2 UND pSMAD3 IN DER NETZHAUT VON A-CRE;TGF-B-R2 ^{FL/FL} UND TGF-B-R2 ^{+/+} MÄUSEN.....	45
ABBILDUNG 11: REPRÄSENTATIVES BEISPIEL EINER PCR ZUM NACHWEIS DER MÖGLICHEN RPE-65 GENVARIANTEN.	46
ABBILDUNG 12: PANORAMABILDER DER SEMIDÜNSCHNITTE VON UNBELICHTETEN A-CRE;TGF-B-R2 ^{FL/FL} UND TGF-B-R2 ^{+/+} TIEREN.	47
ABBILDUNG 13: VERGRÖßERTE AUFNAHME DER RETINAE VON UNBELICHTETEN A-CRE;TGF-B-R2 ^{FL/FL} UND TGF-B-R2 ^{+/+} TIEREN. 48	48
ABBILDUNG 14: DICKENMESSUNG DER INNEREN KÖRNERSCHICHT FÜR A-CRE;TGF-B-R2 ^{FL/FL} UND TGF-B-R2 ^{+/+} TIEREN.	49
ABBILDUNG 15: DICKENMESSUNG DER ÄUßEREN KÖRNERSCHICHT FÜR A-CRE;TGF-B-R2 ^{FL/FL} UND TGF-B-R2 ^{+/+} TIEREN.	50
ABBILDUNG 16: AUSWERTUNG DER DUNKELADAPTIERTEN EINZELBLITZ-ELEKTORETIINOGRAMME.	52
ABBILDUNG 17: AUSWERTUNG DES HELLADAPTIERTEN EINZELBLITZ-ERGS FÜR DIE ZAPFEN.	53
ABBILDUNG 18: AUSWERTUNG DER 15 Hz - ERGS.	54
ABBILDUNG 19: PANORAMAAUFAHME EINES DURCH LICHTSCHADEN VERÄNDERTEN AUGES EINES A-CRE;TGF-B-R2 ^{FL/FL} TIERES MIT VERGRÖßERUNGEN DER RETINA AN VERSCHIEDEN STELLEN.	56
ABBILDUNG 20: DICKENMESSUNG DER ÄUßEREN KÖRNERSCHICHT FÜR PHOTOTOXIERTE A-CRE;TGF-B-R2 ^{FL/FL} UND TGF-B-R2 ^{+/+} TIEREN.....	57
ABBILDUNG 21: TUNEL-FÄRBUNG VON A-CRE;TGF-B-R2 ^{FL/FL} UND TGF-B-R2 ^{+/+} TIEREN.	58
ABBILDUNG 22: QUANTITATIVE AUSZÄHLUNG TUNEL-POSITIVER ZELLEN VON BELICHTETEN VON A-CRE;TGF-B-R2 ^{FL/FL} UND TGF-B-R2 ^{+/+} TIEREN.	59

VI.3. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: REAGENZIENLISTE	20
TABELLE 2: ENZYME	21
TABELLE 3: KITS	21
TABELLE 4: VERBRAUCHSMATERIALIEN	22
TABELLE 5: GERÄTE	23
TABELLE 6: PUFFER UND LÖSUNGEN	24
T	25
TABELLE 8: MASTERMIX CRE-PCR FÜR EINEN ANSATZ	27
TABELLE 9: MASTERMIX CRE-PCR FÜR EINEN ANSATZ	27
TABELLE 10: MASTERMIX TGF- β -R2 PCR FÜR EINEN ANSATZ	28
TABELLE 11: PCR-PROGRAMM TGF- β -R2	28
TABELLE 12: MASTERMIX RPE65 - LEU450MET PCR FÜR EINEN ANSATZ	29
TABELLE 13: PCR-PROGRAMM ZUM NACHWEIS DER RPE65-LEU450MET VARIANTE	30
TABELLE 14: STANDARD-RESTRIKTIONANSATZ RPE65-LEU450MET VARIANTE	30
TABELLE 15: EINBETTPROGRAMM PARAFFIN	32
TABELLE 16: ABFOLGE DER ENTPARAFFINISIERUNG	34
TABELLE 17: TUNEL-REAKTION	35
TABELLE 18: ENTWÄSSERUNG ZUR EPONEINBETTUNG	36
TABELLE 19: EPONEINBETTUNG	37

Danksagung

Nach ca. dreijähriger intensiver Arbeit ist meine Dissertation nun beendet und es ist an der Zeit mich bei denjenigen zu bedanken, die mich bei dieser herausfordernden und intensiven Phase meiner akademischen Laufbahn begleitet haben. Meine Dissertation hat mich fachlich, aber vor allem menschlich unheimlich bereichert.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Professor Ernst Tamm verpflichtet, der mir in seiner Arbeitsgruppe diese Dissertation ermöglicht hat.

Bei Frau PD Dr. Dr. Barbara Braunger kann ich mich gar nicht genug bedanken. Du hast mir den Zugang zum wissenschaftlichen Arbeiten ermöglicht und mich durch Deine immerwährende Motivation angetrieben nicht aufzugeben. Ich danke Dir auch für die vielen fachlichen und auch privaten Gespräche in der Dunkeladaptation zu meinen Versuchen. Barbara, es war eine anstrengende, intensive und doch so bereichernde Zeit im Labor für mich. Ich bin so froh darüber, dass ich damals Dein Angebot im Situskurs, meine Dr.-Arbeit bei Dir durchzuführen, angenommen habe. Ich habe dadurch nicht nur einen Einblick in die Wissenschaft erlangt sondern auch eine liebe Freundin gefunden. Vielen herzlichen Dank dafür!

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Professorin Charlotte Wagner für die Erstellung des Zweitgutachtens meiner Dissertation.

Meinem Laborkollegen und Dr.-Arbeit –Kumpanen Dr.med. Stephan Pielmeier danke ich für die ausdauernde und sorgfältige Einarbeitung im Labor! Du hast mir nie das Gefühl gegeben ein hoffnungsloser Fall zu sein! Vielen Dank dafür!

Meiner lieben Freundin Sarah Leimbeck möchte ich auf diesem Wege ein riesengroßes Dankeschön dafür sagen, dass wir in unseren Doktorarbeiten alles genauso gemacht haben wie auch sonst. Jeder macht irgendwie sein Ding und doch gemeinsam. Sarah, das war einfach nur schön.

Den restlichen Kollegen am Lehrstuhl danke ich für diverse Hilfestellungen und Unterstützung bei meinen Startschwierigkeiten im Labor. Ganz besonderem Dank gebührt Elke Stauber. Im Labor habe ich mich hin und wieder etwas orientierungslos und allein gefühlt. Du, liebe Elke hast mich immer aufgefangen. Du bist eine tolle Frau, die mich tief beeindruckt hat und von der ich unheimlich viel lernen konnte. Lieben Dank auch an Angelika Pach, Silvia Babl und Margit Schimmel für Eure Geduld am Mikroskop und bei der Unterstützung der Erstellung meiner Semidünnschnitte. Bei Euch hatte ich besonders viel Spaß!

Und zum Schluss die beiden wichtigsten Menschen in meinem Leben. Meine liebe Seelenverwandte Katharina. Ich danke Dir für alles. Ohne Dich wäre ich heute nicht da, wo ich bin und der Mensch, der ich bin. Und ich meine nicht nur die Dr.-Arbeit. Meinem lieben Freund Peter danke ich von ganzem Herzen, dass er diesen ganzen Quatsch mitgemacht hat und nie aufgehört hat an mich zu glauben und mir den Rücken zu stärken. Ihr beide seid etwas ganz Besonderes für mich.

Eidesstattliche 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.

Regensburg, den 17.07.2015

Daniela Kawall