

**Analyse der Apoptosemechanismen bei X-chromosomaler Retinitis pigmentosa (XLRP) am Mausmodell BJ6.sv129-Rpgr<sup>tm1sti</sup>**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Kronfeldner, Anne

aus Landshut

Gießen 2014

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Uniklinikum

Gießen & Marburg GmbH, Standort Gießen (Direktorin: Univ. - Prof. Dr. Birgit Lorenz)

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Stieger

Gutachter: Prof. Dr. Müller

Tag der Disputation: 09.07.2015

# Inhalt

Inhalt.....	i
1 Hinführung.....	v
2 Einleitung.....	1
2.1 Das Auge .....	1
2.2 Retinitis Pigmentosa .....	4
2.3 X-chromosomal rezessive Form der Retinitis pigmentosa.....	5
2.4 Tiermodelle der XLRP .....	9
2.4.1 Mausmodelle verschiedener Arbeitsgruppen .....	9
2.4.2 Mausmodell B6J.Sv129-Rpgr <sup>tm1sti</sup> .....	12
2.5 Apoptose.....	17
2.5.1 Allgemeine Mechanismen der Apoptose .....	17
2.5.2 Apoptosemechanismen speziell bei Photorezeptoren .....	22
2.6 Zielsetzung.....	24
3 Material und Methoden.....	25
3.1 Material.....	25
3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	25
3.1.2 Enzyme und Marker .....	26
3.1.3 Primer .....	27
3.1.4 Geräte .....	28
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	28

## Inhalt

3.2.1	Primerdesgin.....	28
3.2.2	RNA Extraktion.....	29
3.2.3	RNA Qualitätskontrolle.....	30
3.2.4	Reverse Transkription .....	31
3.2.5	Quantitative PCR.....	32
3.2.6	Berechnung mittels $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .....	34
3.2.7	Gelelektrophorese.....	34
3.3	Immunhistochemische Methoden.....	35
3.3.1	Kryoschnitte .....	35
3.3.2	Tunel-Assay .....	35
3.3.3	Auswertung .....	37
4	Ergebnisse .....	38
4.1	Projekt der Arbeit .....	38
4.2	Primer .....	39
4.3	Primeroptimierung.....	40
4.3.1	Zusammensetzung des PCR Ansatzes.....	40
4.3.2	Optimale Temperaturen.....	41
4.3.3	Lineare Quantifizierung .....	41
4.4	RNA.....	42
4.4.1	Präparation und Aufbewahrung der Mäuseaugen .....	42
4.4.2	mRNA Isolation und Qualitätskontrolle .....	42
4.4.3	Reverse Transkription .....	44

## Inhalt

4.5	qPCR.....	44
4.5.1	Ablauf.....	44
4.5.2	Ergebnisse der qPCR.....	47
4.5.3	Zusammenfassung der qPCR Ergebnisse.....	61
4.6	Tunel Assay .....	63
4.6.1	Ablauf.....	63
4.6.2	Auswertung .....	65
5	Diskussion.....	68
5.1	Interpretation der qPCR Ergebnisse .....	69
5.2	Interpretation der morphologischen Untersuchung .....	75
5.3	Korrelation der qPCR und morphologischen Ergebnissen.....	78
5.4	Auffällige Ergebnisse der heterozygoten Tiere .....	79
5.5	Ausblick.....	81
6	Zusammenfassung.....	83
7	Summary .....	84
8	Verzeichnisse .....	85
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	85
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	88
8.3	Tabellenverzeichnis .....	91
9	Literaturverzeichnis .....	92
10	Anhang .....	101
10.1	qPCR Ansätze.....	101

## Hinführung

10.2	RNA Qualitätskontrolle .....	105
10.3	PCR-Array für Apoptose .....	107
11	Publikationsverzeichnis.....	110
12	Erklärung zur Dissertation .....	111
13	Danksagung .....	112

# 1 Hinführung

In dieser Arbeit wurde der Zelluntergang der Photorezeptoren bei X-chromosomal vererbter Retinitis pigmentosa am Tiermodell in einer Expressionsanalyse untersucht und mittels Zelltodassay morphologisch dargestellt. Dem Begriff der Retinitis pigmentosa wird eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit Degeneration der Photorezeptoren zugeordnet, die schleichend beginnend im Endstadium zur Erblindung führt. Die X-chromosomal vererbte Form zeigt sich mit einem besonders schwerwiegenden Verlauf. In der Arbeitsgruppe experimentelle Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus Liebig Universität Gießen wurde in vorherigen Arbeiten ein Mausmodell generiert, welches durch eine gezielte Genmutation eine retinale Degeneration, gleich der beim Menschen auftretenden X-chromosomalen Retinitis pigmentosa, entwickelt. Das Ziel dieser Arbeit war an diesem Tiermodell den Zelluntergang der Photorezeptoren darzustellen. In der Einleitung wird zunächst die Anatomie des Auges und der Retina detailliert beschrieben, weiter werden die Erkrankung und schon in der Literatur bekannte Tiermodelle der X-chromosomalen Retinitis pigmentosa erläutert. Ebenso wird der bis zu diesem Zeitpunkt in der Literatur bekannte Ablauf der Apoptose als vermuteter Mechanismus des Zellunterganges der Photorezeptoren dargestellt.

Im ersten Ergebnissteil wird eine Expressionsanalyse mit dreizehn verschiedenen apoptotischen Genen, die im zeitlichen Verlauf (3-21 Monaten) auf ihre mögliche Beteiligung im Zelluntergang untersucht wurden, dargestellt. Im zweiten Teil wird der Zelluntergang charakterisiert. Hierfür wurden zu denselben Zeitpunkten wie in der Expressionsanalyse, Gefrierschnitte der Mäuse immunhistochemisch mittels Tunel-Assay gefärbt.

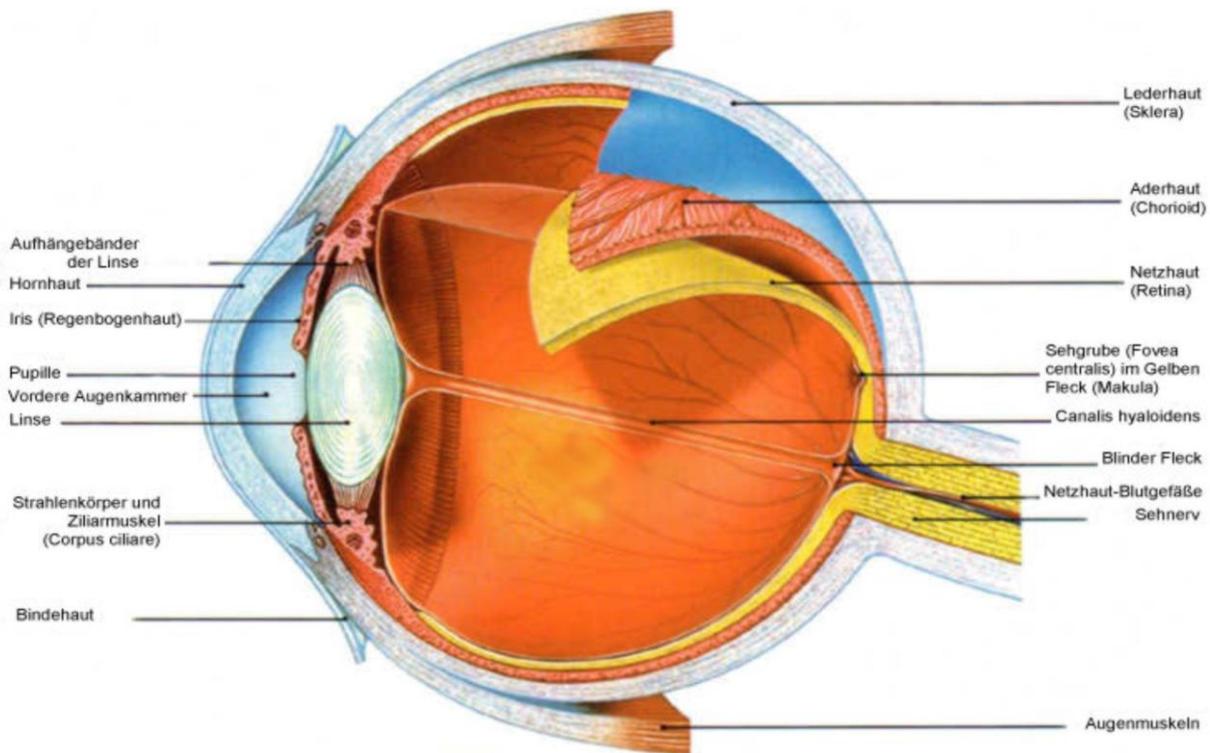
In der Diskussion werden die Ergebnisse dieser Arbeit mit in der Literatur bereits bekannten Mechanismen des Zellunterganges und mit den Ergebnissen früherer Arbeiten derselben Arbeitsgruppe verglichen. Weiter wird versucht die beiden Teile der Arbeit in Bezug auf den zeitlichen Ablauf der Neurodegeneration zu korrelieren.

Das Wissen um den genauen pathogenetischen Mechanismus des Zellunterganges dient der Entwicklung möglicher zukünftiger gentherapeutischen Strategien.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Auge

Das Auge der Wirbeltiere ist ein Sinnesorgan, welches elektromagnetische Strahlen (400-750nm) in optische Wahrnehmung umwandelt. Funktionell gliedert man das Auge in den physikalisch-optischen Teil, bestehend aus verschiedenen brechenden Medien (siehe Abbildung 2.1) und die Netzhaut, bestehend aus mehreren Schichten von Nervenzellen (siehe Abbildung 2.2). Beim Sehvorgang werden dementsprechend zunächst die Lichtstrahlen gebrochen und treffen dann auf die Netzhaut (Retina), wo die Information durch die Erregung der Nervenzellen weitergeleitet wird [Klinke et al. 2010].



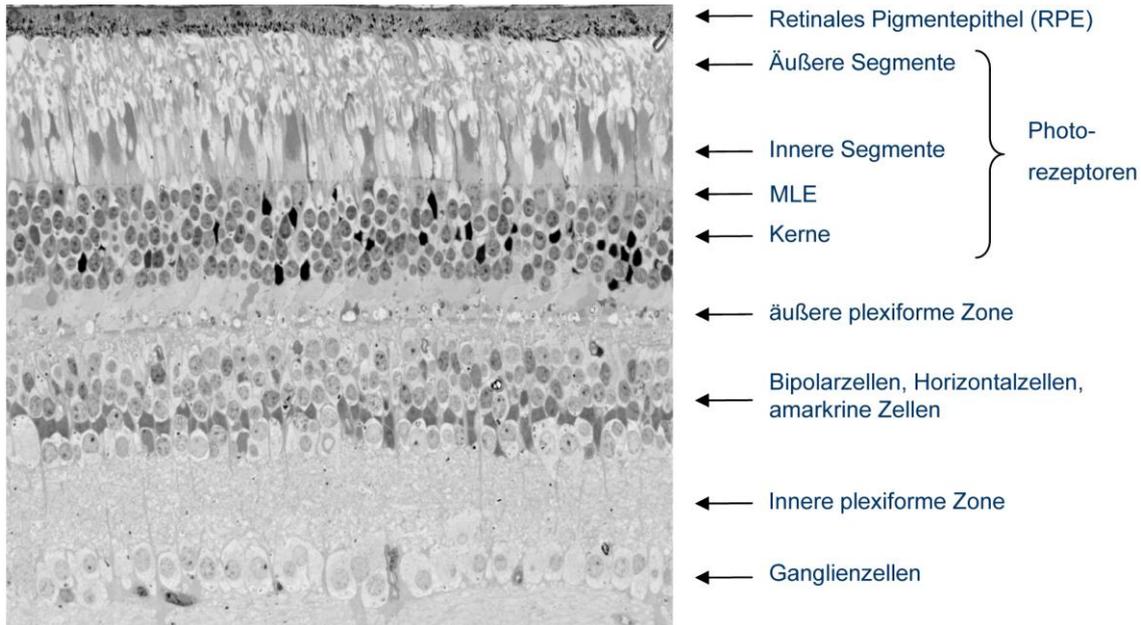
**Abbildung 2.1 Anatomische Darstellung des Auges**

*Quelle: modifiziert nach [organmodelle.de/augenmodell.html](http://organmodelle.de/augenmodell.html)*

Histologisch unterscheidet man neun verschiedene Schichten der Netzhaut, bestehend aus Nervenzellkörper, Dendriten und Axonen.

Die Netzhaut ist aufgebaut von innen nach außen: siehe Abbildung 2.2

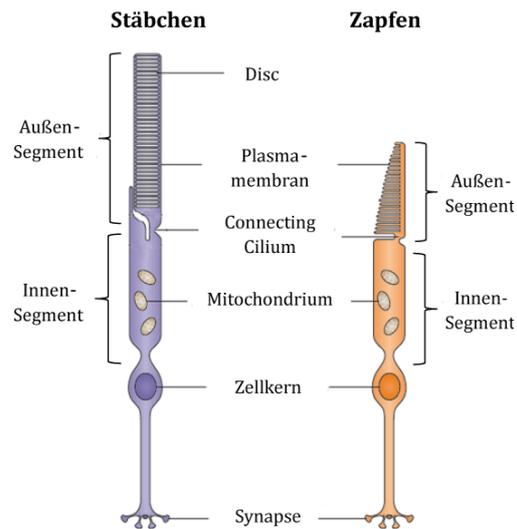
- Basalmembran (*Membrana limitans interna*)
- Nervenfaserschicht (Axone der Ganglienzellen) (*nerve fiber layer, NFL*)
- Ganglienzellschicht (Zellkörper der Ganglienzellen) (*ganglion cell layer, GCL*)
- innere plexiforme Schicht (Axone der Bipolarzellen und Dendriten der Amakrin und Ganglienzellen) (*inner plexiform layer, IPL*)
- innere Körnerschicht (Zellkörper der Bipolar, Amakrin und Horizontalzellen) (*inner nuclear layer, INL*)
- äußere plexiforme Schicht (Dendriten der Bipolar und Horizontalzellen und Synapsen der Photorezeptoren) (*outer plexiform layer, OPL*)
- äußere Körnerschicht (Zellkörper der Photorezeptoren) (*outer nuclear layer, ONL*)
- äußere Grenzmembran (Ausläufer der Müllerzellen) (*Membrana limitans externa, MLE*)
- Innere Segmente der Photorezeptoren (*inner segments, IS*)
- Äußere Segmente der Photorezeptoren (*outer segments, OS*)
- Retinales Pigmentepithel (*RPE*)



**Abbildung 2.2 Die Retina**

*Quelle: Augenlinik Giessen*

Bei den Photorezeptoren unterscheidet man zwei Arten: Zapfen und Stäbchen. Die Stäbchen als Hell-Dunkel-Rezeptoren sind verantwortlich für das Dämmerungssehen und das Helligkeitsempfinden, die Zapfen für das Farb- und Kontrastsehen (verschiedene Absorptionsmaxima). Bei Primaten befindet sich die Stelle des schärfsten Sehens (Fovea) zentral in der Retina und besteht nur aus Zapfen, während die Stäbchen sich vermehrt in der Peripherie der Netzhaut befinden. Alle Photorezeptoren bestehen aus einem Außen- und Innensegment und aus einem Zellkörper mit synaptischer Endigung. Das Connecting Cilium (CC) verbindet das äußere und das innere Segment (siehe Abbildung 2.3) [Hosch et al.2011]. Das CC ist die einzige Verbindung des inneren und des äußeren Segments der Photorezeptoren. Mittels ständigem intraflagellären Transports wird die Passage von Proteinen vom inneren in das äußere, licht-sensitive Segment ermöglicht und somit dessen Funktion und Überleben gesichert. Das äußere Segment, bestehend aus Einstülpungen der Plasmamembran (Discs), besitzt keine eigenen Mitochondrien und keine Proteinproduktion. Da es aber ständig Discs an das retinale Pigmentepithel abgibt und neue Discs ausbildet, muss die Versorgung über das CC konstant gewährleistet sein (siehe Abbildung 2.3 und Abbildung 2.6) [Fliegau et al. 2007].



**Abbildung 2.3 Photorezeptoren**

*Stäbchen und Zapfen mit Innen- und Außensegmenten und Connecting Cilium*

*Quelle: modifiziert nach Wright et al. 2010*

## 2.2 Retinitis Pigmentosa

Dem Begriff der Retinitis Pigmentosa wird eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit Degeneration der Photorezeptoren zugeordnet, die schleichend beginnend im Endstadium zur Erblindung führt [Hartong et al. 2006]. Klassischerweise beginnt die Erkrankung im Jugendalter. Betroffene haben zunehmend Schwierigkeiten bei der Dunkeladaptation und entwickeln eine progrediente Nachtblindheit. Im jungen Erwachsenenalter kommt es zu Gesichtsfeldausfällen und progressiver Verschlechterung des Sehens, bis hin zur Erblindung, meist im Alter von circa 60 Jahren. Eine kausale Therapie ist noch nicht möglich.

Die genetische Ursache ist vielfältig. Zurzeit sind über 45 Gene identifiziert, bei denen eine Mutation der Gensequenz eine Retinitis pigmentosa auslösen kann [Berger et al. 2010]. Jedoch sind diese Gene nur bei circa 60% der Patienten auch verändert. Die übrigen Patienten haben Mutationen in Genen, die noch nicht erforscht sind.

Pathophysiologisch beginnt die Erkrankung mit einem progredienten Verlust der Stäbchen. Im weiteren Verlauf kommt es auch zum Absterben der Zapfen [Zobor et al. 2012].

Weltweit betroffen sind über 1 Million Menschen, die Prävalenz beträgt 1:4000. Alle drei Erbgänge sind möglich – autosomal-dominant (30-40%), autosomal-rezessiv (50-60%) und X-chromosomal rezessiv (5-15%) [Hartong et al. 2006].

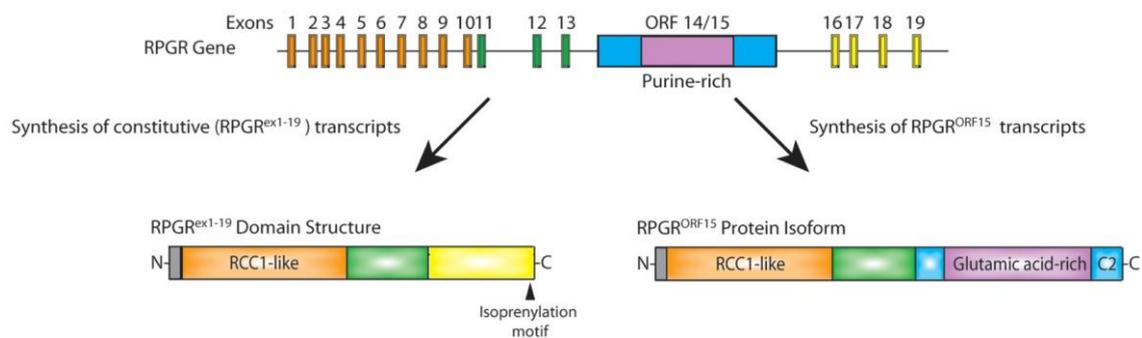
### **2.3 X-chromosomal rezessive Form der Retinitis pigmentosa**

Die X-chromosomal rezessive Form der RP (XLRP) betrifft 5-15% der gesamten RP-Patienten, ist aber von sehr großer klinischer Relevanz, denn der Phänotyp der XLRP zeigt sich typischerweise mit einem frühen Beginn und schwerwiegendem Verlauf bereits in den ersten Lebensdekaden. (siehe Abbildung 2.5)

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden zwei Gene im Zusammenhang mit der XLRP identifiziert. Das RP 2 Protein (RP2) und der RP GTPase Regulator (RPGR) [Meindl et al. 1996]. Dabei haben 75% der XLRP Patienten eine Mutation im *RPGR* Gen [Vervoort et al. 2000; Ferrari et al. 2011].

Das Gen für *RPGR* ist in der Xp21.1 Region der Chromosomen lokalisiert und besteht aus 172 kb und 19 Exons [Meindl et al. 1996]. Es gibt zwei Splicevarianten des *RPGR*s: *RPGR* ex 1-19 und *RPGR* ORF15. *RPGR* ex1-19 besteht aus Exon 1-13 und Exon 16-19 und kommt ubiquitär im Körper vor. *RPGR* ORF15 wird vor allem in der Retina exprimiert.

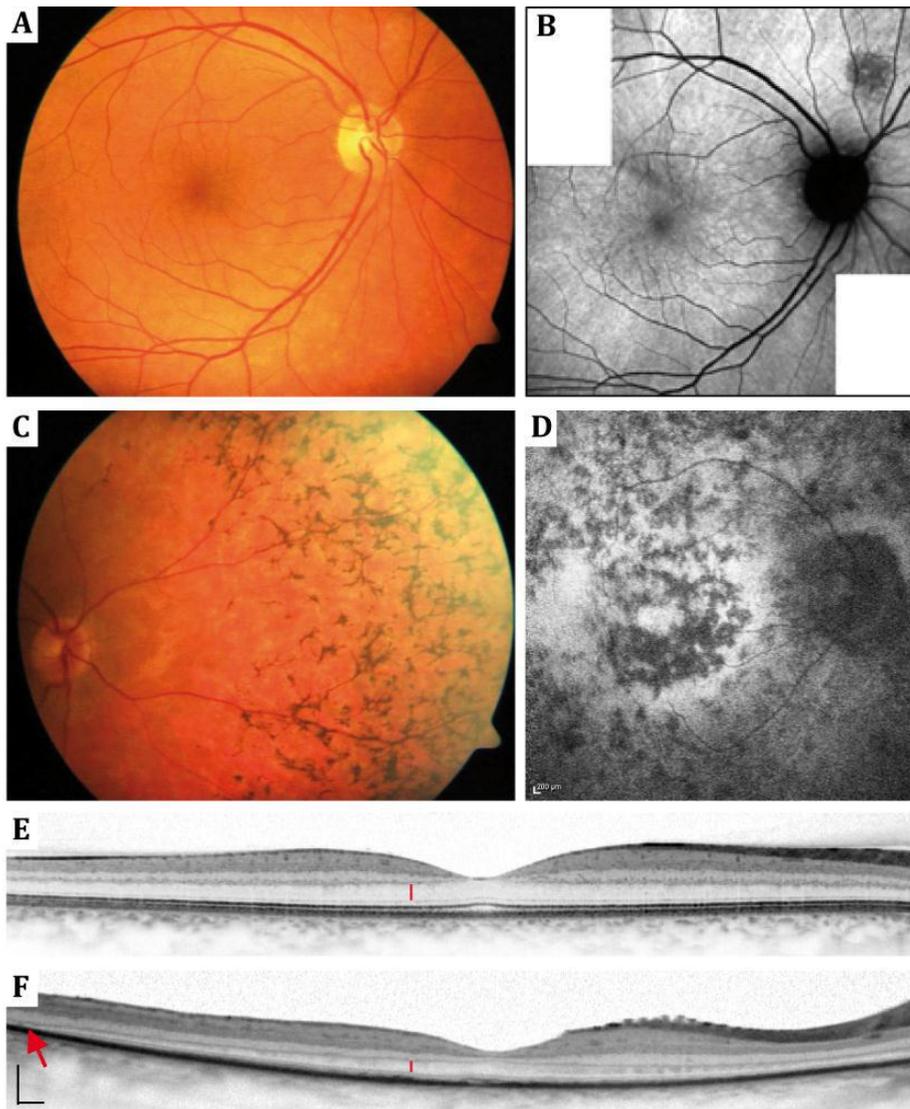
Interessanterweise befinden sich circa 80% der *RPGR* Mutationen im Exon ORF 15 (open reading frame 15). Diese Region scheint ein „Mutational hotspot“ zu sein. Es ist eine purinreiche Region mit einigen potentiellen Stopcodons, weshalb die Vermutung besteht, dass es bei der DNA Replikation zum vorzeitigen Abbruch und Mismatch kommen kann [Vervoort et al. 2000].



**Abbildung 2.4 Splicevarianten des *RPGR***

*Modifiziert nach Wright et al 2011*

Die klinische Symptomatik mit Nachtblindheit, Gesichtsfeldausfällen und fortschreitendem Verlust des Sehvermögens spiegelt sich in pathologischen Befunden in der Funduskopie und im OCT (optische Kohärenztomographie) wieder. In der Funduskopie zeigen sich Atrophien der chorioretinalen Gefäße und Einlagerungen von Knochenkörperchen in der peripheren Retina [Jin et al. 2007; Lorenz et al. 2003]. Im OCT kann eine Abnahme der ONL-Schichtdicke im Vergleich zum Gesunden festgestellt werden [Aleman et al. 2007]. Ebenso können heterozygot betroffenen Frauen, Konduktorinnen, klinische Symptome und ähnliche pathologischen Befunde aufweisen [Jin et al. 2007] (Vergleiche Abbildung 2.5).



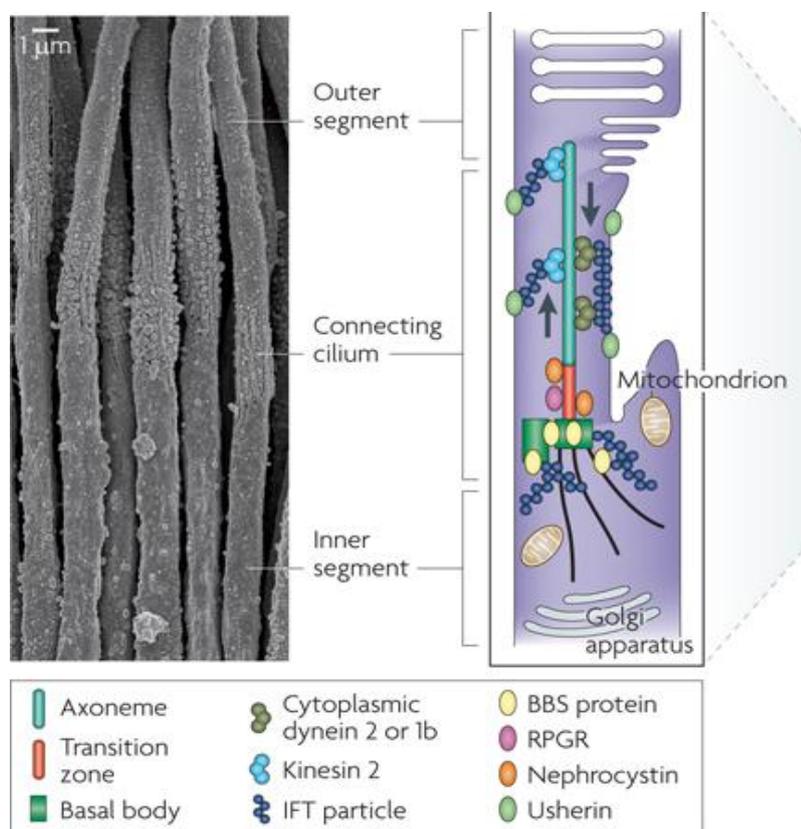
**Abbildung 2.5 XLRP aufgrund von Mutation im RPGR Gen**

A: Funduskopie einer Konduktorin, B: Fundusautofluoreszenz (FAF) einer Konduktorin; sichtbar ist die radiäre Struktur von starken und schwachen Bereichen der FAF. C: Funduskopie eines RPGR-XLRP Patienten; deutliche Bildung von Knochenkörperchen in der Peripherie, attenuierte Gefäße und erhöhte FAF (D) zu erkennen (modifiziert nach Hosch et al. 2011)

E + F: OCT Aufnahmen eines gesunden Erwachsenen (E) und eines 15-jährigen, an RPGR-XLRP erkrankten Patienten (F). Deutliche Reduktion der ONL-Schichtdicke (roter Strich) im erkrankten Patienten zu beobachten. Der rote Pfeil kennzeichnet die Stelle, an der im erkrankten Patienten keine ONL mehr vorhanden ist. Im Gegensatz dazu weist die gesunde Retina, auch peripher, noch eine gut sichtbare Kernschichtung auf. Maßstabsbalken jeweils 200  $\mu\text{m}$ .

Quelle: Röhl 2014; Hosch et al. 2011.

Es konnte gezeigt werden, dass sich vor allem im CC große Mengen des RPGR befinden (siehe Abbildung 2.6) [Hong et al. 2000]. Einige Studien deuten darauf hin, dass RPGR eine Funktion im Proteintransport im CC und eine Rolle bei der Erneuerung der Discs spielt. Durch Veränderung des RPGR scheinen diese Vorgänge beeinträchtigt, wodurch die Photorezeptoren zu Schaden kommen und im weiteren Verlauf absterben. Der genaue Mechanismus des Zelltodes ist noch nicht bekannt, aber es werden apoptotische Vorgänge diskutiert [Hosch et al. 2011; Ramamurthy et al. 2009; Zhao et al. 2003].



**Abbildung 2.6 Connecting Cilium**

Quelle: modifiziert nach Wright et al. 2010

## 2.4 Tiermodelle der XLRP

### 2.4.1 Mausmodelle verschiedener Arbeitsgruppen

Zur genauen Erforschung der XLRP wurden schon einige Mausmodelle entwickelt (siehe Tabelle 2.1). Durch unterschiedliche, induzierte Veränderungen am *rpgr* Gen konnten so die Auswirkungen auf funktioneller, morphologischer und molekularer Ebene untersucht werden.

Tabelle 2.1 Bekannte Mausmodelle

Mausmodell	Genetik	Morphologische Veränderung	Funktionelle Veränderung	Arbeitsgruppe
<i>rpgr</i> knock out ( <i>rpgr</i> -ko)	Deletion von Exon 4-6 →Vorzeitiges Stopcodon	Delokalisation von Zapfen -Opsin	Milde Funktions-einschränkung	[Hong et al. 2000]
Expression eines verkürzten Exon ORF15 mit toxic gain of function Wirkung	In-frame Deletion Exon ORF15	Schnelle Degeneration → toxic gain of function Wirkung	Früher und schwerer Funktions-verlust→ toxic gain of function Wirkung	[Hong et al. 2004]
Expression eines verkürzten Exon ORF15 im <i>rpgr</i> -ko, um Funktion wiederherzustellen	In-frame Deletion Exon ORF 15→verkürzte Region	Verbesserte Morphologie im Vergleich zu <i>rpgr</i> -ko	Verbesserte Funktion im Vergleich zu <i>rpgr</i> -ko	[Hong 2005]
Überexpression von RPGR	Überexpression von RPGR	Strukturelle Des-organisation in Flagellen der Spermien	Abnorme Spermien	[Brunner et al. 2008]
In-frame Deletion Exons 4 des <i>rpgr</i>  Zwei Gruppen (Albino/pigmentiert)	In-frame Deletion Exon 4 des <i>rpgr</i>	Delokalisation von Rhodopsin	Milde Veränderung Albino: Zapfen betroffen Pigmentiert: Stäbchen betroffen	[Brunner et al. 2010]
Überexpression von RPGR <sup>exon1-19</sup> bzw. RPGR <sup>ORF15</sup>	Überexpression	RPGR <sup>exon1-19</sup> : abnorme Akkumulation des RPGR in OS und Delokalisation Zapfen-Opsine	RPGR <sup>exon1-19</sup> : schwerer Phänotyp RPGR <sup>ORF15</sup> : milder Phänotyp	[Wright et al. 2011]

Rd9-Maus (natürlich vorkommend)	32bp Duplikation im Exon ORF15, Verschiebung Leserahmen →vorzeitiges Stopcodon	Pigmentschwund und Verdünnung der äußeren nukleären Schicht (ONL)	Milde Veränderung	[Thompson et al. 2012]
Conditional Knock-out Modell ( <i>rpgr</i> -cko)	Deletion Exon1 und proximale Promotorregion	Verdünnung der äußeren nukleären Schicht (ONL)	Milde Veränderung zu späteren Zeitpunkten	[Huang et al. 2012]

Quelle: modifiziert nach Dissertation Röll

Hong und Kollegen entwickelten 2000 ein Knock-out Modell, indem sie Exon 4-6 im *rpgr* Gen durch einen Fusionsmarker ersetzten und so einen vorzeitigen Abbruch in der codierenden Sequenz erzeugten. In diesen Mäusen konnte weder das Protein noch die RNA des *rpgrs* nachgewiesen werden. Immunhistochemisch wurde im Vergleich zum Wildtyp deutlich, dass sich RPGR im CC befinden muss, denn dieser Bereich war bei den Knock out Mäusen nicht angefärbt. Auffällig war auch eine Delokalisation von Zapfen-Opsinen, die ab Tag 20 sichtbar wurde. Normalerweise lokalisiert im äußeren Segment, wurden sie bei den Knock-out Mäusen vor allem im inneren Segment gefunden. Dies gab Hinweise darauf, dass RPGR für den intraflagellären Transport von Opsinen eine wichtige Rolle spielt. Im ERG zeigten sich milde Funktionseinschränkungen [Hong et al. 2000].

Die gleiche Arbeitsgruppe entwickelte 2004 ein weiteres Mausmodell. Die Basis für dieses Modell ist das Knock-out Modell. Es wurden unterschiedliche Splice-Varianten des *rpgr* Gens erzeugt. Eine Mauslinie enthielt ein in-frame ORF 15 Exon mit einer verkürzten, purinreichen repetitiven Region. Dadurch entstand ein vorzeitiges Stopcodon. Diese Mauslinie zeigte im Vergleich zu den Knock-out Mäusen eine schnellere Degeneration und damit Funktionsverlust der Photorezeptoren. Die schnelle und starke Veränderung der Photorezeptoren deutet daraufhin, dass diese verkürzte Splicevariante toxic-gain of function Vorgänge auslöst [Hong et al. 2004].

In einem weiteren Modell wollte diese Arbeitsgruppe 2005 überprüfen, ob die ORF15 Variante die wichtigste Isoform in den Photorezeptoren ist. So wurde in das Knock-out Modell wieder eine, in der purinreichen Region des ORF 15 verkürzte, Variante des *rpgr* Gens eingebracht. Dieses transgene RPGR konnte dann im CC nachgewiesen

werden. Sowohl morphologisch als auch funktionell zeigte sich hier eine deutliche Verbesserung des Phänotyps im Gegensatz zu den *Rpgr*-ko [Hong 2005].

Um eine generelle Rolle des RPGRs in Ciliopathien darzustellen, entwickelten Brunner und Kollegen eine Mauslinie in der *rpgr* überexprimiert wird. Bei starker Überexpression entwickelten die männlichen Tiere eine Infertilität durch abnorme Spermien. Und auch bei milder Überexpression zeigten sich strukturelle Defizite im Bereich der Spermien. So verdeutlicht dieses Modell die Bedeutsamkeit des RPGR im intraflagellären Transport [Brunner et al. 2008].

Speziell für die Darstellung der Veränderungen in den Photorezeptoren generierte die oben genannte Arbeitsgruppe ein weiteres Mausmodell. In dieser Mauslinie erzeugten sie eine in-frame Deletion des Exons 4 im *rpgr* Gen. Es wurden zwei genetisch unterschiedliche Mauslinien als Ursprung verwendet: pigmentierte BL/6 Mäuse und Albino BALB/c Mäuse. In beiden Mauslinien entwickelte sich eine milde Veränderung des Phänotyps: bei den BL/6 Mäusen die Stäbchen betreffend, und bei den BALB/c Mäusen vor allem die Zapfen [Brunner et al. 2010].

Eine weitere Arbeitsgruppe (Wright und Kollegen) untersuchte die beiden Hauptsplizevarianten des *rpgr* Gens. Dafür erzeugten sie zwei Mausmodelle auf der Basis des *Rpgr*-ko, das eine exprimierte  $\text{RPGR}^{\text{exon1-19}}$ , das andere  $\text{RPGR}^{\text{ORF15}}$ . So konnten sie mittels Immunoblot-Assay und Immunofluoreszenz-Mikroskopie die Expression der Splicevarianten während der retinalen Entwicklung vergleichen. Während  $\text{RPGR}^{\text{exon1-19}}$  in sich entwickelnden Photorezeptoren stark hochreguliert war, in reifen aber deutlich herabreguliert, zeigte sich bei  $\text{RPGR}^{\text{ORF15}}$  eine Korrelation der Expression mit dem Wachstum der Photorezeptoren. In beiden Modellen war aber insgesamt im Vergleich zum Wildtyp ein stark erhöhtes Expressionslevel auffällig. Dies scheint bei  $\text{RPGR}^{\text{exon1-19}}$  einen Krankheitswert zu haben, denn histopathologisch konnte eine abnorme Akkumulation des RPGR im OS und Delokalisation der Zapfen- Opsine gesehen werden. Bei  $\text{RPGR}^{\text{ORF15}}$  zeigte sich dagegen keine signifikante Veränderung [Wright et al. 2011].

Die Rd9-Maus (rd, retinal degeneration) welche 2002 von Chang und Kollegen zum ersten Mal beschrieben wurde [Chang et al. 2002], ist 2012 genotypisiert und

phänotypisch weiter charakterisiert worden. Die Rd9 Maus ist ein natürlich vorkommendes Tiermodell für XLRP. Genetisch findet sich hier im Exon ORF 15 eine 32bp Duplikation, die zu einer Verschiebung des Leserahmens und dadurch zu einem vorzeitigen Stopcodon führt. Histologisch zeigten diese Mäuse einen Pigmentschwund und eine Verdünnung der äußeren nukleären Schicht (ONL), im Elektroretinogramm einen moderaten Verlust der Amplitude [Thompson et al. 2012].

Ein weiteres Knock out Modell wurde 2012 entwickelt. Huang und Kollegen deletierten Exon 1 und proximale Promotorenregionen des *rpgr*. Diese Tiere wurden über 15 Monate untersucht. Morphologisch (histologisch und im OCT) konnte eine Verdünnung der äußeren nukleären Schicht gesehen werden. Funktionell zeigten sich nur milde Einschränkungen [Huang et al. 2012].

#### **2.4.2 Mausmodell B6J.Sv129-Rpgr<sup>tm1sti</sup>**

Das Mausmodell B6J.Sv129-Rpgr<sup>tm1sti</sup> (Rpgr<sup>tm1sti</sup>) wurde 2011 in der Arbeitsgruppe experimentelle Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde in Kooperation mit dem Max Planck Institut für Herz und Lungenforschung Bad Nauheim generiert. Es wurde eine transgene Mauslinie gezüchtet, welche eine Punktmutation im terminalen Exon ORF 15 des *rpgr* Genes trägt. Durch diese gezielt verursachte Genmutation konnte ein Mausmodell mit retinaler Degeneration, gleich dem Geno- und Phänotyp der beim Menschen auftretenden XLRP, erzeugt werden.

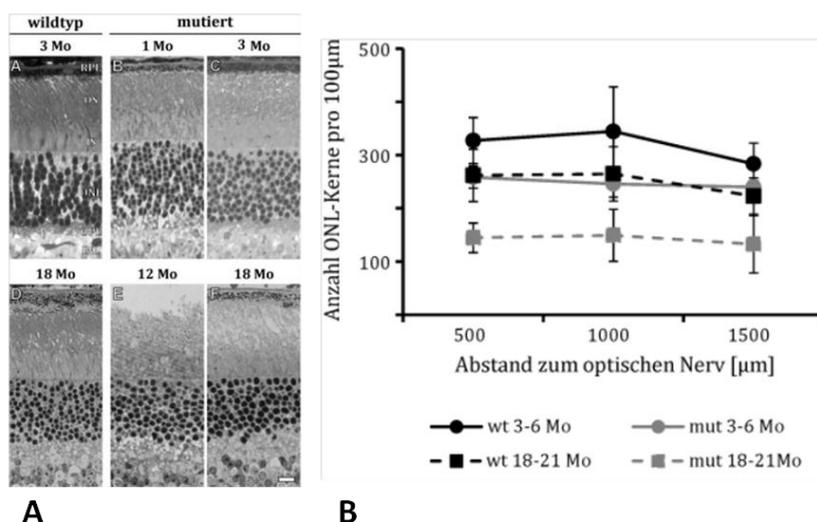
Dazu wurden in das Mäusegenom vier Mutationen eingeführt. Die pathologische Punktmutation ist die Deletion einer Adeninbase an der Position 2793. Dadurch würde es aber aufgrund der Sequenzunterschiede zwischen Maus und Mensch bei der Maus zu einem vorzeitigen Stopcodon kommen. Um diesen vorzeitigen Abbruch zu verhindern, wurde noch eine stille Mutation eingeführt, welche durch Basenaustausch die Bildung des Stopcodons verhindert, aber die Proteininformation nicht ändert. Als dritte Mutation wurden eine XbaI-Restriktionsschnittstelle generiert, um die Nachkommen genotypisieren zu können.

Die letzte Mutation bildet die Erkennungssequenz für eine Homing-Endonuklease (I-SceI-Schnittstelle). Diese Mutation wird benötigt um spätere Therapieentwicklung mittels Endonukleasen zu ermöglichen.

Die erfolgreiche Expression des mutierten RPGRs im humanisierten Mausmodell konnte auf RNA Ebene nachgewiesen werden. Es wurden mehrere Tiere im Zeitraum von 3 bis 21 Monaten gezüchtet und phänotypisch charakterisiert [Dissertation Schlegel 2011; Dissertation Röhl 2014].

Histopathologisch zeigten sich schon in den ersten Monaten Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp. So wurde eine Auflösung der strukturellen Ordnung der äußeren Schichten der Retina deutlich, vor allem betroffen waren die OS (äußeren Segmente der Photorezeptoren), die IS (innere Segmente der Photorezeptoren) und die ONL (äußere nukleäre Schicht) (siehe Abbildung 2.7). Im weiteren Verlauf konnte ein Fortschreiten der Pathologie gesehen werden.

Weiter wurden die Nuclei der Photorezeptoren quantitativ beurteilt, indem sie an drei unterschiedlichen Lokalisationen (verschiedene Abstände zum Sehnerv) jeweils über eine Fläche von 100µm x Schichtdicke der ONL ausgezählt wurden. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte sich eine anfangs geringe Abnahme der Anzahl, die jedoch bei zunehmendem Alter signifikant deutlich wurde (siehe Abbildung 2.7).

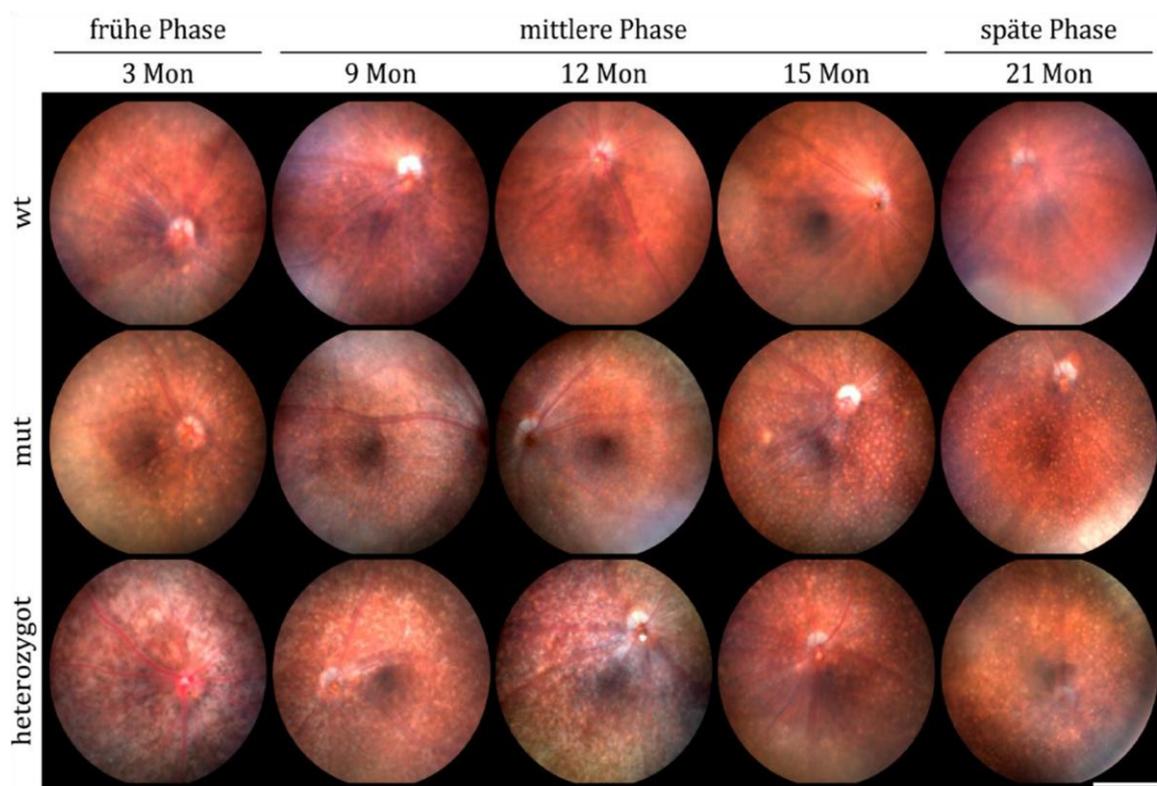


**Abbildung 2.7 A: Semidünnschnitte der Retina, B: Auszählung der Photorezeptornuclei**

A, D Wildtypiere, B, C, E und F mutierte Tiere. Maßstabsbalken 10µm

Mo bedeutet Monate, wt Wildtyp, mut Mutiert; Quelle: Augenklinik Gießen

Auch funduskopisch wurden die Tiere zu den Zeitpunkten 3, 9, 12, 15 und 21 Monaten untersucht. Der Fundus der Wildtyptiere blieb über die Dauer des Zeitraums unverändert. Die mutierten Tiere dagegen zeigten ab 3 Monaten diffus verteilte depigmentierte Bereiche in Form von weißen Punkten. Ebenso zeigte der Fundus der heterozygoten Tiere ab 3 Monaten Pigmentveränderungen, hier aber keine abgegrenzten Punkte sondern unregelmäßige weiße Flecken (siehe Abbildung 2.8).



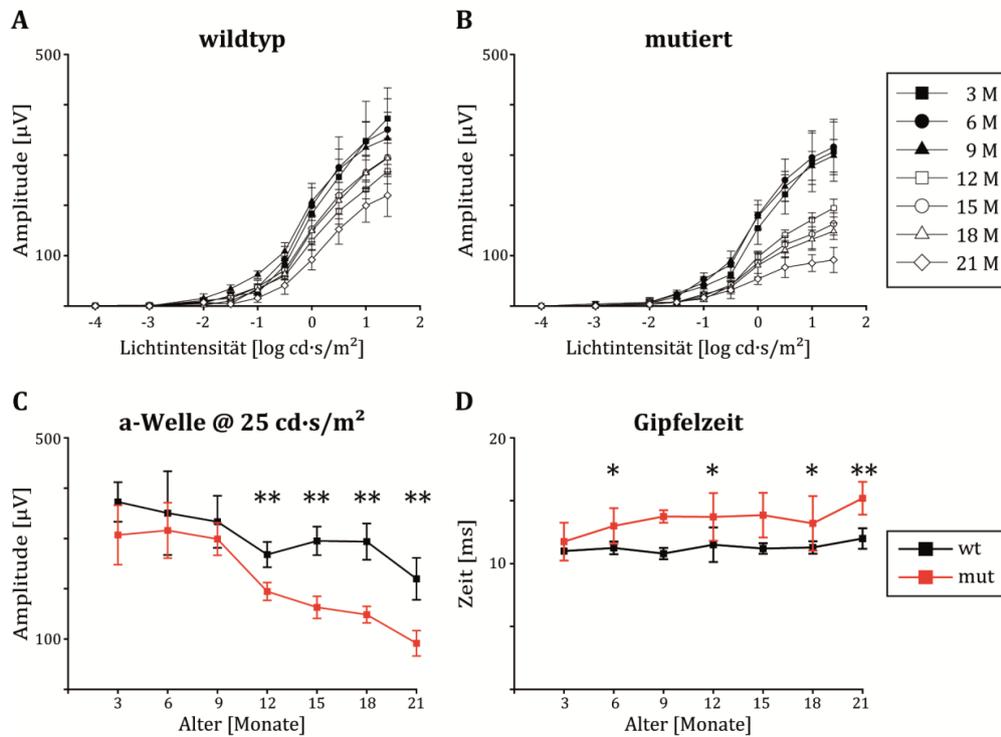
**Abbildung 2.8 Funduskopie**

Funduskopien von wt Tieren (obere Reihe) im Vergleich mit mutierten (mittlere Reihe) und heterozygoten Tieren (untere Reihe). Die Tiere wurden zu den drei Krankheitsphasen untersucht, wobei das entsprechende Alter jeweils angegeben ist.

Wt wildtyp, mut mutiert, Mon Monate, Maßstabsbalken 1 mm, Quelle: Dissertation Röll

Die funktionelle Analyse erfolgte mittels Elektretinogramm (ERG). Es zeigten sich sowohl unter skotopische als auch unter photopischen Bedingungen Veränderungen. Im Gegensatz zu den morphologischen Ergebnissen, die schon früh deutlich wurden, zeigten sich die funktionellen Veränderungen bei den mutierten und bei den heterozygoten Tieren erst im späteren Verlauf. Dabei fiel auf, dass das Stäbchensystem

stärker betroffen ist, denn die deutlichste Veränderung zeigte sich in der skotopischen a-Welle. Diese reduzierte sich bei den mutierten Tieren im gesamten Untersuchungszeitraum (3-21 Monate) um circa 70%, bei den Wildtyptieren nur um circa 40%. Vor allem während des Übergangs von 9 zu 12 Monaten zeigte sich eine ausgeprägte Abnahme der Amplitude der mutierten Tiere gegenüber den Wildtyptieren (siehe Abbildung 2.9). Ebenso war bei den heterozygoten Tieren im Vergleich zu den Wildtyptieren vor allem eine reduzierte Amplitude der skotopischen a-Welle zu beobachten. Unter photopischen Bedingungen wurden ähnliche Amplitudenwerte wie die der Wildtyptiere erreicht (siehe Abbildung 2.10) [Röll 2014].



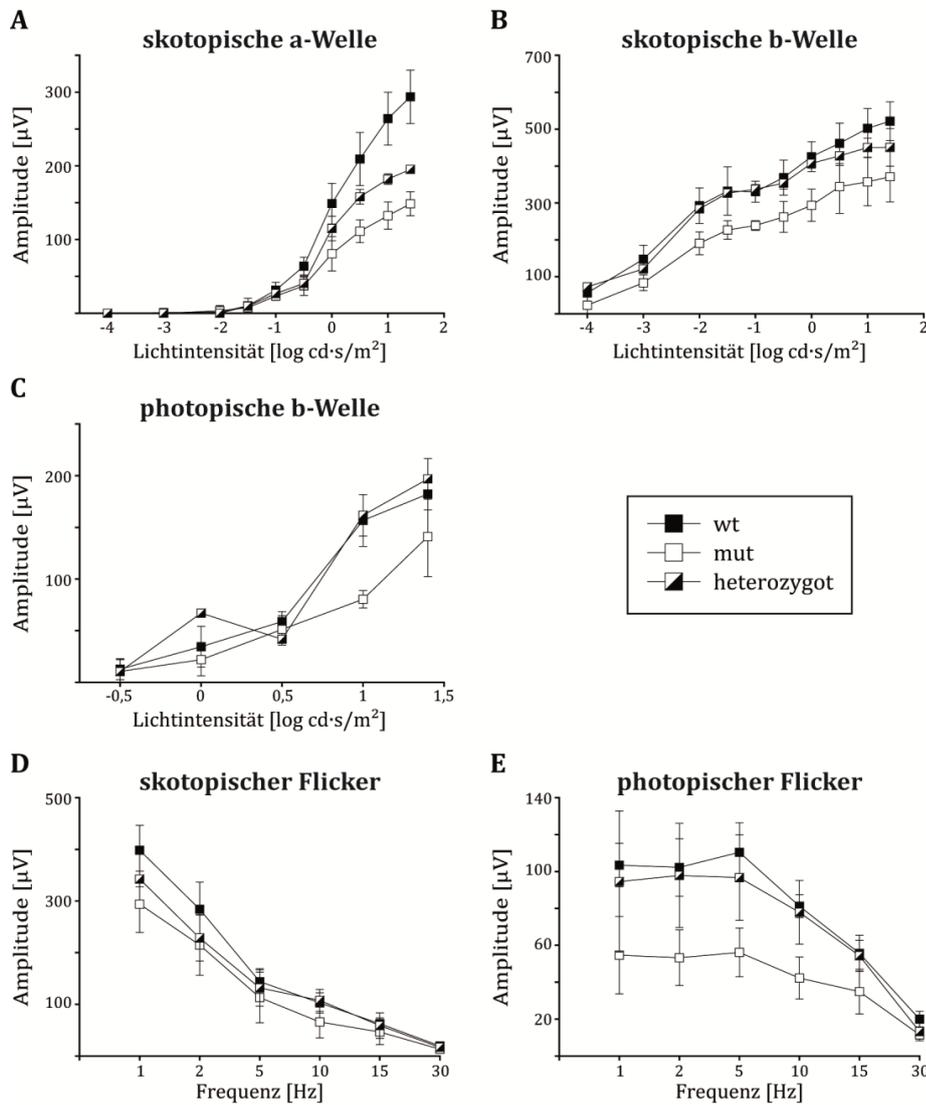
**Abbildung 2.9 Beispiel des ERGs für mutierte Tiere: Skotopische a-Welle**

A + B Vergleich der a-Wellenamplitude in Abhängigkeit der Lichtintensität von wt (A) und mutierten Tieren (B). Jede Kurve repräsentiert einen Alterszeitpunkt.

C Vergleich der a-Wellenamplitude des stärksten Lichtreizes in Abhängigkeit des Alters.

D Darstellung der Gipfelzeiten bei der stärksten Lichtintensität, Vergleich der Werte von wt (schwarz) und mutierten Tieren (rot).

\* signifikant mit  $p < 0,05$ , \*\* signifikant mit  $p < 0,01$ . M Monate, wt wildtyp, mut mutiert. Dargestellt sind stets die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Quelle: Dissertation Röll



**Abbildung 2.10 Beispiel des ERGs für heterozygote Tiere mit 18 Monaten**

Dargestellt sind stets die gemittelten Werte  $\pm$  Standardabweichung zum Zeitpunkt 18 Monate. Dabei wurden die Ergebnisse zweier heterozygoter Tiere mit den gemittelten Werten von wildtyp (wt) und mutierten (mut) Tieren verglichen.

A + B Unter skotopischen Bedingungen wurden die a-Wellenamplitude (A), sowie die b-Wellenamplitude (B) in Abhängigkeit der Lichtintensität beurteilt.

C Darstellung der photopischen b-Welle, aufgetragen gegen die Intensität der Lichtblitze.

D + E Zusammenfassung der Flicker-ERG Messungen. Dabei sind die Amplituden sowohl unter skotopischen (D), als auch unter photopischen Bedingungen (E) in Abhängigkeit der Frequenz dargestellt.

Quelle: Dissertation Röll

Aufgrund der morphologischen und funktionellen Ergebnisse konnte die zeitliche Abfolge der Erkrankung in drei Phasen eingeteilt werden:

- frühe Phase (< 9 Monate) mit weitgehend unveränderter Funktion
- mittlere Phase (9-15 Monaten) beginnender Funktionsverlust
- späte Phase (>15 Monate) fortschreitender Funktionsverlust

## 2.5 Apoptose

Generell unterscheidet man in der Klassifikation des Zelltodes drei Hauptgruppen: Apoptose, Autophagozytose und Nekrose. Diese Klassifikation gründet sich auf die unterschiedlichen morphologischen Kriterien der einzelnen Gruppen [Schweichel et al. 1973; Clarke 1990; Murakami et al. 2013].

Typ I Apoptose: Am Beginn kommt es zur Kondensation des Kerns und des Chromatins, die Zelle bricht auf und es entstehen Zellfragmente, sogenannte „apoptotic bodies“, welche dann von phagozytierenden Zellen aufgenommen werden [Kerr et al. 1972].

Typ II Autophagozytose: Im Zytoplasma bilden sich große Einschlüsse (Autophagosome und Autolysosome), es tritt aber keine Kondensation oder Fragmentation der Zellen auf.

Typ III Nekrose: Das Zytoplasma und die Zellorganelle schwellen stark an, dadurch erhöht sich das Volumen in der Zelle und es kommt zur Ruptur der Plasmamembran [Schweichel et al. 1973; Clarke 1990; Murakami et al. 2013].

Der Zelltod der Photorezeptoren scheint aufgrund von apoptotischen Vorgängen eingeleitet zu werden, daher wird sich im Folgenden auf diesen Mechanismus konzentriert.

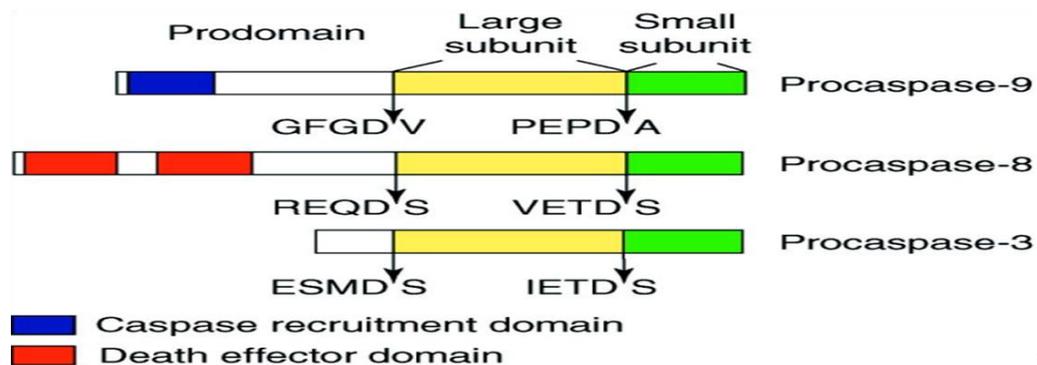
### 2.5.1 Allgemeine Mechanismen der Apoptose

Apoptose allgemein bedeutet programmierter Zelltod. Physiologischerweise ist der programmierte Zelltod ein essentieller Bestandteil für das Erhalten der Organfunktionen, denn nur so können Zellen mit funktionellem oder strukturellem Defizit entfernt werden.

Problematisch wird es, wenn es durch Mutationen oder exogenen Stimuli zu unphysiologisch erhöhter Apoptose kommt. In diesem Fall kann es bis zum Funktionsverlust des Organs kommen [Wenzel et al. 2005].

Lange Zeit wurde angenommen, dass Apoptose nur von Caspasen (Cysteinproteasen, die Proteine nach dem Aspartat spalten) ausgeführt wird [Alnemri et al. 1996]. Alle Caspasen sind Proenzyme, die erst aktiviert werden müssen. Die Proenzyme bestehen aus einer N-terminalen Prodomäne und aus einer kleinen und großen Untereinheit [Earnshaw et al. 1999].

Die aktivierten Caspasen setzen sich aus zwei gleich großen (17-22kDa) Untereinheiten und aus zwei gleich kleinen (10-12kDa) Untereinheiten als  $\alpha_2\beta_2$  Tetramer zusammen [Kaufmann et al. 2001]. Man unterscheidet zwei Gruppen der Caspasen: die Effektorcaspasen (Caspase 3,6 und 7), welche Proteine spalten und die Initiatorcaspasen (Caspase 1,2,8,9 und 10), welche die Effektorcaspasen aktivieren. Die Procaspasen der Effektorcaspasen haben kurze Prodomänen, sie werden durch die Spaltung der großen von der kleinen Untereinheit aktiviert. Die Procaspasen der Initiatorcaspasen dagegen haben lange Prodomänen mit Todesrezeptoren oder Caspasen-aktivierenden Domänen [Earnshaw et al. 1999; Kaufmann et al. 2001; Strasser et al. 2000] (siehe Abbildung 2.11).

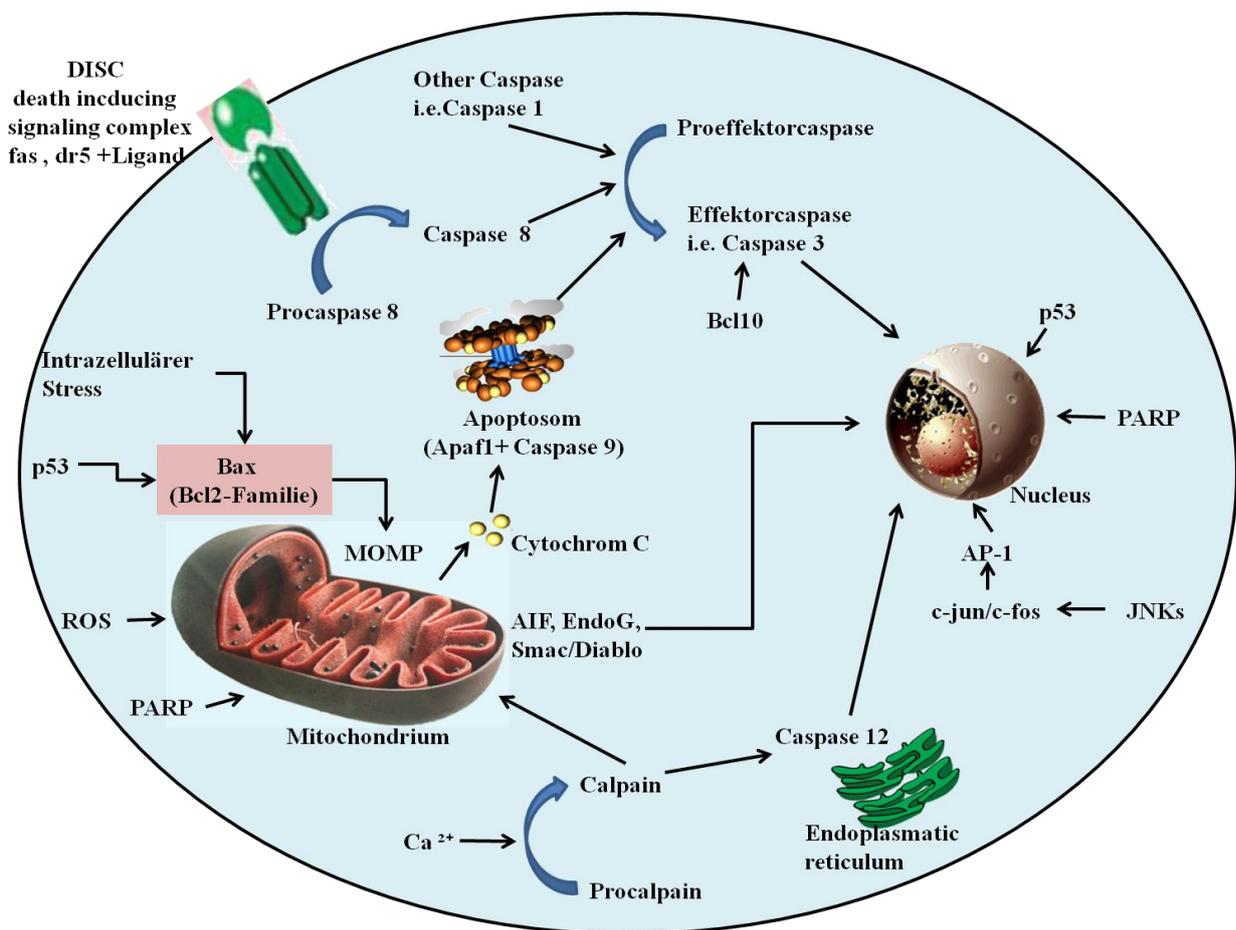


**Abbildung 2.11 Procaspasen mit Prodomäne, kleiner und großer Einheit**

Quelle: modifiziert nach Kaufmann et al. 2001

Die Aktivierung der Initiatorcaspasen erfolgt über vier verschiedene Caspasen-aktivierende Komplexe. Der „death inducing signaling complex (DISC) aktiviert Caspase 8, das Apoptosome aktiviert Caspase 9 (siehe 2.5.1.2), das p53 induced death domain protein (PIDDosome) aktiviert Caspase 2 (siehe 2.5.1.3) und das Inflammasome aktiviert Caspase 1 (siehe 2.5.1.3) [Murakami et al. 2013].

Weitere Forschungen aber zeigten, dass es mehrere Möglichkeiten gibt, wie Apoptose ausgelöst werden kann. Eine mögliche Einteilung der Apoptose wäre in extrazelluläre und mitochondriale Aktivierung, und die Aktivierung durch genotoxische Stimuli oder das Aktivator-Protein (siehe Abbildung 2.12).



**Abbildung 2.12 Schematische Darstellung der bekannten Apoptosemechanismen**

Quelle: Prof. Stieger; Bildelemente modifiziert nach: [campus.ccm-campus.de](http://campus.ccm-campus.de); [mcb.berkeley.edu](http://mcb.berkeley.edu); [biochimie.j.univ-angers.fr](http://biochimie.j.univ-angers.fr); [kidsbiology.com](http://kidsbiology.com); [perkinelmer.com](http://perkinelmer.com)

In den nächsten Unterpunkten werden die verschiedenen Mechanismen der Apoptose-Aktivierung beschrieben. Alle Mechanismen sind in Abbildung 2.12 schematisch dargestellt.

### **2.5.1.1 Extrazelluläre Aktivierung der Apoptose**

Der Auslösemechanismus der extrazellulären Apoptose erfolgt über den DISC. Bei der Bildung des DISC binden die jeweiligen Liganden (z.B FasL oder TNF  $\alpha$ ) an die Todesrezeptoren der Zelloberfläche. Dadurch kommt es zur Trimerisierung des Rezeptors, wodurch Adaptormoleküle aktiviert werden, welche wiederum Caspase 8 aktivieren. Die Caspase 8 aktiviert dann verschiedene Effektorcaspasen [Budihardjo et al. 1999].

### **2.5.1.2 Mitochondriale Aktivierung der Apoptose**

Das Mitochondrium übernimmt eine wichtige Rolle innerhalb unterschiedlicher Apoptosewege, vor allem eine erhöhte Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran (MOMP= mitochondrial outer membrane permeabilization) für apoptotische Proteine gilt als „point of no return“ des Zelltodes [Keeble et al. 2007].

Für die Bildung des Apoptosom ist die Freisetzung des Cytochrom C aus dem Mitochondrium der auslösende Faktor. Intrazellulärer Stress oder p53 aktivieren bax und bak (Bcl-2 assoziierte X Proteine und Bcl-2 Killer Proteine). Durch bax/bak werden Kanäle in der mitochondrialen Membran geschaffen (MOMP), durch welche Cytochrom C freigesetzt wird. Das freigesetzte Cytochrom C triggert die Vereinigung von Caspase 9 und Apaf 1 („Apoptosom“) [Li et al. 1997; Chipuk et al. 2003].

Ein seit längerem bekanntes proapoptotisches mitochondriales Protein ist AIF, welches als erstes Protein der Caspasen-unabhängigen Apoptose entdeckt wurde. Normalerweise lokalisiert im Mitochondrium, translozieren AIF bei entsprechenden Signalen zum Zellkern und verursacht Chromatinkondensation und DNA Fragmentierung [Susin et al. 1999]. Ein wichtiges Signal ist Calpain 1. Diese Cystein-Protease wird durch erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$  Gehalt in der Zelle aktiv und fördert die Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium [Polster et al. 2005]. Ein weiterer auslösender Faktor ist PARP (PolyADPribose Polymerase) [Yu et al. 2002]. Ebenso kann AIF durch ROS (reactive oxygen species) aus dem Mitochondrium freigesetzt werden [Churbanova et al. 2008].

Ein weiteres mitochondriales proapoptotisches Protein ist die Endonuclease G (Endo G). Wie AIF ist sie normalerweise im Mitochondrium lokalisiert und induziert bei ihrer Freisetzung DNA Fragmentation [Li et al. 2001].

Smac/Diablo (second mitochondrial activator of caspases) ist ebenfalls ein mitochondriales Protein und ursprünglich bekannt als Caspasen-Aktivator, zeigte sich in weiteren Studien als Inhibitor antiapoptotischer Proteine. So inhibiert Smac die IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) und begünstigt damit die Apoptose [Verhagen et al. 2000].

### **2.5.1.3 Aktivierung der Apoptose durch genotoxische Stimuli**

Zellulärer Stress wird ausgelöst entweder durch genetische Faktoren, z.B. Mutationen oder durch von außen zugeführte Faktoren, z.B. Hypoxie. Es kommt zu starkem NO, Ca<sup>2+</sup> oder ROS Anstieg, wodurch proapoptotische Faktoren aktiviert werden [Wenzel et al. 2005; Donovan et al. 2001].

So kommt es zum Beispiel über p53 zur Aktivierung von PIDD, welches mit dem Adaptorprotein RAIDD einen Komplex bildet. Dieser Komplex aktiviert die Caspase 2 [Tinel et al. 2004].

Verschiedene Signale, wie ROS, bakterielle Toxine und  $\beta$ -Amyloid, bewirken die Bildung des Inflammasomes. Das Inflammasom besteht aus ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD), NOD like Rezeptor (nucleotid-binding oligomerization domain-containing protein) und Caspase 1 [Murakami et al. 2013].

Auch die oben schon erwähnte PolyADPribose Polymerase (PARP) kann zu dieser Gruppe gezählt werden. Unter physiologischen Bedingungen ist PARP in der DNA-Reparatur involviert und somit zellprotektiv [Chatterjee et al. 1999]. Wenn PARP jedoch überstimuliert wird, z.B. bei starker NO Produktion, induziert es einen raschen Energieabbau der Zelle und dadurch den Zelltod [Pieper et al. 1999]. Auch die Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium verdeutlicht die proapoptotische Wirkung von PARP [Yu et al. 2002].

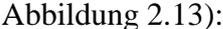
#### **2.5.1.4 AP-1 Aktivierung der Apoptose**

Das Aktivator Protein 1 (AP-1) ist ein Komplex bestehend aus zwei heterodimeren Untereinheiten, jeweils Proteinen der c-fos und c-jun Familie [Curran et al. 1988]. Mehrere Studien haben gezeigt, dass eine Hochregulierung von AP-1, und dabei vor allem c-jun, Apoptose auslösen kann [Bossy-Wetzel et al. 1997; Ham et al. 1995].

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass der programmierte Zelltod einen essentiellen Bestandteil im lebenden Organismus darstellt und über ein vielfältiges, sicher noch nicht vollständig erforschtes System von Signalwegen verfügt.

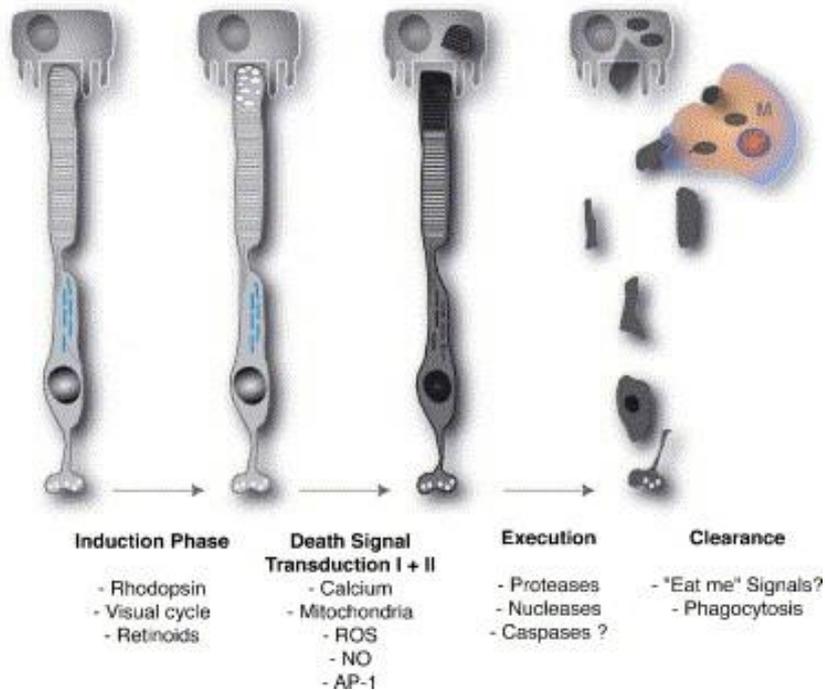
#### **2.5.2 Apoptosemechanismen speziell bei Photorezeptoren**

Seit der Entdeckung der Apoptose von Kerr und Kollegen 1972 wird sie als Ursache des Zelltodes bei neurodegenerativen Erkrankungen angesehen. Der Untergang der Photorezeptoren im Rahmen der Retinitis Pigmentosa zählt zu den neurodegenerativen Erkrankungen. Viele Tiermodelle und Studien befassen sich mit den Mechanismen der Apoptose in den Photorezeptoren. Dabei muss zwischen genetisch bedingten und experimentell erzeugten Netzhautdegenerationen unterschieden werden, denn es kann als sicher gelten, dass die jeweiligen, zum Untergang der Photorezeptoren führenden Mechanismen, voneinander abweichen.

Eine Möglichkeit der experimentell erzeugten Netzhautdegeneration ist die durch exzessive Lichtbestrahlung in der Maus hervorgerufene Apoptose der Photorezeptoren [Wenzel et al. 2005]. In diesem Modell konnten so die dabei wichtigsten Komponenten des Photorezeptortodes dargestellt werden. Sie gliederten den Verlauf der Apoptose in mehrere Phasen (siehe auch  Abbildung 2.13):

1. Induktionsphase: Beginn der Apoptose. Dabei zeigt sich, dass Rhodopsin ein essentieller Bestandteil der lichtinduzierten Photorezeptorapoptose ist.
2. Todessignal Transduktionphase I: besteht aus einer Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ - Levels, Läsionen des Mitochondriums und einer Erhöhung des NO und ROS Levels

3. Todessignal Transduktionphase II: beinhaltet die Aktivierung des AP-1, was bei lichtinduzierter Apoptose essentiell scheint.
4. Schlussphase: Hierbei kommt es zur DNA Fragmentation, Zelldisintegration und zur Beseitigung der apoptotic bodies



**Abbildung 2.13 Phasen der lichtinduzierten Apoptose der Photorezeptoren**

*Quelle: modifiziert nach Wenzel et al. 2005*

Ein weiteres Modell für experimentell erzeugte Apoptose, ist die gezielte Ablösung der Retinae von Ratten. Hier konnte eine Aktivierung der Caspasen und erhöhte Expressionslevel der Todesrezeptoren gezeigt werden [Zacks et al. 2003; Nakazawa et al. 2011].

Jedoch konnte, wieder bei experimentell bewirkter retinaler Ablösung, trotz der Injektion von Caspasen-Inhibitor Z-VAD die Apoptose in Photorezeptoren nicht verhindert werden, was darauf hindeutet, dass auch in den Photorezeptoren mehrere verschiedene Caspasen-unabhängige Signalwege ablaufen [Hisatomi et al. 2001].

Bei der lichtinduzierten Apoptose der Photorezeptoren zeigte sich der Signalweg über AP-1 (c-jun/c-fos) als essentieller Bestandteil [Wenzel et al. 2005].

Ebenso konnte die Aktivierung und Translokation (vom Mitochondrium in den Zellkern) von AIF beim Untergang der Photorezeptoren im genetisch bedingten Tiermodell, der rd1-Maus, nachgewiesen werden [Sanges et al. 2006]. Die auslösenden Faktoren sind hier auch Calpain 1 und PARP [Sanges et al. 2006; Paquet-Durand et al. 2007b].

Wichtige Faktoren scheinen ebenso  $\text{Ca}^{2+}$ , ROS und das Endoplasmatische Reticulum zu sein. Es ist dennoch immer noch schwierig, deren genaue Rolle in der Apoptose zu definieren [Sancho-Pelluz et al. 2008].

Die momentane Diskussion beschäftigt sich vornehmlich mit der Frage, ob es wirklich Apoptose ist, welche die Neurodegeneration der Photorezeptoren bei retinalen Erkrankungen verursacht. Da sich zunehmend deutliche Unterschiede zum Ablauf der Apoptose herauskristallisieren, festigt sich zunehmend die Meinung, dass andere Arten des Zelluntergangs ebenfalls eine Rolle spielen [Sancho-Pelluz et al. 2008].

## 2.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Expressionsanalyse ausgewählter apoptotischer Gene, um mögliche Unterschiede im zeitlichen Verlauf bei den  $\text{Rpgri}^{\text{tm1sti}}$  Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren zu zeigen. Es wurde mit dreizehn verschiedenen Genen gearbeitet. Diese wurden so ausgewählt, dass der Großteil aller bisher bekannten Wege der Apoptose untersucht wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die Apoptose der Photorezeptoren immunhistochemisch dargestellt. Mittels eines Tunel-Assays konnten DNA Strangbrüche auf histologischen Schnitten fluoreszenzmarkiert und so quantifiziert werden.

Abschließend werden beide Ansätze, vor allem im Bezug auf den zeitlichen Ablauf der Neurodegeneration, korreliert.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 3.1 alphabetisch aufgelistet, die verwendeten Kits in Tabelle 3.2.

**Tabelle 3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien**

Chemikalien/Verbrauchsmaterialien	Hersteller
$\beta$ -mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
DAPI Lösung 1:1000 (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Eigene Herstellung
DMSO	New England Biolab, Frankfurt am Main
Einmalhandschuhe, Nitril	Ansell Gmbh, München, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, München
Färbekammer für Objektträger	Science Services GmbH, München
Färbeküvette	VWR International GmbH, Darmstadt
Leica 819 Low Profile Microtome Blades	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch
LC Green	Biochem, Salt Lake City
LE Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Loading Dye	Fermentas, St.Leon-Rot
Microtubes div.Größen	Sarstedt, Nümbrecht
MgCl <sub>2</sub>	Promega, Mannheim
Objektträgerkästen, 50 und 100 Stellplätze	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Pap Pen	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt,
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA
Paraformaldehyd 4%	Eigene Herstellung
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Eigene Herstellung
PCR TW Tube 0,2ml	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Pipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim

Pipettierspitzen 10µl, 200µl	Sarstedt, Nümbrecht
RNA Later	Ambion, Darmstadt
Sybre Green	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Superfrost Objektträger	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen,
TBE	Eigene Herstellung
Tissue-Tek® Cryomold®	Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA, USA
Tris HCl	Eigene Herstellung

Tabelle 3.2 Kits

Kit	Hersteller
QIAGEN RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Qiaxcel RNA QC Kit v2.0	Qiagen, Hilden
Takara cDNA Synthesis Kit	Takara, Saint-Germain-en-Laye, France
Fluorometric DNA Fragmentation Detection Kit 2 (BrdU)	PromoKine, Heidelberg

### 3.1.2 Enzyme und Marker

In dieser Arbeit verwendete Enzyme und Marker sind in Tabelle 3.3 und in Tabelle 3.4 aufgelistet.

Tabelle 3.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
GoTaq Polymerase	Promega, Mannheim
PrimeScript RTase	Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
Proteinase K	Qiagen, Hilden
RNase Free DNase	Qiagen, Hilden
DNase 1	Fermentas, St.Leon-Rot

Tabelle 3.4 Marker

Marker	Hersteller
QX Alignment Marker 15bp/1kbp	Qiagen, Hilden
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot

### 3.1.3 Primer

Die verwendeten Primer wurden zum Teil über Vektor NTI (NTI) designt und zum Teil aus der Harvard Primer Datenbank (HPD) (siehe Tabelle 3.5) bezogen. Alle Primer wurden auf 10mmol/l verdünnt.

Tabelle 3.5 Primer

Gen	Produktlänge	Sequenz Sense Primer	Sequenz Antisense Primer	Hersteller
<i>gapdh</i>	199bp	ggtcggtgtgaacggatttg	cccgttgatgacaagctccc	NTI
<i>aif</i>	150bp	caagcagaaactggtgccct	ccccctgatgaaccagagct	NTI
<i>bcl112 (Bcl-xL)</i>	199bp	attgcaagttggatggcc	agagtgagcccagcagaa	NTI
<i>bcl10</i>	184bp	tcctcacggaggaggattg	actcccagcccgtttctac	HPD
<i>calpain 1</i>	170bp	caaggaactggctctattcc	tgagggtgaggaggcaatg	NTI
<i>calpain 2</i>	164bp	ggcgtcttccaggatcctt	agatgtctgtcgggtggct	NTI
<i>caspase 3</i>	201bp	ctcgtctggtacggatgtg	Tcccataaatgacccttcatca	HPD
<i>caspase 12</i>	243bp	taggggaaagtgcgagttca	ggccaatccagcatttacct	HPD
<i>c-fos</i>	173bp	ccggggacagcctttcctacta	aggtctgggctggtggagat	NTI
<i>c-jun</i>	133bp	ttctccagtcgagagcg	tgagaagggtccgagttcttgg	HPD
<i>dr 5</i>	148bp	tgctgcttgctgtgctacagg	ggcttgcagttcccttctgaca	NTI
<i>fas</i>	195bp	gcgggttcgtgaaactgataa	gcaaaatgggcctccttgata	HPD
<i>parp</i>	160bp	gctttatcgagtggagtacgc	ggagggagtccttgggaatac	HPD
<i>trp63</i>	221bp	ccacagtacacgaacctggg	tggaaggacacatcgaagctg	HPD

### 3.1.4 Geräte

In dieser Arbeit verwendete Geräte sind in Tabelle 3.6 alphabetisch aufgelistet.

**Tabelle 3.6 Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
BioDocAnalyze	Biometra, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Wessling-Berzdorf
Eismaschine	Scotsman, Berlin
Elektrophorese Powersupply	Biometra, Göttingen
Fluoreszenz Mikroskop	Keyence, Essen
Gelkammer Whatman	Biometra, Göttingen
Homogenisator Precellys	Peqlab,Erlangen
Kryostat Slee	Slee, Mainz
Magnetrührer	IKA, Staufen
Mastercycler ep realplex	Eppendorf, Schönebuch/Basel
PCR Cycler T Professional Basic Gradient	Biometra, Göttingen
pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Qiaxcel System	Qiagen,Hilden
Thermoblock	Biometra, Göttingen
Vortexer	VWR International GmbH, Darmstadt
Waage	Ohaus, Zürich
Zentrifuge 1-15 PK	Sigma, München
Zentrifuge 4K15	Sigma, München

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Primerdesgin

In dieser Arbeit verwendete Primerpaare wurden teilweise über Vektor NTI designt (siehe Tabelle 3.5). Die Gensequenz wurde über NCBI (National Center for Biotechnology Information) ermittelt.

### 3.2.2 RNA Extraktion

Die RNA Extraktion ist ein Verfahren, bei der die RNA aus vor kurzem präparierten Gewebe extrahiert wird. Dieses Verfahren hat in der Molekularbiologie einen wichtigen Stellenwert, denn in der RNA werden nur Gene exprimiert, die zu diesem Zeitpunkt in der Zelle aktiv sind. So ergibt sich die Möglichkeit, mit einer folgenden PCR zu analysieren, welche Gene zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Präparation des Gewebes in einer Zelle aktiv sind und verschiedene Prozesse in Gang setzen. Die RNA Extraktion wird in dieser Arbeit mit dem Qiagen RNA Mini Kit durchgeführt. Dabei wurden die Mäuseaugen erst mittels Homogenisator zerstückelt und danach über einer Membran mit verschiedenen Waschpuffern zentrifugiert, um so die freigewordenen RNA aufzureinigen und aufzufangen. Zwischenzeitlich wurde eine DNase dazugegeben, um eine Verunreinigung der RNA durch DNA zu verhindern. Eine wichtige Komponente der RNA-Extraktion stellt das beständige saubere Arbeiten dar, um die empfindliche RNA vor äußeren Einflüssen zu schützen.

Protokoll der Arbeitsschritte nach Herstellerangaben:

- Gewebe mit Buffer RLT homogenisieren
- Ethanol zugeben
- Auf Rneasy Mini Spin geben und zentrifugieren
- DNase Verdau: Buffer RW1, zentrifugieren, 15min DNase direkt auf Membran geben, Buffer RW1, zentrifugieren
- Buffer RPE, zentrifugieren
- Erneut Buffer RPE, zentrifugieren
- Bei full speed zentrifugieren um Membran zu trocknen
- Rnase-freies H<sub>2</sub>O direkt auf die Membran geben, zentrifugieren

### 3.2.3 RNA Qualitätskontrolle

Einen wichtigen Schritt vor der qPCR stellt die RNA Qualitätskontrolle dar, sie wird auch in den international gültigen MIQE Guidelines für die qPCR (=Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) gefordert. Denn ohne RNA Qualitätskontrolle können Ergebnisse einer qPCR nicht als valide gelten. Die Problematik bei der Arbeit mit RNA ist vor allem deren Empfindlichkeit gegenüber äußeren Einflüssen, insbesondere gegenüber den ubiquitär vorkommenden RNAsen [Becker et al. 2009]. Wie schon in Punkt 3.2.2 erläutert, erfordert die Arbeit mit RNA deshalb in allen Verarbeitungsschritten strenge Vorsichtsmaßnahmen. Mit der RNA Qualitätskontrolle wird vor der Reversen Transkription überprüft, ob die RNA während der Aufbereitung zu Schaden gekommen ist. In dieser Arbeit wurde für die Qualitätskontrolle das Qiaxcel Screen Gel verwendet. Das Screen Gel ist ein automatisiertes Elektrophorese System, basierend auf einer Kapillarelektrophorese. Ziel der RNA Qualitätskontrolle ist es, in einem Gel die einzelnen Anteile der RNA darzustellen. Die gesamte RNA setzt sich aus rRNA (5S,18S und 28S), mRNA und fragmentierter RNA zusammen. Durch die Kapillarelektrophorese können die einzelnen Anteile der Größe nach aufgetrennt werden. Wie bei einem herkömmlichen Gel laufen die negativ geladenen Nukleotide zum positiv geladenen Ende, je kleiner desto schneller. Ein Detektor misst mittels Fluoreszenz die entstehenden Emissionssignale, welche dann in elektronische Daten konvertiert und auf einem virtuellen Gel sichtbar gemacht werden [Handbuch Qiaxcel Screen Gel]. Ein sicheres Zeichen für die Integrität der RNA sind eindeutige 18S und 28S Banden und keine weiteren Spuren fragmentierter RNA in Form von Schlieren oder Streifen im Gel.

Protokoll der Kapillarelektrophorese:

- 1µl RNA + 1µl Denaturation Buffer, in ein Tube statt RNA 1µl QX RNA Size Marker
- 2 Minuten bei 70°C inkubieren, dann auf den Eisblock
- Kurz zentrifugieren
- Mit RNA Dilution Buffer auf 10µl auffüllen

### 3.2.4 Reverse Transkription

Die aus den Mäuseaugen extrahierte mRNA muss für die qPCR in eine cDNA umgeschrieben werden. Dafür wurde eine Reverse Transkription gemacht. Benötigt wird dabei eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die den mRNA Strang in eine einzelsträngige cDNA umschreibt. Verwendet wurde hierfür das Takara cDNA Synthesis Kit. Der Gehalt der RNA wurde zuvor mittels eines Photometers bestimmt.

Protokoll auf 500ng RNA

10µl Template Mix:

**Tabelle 3.7 Protokoll Teil I**

RNA	Je nach RNA Gehalt ng/µl
Random 6mers	2µl
dNTPs	1µl
ddH <sub>2</sub> O	Je nach RNA-Gehalt auf 10µl auffüllen

Dann fünf Minuten bei 65°C inkubieren, danach auf Eis kühlen.

Zum 10µl Template Mix hinzugeben:

**Tabelle 3.8 Protokoll Teil II**

RNase Inhibitor	0,5 µl
5x Buffer	4µl
Prime Script RTase	1µl
ddH <sub>2</sub> O	4,5µl

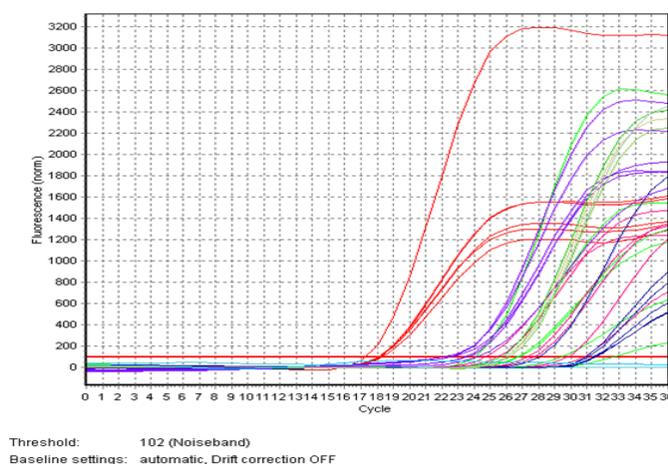
Anschließen in PCR Cycler geben.

PCR Programm: 10min bei 30°C, 60min bei 42°C, 15min bei 70°C

### 3.2.5 Quantitative PCR

Die quantitative PCR (Real-Time PCR, qPCR) erfolgt nach dem Prinzip der normalen PCR, mit dem Vorteil, dass in Echtzeit über Fluoreszenzsignale die Menge der entstandenen Produkte quantifiziert werden können. Eine PCR (Polymerase Chain Reaction) ermöglicht die Vervielfältigung eines durch Primer bestimmten DNA Abschnittes. Die Reaktion beginnt bei 95°C, der Denaturierung. Hierbei wird eine doppelsträngige DNA aufgetrennt. Im zweiten Schritt, Annealing, binden bei 75°C die Oligonukleotidprimer an die DNA Einzelstränge und ermöglichen der Polymerase einen Anknüpfungspunkt. Dann erfolgt die Elongation, wobei die Polymerase mit dNTPs die DNA wieder zu einem Doppelstrang vervollständigt. Diese Reaktionskette wiederholt sich in jedem Zyklus.

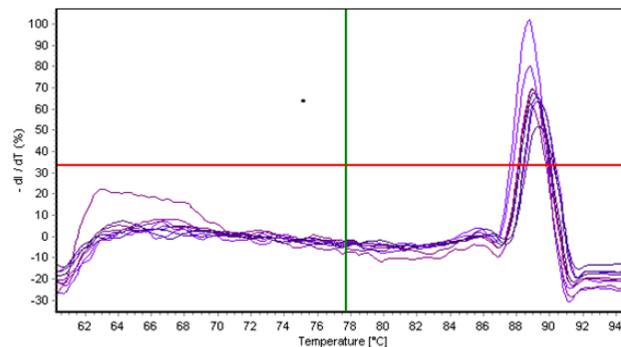
Bei der qPCR werden in jeden neuen Doppelstrang Floreszenzen eingebaut. Jedes Emissionssignal der Fluoreszenz wird gemessen. Sobald die Fluoreszenz in den Produkten die Hintergrundfluoreszenz überschreitet, ist der Ct-Wert (Cycle-Threshold, Schwellenwert-Zyklus) erreicht. Der Ct-Wert gilt somit als Anfang des exponentiellen Wachstums der Doppelstrang-Produkte. Quantitativ bedeutet das, je weniger Zyklen benötigt werden, um den Ct-Wert zu erreichen, desto stärker war die Expression des Gens in der mRNA.



**Abbildung 3.1 qPCR mit Ct-Werten verschiedener Primer**

*Quelle: Augenlinik Giessen*

Da aber anhand der Ct-Werte nicht zwischen verschiedenen möglichen PCR-Produkten unterscheiden werden kann, gibt es zusätzlich noch die Schmelzkurvenanalyse (Melting Curve). In der Schmelzkurvenanalyse werden die PCR-Produkte wieder aufgeschmolzen, dabei wird die Fluoreszenz frei. Jedes Produkt wird bei einer spezifischen Temperatur aufgeschmolzen. Anhand der Temperatur kann zwischen unspezifischen Primerdimeren und spezifischen PCR-Produkten unterschieden werden.



Threshold: 33%

**Abbildung 3.2 Melting Curve eines spezifischen Produkts bei 89°C**

*Quelle: Augenklinik Giessen*

Das Standard qPCR Protokoll in dieser Arbeit ist in Tabelle 3.9 aufgelistet (Die Abweichungen bei den verschiedenen Primerpaaren sind im Anhang 10.1 aufgelistet):

**Tabelle 3.9 Standard PCR Protokoll**

Standard Ansatz für 60µl		Standard PCR Programm	
ddH <sub>2</sub> O	24,2µl	94°C (Hot Start)	5min
Puffer	12µl	Zyklen	40x
dNTP	9,6µl	53-65°C (Annealing)	30s
MgCl <sub>2</sub>	4,8µl	72°C (Extension)	30s
Primer a	0,8µl	94°C (Denaturierung)	30s
Primer b	0,8µl	53-65°C (Annealing)	30s
Polymerase	0,6µl	72°C (Extension)	5min
LCGreen	4,8µl		
cDNA	2,4µl		

Um eine Verunreinigung des Ansatzes auszuschließen, wurde bei jeder PCR auch eine Kontrolle mit H<sub>2</sub>O statt DNA hinzugefügt.

### 3.2.6 Berechnung mittels $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Um die ermittelten Ct Werte aus der qPCR quantitativ zu beurteilen und so eine Aussage über die Genexpression treffen zu können, wurde der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Wert ermittelt. Die Berechnung des  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Wertes wird in Abbildung 3.3 dargestellt.

$$\begin{aligned}\Delta Ct &= Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct - \Delta Ct \text{ Kontrolle} \\ &2^{-\Delta\Delta Ct}\end{aligned}$$

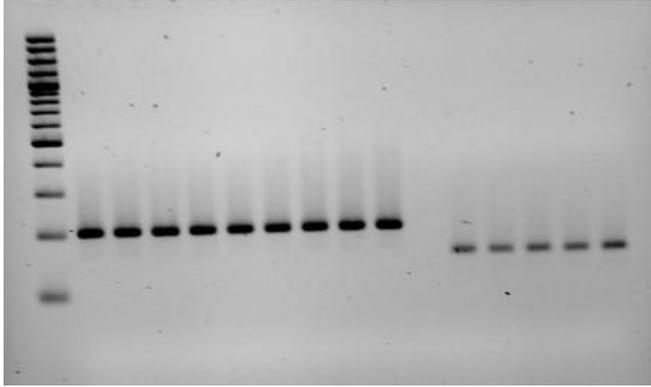
Abbildung 3.3 Berechnung  $2^{-\Delta\Delta Ct}$

### 3.2.7 Gelelektrophorese

Die Elektrophorese ist definiert als Wanderung von Ionen und kolloidalen Teilchen im elektrischen Feld, wobei eine Auftrennung nach Größe und Ladungsdichte erfolgt. So können z.B. verschiedene PCR-Produkte sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit wurden alle in der qPCR entstandenen Produkte auf ein Ethidiumbromid-Gel aufgetragen. Dadurch konnte zusätzlich zur Schmelzkurvenanalyse, anhand der Größe eindeutig gezeigt werden, dass es sich um das erwünschte Genprodukt und nicht um verschiedene andere Produkte handelt und es konnten Verunreinigungen, z.B. Primerdimere ausgeschlossen werden.

Protokoll eines 2% Ethidiumbromidgels:

2g Agarose und 100ml TBE vermischen und erwärmen, 7µl Ethidiumbromid zugeben und in einer Gelkammer erstarren lassen. Anschließend Produkte und Marker (GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder) auftragen und bei einer Spannung von 100Volt 60 Minuten laufen lassen.



**Abbildung 3.4 Beispiel einer Gelelektrophorese**

*Quelle: Augenlinik Giessen*

## 3.3 Immunhistochemische Methoden

### 3.3.1 Kryoschnitte

Für die Kryoschnitte wurden von Mitarbeitern des Instituts die Augen der Tiere entnommen und nach einem bestimmten Schema (um die Orientierung der Augen zu erhalten) in Tissue-Tek eingebettet.

Diese eingebetteten Augen konnten auf einem Block des Kryostaten aufgefroren und mit einer Rasierklinge getrimmt werden, um sie dann einzuspannen und in 16µm dünne Schnitte zu schneiden. Die Schnitte wurden dann auf Superfrost Objektträger aufgezo-

### 3.3.2 Tunel-Assay

Mittels eines Tunel-Assays (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) werden DNA-Strangbrüche auf Gewebeschnitten mit Fluoreszenz markiert und so mikroskopisch sichtbar gemacht. Durch die Fragmentation der DNA während der Zelldegeneration, werden an den Bruchenden Hydroxygruppen (3'-OH Gruppen) frei. Bei der immunhistochemischen Färbung kann nun das Enzym Tdt (terminal desoxynucleotidyl transferase) fluoreszenzmarkierte Nukleotide an die Hydroxygruppen binden. Im Fluoreszenz-Mikroskop können diese Nukleotide dargestellt werden. So

kann mit der Anzahl an Tunel-positiven Zellen eine quantitative Aussage über die Degeneration von Zellen in einem Gewebe gemacht werden.

Protokoll der Tunel-Färbung: Fluometric DNA Fragmentation Detection Kit II (BrdU)

1. Schnitte auftauen und antrocknen lassen (30 Minuten)
2. Schnitte in PBS waschen (3x10 Minuten)
3. Für Positivkontrolle einen Objektträger: 100µl (1µl DNase I + 99 µl DNase Puffer (0,05 M Tris HCl, (pH 8,0) und 0,05M EDTA (pH 8,0))), 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
4. Waschen in PBS, 2x 10 Minuten
5. Alle Objektträger in 4% Paraformaldehyd fixieren,15 Minuten
6. Waschen in PBS, 2x 10 Minuten
7. Proteinase-K-Verdau: 5 Minuten (2 µl Proteinase K + 998 µl TrisHCl, (0,1M pH 8, inklusive 0,05 M EDTA)
8. Waschen in PBS, 1x 5 Minuten
9. Nachfixieren in 4% Paraformaldehyd, 5 Minuten
10. Waschen in PBS, 1x 5 Minuten
11. Waschen mit Waschpuffer, 2x 5 Minuten
12. DNA labeling solution ansetzen, Inkubation bei 37°C für 60 min

**Tabelle 3.10 DNA labeling solution**

	<b>1 assay</b>	<b>4 assays</b>	<b>8 assays</b>	<b>Negativkontrolle, 1 Objektträger</b>
<b>TdT Reaction buffer</b>	10 µl	40 µl	80 µl	10 µl
<b>TdT Enzyme</b>	0,75 µl	3,0 µl	6,0 µl	_____
<b>Br-dUTP</b>	8 µl	32 µl	64 µl	8 µl
<b>dd water</b>	32,25 µl	129,00 µl	258,00 µl	33,0 µl
<b>Total Volume</b>	51 µl	204 µl	408 µl	51 µl

13. Waschen in PBS, 2x 5 Minuten
14. Antibody Solution: 50µl Anti-BrdU Red(Anti-BrdU-Red, Ex/Em: 488/576nm) + 950µl Waschpuffer → Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten
15. DAPI-Lösung(1:5000 (200 µl DAPI (1:1000) + 800 µl PBS)), für 5 Minuten
16. Waschen in Aqua, 2x5 Minuten, ab jetzt alles im Dunkeln
17. Waschen mit PBS, 2x5 Minuten
18. Eindeckeln mit Deckgläschen in Aquapolymount
19. Mikroskopieren (Zeitfenster max. 48 h)

### **3.3.3 Auswertung**

Die gefärbten Schnitte wurden anschließend im Fluoreszenzmikroskop mit 20x Objektiv mikroskopiert und fotografiert. Aus den jeweiligen Fotografien wurde ein gröbendefinierter Ausschnitt (900x600px, bzw. 238,13mm x 158,75mm) entnommen und innerhalb dieses Ausschnittes alle Tunel-positiven Zellen gezählt. Die gezählten Daten wurden gemittelt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Projekt der Arbeit

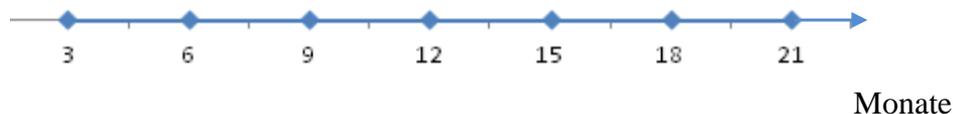
In dieser Arbeit wurden mittels qPCR verschiedene Gene der Apoptose im zeitlichen Verlauf an den B6J.Sv129-Rpgr<sup>tm1sti</sup> Mäusen quantitativ untersucht und zeitgleich der Zelluntergang mit einem Tunel-Assay dargestellt.

Zu sieben verschiedenen Zeitpunkten (siehe Abbildung 4.1) wurde aus wildtyp-, mutierten- und heterozygoten B6J.Sv129-Rpgr<sup>tm1sti</sup> Augen mRNA extrahiert, zu cDNA umgewandelt, in der qPCR mit verschiedenen Primern eingesetzt und die  $2^{-\Delta\Delta}$  Ct Werte für verschiedene Gene berechnet. So konnte die Veränderung der Expression der Gene im zeitlichen Verlauf bei den mutierten und heterozygoten Tieren gezeigt werden.

Die molekularbiologische Analyse orientierte sich an den international gültigen MIQE Guidelines [Bustin et al. 2009]. Diese Guidelines fordern bestimmte Vorgehensweisen und Darstellungen um quantitative qPCR Ergebnisse international vergleichbar und validierbar zu machen.

Die morphologische Darstellung erfolgte mittels Tunel-Assays. Diese immunhistochemische Färbung detektiert DNA Strangbrüche. Die Färbung wurde zu denselben sieben Zeitpunkten mit Wildtyp-, mutiert und heterozygoten B6J.Sv129-Rpgr<sup>tm1sti</sup> Augen durchgeführt.

Anschließend wurden beide Ansätze miteinander verglichen und korreliert.



**Abbildung 4.1** Untersuchte Zeitpunkte

*Pro Zeitpunkt je 3 Augen für qPCR, je 2 Augen für den Tunel-Assay*

## 4.2 Primer

Die Auswahl, welche Gene der Apoptose untersucht werden sollen, wurde anhand des bis dahin vorliegenden Wissens um den Ablauf der Apoptose und anhand eines zuvor von Mitarbeitern des Instituts angefertigten PCR-Arrays zur Apoptose mit drei Monate alten mutierten Mäusen getroffen (siehe Anhang 10.3). Die Primerpaare wurden dann mit dem Programm Vektor NTI designt oder über die Harvard Primer Datenbank bestellt.

In der Literatur werden häufig AIF, Calpain 1 und 2, Caspase 12, c-jun/c-fos, und PARP beschrieben. Im PCR Array waren zusätzlich die Gene *bcl2l1*, *bcl10*, *caspase 3*, *fas*, *trp63* und *dr 5* auffällig (siehe Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1 Proteine der Primerpaare der qPCR**

Primer	Sequenzlänge	Apoptoseweg
GAPDH	199bp	Referenzgen (Housekeepinggene)
AIF (apoptosis inducing factor)	150bp	Transloziert bei entsprechenden Signalen zum Zellkern und verursacht Chromatinkondensation
bcl2l1 (Bcl-xL)	199bp	Reguliert die Kanäle in der mitochondrialen Membran; antiapoptotisch
bcl10	184bp	Besitzt Caspasen Verstärkungsdomäne [Hofmann et al. 1997]
calpain 1	170bp	Fördert Freisetzung von <i>aif</i>
calpain 2	164bp	Aktiviert Caspase 12 [Marigo 2007]

caspase 3	201bp	Effektorcaspase
caspase 12	243bp	Involviert in ChromatinfrAGMENTIERUNG [Marigo 2007]
c-fos	173bp	Teil des AP-1 (Aktivator Protein)
c-jun	133bp	Teil des AP-1
dr5 (death receptor 5)	148bp	Todesrezeptor
fas	195bp	Todesrezeptor
PARP	160bp	Fördert Freisetzung von AIF und induziert raschen Energieabbau
trp63	221bp	Mitglied der p53 Familie

### 4.3 Primeroptimierung

Ein wichtiger Schritt vor jeder analytischen PCR ist die Optimierung der PCR Protokolle für das einzelnen Primerpaar. Das Ziel der Optimierung ist eine optimale Zusammensetzung des PCR- Ansatzes und optimale Temperaturen, sodass am Ende der PCR eindeutig das erwünschte Produkt ohne Kontamination entsteht.

#### 4.3.1 Zusammensetzung des PCR Ansatzes

Der Standard qPCR Ansatz dieser Arbeit besteht aus ddH<sub>2</sub>O, Puffer, dNTP, MgCl<sub>2</sub> Primer a, Primer b, Polymerase, LCGreen und der cDNA (siehe Tabelle 3.9). Die Standardgrößen des Puffers, der dNTPs, der Polymerase und des LC Greens wurden stets beibehalten. Verändert wurde die Menge der Primer, der cDNA und des MgCl<sub>2</sub>. Zusätzlich wurde teilweise DMSO hinzugegeben. Die Menge des ddH<sub>2</sub>O sollte die Veränderungen ausgleichen, das bedeutet den Ansatz wieder auf 20µl auffüllen.

Jedes Primerpaar wurde zu Anfang mit dem Standardansatz zusammengesetzt. Meist ergaben sich dabei jedoch ungültige Ergebnisse in Form von mehreren verschiedenen Produkten, Primerdimere, kein Produkt oder Kontaminationen. Daraufhin wurde für jedes Primerpaar einzeln die Zusammensetzung des Ansatzes optimiert.

Zuerst wurde die Menge der cDNA variiert. Wenn in der qPCR kein Produkt entstanden ist, wurde die Menge in kleinen Schritten erhöht, wenn Primerdimere zu sehen waren, erniedrigt. Zeigte sich durch eine Veränderung der Menge an DNA keine Besserung, wurde der Anteil der Primer in gleicher Weise erhöht, beziehungsweise erniedrigt. Weiter konnte dann der Betrag an  $MgCl_2$  verändert werden. In manchen Fällen half die Zugabe von DMSO.

Die optimierten Protokolle der einzelnen Primer können im Anhang 10.1 eingesehen werden.

### **4.3.2 Optimale Temperaturen**

Nicht nur die Zusammensetzung des Ansatzes, sondern auch die Temperaturen während der qPCR, spielen eine Rolle für optimale Ergebnisse.

Die Denaturierung findet wie bei jeder PCR bei  $94^\circ C$  statt, ebenso die Extension bei  $72^\circ C$ . Die Annealing Temperatur wurde bei jedem Primer mit einer Range von  $53-65^\circ C$  ausgetestet. ( $53,5^\circ C$ ,  $55,4^\circ C$ ,  $58,5^\circ C$ ,  $61,7^\circ C$ ,  $64,2^\circ C$ ,  $65,1^\circ C$ ) Bei allen verwendeten Primern ergab sich schließlich  $64,2^\circ C$  als optimale Temperatur.

Da alle vierzehn Primerpaare sehr kleine Produkte bilden (maximal 250bp) wurden nur jeweils 30s für die einzelnen Schritte gewählt.

### **4.3.3 Lineare Quantifizierung**

Einen weiteren Teil der PCR Optimierung stellt die lineare Quantifizierung dar. In Form einer Verdünnungsreihe kann so bewiesen werden, dass durch eine geringere DNA Konzentration auch ein verringertes Signal entsteht und durch eine höhere Konzentration ein deutlicheres Signal.

Am Beispiel des Referenzgens *gapdh* wurde dies dargestellt (siehe Abbildung 4.2).

Begonnen wurde mit einem Mischverhältnis 1 $\mu$ l cDNA und 9 $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Aus dieser Zusammensetzung wurde 1 $\mu$ l entnommen und wieder mit 9 $\mu$ l H<sub>2</sub>O vermischt, wodurch ein Mischverhältnis von 1:100 entstand. Die Verdünnungsreihe wurde so bis zu einem Mischverhältnis 1:1.000.000 weitergeführt. In der qPCR zeigten sich im Verlauf steigend Ct Werte, in der Gelelektrophorese nahm die Stärke des Produktes immer weiter ab, bis kein Produkt mehr zu sehen war (siehe Abbildung 4.2)

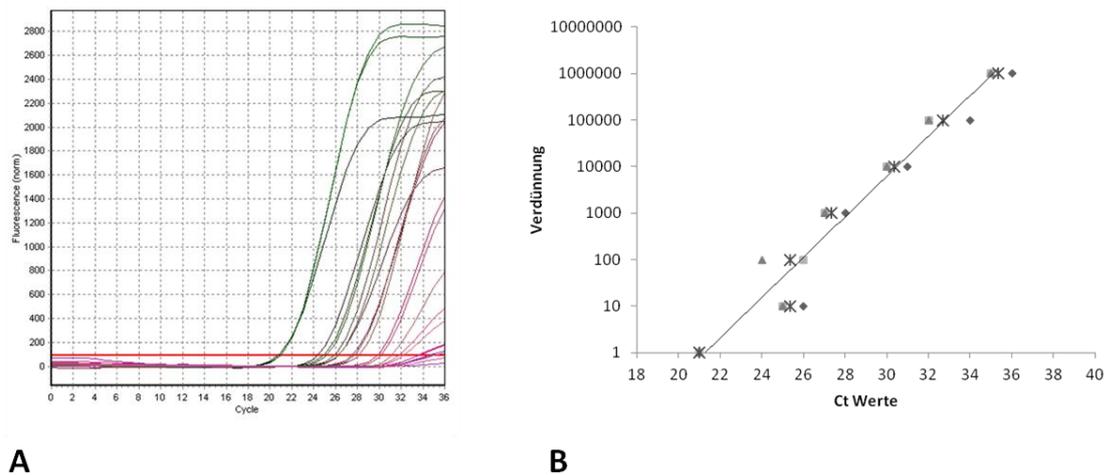


Abbildung 4.2 qPCR (A) und Regressionsanalyse (B) der linearen Quantifizierung

## 4.4 RNA

### 4.4.1 Präparation und Aufbewahrung der Mäuseaugen

Die Augen der euthanasierten Mäuse wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten von tierärztlichen Mitarbeitern des Labors für molekulare Ophthalmologie nach Meldung 409\_M präpariert und komplett entnommen. Dann wurden die Augen einzeln in RNA-Later eingelegt und bei -80°C aufbewahrt.

### 4.4.2 mRNA Isolation und Qualitätskontrolle

Zu jedem der untersuchten sieben verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils drei Augen von unterschiedlichen Mäusen (in Alter und bezüglich der Mutation übereinstimmend) gepoolt. Diese Vermischung von drei Augen hat ihren Hintergrund in der Größe eines Mauseuges. Das geringe Gewebe eines Mauseuges reicht nicht aus, um

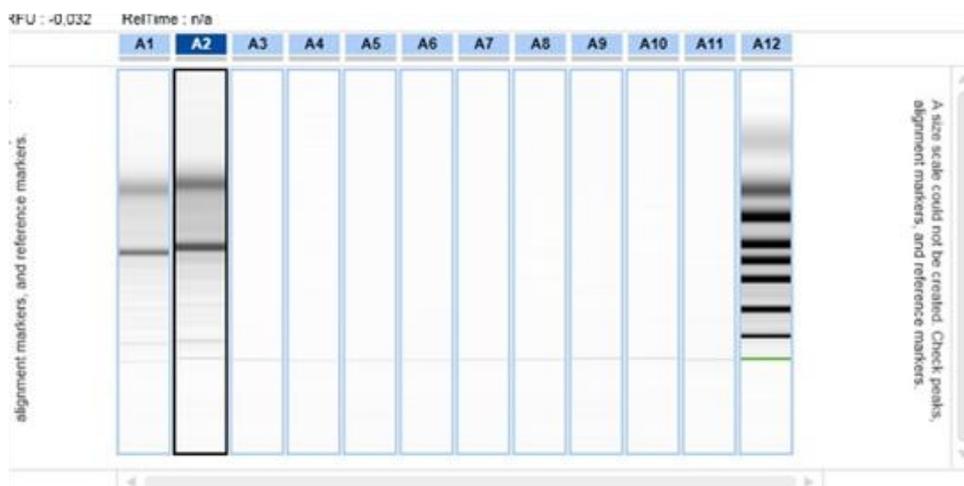
eine suffiziente Menge an mRNA zu gewinnen. Die Vermengung jedoch ermöglichte einen ausreichenden Gehalt an mRNA.

Die drei Augen wurden in ein Microtube gegeben und durch den Homogenisator fein zermürbt. Daraus wurde dann die mRNA extrahiert (siehe 3.2.2). Während der Extraktion wurde auch eine DNase angewandt, um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern.

Der Gehalt der mRNA wurde mittels eines Biophotometers bestimmt und dokumentiert. Mit dieser Methode wurde der Gehalt einer jeden mRNA in dieser Arbeit festgestellt. Dies ist ein wichtiger Schritt vor der Reversen Transkription, denn verschiedene Proben können nur untereinander verglichen werden, wenn auch deren Gehalt an RNA bekannt ist (siehe MIQE Guidelines) [Bustin et al. 2009].

Auch die RNA Qualitätskontrolle wird von den MIQE Guidelines gefordert [Bustin et al. 2009]. Denn eine Verunreinigung, z.B. durch DNA, oder auch eine defekte RNA, verändern die Bedingungen der qPCR und beeinflussen somit die Ergebnisse. Die Qualität der RNA wurde in dieser Arbeit mittels Gelelektrophorese (Qiaxel Screen Gel) überprüft. Das Protokoll der Qualitätskontrolle wird in Punkt 3.2.3 erläutert. Ein Beispiel der Qualitätskontrolle ist in Abbildung 4.3 dargestellt.

Die restlichen Bilder der RNA Qualitätskontrolle für die verwendete RNA sind im Anhang (Punkt 10.2) gezeigt.



**Abbildung 4.3 RNA Qualitätskontrolle**

*Qualität der RNA bei 18 Monate heterozygot (A1) und bei 18 Monate mutiert (A2)*

### 4.4.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wurde entsprechend der Empfehlung in den MIQE Guidelines in Triplikates ausgeführt. Das bedeutet, dass aus jeder RNA in jeweils drei eigenen Reversen Transkriptionen drei cDNAs hergestellt wurden (siehe Abbildung 4.4). Diese Maßnahme diente dazu, um Fehler in der Umwandlungsphase gegebenenfalls darzustellen. So konnten in der qPCR die drei cDNAs verglichen werden, und bei starkem Abweichen voneinander, konnte der Fehler in der Reversen Transkription gefunden werden.

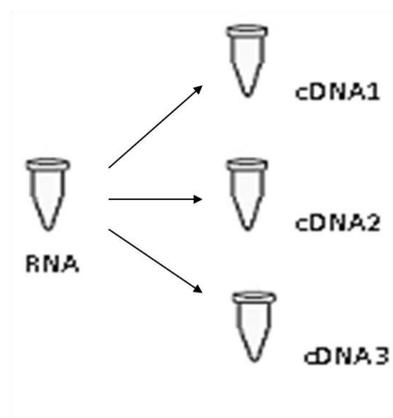


Abbildung 4.4 RNA Umwandlung in Triplikates

Anhand des Gehaltes wurde errechnet, wie viel RNA in der Reversen Transkription eingesetzt werden muss, damit die RNA Konzentration in allen Proben gleich ist. In jeder Reversen Transkription wurden 500ng/ $\mu$ l RNA eingesetzt.

Das Protokoll der Reversen Transkription wurde im Punkt 3.2.4 detailliert beschrieben.

## 4.5 qPCR

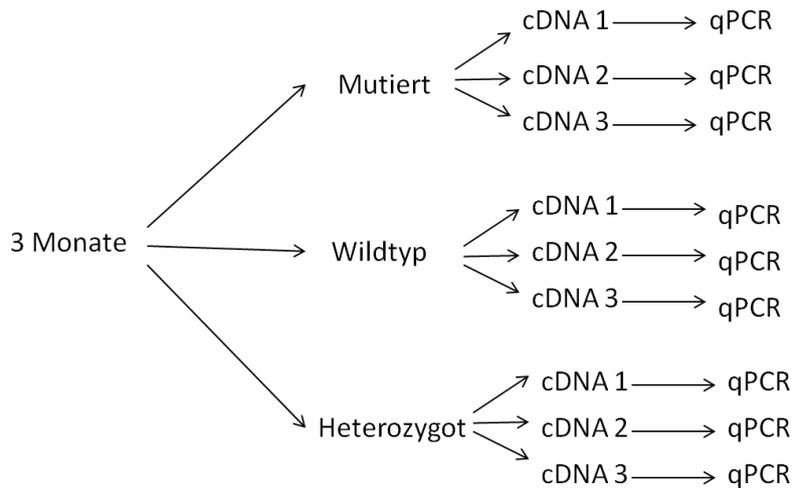
### 4.5.1 Ablauf

Nach der Reversen Transkription wurde der Gehalt der cDNA mittels Biophotometer bestimmt. So konnte jeweils die Konzentration der cDNA auf 500ng/ $\mu$ l mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt werden, damit in jeder qPCR die Konzentration der cDNA gleich war.

Die Protokolle des PCR Ansatzes und Temperaturen der einzelnen Primer können im Anhang 10.1 eingesehen werden.

Für jeden der sieben verschiedenen Zeitpunkte und jedes der 14 verschiedenen Gene wurden jeweils alle drei cDNAs für Wildtyp, heterozygote und mutierte Tiere gleichzeitig in einer qPCR eingesetzt (siehe Abbildung 4.5). Die dabei jeweils entstandenen drei Ct Werte pro Zeitpunkt und Gen wurden in der anschließenden Auswertung gemittelt.

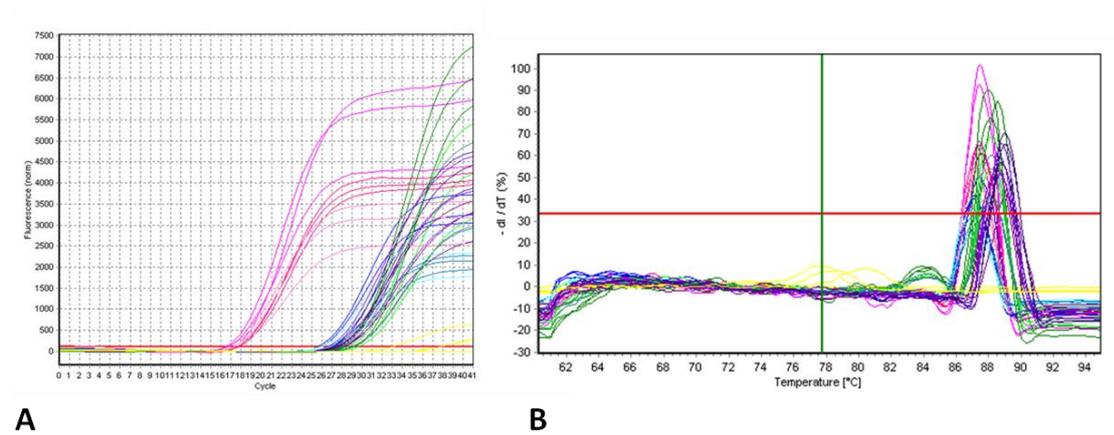
Beispiel für 3 Monate:



**Abbildung 4.5 Beispiel Ablauf qPCR 3 Monate**

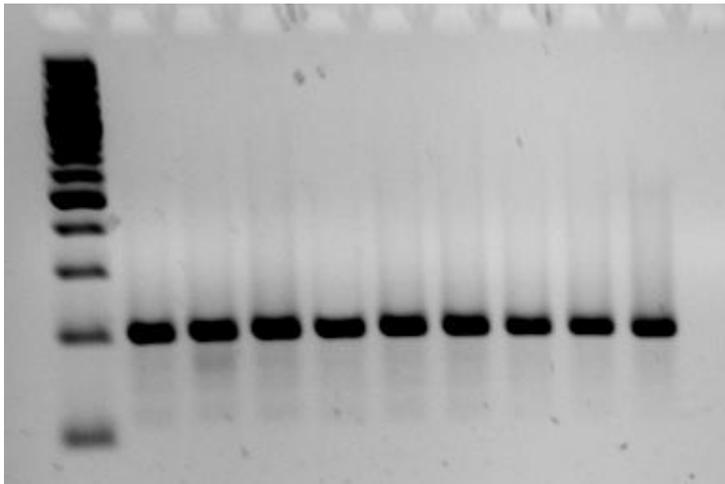
So gab es pro Zeitpunkt jeweils neun qPCR Ansätze für ein Gen (siehe Abbildung 4.5). Die zehnte Probe wurde anstelle von cDNA mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt, um eine mögliche Verunreinigung zeigen zu können. Nur wenn die ddH<sub>2</sub>O Probe negativ war, wurden die Werte der restlichen Proben in die Auswertung übernommen.

Die Abbildung 4.6 und die Abbildung 4.7 zeigen beispielhaft die Ergebnisse einer qPCR. Auf der Abbildung 4.6 werden die Ct-Werte von *gapdh*, *aif*, *calpain 1* und 2 und die Schmelzkurven dieser Gene bei 3 Monaten gezeigt. Die Abbildung 4.7 zeigt ein Gelbild der *caspase 3* bei 3 Monaten.



**Abbildung 4.6 Beispiel der qPCR (A) und der Schmelzkurvenanalyse (B)**

*gapdh*, *aif*, *calpain 1* und *calpain 2* bei 3 Monaten (gelb:  $ddH_2O$ )



**Abbildung 4.7 Gelbild *caspase 3* bei 3 Monaten**

Die Auswertung wurde nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Methode berechnet, dafür wurde ein housekeeping gene als Referenzgen benötigt. Als housekeeping gene wurde *gapdh* verwendet. Mittels *gapdh* werden die Werte innerhalb der jeweiligen Gruppe normalisiert, das bedeutet, dass dadurch Variationen in der Ausgangsmenge ausgeglichen werden können (siehe Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2 Beispiel für die  $2^{-\Delta\Delta}$  Ct Berechnung

		Referenzgen <i>gapdh</i>	Mittelwert <i>gapdh</i>	Zielgen <i>aif</i>	Mittelwert Zielgen <i>aif</i>	$\Delta$ Ct=Ct Zielgen-Ct Referenzgen	$\Delta\Delta$ Ct ( $\Delta$ Ct- $\Delta$ Ct Kontrolle)	$2^{-\Delta\Delta}$ Ct
mutiert	cDNA 1	17,79		26,80				
	cDNA 2	17,79		27,40				
	cDNA 3	17,89	17,823333	27,04	27,08	9,256666667	0,01	0,993092495
wildtyp	cDNA 1	16,62		25,73				
	cDNA 2	17,41		26,96				
	cDNA3	16,79	16,94	25,87	26,18666667	9,246666667		

#### 4.5.2 Ergebnisse der qPCR

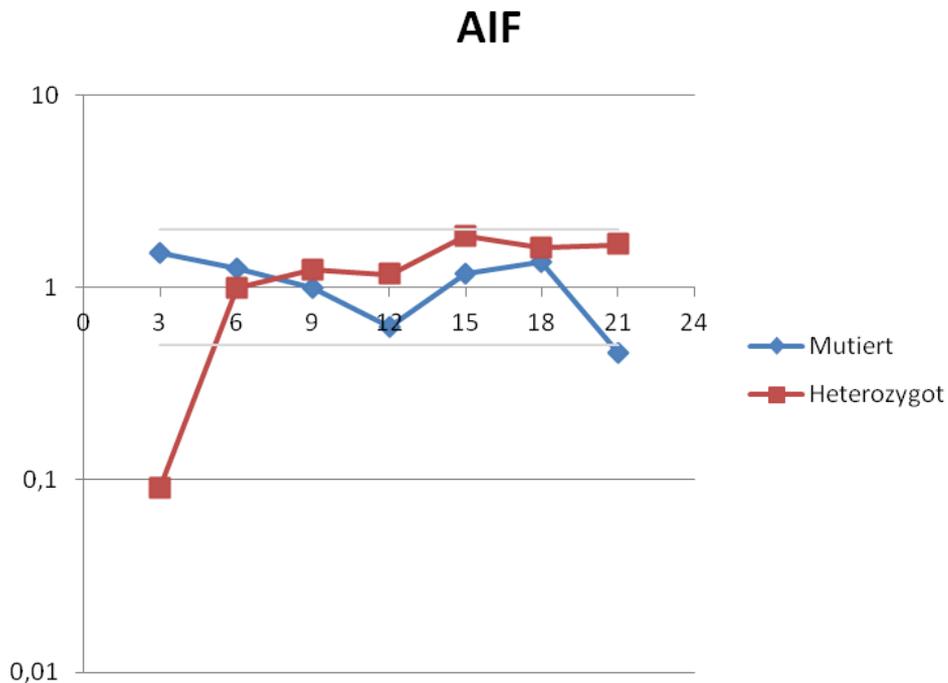
Nach der Berechnung der  $2^{-\Delta\Delta}$  Ct Werte für die mutierten und heterozygoten Tiere wurden diese Werte zur Verdeutlichung in Diagramme eingetragen.

Alle Diagramme sind gleich aufgebaut. Auf der x-Achse wurde der zeitliche Verlauf aufgetragen, 3 bis 21 Monate. Auf der y-Achse die logarithmische Spannweite der Genexpression von 0,1 bis 10. Eine signifikante Hoch oder Herabregulation der Genexpression zeigt sich bei  $2^{-\Delta\Delta}$  Ct Werten größer 2 oder kleiner 0,5. Graue Linien verdeutlichen den nicht signifikanten Bereich zwischen 2 und 0,5. Die Graphen der mutierten Tiere wurden blau dargestellt, die der heterozygoten rot.

Die Diagramme wurden nach ihrer Zusammengehörigkeit innerhalb der bekannten Apoptosewege gruppiert.

Um einen anschaulichen Vergleich beider Diagramme zu ermöglichen, wurden die jeweiligen Diagramme eines Gens für mutierte und heterozygote Tiere übereinandergelegt.

#### 4.5.2.1 Mitochondriale Aktivierung der Apoptose



**Abbildung 4.8** 2<sup>-ΔΔCt</sup> Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei *aif*

Anhand des blauen Graphen lässt sich erkennen, dass sich die Expression von *aif* bei den mutierten Tieren im Laufe der Zeit kaum ändert. Bei 21 Monaten wird *aif* herabreguliert. Alle anderen Zeitpunkte zeigen keine signifikante Änderung der Genexpression.

*Aif* zeigt bei den heterozygoten Tieren eine Herabregulation der Genexpression bei 3 Monaten. Der restliche Verlauf ist unauffällig.

Beide Kurven unterscheiden sich nicht stark voneinander. Eine Ausnahme ist eine Herabregulation bei den heterozygoten Tieren während der 3 Monate und bei den mutierten Tieren während der 21 Monate. Im restlichen zeitlichen Verlauf zeigt *aif* weder bei den mutierten noch bei den heterozygoten Tieren eine signifikante Veränderung der Genexpression.

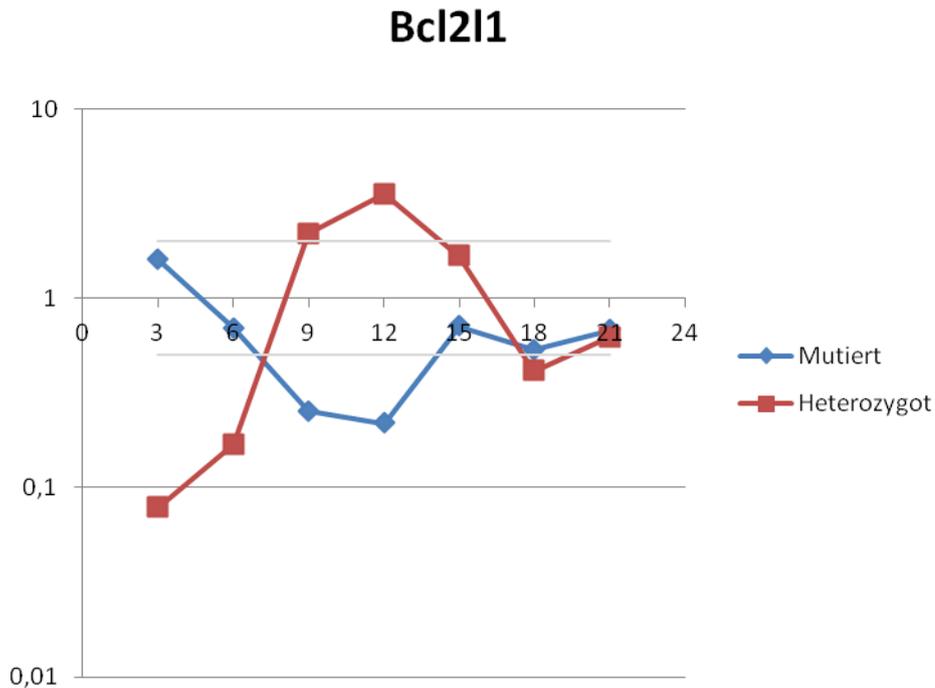
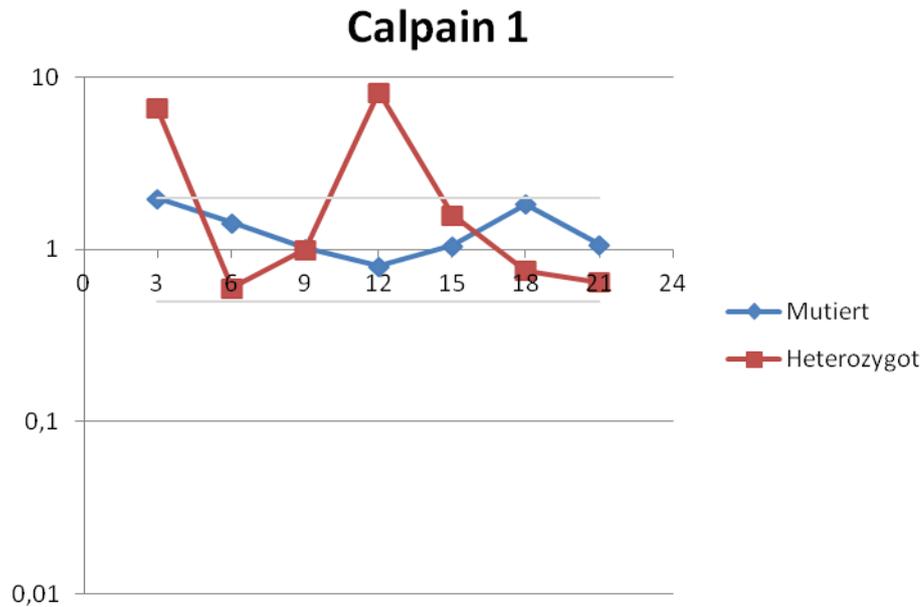


Abbildung 4.9  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei *bcl2l1*

*Bcl2l1* zeigt bei den mutierten Tieren eine Herabregulation der Genexpression bei 9 und 12 Monaten. Die Expression zu den übrigen Zeitpunkten ist nicht verändert.

Bei den heterozygoten Tieren ist *bcl2l1* bei 3 und 6 Monaten stark herabreguliert, steigt dann aber bei 9 und 12 Monaten wieder über die Signifikanzschwelle an. Bei 18 Monaten ist es leicht herabreguliert.

Die beiden Kurven für mutierten und heterozygoten Tiere weichen bei *bcl2l1* stark voneinander ab. Die mutierten Tiere zeigen keine Auffälligkeit, außer der Herabregulation bei 9 und 21 Monaten. Bei den heterozygoten Tieren zeigen sich jedoch starke Schwankungen, beginnend mit einer Herabregulation, dann eine Hochregulation und schließlich wieder eine Herabregulation.

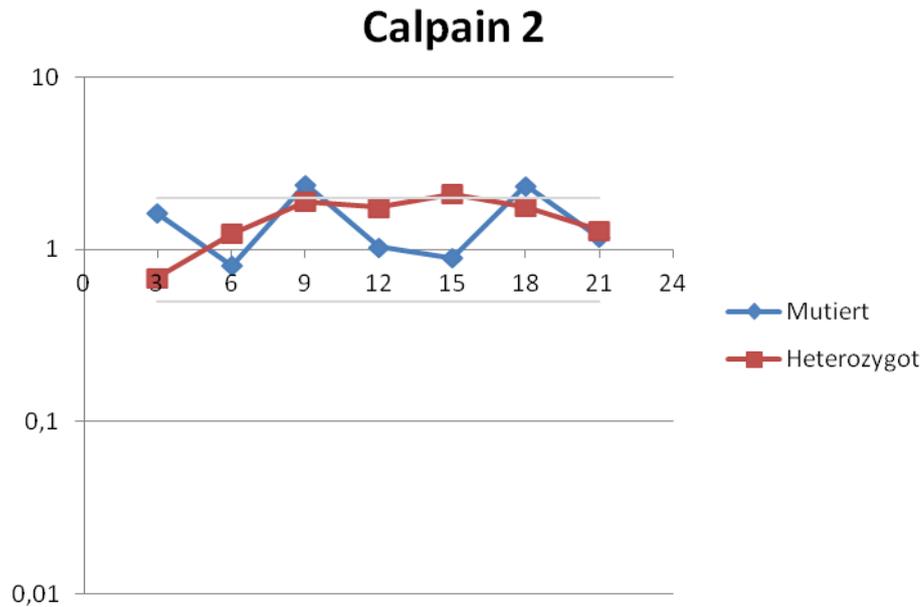


**Abbildung 4.10**  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei *calpain 1*

Die Genexpression von *calpain 1* ist bei den mutierten Tieren zu keinem der sieben verschiedenen Zeitpunkten signifikant verändert.

Bei den heterozygoten Tieren zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Genexpression bei 3 und 12 Monaten.

So zeigen die Kurven von *calpain 1* wenig Übereinstimmung zwischen dem Verlauf der Genexpression bei mutierten und heterozygoten Tieren. Die mutierten Tiere zeigen keine signifikante Änderung der Genexpression, während es bei den heterozygoten Tieren bei 3 und bei 12 Monaten zu einer Hochregulation kommt.

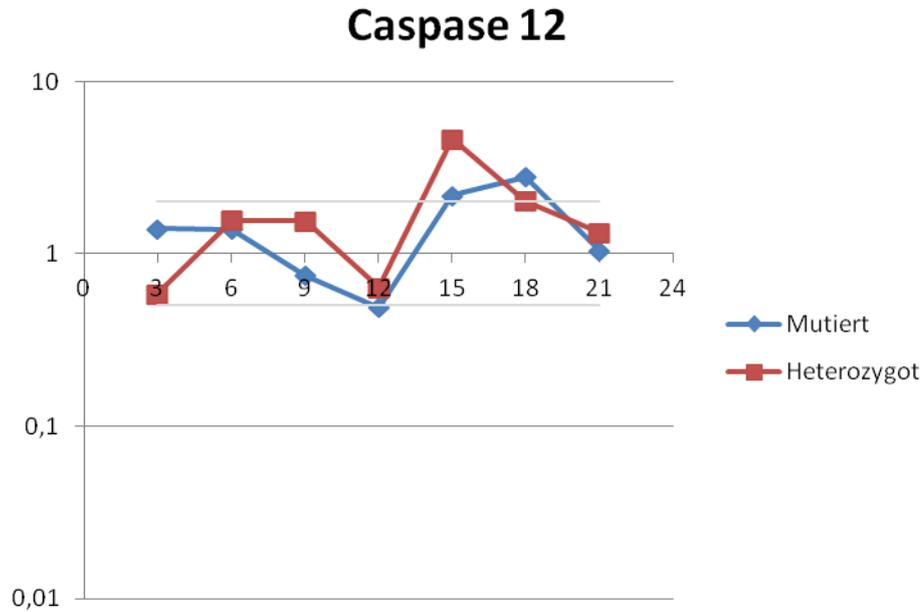


**Abbildung 4.11**  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei *calpain 2*

*Calpain 2* ist bei den mutierten Tieren zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten hochreguliert- bei 9 Monaten und bei 18 Monaten. Die restlichen Zeitpunkte zeigen keine Veränderung der Expression.

Bei den heterozygoten Tieren zeigen sich keine Auffälligkeiten während des gesamten zeitlichen Verlaufes.

Die beiden Diagramme unterscheiden sich nicht stark voneinander, beide bleiben im zeitlichen Verlauf innerhalb der Signifikanzschwelle, mit der Ausnahme von einer sehr knappen Hochregulation bei mutierten Tieren während 9 und 18 Monaten.



**Abbildung 4.12**  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei *caspase 12*

*Caspase 12* ist bei den mutierten Tieren bei 15 und 18 Monaten signifikant hochreguliert. Zu den weiteren Zeitpunkten zeigt sich keine Veränderung.

Bei den heterozygoten Tieren zeigt sich eine Hochregulation der Genexpression zum Zeitpunkt 15 Monate. Alle weiteren Zeitpunkte sind nicht signifikant verändert.

So zeigen beide Kurven einen sehr ähnlichen Verlauf. Es kommt sowohl bei den mutierten, als auch bei den heterozygoten Tieren zu einer Hochregulation bei 15 und 18 Monaten. Die übrigen Zeitpunkte zeigen keine Veränderung.

#### 4.5.2.2 Aktivierung der Apoptose über PARP

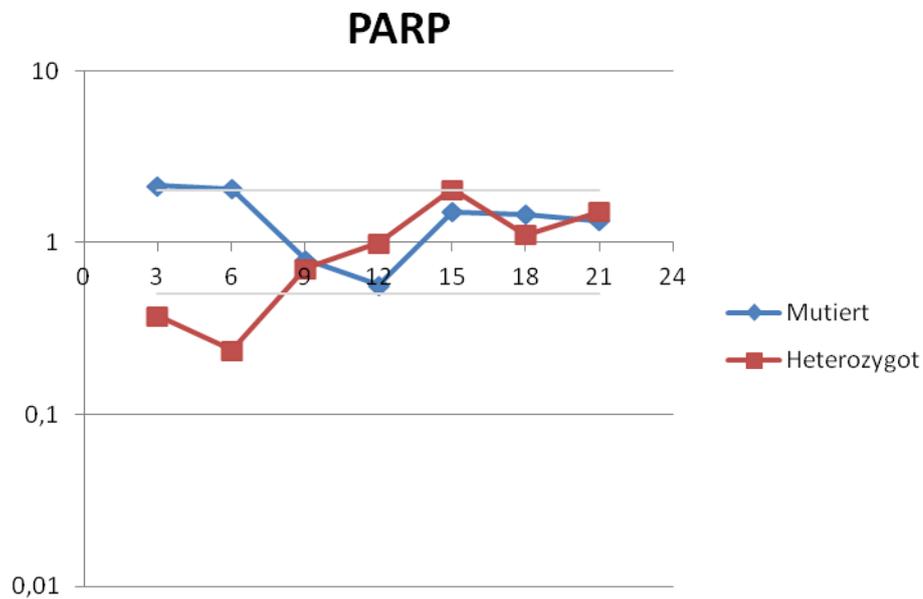


Abbildung 4.13 2<sup>-ΔΔCt</sup> Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei *parp*

*Parp* zeigt bei den mutierten Tieren eine Hochregulation der Genexpression bei 3 und 6 Monaten. Die übrigen Zeitpunkte sind unauffällig.

Bei den heterozygoten Tieren ist *parp* zu den Zeitpunkten 3 und 6 Monaten herabreguliert. Zu den anderen Zeitpunkten bleiben die Werte unterhalb der Signifikanzschwelle.

Die beiden interessanten Zeitpunkte bei *parp* sind 3 und 6 Monaten. Die Genexpression mutierter zu heterozygoter Tiere zeigt sich hier entgegengesetzt, bei den mutierten Tieren hochreguliert, bei den heterozygoten Tieren herabreguliert. Der restliche Verlauf ist unauffällig.

### 4.5.2.3 Extrazelluläre Aktivierung der Apoptose

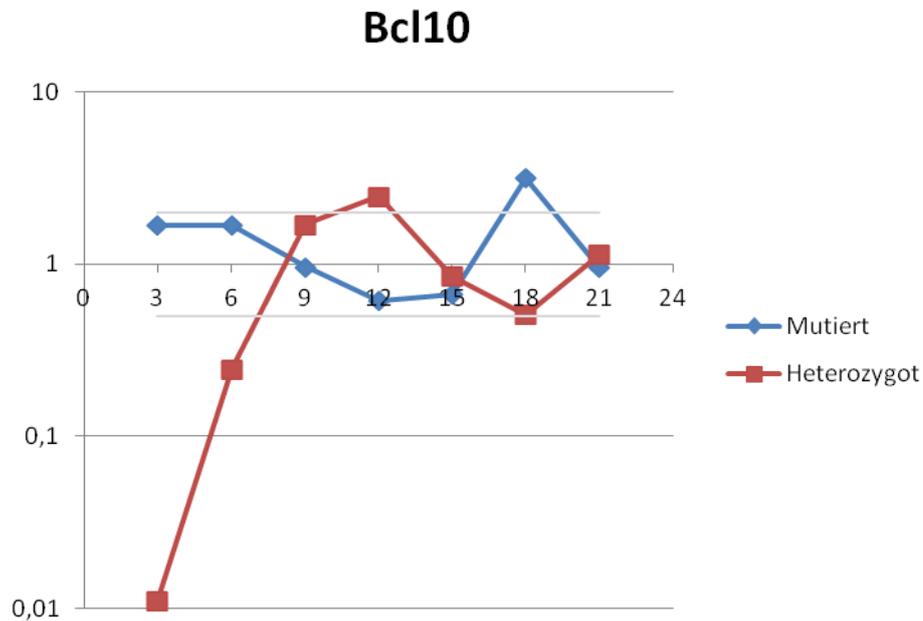
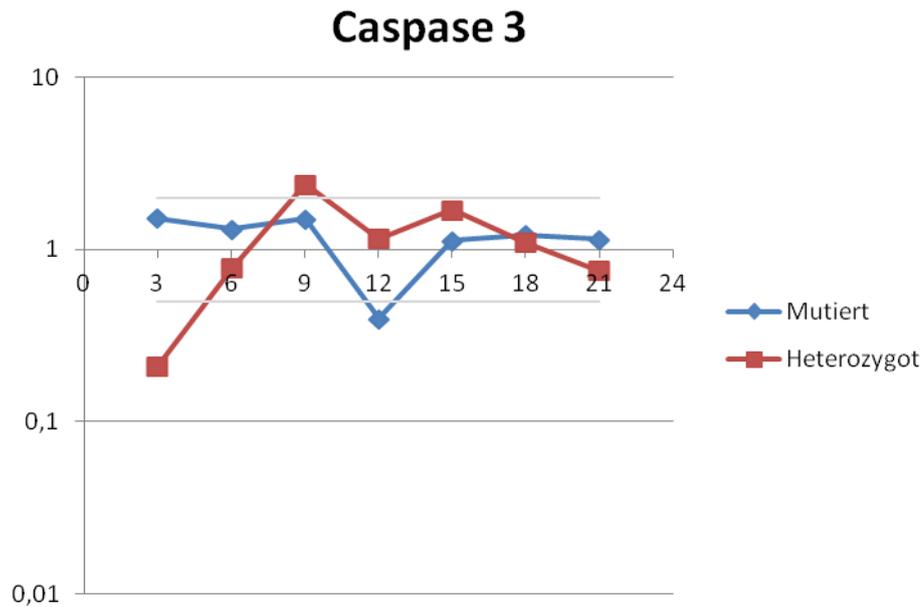


Abbildung 4.14 2<sup>-ΔΔCt</sup> Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei *bcl10*

*Bcl10* ist bei den mutierten Tieren bei 18 Monaten signifikant hochreguliert, sonst ist die Expression im Verlauf gleichbleibend.

Bei den heterozygoten Tieren ist *bcl 10* ist zu den Zeitpunkten 3 und 6 Monaten stark herabreguliert und bei 12 Monaten leicht hochreguliert.

Bei *bcl10* weicht der Kurvenverlauf der mutierten Tiere deutlich von dem der heterozygoten ab. Es zeigt sich bei den mutierten Tieren eine Hochregulation bei 18 Monaten. Bei den heterozygoten Tieren aber sieht man eine starke Herabregulation bei 3 und 6 Monaten und eine Hochregulation bei 12 Monaten.

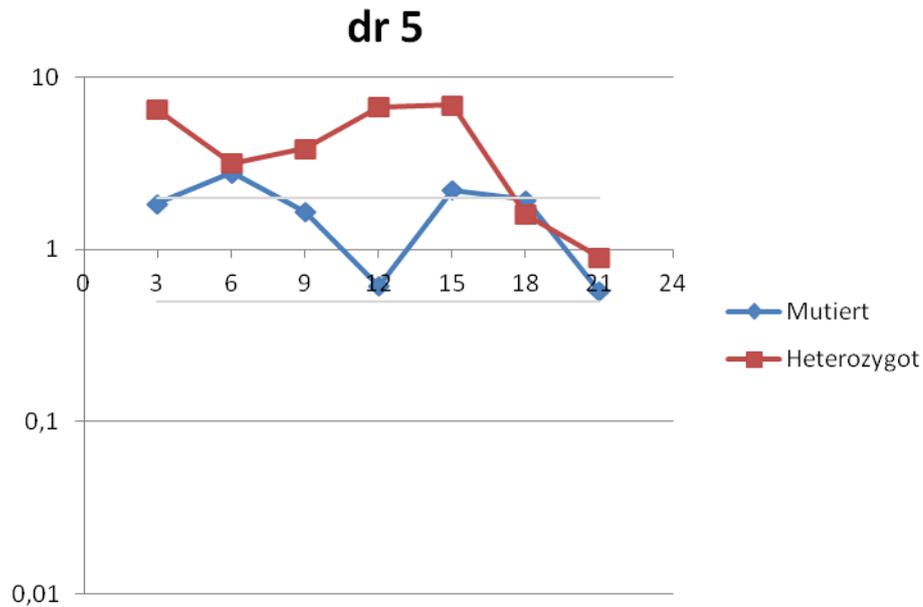


**Abbildung 4.15**  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei *caspase 3*

Bei *caspase 3* zeigt sich bei den mutierten Tieren während des zeitlichen Verlaufs eine Herabregulation bei 12 Monaten. Weiter gibt es keine signifikanten Veränderungen der Expression.

Bei den heterozygoten Tieren ist sie bei 3 Monaten herabreguliert und bei 9 Monaten wieder hochreguliert. Zu den übrigen Zeitpunkten zeigt sich keine signifikante Veränderung in der Genexpression.

Der Kurvenverlauf zeigt dementsprechend einen sehr ähnlichen Verlauf der Genexpression mutierter und heterozygoter Tiere. Sie unterscheiden sich nur darin, dass die heterozygoten Tiere zu Beginn herabreguliert und bei 9 Monaten dann hochreguliert sind, während die mutierten Tiere nur bei 12 Monaten herabreguliert sind.

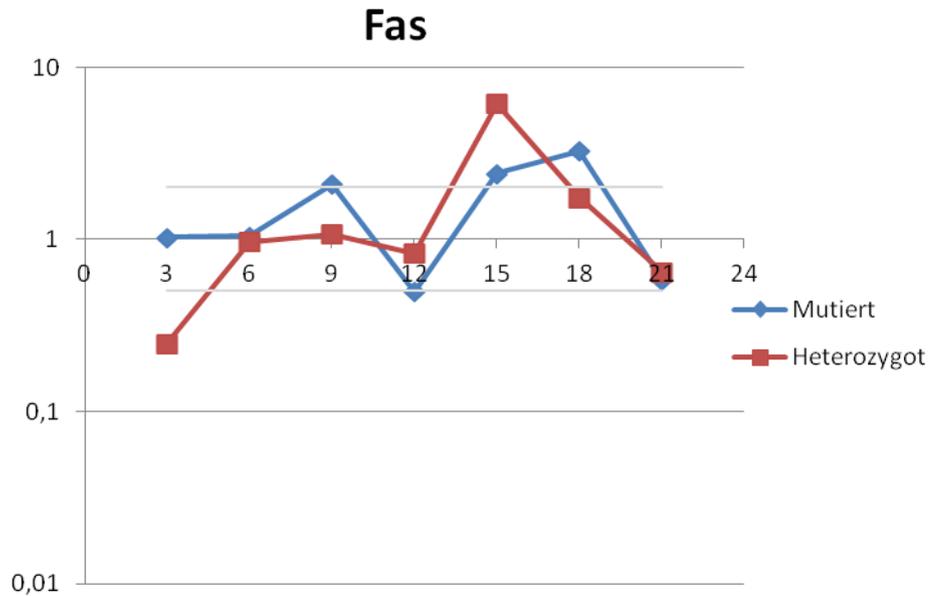


**Abbildung 4.16** 2<sup>-ΔΔCt</sup> Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei *dr 5*

Die Expression von *dr 5* bei den mutierten Tieren ist bei 6, 15 und 18 Monaten hochreguliert. Ansonsten zeigen sich keinen Expressionsveränderungen.

Bei den heterozygoten Tieren zeigt sich bei allen Zeitpunkten, außer bei 18 und 21 Monaten, eine Hochregulation der Genexpression.

Die Diagramme der mutierten und heterozygoten Tiere zeigen bei *dr 5* eine starke Differenz. Während die Genexpression von *dr 5* bei den heterozygoten Tieren stetig bis zu 18 Monaten erhöht ist, zeigt sich bei den mutierten Tieren nur ein Peak bei 6 und 15 Monaten.



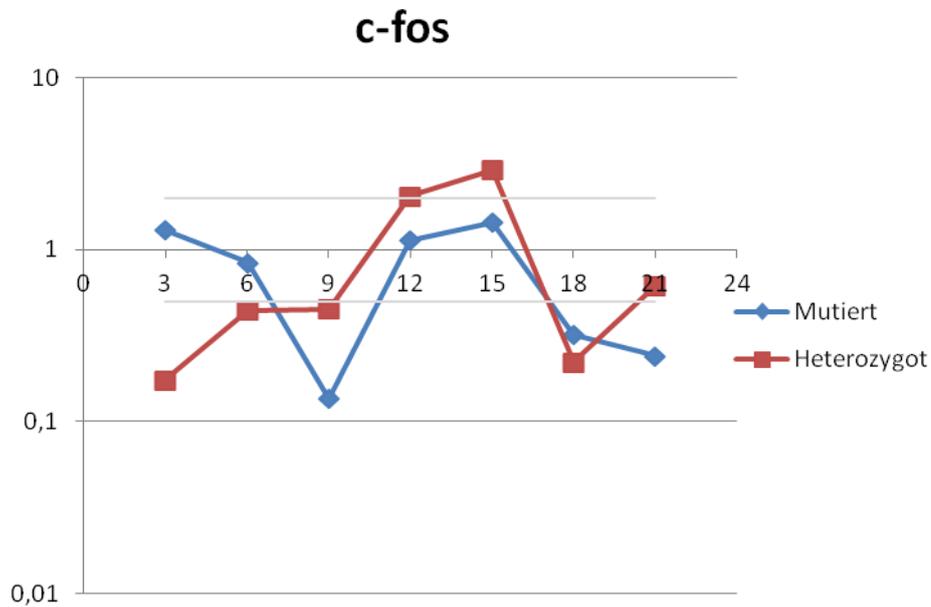
**Abbildung 4.17**  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei *fas*

Ähnlich dem *dr 5* ist auch *fas* bei den mutierten Tieren zu den Zeitpunkten 9, 15 und 18 Monaten hochreguliert.

Bei den heterozygoten Tieren ist es zu den Zeitpunkten 3 und 15 Monaten in der Genexpression signifikant verändert. Bei 3 Monaten ist es herabreguliert, bei 15 Monaten hochreguliert.

Die beiden Kurven zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf. Zu Beginn eine normale Expression und bei 15 und 18 Monaten dann eine erhöhte Expression. Einzig bei 3 Monaten ist die Expression bei den heterozygoten Tieren herabreguliert, während sie bei den mutierten Tieren nicht signifikant verändert ist.

#### 4.5.2.4 Aktivierung der Apoptose über das Aktivator Protein



**Abbildung 4.18**  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei *c-fos*

Bei den mutierten Tieren wird die Expression von *c-fos* bei 9, 18 und 21 Monaten herabreguliert.

Betrachtet man die heterozygoten Tiere so ist *C-fos* bei 3, 6 und 9 Monaten herabreguliert, bei 12 und 15 Monaten hochreguliert und bei 18 Monaten wieder herabreguliert. Bei 21 Monaten zeigt sich keine Veränderung der Genexpression.

Beide Diagramme zeigen eine große Übereinstimmung. Lediglich bei 3 und 6 Monaten ist *c-fos* bei den heterozygoten Tieren herabreguliert, während es sich bei den mutierten Tieren im Normbereich bewegt.

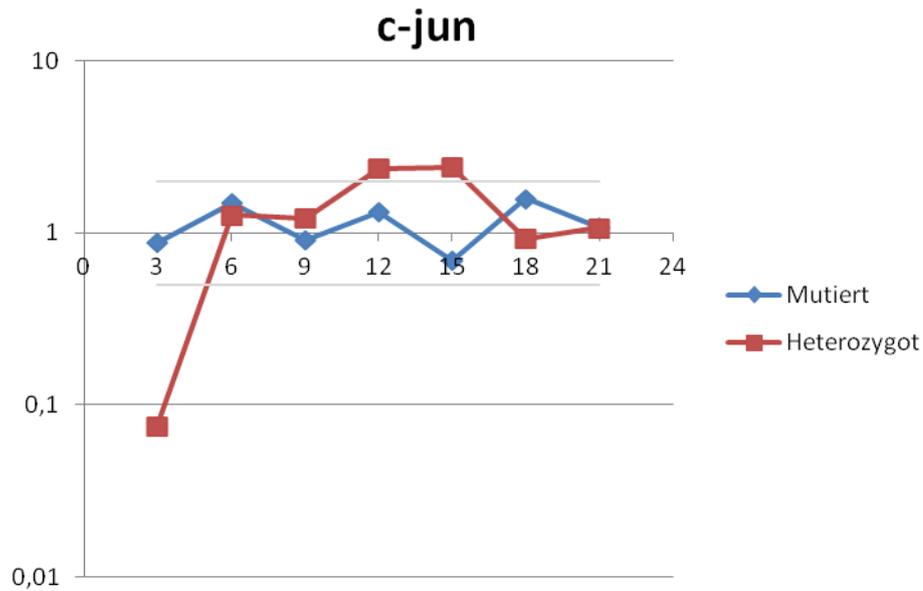


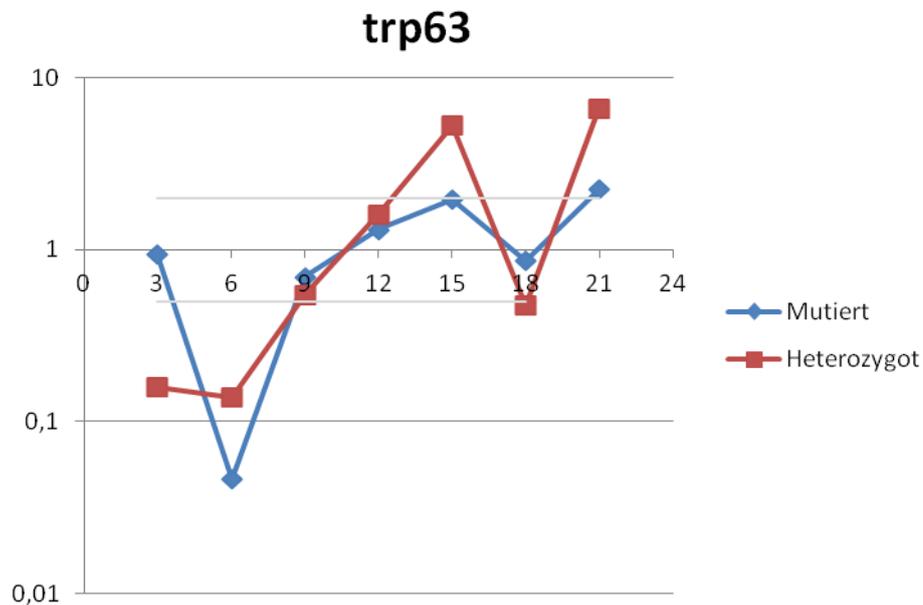
Abbildung 4.19  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei *c-jun*

*C-jun* zeigt bei den mutierten Tieren im kompletten Verlauf keine Veränderung der Genexpression.

Bei den heterozygoten Tieren zeigt sich eine Herabregulation bei 3 Monaten und eine leichte Hochregulation bei 12 und 15 Monaten.

Im Vergleich fallen die Veränderungen bei den heterozygoten Tieren, im Gegensatz zu keiner Veränderung bei den mutierten Tieren, auf.

#### 4.5.2.5 Aktivierung der Apoptose über die *p53* Familie



**Abbildung 4.20** 2<sup>-ΔΔCt</sup> Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei *trp63*

Bei *trp63* zeigt sich bei den mutierten Tieren während der 6 Monate eine stark signifikante Herabregulation. Bei 21 Monaten ist *trp63* dann noch einmal signifikant hochreguliert.

Bei den heterozygoten Tieren ist es bei 3 und 6 Monaten herabreguliert, bei 15 und 21 Monaten aber hochreguliert.

Der Verlauf der beiden Diagramme ist sehr ähnlich, es zeigen sich insgesamt die gleichen Abweichungen. Eine Ausnahme findet sich bei 3 Monaten, dort ist die Expression der heterozygoten Tiere herabreguliert.

### 4.5.3 Zusammenfassung der qPCR Ergebnisse

Tabelle 4.3 Zusammenfassung der qPCR Ergebnisse

	3	6	9	12	15	18	21 Mon
<i>aif</i>	↓						↘
<i>bcl2l1</i>	↓	↘	↘↗	↗↘		↘	
<i>calpain1</i>	↑			↑			
<i>calpain 2</i>			↗			↗	
<i>caspase 12</i>					↗↗	↑	
<i>parp</i>	↘↗	↘↗					
<i>bcl10</i>	↓	↘		↗		↑	
<i>caspase 3</i>	↘		↗	↘			
<i>dr 5</i>	↑	↑↗	↑	↑	↑↗	↗	
<i>fas</i>	↘		↗		↗↗	↑	
<i>c-fos</i>	↘	↘	↘↘	↗	↑	↘↘	↘
<i>c-jun</i>	↓			↗	↗		
<i>trp63</i>	↓	↘↘			↑		↑↗

↗↘: heterozygot > 0,3 - < 3

↗↘: mutiert > 0,3 - < 3

↓↑: heterozygot: < 0,3 - > 3

↓↑: mutiert < 0,3 - < 3

Anhand dieser Tabelle fällt auf, dass die Genexpression in den Netzhäuten der heterozygoten Tiere häufiger deutlich verändert ist als in den Netzhäuten der mutierten Tiere. Vor allem zu den frühen Zeitpunkten (3-12 Monaten) zeigen sich viele Hoch- oder Herabregulationen bei den heterozygoten Tieren. Zu den späteren Zeitpunkten (15-21 Monate) sind überwiegend Veränderungen in der Genexpression der mutierten Tiere zu beobachten. Betrachtet man die einzelnen Gengruppen hinsichtlich der unterschiedlichen Apoptosewegen, so zeigen sich auch dabei deutliche Unterschiede. Die größte Gruppe ist die des mitochondrialen Apoptoseweges, bestehend aus fünf

verschiedenen Genen. *bcl2l1*, das die Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium verhindert, ist bei den heterozygoten Tieren bei 9 Monaten mäßig und bei 12 Monaten stark hochreguliert. Zu den übrigen Zeitpunkten ist es jedoch herabreguliert. Bei den mutierten Tieren ist es nur leicht herabreguliert. Dies spiegelt sich auch in *aif* wieder, es zeigt keine entgegengesetzte Hochregulation, sondern ist nur herabreguliert. *calpain 1*, *calpain 2* und *caspase 12* dagegen zeigen zu den späteren Zeitpunkten deutliche Hochregulationen sowohl bei den mutierten als auch bei den heterozygoten Tieren. Besonders *calpain 2* und *caspase 12*, welche auch während der Apoptose eng zusammenspielen, zeigen bei den mutierten Tieren eine gleichzeitige späte Hochregulation. Im Vergleich mit den anderen Gengruppen ist der mitochondriale Apoptoseweg jedoch derjenige, mit der insgesamt geringsten Änderung der Genexpression. *Parp*, welches unterschiedliche Aufgaben in der Apoptose hat, zeigt sich hier auf der molekularen Ebene eher unauffällig. Bei den heterozygoten Tieren ist es anfangs herabreguliert. Dies zeigt sich auch bei *aif*, dessen Freisetzung aus dem Mitochondrium von PARP getriggert wird. Bei den mutierten Tieren ist es dagegen leicht hochreguliert.

Die dritte Gruppe besteht aus Genen, die im extrazellulären Weg eine Rolle spielen. Am auffälligsten sind hier die beiden Todesrezeptoren *dr 5* und *fas*. Beide zeigen fast im kompletten Verlauf eine starke Hochregulation. Bei den heterozygoten Tieren ist vor allem *dr 5* hochreguliert, bei den mutierten Tiere dagegen eher *fas*. Es fällt auf, dass die Hochregulation bei den mutierten Tiere bei *dr 5* und *fas* im späten Verlauf übereinstimmt. *bcl10*, welches eine Caspasen-Verstärkungsdomäne besitzt, hat eine sehr unterschiedliche Expressionsänderung zu *caspase 3*. *Bcl10* zeigt in der frühen Phase eine Herabregulation, in der späten eine Hochregulation. *Caspase 3* ist dagegen nur herabreguliert, mit der Ausnahme der heterozygoten Tiere bei 9 Monaten.

Das Aktivatorprotein, bestehend aus *c-fos* und *c-jun*, bildet eine eigenständige Gruppe. Die Veränderung der Genexpression zeigt sich aber völlig unabhängig voneinander. *C-fos* ist während des gesamten Zeitverlaufs stark verändert. Es ist sowohl bei den heterozygoten als auch bei den mutierten Tieren die meiste Zeit mäßig bis stark herabreguliert. Bei den heterozygoten Tieren ist es zwischenzeitlich bei 12 und 15 Monaten erhöht. Dies ist eine Gemeinsamkeit mit *c-jun*, welches bei den heterozygoten

Tieren zur gleichen Zeit hochreguliert ist. Ansonsten ist *c-jun*, im Gegensatz zu *c-fos*, nicht verändert.

Die Gruppe der p53 Familie besteht nur aus *trp63*. Die Veränderung der Genexpression bei *trp63* zeigt sowohl bei den heterozygoten als auch bei den mutierten Tieren eine starke frühe Herabregulation und späte Hochregulation.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass vor allem die Todesrezeptoren *dr 5* und *fas*, *c-fos* als Teil des Aktivatorproteins, *trp63* und *calpain 1* mit der *caspase 12* starke Veränderungen der Genexpression sowohl bei den heterozygoten als auch bei den mutierten Tieren zeigen. Bei den übrigen Genen zeigen sich auch einige Veränderungen, jedoch nicht so ausgeprägt.

## 4.6 Tunel Assay

### 4.6.1 Ablauf

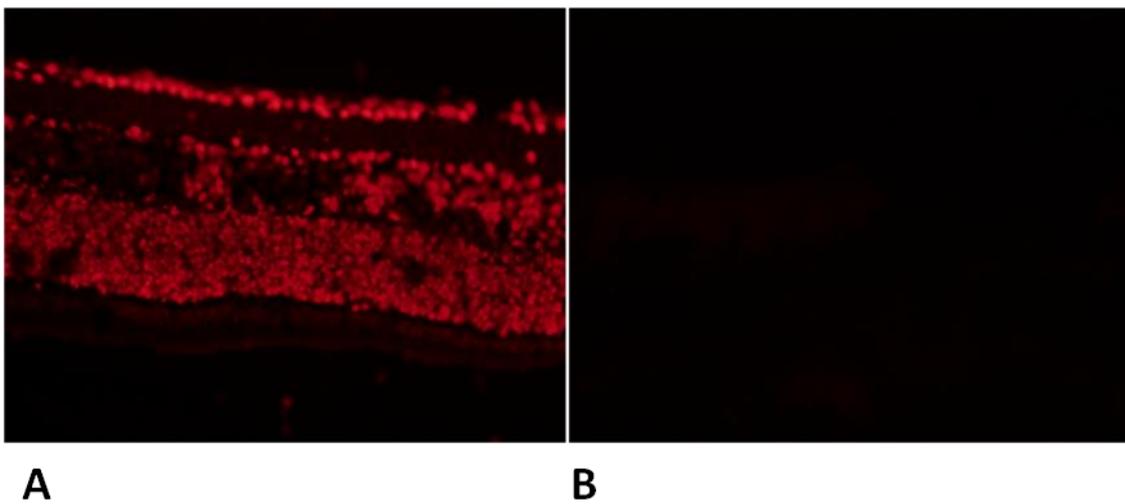
Im zweiten Teil der Arbeit wurden in Kryoblöcken gefrorene Augen der *Rpgr<sup>tm1sti</sup>* Mäuse, zu den gleichen Zeitpunkten wie in der qPCR, am Kryostaten geschnitten und anschließend mit einem Tunel-Assay gefärbt. Ziel dieser Färbung war, mögliche DNA Strangbrüche in den Netzhäuten zu detektieren und im zeitlichen Verlauf quantitativ darzustellen.

Um eine quantitative Aussage über die Tunel-positiven Zellen im Zeitverlauf machen zu können, wurden für jeden Zeitpunkt pro Genotyp zwei Augen von unterschiedlichen Mäusen gefärbt.

Das Protokoll der Kryoschnitte ist in Punkt 3.3.1, das Protokoll der Tunel-Färbung in Punkt 3.3.2 aufgeführt.

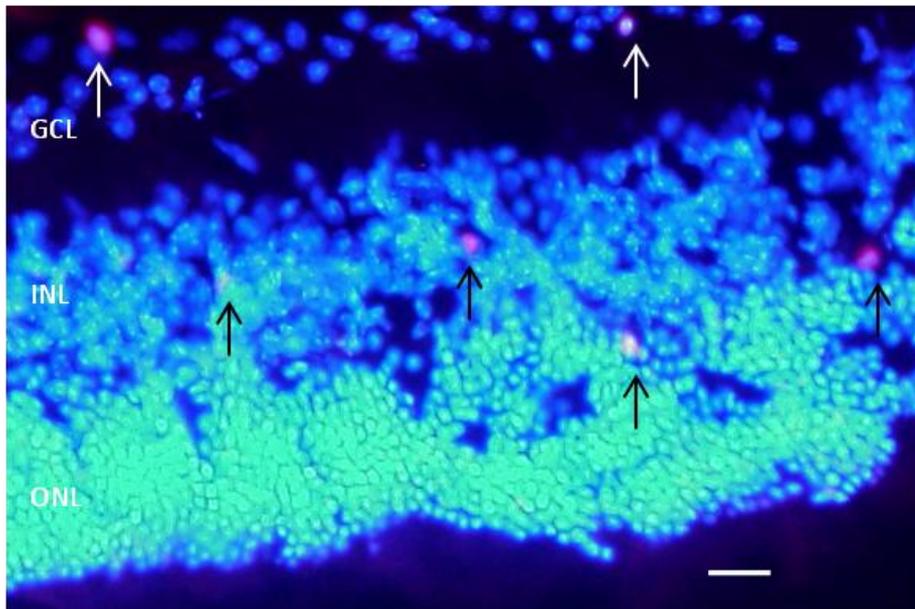
Anschließend wurden die Tunel-positiven Zellen mittels Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht.

Zusätzlich zu jeder Färbungsreihe wurden jeweils eine Positiv- und eine Negativkontrolle gefärbt. Die Positivkontrolle (siehe Abbildung 4.21) wird mit DNase versetzt, um zeigen zu können, dass es bei vorhandenen DNA Strangbrüchen zu Tunel-positiven Zellen kommt. Bei der Negativkontrolle (siehe Abbildung 4.21) wurde das Enzym Tdt weggelassen. Die Negativkontrolle dient der korrekten Belichtung. Es wird immer zuerst die Negativkontrolle mikroskopiert, die Belichtung im Rotlicht Kanal wird dabei solange verringert bis keine Hintergrundfluoreszenz mehr sichtbar ist. Alle übrigen Schnitte werden mit dieser ermittelten Belichtung mikroskopiert.



**Abbildung 4.21 Positiv- (A) und Negativkontrolle (B)**

Um eine anschauliche Darstellung zu erreichen, wurden die Schnitte zusätzlich mit DAPI gefärbt. Dadurch ergab sich die Möglichkeit eines Overlays. Ein Overlay bedeutet, dass von einem Schnitt Bilder mit zwei unterschiedlichen Lichtkanälen (rotes und blaues Licht) gemacht und anschließend übereinander gelegt wurden, um die einzelnen Tunel-positiven Zellen in den verschiedenen Schichten der Retina darzustellen. In Abbildung 4.22 wird ein Beispielbild eines Overlays mit Tunel-positiven Zellen gezeigt.



**Abbildung 4.22 Beispiel Tunel- positive Zellen**

*Maßstab Ausschnitt: 900x600px*

*Maßstabsbalken: 20µm*

#### **4.6.2 Auswertung**

Für die Auswertung wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm gimp aus jedem mikroskopierten Bild ein größendefinierter Ausschnitt (900x600px) entnommen und die Tunel-positiven Zellen innerhalb dieses Ausschnittes ausgezählt.

Im Folgenden werden beispielhaft zu jedem Zeitpunkt größendefinierte Ausschnitte von Bildern für jeden Genotyp gezeigt.

Eine statistische Auswertung war aufgrund der geringen Zahl ausgezählter Bereiche (n=2) nicht angezeigt.

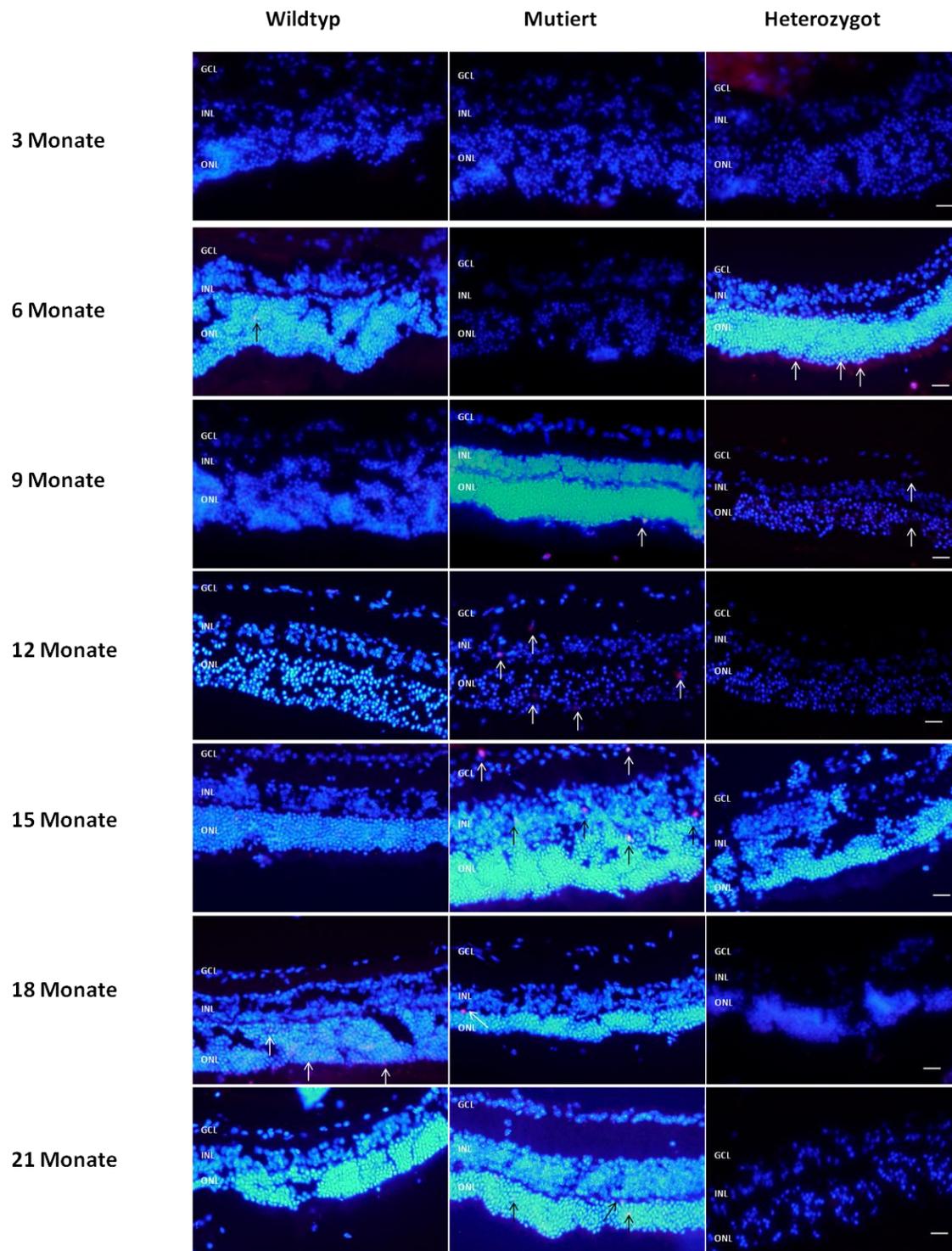
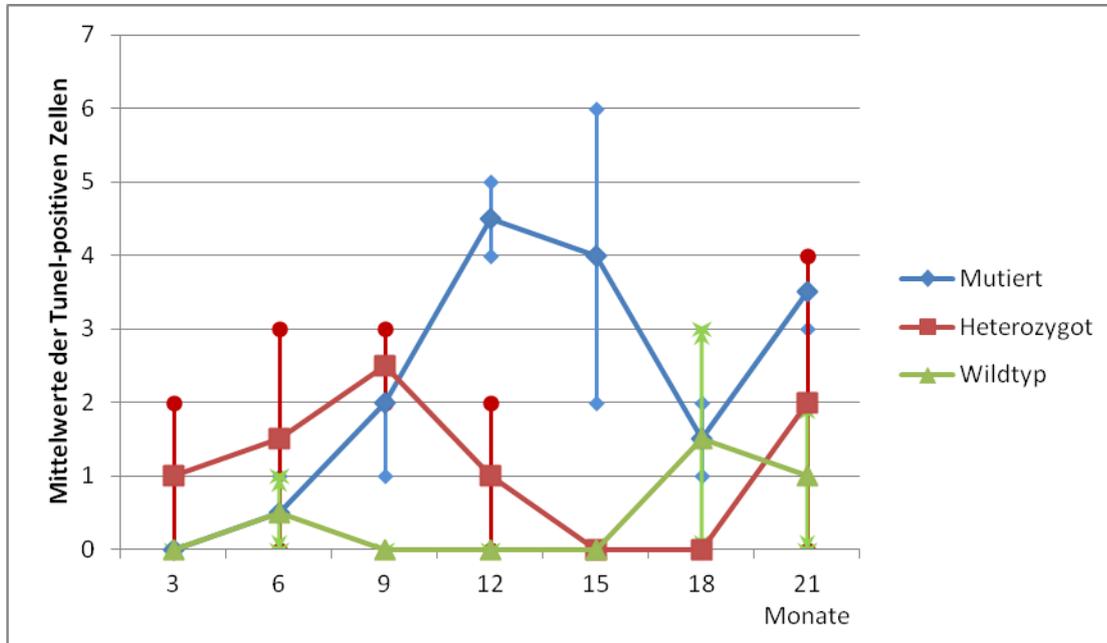


Abbildung 4.23 Beispiel Tunel-Assay zu jedem Zeitpunkt und Genotyp

Pfeile zeigen auf Tunel-positive Zellen, Maßstabsbalken 20µm

Die Mittelwerte aller ausgezählten Tunel-positiven Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden berechnet und in ein Diagramm eingetragen (siehe Abbildung 4.24).



**Abbildung 4.24 Diagramm der Tunel-positiven Zellen im zeitlichen Verlauf**

Die x-Achse stellt den zeitlichen Verlauf (3-21 Monate) dar, die y-Achse die Mittelwerte der Tunel-positiven Zellen. Das Diagramm der Wildtypiere ist grün, das der mutierten Tiere blau und das der heterozygoten Tiere rot.

Anhand des Diagramms fällt auf, dass bei den heterozygoten Tieren früh vermehrt Tunel-positive Zellen, vor allem bei 6 und 9 Monaten vorkommen. Zu den späteren Zeitpunkten zeigt sich nochmals bei 21 Monaten eine erhöhte Anzahl an Tunel-positiven Zellen.

Bei den mutierten Tieren kommen vor allem bei 9 bis 15 Monaten zahlreiche Tunel-positive Zellen vor, und noch einmal spät, bei 21 Monaten. Bei 3 und 6 Monaten zeigen sich jedoch kaum Tunel-positive Zellen. Die Anzahl an Tunel-positiven Zellen ist bei den mutierten Tieren insgesamt höher als bei den heterozygoten Tieren.

Die Färbungen der Wildtypiere zeigen im gesamten Verlauf kaum Tunel-positive Zellen, nur in der späten Phase (18 und 21 Monate) zeigt sich eine geringe Anzahl.

## 5 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Expressionsanalyse verschiedener ausgewählter Gene, die Einfluss auf die Apoptose haben, um mögliche Unterschiede im zeitlichen Verlauf von 3 bis 21 Monaten bei den  $Rpgr^{tm1sti}$  Mäusen zu zeigen und zeitgleich mittels eines Tunel-Assays den Zelluntergang morphologisch darzustellen.

Das Mausmodell  $Rpgr^{tm1sti}$ , entwickelt im Labor für molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus Liebig Universität Gießen, zeigt eine Netzhautdegeneration, hervorgerufen durch eine Deletionsmutation im Exon ORF15 des *Rpgr* Gens. Durch diese gezielt verursachte Genmutation konnte ein Mausmodell mit retinaler Degeneration, gleich dem Geno und-Phänotyp der beim Menschen auftretenden XLRP, erzeugt werden. Die XLRP zeigt sich beim Menschen typischerweise mit einem frühen Beginn und schwerwiegendem Verlauf bereits in den ersten Lebensdekaden. Durch Tiermodelle wie  $Rpgr^{tm1sti}$  wird versucht, die Erkrankung sowohl funktionell als auch morphologisch zu charakterisieren und im weiteren Verlauf mögliche Therapieansätze zu entwickeln. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde noch kein weiteres Tiermodell der XLRP bis zu einem Alter von 21 Monaten untersucht.

Pathophysiologisch kommt es im zeitlichen Verlauf der XLRP zum Zelluntergang der Photorezeptoren [Zobor et al. 2012]. Die Art des Zelluntergangs bei neurodegenerativen Erkrankungen wird seit der Entdeckung durch Kerr und Kollegen 1972 als apoptotischer Vorgang angesehen. Die Apoptose als Ursache des Zelluntergangs wurde vielfältig untersucht.

Es gibt jedoch weitere Studien, die darauf hinweisen, dass es neben der Apoptose noch andere Mechanismen des Zelltodes der Photorezeptoren bei neurodegenerativen Erkrankungen gibt. Sahaboglu und Kollegen konnten im Tiermodell zeigen, dass sich die Neurodegeneration der Photorezeptoren über einen deutlich längeren Zeitraum erstreckt als bei der Apoptose und bei der Nekrose. Dies legt den Verdacht nahe, dass ein weiterer Typ des Zelltodes im Bereich der Neurodegeneration der Photorezeptoren stattfindet. [Sahaboglu et al. 2013]

## 5.1 Interpretation der qPCR Ergebnisse

Die Expressionsanalyse der dreizehn apoptotischen Gene zeigte sich zu verschiedenen Zeitpunkten als sehr auffällig.

Das Expressionsniveau mittels qPCR gibt keinerlei Auskunft darüber ob eine Delokalisation der Proteine vorliegt oder nicht, ebenso kann dadurch die Enzymaktivität nicht bestimmt werden. Allerdings konnte dargestellt werden, dass apoptotische Proteine bei aktivierter Apoptose verändert exprimiert sind. Genini et al. entwickelten mit MDCK (Madin-darby canine kidney) Zellen, die mit Staurosporin in Apoptose gebracht wurden, einen qPCR-Array für Photorezeptorapoptose im Hundemodell. Dabei konnten sie zeigen, dass einige proapoptotische Proteine in der Expression hochreguliert waren [Genini et al. 2012]. So ist anzunehmen, dass sich auch bei den Photorezeptoren der  $Rpgr^{tm1sti}$  Mäuse eine veränderte Expressionsrate zeigt, sollten apoptotische Vorgänge eine Rolle spielen.

Bei der Betrachtung der Tabelle 5.1 Ergebnisse der qPCR fällt als erstes ins Auge, dass die heterozygoten Tiere im Vergleich zu den mutierten Tieren genauso stark, teilweise sogar stärker in ihrer Expression verändert sind. Mögliche Ursachen für diese Auffälligkeiten der heterozygoten Tiere werden in Punkt 5.4 diskutiert.

Die genauere Betrachtung zeigt eine zeitliche Verteilung der Expressionsveränderungen. Die heterozygoten Tiere sind vor allem zu den frühen und mittleren Zeitpunkten bis einschließlich 15 Monaten in der Expression verändert. Während die Veränderung der Expression bei den mutierten Tieren vermehrt zu den späten Zeitpunkten, ab 15 Monaten, stattfindet. Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch bei der morphologischen Analyse mittels Tunel-Assays beobachten. Dieser Zusammenhang wird in Punkt 5.3 ausführlich diskutiert.

Im Folgenden werden die untersuchten Gruppen möglicher Apoptosewege in ihrer Veränderung einzeln analysiert und anhand von in der Literatur bereits vorhandenen Daten diskutiert. Dabei wird sich auf die Tabelle 5.1 bezogen.

Tabelle 5.1 Ergebnisse der qPCR

	3	6	9	12	15	18	21 Mon	
<i>aif</i>	↓						↘	Mitochondrial
<i>bcl2l1</i>	↓	↘	↘↗	↗↘		↘		
<i>calpain1</i>	↑			↑				
<i>calpain 2</i>			↗			↗		
<i>caspase 12</i>					↗↗	↗		
<i>parp</i>	↘↗	↘↗						PARP
<i>bcl10</i>	↓	↘		↗		↗		extrazellulär
<i>caspase 3</i>	↘		↗	↘				
<i>dr 5</i>	↑	↑↗	↑	↑	↑↗	↗		
<i>fas</i>	↘		↗		↗↗	↗		
<i>c-fos</i>	↘	↘	↘↘	↗	↑	↘↘	↘	Aktivator-
<i>c-jun</i>	↓			↗	↗			Protein
<i>trp63</i>	↓	↓↘			↑		↗↗	p53

↗↘: heterozygot > 0,3 - < 3

↗↘: mutiert >0,3- <3

↓↑: heterozygot: < 0,3 - >3

↓↑: mutiert <0,3- < 3

Die erste Gruppe ist die des mitochondrialen Apoptoseweges, in diese Gruppe gehören AIF, Bcl2l1, Calpain 1 und 2 und die Caspase 12.

Bcl2l1 ist als Mitglied der Bcl-2 Familie verantwortlich für MOMP, also die Regulation der Freisetzung von IMS (intermembrane space proteins), wie Cytochrom C und AIF, aus dem Mitochondrium [Desagher et al. 2000]. Bcl2l1 (auch bekannt als Bcl-xL) ist Teil der antiapoptotischen Familie, es verhindert also die Freisetzung der IMS aus dem Mitochondrium. *Bcl2l1* war in dem in Vorarbeiten durchgeführten [Schlegel 2011] Apoptose-Array bei 3 Monate alten mutierten Tieren stark herabreguliert (siehe Anhang 10.3). Ähnlich sind die Daten der vorliegenden Expressionsanalyse. *Bcl2l1* ist nur bei den heterozygoten Tieren bei 9 und 12 Monaten hochreguliert, zu den übrigen

## Diskussion

Zeitpunkten ist es herabreguliert. Eine Herabregulation eines antiapoptotischen Proteins könnte auf eine aktuell ablaufende Apoptose hinweisen. Würde man die proapoptotischen Proteine der Bcl-Familie zu denselben Zeitpunkten untersuchen, könnte man mit einer Hochregulation rechnen.

Jedoch zeigt *aif*, trotz der scheinbaren guten mitochondrialen Membranpermeabilisation, als IMS keine Hochregulation über den gesamten Zeitverlauf. Ähnlich verhält sich *calpain 1*, als Delokalisationssignal für AIF bekannt [Polster et al. 2005; Yu et al. 2002]. *calpain 1* ist bei den heterozygoten Tieren bei 3 und 12 Monaten hochreguliert, zeigt aber ansonsten keine Auffälligkeiten. Diese Hochregulation scheint unabhängig von AIF zu sein. Sanges und Kollegen konnten 2006 in der rd1 Maus zeigen, dass Calpain 1 bei erhöhtem intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel die Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium fördert [Sanges et al. 2006]. Da jedoch in dieser Arbeit die Proteine, mit einer möglichen Delokalisation nicht untersucht wurden, kann keine abschließende Aussage zur Beteiligung von AIF und Calpain 1 am Zelluntergang getroffen werden.

Ebenso beschrieben Sanges und Kollegen, dass wieder bei erhöhtem intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel, Calpain 2 die Freisetzung von Caspase 12 aus dem Endoplasmatischen Retikulum fördert [Sanges et al. 2006]. Bei Studien mit der rd1 Maus zeigte sich gleichfalls eine zeitliche Übereinstimmung apoptotischer Vorgänge mit Hochregulation der Caspase 12 [Yang et al. 2007]. In dieser Arbeit waren beide Faktoren vor allem bei den mutierten Tieren hochreguliert. *Calpain 2* ist etwas früher, bei 9 Monaten, hochreguliert, die *caspase 12* später bei 15 Monaten, was vermuten lässt, dass Calpain 2 die Caspase 12 aktiviert.

PARP wird hier einzeln und nicht in einer Gruppe betrachtet, denn es stellt sowohl ein Delokalisationssignal für AIF [Yu et al. 2002], als auch ein eigenständiges Signal für den Zelluntergang durch einen raschen Energieabbau der Zelle dar [Pieper et al. 1999]. *Parp* ist in der Expressionsanalyse jeweils nur bei 3 und 6 Monaten auffällig, bei den mutierten Tieren ist es leicht hochreguliert, bei den heterozygoten Tieren leicht herabreguliert. Die übrigen Zeitpunkte sind unauffällig. Da auch *aif* zu keinem Zeitpunkt hochreguliert ist, scheint keine Freisetzung von AIF aus dem Mitochondrium über PARP stattzufinden. Die signifikanten Veränderungen in den sehr frühen Phasen könnten auch als nicht apoptotisch eingestuft werden, denn unter physiologischen

## Diskussion

Bedingungen ist PARP in der DNA-Reparatur involviert und somit zellprotektiv [Chatterjee et al. 1999]. Paquet-Durand und Kollegen konnten in der rd1 Maus ebenfalls keinen Unterschied zwischen der Expression *parps* im Vergleich Wildtyp und rd1 Maus finden. Allerdings zeigte sich auf Proteinebene eine stark erhöhte enzymatische Aktivität bei der rd1 Maus [Paquet-Durand et al. 2007a]. Nach diesen Ergebnissen müsste auch bei den Rpgr<sup>tm1sti</sup> Mäusen die Enzymaktivität PARPs auf Proteinebene untersucht werden, um dessen Beteiligung am Zelluntergang in der Retina weiter zu erforschen.

Die nächste Gruppe ist die des extrazellulären Apoptoseweges. Untersucht wurden hier Bcl10, mit einer Caspasen-Verstärkungs Domäne, Caspase 3, als Vertreter der Effektorcaspasen, und die beiden Todesrezeptoren *dr 5* und *fas*.

*bcl10* wurde ebenfalls zuvor im, in Vorarbeiten durchgeführten, Apoptose-Array untersucht und zeigte bei 3 Monate alten mutierten Tieren eine leichte Herabregulation (siehe Anhang 10.3). In der vorliegenden Expressionsanalyse sieht man diese frühe Herabregulation aber bei den heterozygoten Tieren. Im weiteren Verlauf sind sowohl die heterozygoten als auch die mutierten Tiere zu jeweils einem Zeitpunkt hochreguliert. Anhand dieser geringen Expressionsveränderung lässt sich vermuten, dass Bcl10 keinen großen Einfluss auf den Zelluntergang bei den Rpgr<sup>tm1sti</sup> Mäusen hat.

Ähnlich verhält sich die *caspase 3*, auch sie ist nur zu wenigen Zeitpunkten und dabei nur leicht signifikant verändert. Bcl 10 und Caspase 3 als Vertreter des Caspasen-abhängigen Weges scheinen nicht stark auffällig verändert zu sein. Jedoch zeigt sich im Gegensatz dazu bei den beiden Todesrezeptoren eine starke Veränderung der Expression. Da aber eine Aktivierung der Todesrezeptoren meist in eine Aktivierung der Caspasen mündet, kann der seit langem bekannte Apoptoseweg über die Caspasen nicht ganz außer Acht gelassen werden.

*dr 5*, welches auch im, in Vorarbeiten durchgeführten, Apoptose-Array hochreguliert war (siehe Anhang 10.3), zeigt über den gesamten Verlauf eine Hochregulation, sowohl bei den mutierten Tieren als auch bei den heterozygoten Tieren. Ebenso ist *fas* die meiste Zeit hochreguliert, dies zeigte sich auch im Apoptose-Array. Hier lässt sich vermuten, dass die Todesrezeptoren im zeitlichen Verlauf weitgehend ständig aktiviert

## Diskussion

sind. Beide Gene sind auch in der Literatur schon als auffällig beschrieben. So wurde in einem Retina Detachment Modell ein Fas-Rezeptor neutralisierender Antikörper ins Auge appliziert nachdem die Retina durch subretinale Injektion vom Mausauge entfernt worden war. Danach konnte eine deutliche Verminderung Tunel-positiver Zellen im Vergleich zu Retinae ohne den Antikörper gesehen werden [Zacks et al. 2007].

Eine Hochregulation von *dr 5* wurde unter anderem bei der induzierten Apoptose an Retinobalstomzellen durch Gossypol (schwaches Gift, bekannt in der Krebsforschung) beobachtet [Hsiao et al. 2012]. Würde man die Vorgänge des Zelluntergangs in den *Rpgr<sup>tm1sti</sup>* Mäusen weiter untersuchen, könnte zum Beispiel die Expression der Caspase 8, welche von den Todesrezeptoren aktiviert wird, noch dargestellt werden.

Das Aktivator-Protein, bestehend aus *c-fos* und *c-jun*, zeigt in der Expressionsanalyse ebenfalls vermehrte Auffälligkeiten. Vor allem *c-fos* ist fast zu allen Zeitpunkten herabreguliert. Einzig bei den heterozygoten Tieren ist es bei 12 und 15 Monaten hochreguliert. Dies spiegelt sich auch bei *c-jun* wieder, welches im übrigen Verlauf weitgehend unauffällig ist. Die starke Herabregulation bei *c-fos* und zugleich der unauffällige Verlauf von *c-jun* sprechen eigentlich gegen eine Beteiligung am Zelluntergang in den *Rpgr<sup>tm1sti</sup>* Mäusen. Dennoch werden beide bei den heterozygoten Tieren bei 12 und 15 Monaten hochreguliert. So scheint es, dass *c-fos* und *c-jun* bei den heterozygoten Tieren ein Teil des Apoptose-auslösenden Mechanismus sind. Auch in der Literatur wurde das Aktivator-Protein schon mehrmals als wichtige Komponente des Zelluntergangs in der Retina beschrieben. So konnte in unterschiedlichen Tierversuchen gezeigt werden, dass AP-1 bei der lichtinduzierten Apoptose der Photorezeptoren eine sehr große Rolle spielt. Eine Arbeitsgruppe konnte eine erhöhte Expression von *c-fos* und *c-jun* nach starker Lichtinduktion zeigen [Grimm et al. 2000], eine andere Gruppe konnte an *c-fos*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen, dass diese Mäuse, resistenter gegenüber lichtinduzierten Schäden sind [Hafezi et al. 1997].

Als Mitglied der p53 Familie wurde *trp63* untersucht. *Trp63* ist früh stark herabreguliert, spät stark hochreguliert. Dies deutet auf einen möglichen Anteil am Zelluntergang in der Retina hin. Die p53 Familie wurde auch schon mit der Apoptose der Photorezeptoren in Verbindung gebracht. Eine Arbeitsgruppe generierte rd Mäuse, denen p53 fehlte. Sie konnten an diesen Mäusen zeigen, dass dadurch die Apoptose um

## Diskussion

einige Tage hinausgezögert wurde [Ali et al. 1998]. Weiter ist *p53* ebenso wie *dr 5* auch bei der Apoptose der Retinoblastomzellen hochreguliert [Hsiao et al. 2012].

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass man mit den Ergebnissen der Expressionsanalyse keinen eindeutigen Apoptosewege beim Zelluntergang der *Rpgr<sup>tm1sti</sup>* Mäuse benennen kann. Trotzdem sind viele unterschiedliche apoptotische Gene in ihrer Expression im zeitlichen Verlauf signifikant verändert. Die starke Veränderung der Todesrezeptoren könnte ein Hinweis auf einen möglichen Apoptoseweg sein. Aber auch *trp63* als Mitglied der *p53* Familie scheint eine Rolle zu spielen. Ebenso könnten Calpain 2 und die Caspase 12 wichtige Faktoren der Apoptose sein. Auch PARP, welches aktuell oft als wichtiger Faktor des retinalen Zelluntergangs diskutiert wird, darf nicht außer Acht gelassen werden. Einige Gene zeigen sich in der Expressionsanalyse unauffällig. Sowohl *aif* und *calpain 1* als auch *bcl10* und die *caspase 3* scheinen innerhalb der Genexpression nur eine sehr geringe Rolle in der neuronalen Degeneration zu spielen. Auch das *Ap-1* fällt eher durch eine übermäßige Herabregulation auf.

Bei nachfolgenden Untersuchungen könnten weitere Faktoren der extrazellulären Aktivierung und die *p53* Familie umfassender untersucht werden. Ebenfalls ist die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration die zu erhöhten Calpain 2 führt von Interesse. Die Enzymaktivität PARPs auf der Proteinebene oder immunhistochemische Färbungen mittels Antikörper gegen PARP könnten dargestellt werden.

Ebenso könnten alle weiteren untersuchten Gene, auch diejenigen welche in der Expressionsanalyse unauffällig waren, auf enzymatischer und proteinaler Ebene untersucht werden.

Auch im Hinblick auf die öfters postulierte These, dass der Zelluntergang der Photorezeptoren kein apoptotischer Vorgang sei, sollten weitere Untersuchungen erfolgen. So könnte ebenso wie bei der *rd1* Maus über mathematische Modelle [Sahaboglu et al. 2013] die Zeit des Zelluntergangs gemessen werden, um zu sehen ob auch der Zelluntergang in der Retina der *Rpgr<sup>tm1sti</sup>* Mäuse länger dauert als die normale Apoptose. Ein weiterer Versuch wäre es Gene, die Einfluss auf Nekrose oder Autophagozytose haben, zu untersuchen, denn auch diese beiden Möglichkeiten des

Zelltodes könnten eine Rolle bei der retinalen Neurodegeneration spielen [Murakami et al. 2013].

Als mögliche Fehlerquelle in der Expressionsanalyse kann die Anzahl der untersuchten Augen gelten. Es wurden pro Zeitpunkt und Genotyp drei unterschiedliche Augen gepoolt. Durch eine erhöhte Anzahl an Augen könnte die Signifikanz der Expressionsanalyse erhöht werden. In dieser Arbeit war die Anzahl der Augen jedoch durch andere Arbeiten und Züchtungsvorschriften begrenzt.

Ebenso spielt die Wahl der Untersuchungszeitpunkte eine wichtige Rolle. Durch Testung anderer Zeitpunkte könnte das Expressionsprofil einzelner Gene variieren.

## **5.2 Interpretation der morphologischen Untersuchung**

Bei der morphologischen Untersuchung mittels Tunel-Assay waren die mutierten und heterozygoten Tiere im Vergleich zu den Wildtyptieren im zeitlichen Verlauf auffällig.

Diese Art der Darstellung des Zelluntergangs ist sehr geläufig in der aktuellen Forschung. In verschiedenen Tiermodellen wurde so bereits mehrmals der Zelluntergang in der Retina gezeigt [Beltran et al. 2009; Paquet-Durand et al. 2007a].

Die Wildtyptiere zeigen zu allen sieben verschiedenen Zeitpunkten keine bis wenige Tunel-positive Zellen. Nur zu den späteren Zeitpunkten, bei 18 und 21 Monaten, kommen Tunel-positive Zellen vor. In der Retina der Wildtyptiere scheint somit während der 21 Monate Lebensdauer kaum Zelluntergang stattzufinden. Die wenigen Tunel-positiven Zellen zu den späteren Zeitpunkten können als altersbedingter Zelluntergang in der Retina gelten.

Im Gegensatz dazu zeigen sich bei den mutierten Tieren vermehrt Tunel-positive Zellen, welche auf einen stärkeren Zelluntergang hinweisen. Zu Beginn der Zeitspanne, also ab 3 Monaten, zeigen sich nur vereinzelt Tunel-positive Zellen. In der späteren Phase, beginnend mit 12 Monaten, sieht man eine erhöhte Anzahl an Tunel-positiven Zellen. In der Zeitspanne von 12 bis 15 Monaten scheint ein vermehrter Zelluntergang stattzufinden. Bei 18 Monaten sind es dann wieder weniger Tunel-positive Zellen, hier scheint die Phase des starken Zelluntergangs wieder abzunehmen. Bei 21 Monaten

## Diskussion

dagegen steigt die Zahl der Tunel-positiven Zellen wieder an, das kann aber eventuell auch als altersbedingte Erscheinung gewertet werden.

Die Ergebnisse des Tunel-Assays bei den mutierten Tieren können sehr gut mit den funktionellen und morphologischen Ergebnissen früherer Arbeiten korreliert werden [Röll 2014; Schlegel 2011].

Der Krankheitsverlauf der mutierten Tiere konnte anhand der damaligen Ergebnisse in drei Phasen eingeteilt werden:

- Frühe Phase (< 9 Monate): funktionell weitgehend unverändert, morphologisch erste Veränderungen der IS/OS
- Mittlere Phase (9-15 Monate): funktionell beginnender Funktionsverlust, morphologisch deutliche Veränderungen der IS/OS, Abnahme der Photorezeptorkerne der ONL
- Späte Phase (> 15 Monate): funktionell fortschreitender Funktionsverlust, weitere Ausprägung der morphologischen Veränderungen der äußeren Retina

Ebenso können auch die Ergebnisse des Tunel-Assays eingeteilt werden:

- Frühe Phase (< 9 Monate): vereinzelte Tunel-positive Zellen, kein Zelluntergang
- Mittlere Phase (9-15 Monate): erhöhte Anzahl an Tunel-positiven Zellen, deutlicher Zelluntergang
- Späte Phase (>15 Monate): weiter mäßig erhöhte Anzahl Tunel-positiver Zellen, weiterer Zelluntergang

So konnte durch eine direkte Darstellung des Zelluntergangs gezeigt werden, dass bei den  $Rpgr^{tm1sti}$  Mäusen die funktionellen Veränderungen zeitlich mit denen des Zelluntergangs übereinstimmen.

Auch die Ergebnisse des Tunel-Assays der heterozygoten Tiere können mit den früheren Ergebnissen verglichen werden. Bei den heterozygoten Tieren kommen insgesamt weniger Tunel-positive Zellen vor als bei den mutierten Tieren. Die Mehrzahl der Tunel-positiven Zellen liegt hier jedoch in der frühen Phase vor.

## Diskussion

Bei 3 bis 12 Monaten zeigen sich zu jedem Zeitpunkt jeweils mäßig viele Tunel-positive Zellen, zu den späteren Zeitpunkten aber gar keine mehr. Nur bei 21 Monaten kommen noch, ähnlich den mutierten und Wildtyp-tieren, vermehrt Tunel-positive Zellen vor, die auch hier als altersbedingt gedeutet werden können.

Der Vergleich mit den Ergebnissen der funktionellen Analyse erweist sich bei den heterozygoten Tieren als schwieriger, denn funktionell wurden die heterozygoten Tiere nur zum Zeitpunkt 18 Monate elektrophysiologisch untersucht [Röll 2014]. Hier zeigte sich eine Abnahme der Amplitude gegenüber den Wildtyp-tieren, so dass die Werte der heterozygoten Tiere zwischen den Werten der Wildtyp- und mutierten Tiere lagen. Dieser mildere Funktionsverlust spiegelt sich auch in den Ergebnissen des Tunel-Assays wieder, denn insgesamt kommt es hier zu einem stärkeren Zelluntergang als bei den Wildtyp-tieren und einem geringeren Zelluntergang als bei den mutierten Tieren. Zeitlich können diese Ergebnisse jedoch nicht korreliert werden, da nur zu einem Zeitpunkt eine Messung stattgefunden hat.

Zusätzlich ist eine Korrelation mit den Ergebnissen der Funduskopie möglich [Röll 2014] (siehe Abbildung 2.8). In der Funduskopie sichtbare Pigmentveränderungen des Augenhintergrunds sind meist auf Depigmentierungen oder Hypopigmentierungen des RPE zurückzuführen und typische Zeichen einer stattfindenden retinalen Degeneration [Hawes et al. 1999].

Der Fundus der Wildtyp-tiere bleibt über die Dauer der Zeitspanne unverändert. Ebenso zeigen sich demnach im Tunel-Assay kaum Tunel-positive Zellen. Es findet keine retinale Degeneration statt.

Bei den mutierten Tieren dagegen zeigen sich ab 3 Monaten depigmentierte Bereiche in Form von weißen Punkten im Fundus. Diese Punkte werden im zeitlichen Verlauf einheitlicher, bis sie schließlich bei 15 Monaten am deutlichsten ausgeprägt sind. Im Tunel-Assay kommen auch zu diesen Zeitpunkten vermehrt Tunel-positive Zellen vor.

Die heterozygoten Tiere weisen deutliche Veränderungen mit unregelmäßigen weißen Flecken ab 3 Monaten auf. Diese Flecken verändern sich ab 15 Monaten zu den gleichen Punkten wie bei den mutierten Tieren. Auch hier findet eine deutliche retinale Degeneration statt. Es finden sich vermehrt Tunel-positive Zellen bei den heterozygoten

## Diskussion

Tieren ab 3 Monaten konstant bis zu 12 Monaten. Bei 15 und 18 Monaten jedoch zeigen sich im Gegensatz zur Funduskopie keine Veränderungen.

Insgesamt fällt bei den Ergebnissen des Tunel-Assays auf, dass der Zelluntergang bei den mutierten und heterozygoten Tieren zu unterschiedlichen Zeitspannen stattzufinden scheint.

Während bei den mutierten Tieren der stärkste Zelluntergang in der mittleren Phase (9-15 Monate) stattfindet, zeigt sich bei den heterozygoten Tieren ein konstant mäßiger Zelluntergang in der frühen Phase, hier bis zu 12 Monaten.

Die Ergebnisse des Tunel Assays sollten ebenso kritisch hinterfragt werden. Hier muss als eventuelle Fehlerquelle die geringe Probenanzahl (zwei unterschiedliche Augen pro Zeitpunkt) angegeben werden. Eine größere Anzahl würde eine signifikantere Aussage ermöglichen. Jedoch erwies sich die Färbetechnik des Tunel-Assays, vor allem zu späteren Zeitpunkten, als sehr schwierig handhabbar. Das geringe Gewebe eines Mäuseauges war nach 5h Färbung oft stark zerrissen und löchrig, so dass es kaum auswertbar war. Auch die Zahl der vorhandenen Augen war, wieder vor allem zu den späten Zeitpunkten, beschränkt.

### **5.3 Korrelation der qPCR und morphologischen Ergebnissen**

Die Schwierigkeit der Korrelation der Ergebnisse der Expressionsanalyse und des Tunel-Assays liegt vor allem darin, dass in der Expressionsanalyse viele Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten signifikant verändert waren, aber kein eindeutiger Weg der Apoptose und kein definitiver Zeitraum dargestellt werden konnte. Trotzdem lassen sich im Verlauf einige Ähnlichkeiten feststellen.

Betrachtet man zuerst die Ergebnisse der mutierten Tiere, so folgen sie im Tunel-Assay deutlich dem zuvor postulierten dreiphasischen Krankheitsverlauf. In der mittleren Phase beginnt der Untergang der retinalen Zellen und schreitet in der späteren Phase weiter fort. Auch in der Expressionsanalyse lässt sich ein ähnlicher Verlauf erahnen. In der frühen Phase sind die meisten Gene herabreguliert oder nur mäßig hochreguliert. Eine starke Hochregulation zeigt sich erst ab 15 Monaten in der späten Phase. Die

## Diskussion

Unterscheidung zwischen früher und mittlerer Phase kann hier nur schwer erfolgen, es zeigen sich aber bei < 9 Monaten geringere Expressionsveränderungen als bei 9-15 Monaten (siehe Tabelle 5.1)

Bei den heterozygoten Tieren scheint nach den Ergebnissen dieser Arbeit der Krankheitsverlauf ein ganz anderer zu sein. Im Tunel-Assay zeigen sich vor allem in der frühen Phase vermehrt Tunel-positive Zellen, in der mittleren und späten dagegen wenig. Ähnliches fällt auch in der Expressionsanalyse auf, im Gesamtbild zeigt sich eine vermehrte Veränderung vor allem in der frühen Phase, spät sind kaum mehr Veränderungen zu sehen (Vergleiche Tabelle 5.1). Man könnte bei den heterozygoten Tieren eher von zwei Phasen im Krankheitsverlauf sprechen: eine frühe aktive Phase, und eine späte ruhige Phase, in der der Zelluntergang bereits abgeschlossen ist.

Jedoch zeigt sich bei den heterozygoten Tieren auch eine gewisse Unvereinbarkeit der Ergebnisse. Der Zelluntergang erscheint im Tunel-Assay insgesamt nur mäßig stark, im Gegensatz dazu ist die Expressionsanalyse sehr stark verändert, teilweise stärker als bei den mutierten Tieren. Mögliche Ursachen werden in Punkt 5.4 erörtert.

### **5.4 Auffällige Ergebnisse der heterozygoten Tiere**

Bei der Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit zeigt sich, dass teilweise die heterozygoten Tiere besonders auffällig waren.

Eigentlich würde man bei den heterozygoten Tieren einen eher milden Phänotyp der Erkrankung erwarten, die Werte sollten sich in allen Analysen zwischen denen der Wildtypiere und der mutierten Tiere befinden. Betrachtet man jedoch die Ergebnisse dieser und vorheriger Arbeiten, zeigen sich gewisse Auffälligkeiten. So scheint nach dem Tunel-Assay nur ein mäßiger Zelluntergang statt zu finden, ebenso zeigen die ERG Analysen bei 18 Monaten nur eine milde Funktionseinschränkung.

In der Expressionsanalyse jedoch sind viele Gene stark verändert, und auch die Funduskopie beschreibt deutliche Pigmentveränderungen ab drei Monaten. [Röll 2014]

## Diskussion

Daher stellt sich die Frage, warum die heterozygoten Tiere in den Analysen so unterschiedlich sind und warum sie teilweise ebenso auffällig sind wie bei den mutierten Tieren.

Eine mögliche Erklärung könnte über die Inaktivierung des X-Chromosoms (XCI, Lyonisierung) gefunden werden. 1961 wurde von Mary F. Lyon die Hypothese postuliert, dass bei Weibchen jeweils ein X-Chromosom inaktiviert wird, dass diese Inaktivierung zufällig erfolgt (entweder paternales oder maternales X-Chromosom), und dass die XCI in verschiedenen Zellen im gleichen Organismus unterschiedlich sein kann [LYON 1961]. Diese XCI soll auch eine Rolle bei X-chromosomal vererbten Erkrankungen spielen. Denn die Erkrankung bei weiblichen Carrieren kann unterschiedlich stark ausgeprägt sein, von symptomlos bis hin zur gleichstarken Symptomatik wie beim erkrankten Mann, je nachdem welches X-Chromosom inaktiviert ist [Migeon 2007]. Eine normale Verteilung der XCI wäre 50:50, paternales zu maternales X-Chromosom, dabei wird bei weiblichen Individuen, falls vorhanden, das mutierte Gen unterdrückt, es zeigen sich keine Symptome. Kommt es jedoch zu einer verschobenen XCI Ratio, das heißt 75-90% der Zellen zeigen vorrangig eine XCI des normalen X-Chromosoms und eine Expression des mutierten X-Chromosoms, dann ist es wahrscheinlicher, dass Symptome auftreten. Eine extreme Verschiebung der XCI würde bedeuten, dass in 90-95% der Zellen ein bestimmtes X-Chromosom inaktiviert ist und falls dieses das normale sei, das mutierte starke Symptome hervorrufen kann [Orstavik 2009].

Die Möglichkeit dieser verschobenen XCI zugunsten des mutierten X-Chromosoms wurde auch für die XLRP vielfach diskutiert. In einer Studie wurden 11 verschiedene heterozygote Carrier für die X-chromosomale Retinitis pigmentosa mittels Autofluoreszenz untersucht, 9 davon zeigten Auffälligkeiten. Als Ursache wurde dabei ebenfalls die XCI angenommen [Wegscheider et al. 2004].

Die unterschiedliche XCI wäre eine mögliche Erklärung weshalb die heterozygoten Tiere der  $Rpgr^{tm1sti}$  Linie teilweise nur mäßige, teilweise aber sehr starke Veränderungen in den Analysen zeigen. Um dies zukünftig genauer nachvollziehen zu können, müsste eine Darstellung des XCI Verhältnisses der zu analysierenden Mäuse

## Diskussion

erfolgen. Um die XCI bei einem Individuum darzustellen, wird eine RNA Expressionsanalyse benötigt, am einfachsten mit Zellen des Blutes [Orstavik 2009].

Jedoch gibt es auch einige Argumente, die dagegen sprechen, dass allein die XCI für die unterschiedliche Ausprägung des Phänotyps bei weiblichen Individuen verantwortlich ist. Zum Beispiel die Tatsache, dass bei erkrankten heterozygoten Carrierinnen fast ausschließlich beide Augen symmetrisch betroffen sind, spricht gegen die alleinige XCI als Ursache [Bird 1975].

Berghmans und Kollegen beschrieben 2011 den Fall zweier monozygoter weiblicher Zwillingsschwesterpaare, bei denen jeweils ein Zwilling klinisch und funktionell eine Retinitis pigmentosa entwickelt, der andere Zwilling jedoch nicht. In beiden Fällen wurde eine verschobene XCI als Krankheitsgrund ausgeschlossen. Die wirkliche Ursache blieb undefinierbar [Berghmans et al. 2011].

Deshalb erscheint es wahrscheinlich, dass der Phänotyp der heterozygoten Individuen von vielen verschiedenen Faktoren abhängt, unter anderem dem Einfluss des normalen Allels, der XCI, der unterschiedlichen Beleuchtung der Retina, und anatomische und physiologische Faktoren, die die Retina beeinflussen [Bird 1975].

Welche Faktoren nun bei den heterozygoten  $Rpgr^{tm1sti}$  Mäusen diese teilweise unterschiedliche Ausprägung des Phänotyps bewirkten oder ob doch die XCI dafür verantwortlich war, lässt sich mit dem derzeitigen Stand der Forschung nicht ausreichend erklären und erfordert noch weitere wissenschaftliche Arbeit.

## 5.5 Ausblick

Diese Arbeit diente der Analyse des Zellunterganges der Photorezeptoren in der Retina der  $Rpgr^{tm1sti}$  Mäuse. In der Expressionsanalyse wurden mehrere verschiedene bekannte Wege der Apoptose auf molekularer Ebene untersucht, um eventuelle deutliche Veränderungen der Genexpression im zeitlichen Verlauf darzustellen und dadurch den pathogenetischen Mechanismus des Zellunterganges benennen zu können. Jedoch zeigten sich in der Expressionsanalyse einige verschiedene Gene signifikant auffällig, vor allem die Todesrezeptoren, *trp63* und *calpain 2* mit *caspase 12*, sodass kein

## Diskussion

eindeutiger Weg erkannt werden konnte. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass einige schon in der Literatur beschriebene Gene in der Expressionsanalyse weitgehend unauffällig waren. Zusätzlich konnte ein grober zeitlicher Ablauf bestimmt werden.

Mittels des Tunel-Assays wurde der Zelluntergang morphologisch dargestellt. Hier zeigte sich bei den mutierten Tieren ein schon zuvor beschriebener, dreiphasischer Krankheitsverlauf. Bei den heterozygoten Tieren ließ sich dagegen eher ein zweiphasischer Verlauf erahnen.

In der weiterführenden Charakterisierung sollte versucht werden, die genaue Art des Zelluntergangs zu erforschen. Sowohl die hier vorgestellte Expressionsanalyse, als auch weitere Arbeiten unterschiedlicher Gruppen, fordern eine neue Sicht auf die lange postulierte These, dass bei neurodegenerativen Erkrankungen zwingend Apoptose die Ursache des Zelltodes sein müsse.

Zusätzlich ergab sich im Laufe dieser Arbeit die Frage, weshalb die heterozygoten Tiere teilweise ähnlich schwere Verläufe wie die mutierten Tiere zeigten. Als mögliche Ursache wurde eine verschobene XCI diskutiert. Dennoch lässt sich damit die Auffälligkeit der heterozygoten Tiere nicht ausreichend erklären und weitere Überlegungen und Studien sollten sich anschließen.

Die Analysen dieser Arbeit dienen der Entwicklung möglicher gentherapeutischer Strategien. Das Wissen um den genauen pathogenetischen Mechanismus des Zelluntergangs ist ein wichtiger Bestandteil einer Therapieentwicklung. Ebenso ermöglicht die Darstellung des zeitlichen Ablaufs des Zelluntergangs einen eventuellen therapeutischen Eingriff vor dem Beginn der Degeneration

## 6 Zusammenfassung

Dem Begriff der Retinitis pigmentosa (RP) wird eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit Degeneration der Photorezeptoren zugeordnet, die schleichend beginnend im Endstadium zur Erblindung führen. Einen sehr schwerwiegenden Verlauf hat die X-chromosomal vererbte Form (XLRP). Verantwortlich ist hierfür hauptsächlich eine Mutation im terminalen Exon ORF 15 des *RPGR* Gens (Retinitis pigmentosa GTPase Regulator). In der Arbeitsgruppe experimentelle Ophthalmologie wurde in vorherigen Arbeiten ein Mausmodell ( $Rpgr^{tm1sti}$ ) generiert, welches durch eine gezielte Genmutation in diesem „Mutational Hotspot“ eine mit dem Menschen vergleichbare retinale Degeneration entwickelt hat. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den möglichen pathogenetischen Mechanismus und das Ausmaß des Zellunterganges der Photorezeptoren in diesem Mausmodell innerhalb des zeitlichen Verlaufs (3-21 Monate) darzustellen. In einer Expressionsanalyse wurden dreizehn verschiedene, an der Apoptose beteiligte Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten (3,6,9,12,15,18 und 21 Monaten) auf mögliche Veränderungen in ihrer Genexpression untersucht. Das Ausmaß des Zellunterganges wurde zu denselben Zeitpunkten immunhistochemisch mittels Tunel-Färbung bestimmt. Es zeigte sich, dass zu bestimmten Zeitpunkten die Expression mehrerer unabhängig voneinander wirkender Gene hochreguliert war, beispielsweise die Todesrezeptoren, ein Mitglied der *p53* Familie sowie *calpain 2* und *caspase 12*. Deshalb konnte kein einzelner pathogenetischer Mechanismus des Zellunterganges dargestellt werden. Trotzdem konnte gezeigt werden, dass einige bekannte apoptotische Gene in der Expressionsanalyse weitgehend unauffällig waren. Zusätzlich konnte ein grober zeitlicher Ablauf bestimmt werden. In der immunhistochemischen Darstellung zeigte sich ein deutlicher Zelluntergang bei den mutierten Tieren in der mittleren Phase, was auf einen schon in vorherigen Arbeiten beschriebenen dreiphasigen Krankheitsverlauf hindeutet. Bei den heterozygoten Tieren fiel ein vermehrter Zelluntergang in der frühen Phase auf. Die Korrelation der beiden Analysen zeigte bei den mutierten Tieren vor allem in der mittleren Phase (9-15 Monate), bei den heterozygoten Tieren dagegen eher in der frühen Phase (< 9 Monate) auffällige Ergebnisse. Die Darstellung des Zellunterganges der Photorezeptoren im  $Rpgr^{tm1sti}$  Mausmodell stellt einen weiteren wichtigen Bestandteil in der Erforschung der XLRP im Hinblick auf mögliche gentherapeutische Strategien dar.

## 7 Summary

Retinitis pigmentosa (RP) is a heterogeneous group of hereditary retinal dystrophies, which mostly begins with difficulties in dark adaptation and night blindness in adolescence and finally results in a loss of central vision. The X-linked RP (XLRP) is known for its severe progress. The majority of XLRP are caused by mutations in the terminal Exon ORF15 of the gene encoding RPGR (Retinitis pigmentosa GTPase regulator), also called mutational hotspot. The Department of Ophthalmology in Gießen generated  $Rpgr^{tm1sti}$ , a mouse model for XLRP, comparable with a human XLRP patient, with a point mutation inserted in this “mutational hotspot”. The aim of this study was to characterize the potential pathogenetic mechanism and degree of photoreceptor degeneration in the  $Rpgr^{tm1sti}$  model over time (3-21 months).

Thirteen different genes known for their influence in apoptotic pathways have been studied in a gene expression analysis due to their change of expression in the chronological sequence. The degree of the photoreceptor degeneration during the same points of time was illustrated with Tunel-Assays.

The gene expression analysis showed upregulation of several different genes, e.g. the death receptors, a member of the *p53* family and *calpain 2* with *caspase 12*. This fact, and the additional variable time points of upregulation, aggravated the identification of an explicit pathogenetic mechanism. In spite of these facts, there were some genes, which had no altered gene expression. In addition, it was possible to fit the events in an approximate chronological sequence. The morphological illustration of the mutated animals showed increased Tunel-positive cells during the middle phase of the disease (9-15 months). This agrees with the in earlier works postulated three phases in the course of disease. The heterozygous animals in contrast showed increased Tunel-positiv cells in the early phase (< 9). The correlation of both analyses indicated that the majority of the photoreceptors degenerate in mutant animals in the middle phase, whereas in the heterozygous animals in the early phase.

These findings help to create a better understanding in the photoreceptor degenerations in XLRP to enable possible gene-therapeutic strategies.

## 8 Verzeichnisse

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

°C.....	Celsius
µl.....	<i>Mikroliter</i>
µm.....	Mikrometer
AP-1 .....	Aktivator Protein 1
ASC .....	apoptosis associated speck like protein containing a CARD
Bax.....	Bcl-2 assoziierte X Proteine
bp .....	Basenpaare
Ca <sup>2+</sup> .....	Calcium
CC.....	Connecting Cilium
cDNA.....	complementary DNA
Ct-Wert .....	Schwellenwert Zyklus
DAPI .....	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O.....	doppelt destilliertes Wasser
DISC.....	death inducing signaling complex
DMSO .....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	Desoxyribonucleinsäure
dNTP .....	desoxyribonucleosidtriphosphat
dr5 .....	death receptor 5
EDTA.....	Ethylendiamintetraacetat

## Verzeichnisse

Endo G.....	Endonuclease G
ERG.....	Elektroretinogramm
Ex .....	Exon
Exon ORF15 .....	Exon open reading frame 15
FAF .....	Fundusautofluoreszenz
GAPDH .....	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCL .....	Ganglienzellschicht
IAP .....	inhibitor of apoptosis proteins
IMS.....	Intermembrane space proteins
INL.....	innere Körnerschicht
IPL.....	innere plexiforme Schicht
IS.....	inneres Segment, Photorezeptoren
MgCL.....	Magnesium -Chlorid
MgCl <sub>2</sub> .....	Magnesium Chlorid
MIQE.....	Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments
MLE .....	äußere Grenzmembran
mm .....	Millimeter
MOMP.....	mitochondrial outer membrane permeabilization
mRNA .....	messenger RNA
mut.....	mutiert
NCBI.....	National Center for Biotechnology Information

## Verzeichnisse

NFL.....	Nervenfaserschicht
ng .....	Nanogramm
NO .....	Stickstoffmonoxid
NOD.....	nucleotid binding oligomerization domain containing protein
OCT.....	optische Kohärenztomographie
ONL .....	äußere Körnerschicht
OPL.....	äußere plexiforme Schicht
OS.....	äußeres Segment, Photorezeptoren
PARP.....	PolyADPribose Polymerase
PBS .....	Phosphatgepufferte Salzlösung
PIDDosome .....	p53 induced death domain protein
px .....	Pixel
Rd9 .....	retinal degeneration 9
RNA.....	Ribonucleinsäure
ROS.....	reactive oxygen species
RP.....	Retinitis pigmentosa
RP2 .....	RP 2 Protein
RPE.....	Retinales Pigmentepithel
RPGR.....	RP GTPase Regulator
Rpgr-ko.....	Rpgr-knock out
rRNA.....	ribosomale RNA
Smac/Diablo .....	second mitochondrial activator of caspases

## Verzeichnisse

Tdt .....	terminal desoxynucleotidyl transferase
Tris HCl.....	Tris-Hydrocholrid
TUNEL.....	Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling
wt.....	Wildtyp
XCI .....	X-Chromosom Inaktivierung
XLRP .....	X-chromosomal rezessive Retinitis pigmentosa

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1 Anatomische Darstellung des Auges .....	1
Abbildung 2.2 Die Retina.....	3
Abbildung 2.3 Photorezeptoren.....	4
Abbildung 2.4 Splicevarianten des <i>RPGR</i> .....	6
Abbildung 2.5 XLRP aufgrund von Mutation im <i>RPGR</i> Gen .....	7
Abbildung 2.6 Connecting Cilium .....	8
Abbildung 2.7 A: Semidünnschnitte der Retina.....	13
Abbildung 2.8 Funduskopie .....	14
Abbildung 2.9 Beispiel des ERGs für mutierte Tiere: Skotopische a-Welle .....	15
Abbildung 2.10 Beispiel des ERGs für heterozygote Tiere mit 18 Monaten .....	16
Abbildung 2.11 Procaspasen mit Prodomäne, kleiner und großer Einheit .....	18
Abbildung 2.12 Schematische Darstellung der bekannten Apoptosemechanismen .....	19
Abbildung 2.13 Phasen der lichtinduzierten Apoptose der Photorezeptoren.....	23

## Verzeichnisse

Abbildung 3.1 qPCR mit Ct-Werten verschiedener Primer .....	32
Abbildung 3.2 Melting Curve eines spezifischen Produkts bei 89°C .....	33
Abbildung 3.3 Berechnung $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .....	34
Abbildung 3.4 Beispiel einer Gelelektrophorese .....	35
Abbildung 4.1 Untersuchte Zeitpunkte .....	38
Abbildung 4.2 qPCR (A) und Regressionsanalyse (B) der linearen Quantifizierung...42	
Abbildung 4.3 RNA Qualitätskontrolle .....	43
Abbildung 4.4 RNA Umwandlung in Triplikates .....	44
Abbildung 4.5 Beispiel Ablauf qPCR 3 Monate .....	45
Abbildung 4.6 Beispiel der qPCR (A) und der Schmelzkurvenanalyse (B) .....	46
Abbildung 4.7 Gelbild <i>caspase 3</i> bei 3 Monaten .....	46
Abbildung 4.8 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei <i>aif</i> .....	48
Abbildung 4.9 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei <i>bcl2l1</i> .....	49
Abbildung 4.10 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei <i>calpain 1</i> .....	50
Abbildung 4.11 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei <i>calpain 2</i> .....	51
Abbildung 4.12 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei <i>caspase 12</i> .....	52
Abbildung 4.13 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei <i>parp</i> .....	53
Abbildung 4.14 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei <i>bcl10</i> .....	54
Abbildung 4.15 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei <i>caspase 3</i> .....	55
Abbildung 4.16 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei <i>dr 5</i> .....	56
Abbildung 4.17 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei <i>fas</i> .....	57
Abbildung 4.18 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei <i>c-fos</i> .....	58

## Verzeichnisse

Abbildung 4.19 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei <i>c-jun</i> .....	59
Abbildung 4.20 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ Werte mutierter und heterozygoter Tiere bei <i>trp63</i> .....	60
Abbildung 4.21 Positiv- (A) und Negativkontrolle (B) .....	64
Abbildung 4.22 Beispiel Tunel- positive Zellen .....	65
Abbildung 4.23 Beispiel Tunel-Assay zu jedem Zeitpunkt und Genotyp .....	66
Abbildung 4.24 Diagramm der Tunel-positiven Zellen im zeitlichen Verlauf .....	67

### 8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Bekannte Mausmodelle .....	9
Tabelle 3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien .....	25
Tabelle 3.2 Kits .....	26
Tabelle 3.3 Enzyme .....	26
Tabelle 3.4 Marker .....	27
Tabelle 3.5 Primer .....	27
Tabelle 3.6 Geräte .....	28
Tabelle 3.7 Protokoll Teil I .....	31
Tabelle 3.8 Protokoll Teil II .....	31
Tabelle 3.9 Standard PCR Protokoll .....	33
Tabelle 3.10 DNA labeling solution .....	36
Tabelle 4.1 Proteine der Primerpaare der qPCR .....	39
Tabelle 4.2 Beispiel für die $2^{-\Delta\Delta}$ Ct Berechnung .....	47
Tabelle 4.3 Zusammenfassung der qPCR Ergebnisse .....	61
Tabelle 5.1 Ergebnisse der qPCR .....	70

## 9 Literaturverzeichnis

**Aleman, Tomas S.; Cideciyan, Artur V.; Sumaroka, Alexander; Schwartz, Sharon B.; Roman, Alejandro J.; Windsor, Elizabeth A M et al. (2007):** Inner retinal abnormalities in X-linked retinitis pigmentosa with RPGR mutations. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 (10), S. 4759–4765. DOI: 10.1167/iovs.07-0453.

**Ali, R. R.; Reichel, M. B.; Kanuga, N.; Munro, P. M.; Alexander, R. A.; Clarke, A. R. et al. (1998):** Absence of p53 delays apoptotic photoreceptor cell death in the rds mouse. In: *Curr Eye Res* 17 (9), S. 917–923.

**Alnemri, E. S.; Livingston, D. J.; Nicholson, D. W.; Salvesen, G.; Thornberry, N. A.; Wong, W. W.; Yuan, J. (1996):** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. In: *Cell* 87 (2), S. 171.

**Becker, Christiane; Riedmaier Irmgard; Pfaffel, Michael W. (2009):** RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik. In: *BIO Spektrum* 15, S. 512–515.

**Beltran, William A.; Acland, Gregory M.; Aguirre, Gustavo D. (2009):** Age-dependent disease expression determines remodeling of the retinal mosaic in carriers of RPGR exon ORF15 mutations. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 (8), S. 3985–3995. DOI: 10.1167/iovs.08-3364.

**Berger, Wolfgang; Kloeckener-Gruissem, Barbara; Neidhardt, John (2010):** The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. In: *Prog Retin Eye Res* 29 (5), S. 335–375. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2010.03.004.

**Berghmans, Lieve V.; de Mendonca, Regina Halfeld Furtado; Coppieters, Frauke; de Oliveira Maia, Otacilio Jr; Takahashi, Walter Yukihiko; Lissens, Willy et al. (2011):** Discordance for retinitis pigmentosa in two monozygotic twin pairs. In: *Retina* 31 (6), S. 1164–1169. DOI: 10.1097/IAE.0b013e3181fbcf2b.

**Bird, A. C. (1975):** X-linked retinitis pigmentosa. In: *Br J Ophthalmol* 59 (4), S. 177–199.

**Bossy-Wetzel, E.; Bakiri, L.; Yaniv, M. (1997):** Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. In: *EMBO J* 16 (7), S. 1695–1709. DOI: 10.1093/emboj/16.7.1695.

**Brunner, S.; Colman, D.; Travis, A. J.; Luhmann, U. F.O; Shi, W.; Feil, S. et al. (2008):** Overexpression of RPGR Leads to Male Infertility in Mice Due to Defects in Flagellar Assembly. In: *Biology of Reproduction* 79 (4), S. 608–617. DOI: 10.1095/biolreprod.107.067454.

**Brunner, S.; Skosyrski, S.; Kirschner-Schwabe, R.; Knobloch, K.-P; Neidhardt, J.; Feil, S. et al. (2010):** Cone versus Rod Disease in a Mutant Rpgr Mouse Caused by Different Genetic Backgrounds. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51 (2), S. 1106–1115. DOI: 10.1167/iovs.08-2742.

**Budihardjo, I.; Oliver, H.; Lutter, M.; Luo, X.; Wang, X. (1999):** Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, S. 269–290. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.269.

**Bustin, Stephen A.; Benes, Vladimir; Garson, Jeremy A.; Hellemans, Jan; Huggett, Jim; Kubista, Mikael et al. (2009):** The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. In: *Clin Chem* 55 (4), S. 611–622. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.

**Chang, B.; Hawes, N. L.; Hurd, R. E.; Davisson, M. T.; Nusinowitz, S.; Heckenlively, J. R. (2002):** Retinal degeneration mutants in the mouse. In: *Vision Res* 42 (4), S. 517–525.

**Chatterjee, S.; Berger, S. J.; Berger, N. A. (1999):** Poly(ADP-ribose) polymerase: a guardian of the genome that facilitates DNA repair by protecting against DNA recombination. In: *Mol Cell Biochem* 193 (1-2), S. 23–30.

**Chipuk, Jerry E.; Maurer, Ulrich; Green, Douglas R.; Schuler, Martin (2003):** Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. In: *Cancer Cell* 4 (5), S. 371–381. DOI: 10.1016/S1535-6108(03)00272-1.

**Churbanova, Inna Y.; Sevrioukova, Irina F. (2008):** Redox-dependent changes in molecular properties of mitochondrial apoptosis-inducing factor. In: *J Biol Chem* 283 (9), S. 5622–5631. DOI: 10.1074/jbc.M709147200.

**Clarke, P. G. (1990):** Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. In: *Anat Embryol (Berl)* 181 (3), S. 195–213.

**Curran, T.; Franza, B. R., JR (1988):** Fos and Jun: the AP-1 connection. In: *Cell* 55 (3), S. 395–397.

**Desagher, S.; Martinou, J. C. (2000):** Mitochondria as the central control point of apoptosis. In: *Trends Cell Biol* 10 (9), S. 369–377.

**Donovan, M.; Carmody, R. J.; Cotter, T. G. (2001):** Light-induced photoreceptor apoptosis in vivo requires neuronal nitric-oxide synthase and guanylate cyclase activity and is caspase-3-independent. In: *J Biol Chem* 276 (25), S. 23000–23008. DOI: 10.1074/jbc.M005359200.

**Earnshaw, W. C.; Martins, L. M.; Kaufmann, S. H. (1999):** Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. In: *Annu Rev Biochem* 68, S. 383–424. DOI: 10.1146/annurev.biochem.68.1.383.

**Ferrari, Stefano; Di Iorio, Enzo; Barbaro, Vanessa; Ponzin, Diego; Sorrentino, Francesco S.; Parmeggiani, Francesco (2011):** Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. In: *Curr. Genomics* 12 (4), S. 238–249. DOI: 10.2174/138920211795860107.

**Fliegauf, Manfred; Benzing, Thomas; Omran, Heymut (2007):** When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies : Article : Nature Reviews Molecular Cell Biology. Unter Mitarbeit von Nature Publishing Group. Online verfügbar unter <http://www.nature.com/nrm/journal/v8/n11/full/nrm2278.html#B87>, zuletzt aktualisiert am 31.05.2014, zuletzt geprüft am 31.05.2014.

**Genini, Sem; Beltran, William A.; Aguirre, Gustavo D. (2012):** Development and validation of a canine-specific profiling array to examine expression of pro-apoptotic and pro-survival genes in retinal degenerative diseases. In: *Adv Exp Med Biol* 723, S. 353–363. DOI: 10.1007/978-1-4614-0631-0\_46.

**Grimm, C.; Wenzel, A.; Hafezi, F.; Reme, C. E. (2000):** Gene expression in the mouse retina: the effect of damaging light. In: *Mol Vis* 6, S. 252–260.

**Hafezi, F.; Steinbach, J. P.; Marti, A.; Munz, K.; Wang, Z. Q.; Wagner, E. F. et al. (1997):** The absence of c-fos prevents light-induced apoptotic cell death of photoreceptors in retinal degeneration in vivo. In: *Nat Med* 3 (3), S. 346–349.

**Ham, J.; Babij, C.; Whitfield, J.; Pfarr, C. M.; Lallemand, D.; Yaniv, M.; Rubin, L. L. (1995):** A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. In: *Neuron* 14 (5), S. 927–939.

**Hartong, Dyonne T.; Berson, Eliot L.; Dryja, Thaddeus P. (2006):** Retinitis pigmentosa. In: *Lancet* 368 (9549), S. 1795–1809. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69740-7.

**Hawes, N. L.; Smith, R. S.; Chang, B.; Davisson, M.; Heckenlively, J. R.; John, S. W. (1999):** Mouse fundus photography and angiography: a catalogue of normal and mutant phenotypes. In: *Mol Vis* 5, S. 22.

**Hisatomi, T.; Sakamoto, T.; Murata, T.; Yamanaka, I.; Oshima, Y.; Hata, Y. et al. (2001):** Relocalization of apoptosis-inducing factor in photoreceptor apoptosis induced by retinal detachment in vivo. In: *Am J Pathol* 158 (4), S. 1271–1278. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)64078-3.

**Hofmann, K.; Bucher, P.; Tschopp, J. (1997):** The CARD domain: a new apoptotic signalling motif. In: *Trends Biochem Sci* 22 (5), S. 155–156.

**Hong, D. H.; Pawlyk, B. S.; Shang, J.; Sandberg, M. A.; Berson, E. L.; Li, T. (2000):** A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3). In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (7), S. 3649–3654. DOI: 10.1073/pnas.060037497.

**Hong, D.-H (2005):** A Single, Abbreviated RPGR-ORF15 Variant Reconstitutes RPGR Function In Vivo. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46 (2), S. 435–441. DOI: 10.1167/iovs.04-1065.

**Hong, Dong-Hyun; Pawlyk, Basil S.; Adamian, Michael; Li, Tiansen (2004):** Dominant, gain-of-function mutant produced by truncation of RPGR. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 (1), S. 36–41.

**Hosch, Jutta; Lorenz, Birgit; Stieger, Knut (2011):** RPGR: role in the photoreceptor cilium, human retinal disease, and gene therapy. In: *Ophthalmic Genet.* 32 (1), S. 1–11. DOI: 10.3109/13816810.2010.535889.

**Hsiao, Wei-Ting; Tsai, Ming-Dar; Jow, Guey-Mei; Tien, Lu-Tai; Lee, Yih-Jing (2012):** Involvement of Smac, p53, and caspase pathways in induction of apoptosis by gossypol in human retinoblastoma cells. In: *Mol Vis* 18, S. 2033–2042.

**Huang, W. C.; Wright, A. F.; Roman, A. J.; Cideciyan, A. V.; Manson, F. D.; Gewaily, D. Y. et al. (2012):** RPGR-Associated Retinal Degeneration in Human X-Linked RP and a Murine Model. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53 (9), S. 5594–5608. DOI: 10.1167/iovs.12-10070.

**Jin, Zi-Bing; Gu, Feng; Ma, Xu; Nao-i, Nobuhisa (2007):** Identification of a novel RPGR exon ORF15 mutation in a family with X-linked retinitis pigmentosa. In: *Arch Ophthalmol* 125 (10), S. 1407–1412. DOI: 10.1001/archopht.125.10.1407.

**Kaufmann, S. H.; Hengartner, M. O. (2001):** Programmed cell death: alive and well in the new millennium. In: *Trends Cell Biol* 11 (12), S. 526–534.

**Keeble, James A.; Gilmore, Andrew P. (2007):** Apoptosis commitment--translating survival signals into decisions on mitochondria. In: *Cell Res* 17 (12), S. 976–984. DOI: 10.1038/cr.2007.101.

**Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. (1972):** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. In: *Br J Cancer* 26 (4), S. 239–257.

**Klinke, Rainer; Baumann, Rosemarie (2010):** Physiologie. Unter Mitarbeit von]. 6. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme.

**Li, L. Y.; Luo, X.; Wang, X. (2001):** Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. In: *Nature* 412 (6842), S. 95–99. DOI: 10.1038/35083620.

**Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S. M.; Ahmad, M.; Alnemri, E. S.; Wang, X. (1997):** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. In: *Cell* 91 (4), S. 479–489.

**Lorenz, Birgit; Andrassi, Monika; Kretschmann, Ulf (2003):** Phenotype in two families with RP3 associated with RPGR mutations. In: *Ophthalmic Genet* 24 (2), S. 89–101.

**LYON, M. F. (1961):** Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). In: *Nature* 190, S. 372–373.

**Marigo, Valeria (2007):** Programmed cell death in retinal degeneration: targeting apoptosis in photoreceptors as potential therapy for retinal degeneration. In: *Cell Cycle* 6 (6), S. 652–655.

**Meindl, A.; Dry, K.; Herrmann, K.; Manson, E.; Ciccodicola, A.; Edgar, A. et al. (1996):** A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3) - Nature Genetics. Unter Mitarbeit von Nature Publishing Group. Online verfügbar unter <http://www.nature.com/ng/journal/v13/n1/abs/ng0596-35.html>, zuletzt aktualisiert am 01.05.1996, zuletzt geprüft am 31.05.2014.

**Migeon, Barbara R. (2007):** Why females are mosaics, X-chromosome inactivation, and sex differences in disease. In: *Gend Med* 4 (2), S. 97–105.

**Murakami, Yusuke; Notomi, Shoji; Hisatomi, Toshio; Nakazawa, Toru; Ishibashi, Tatsuro; Miller, Joan W.; Vavvas, Demetrios G. (2013):** Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations. In: *Prog Retin Eye Res* 37, S. 114–140. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.08.001.

**Nakazawa, Toru; Kayama, Maki; Ryu, Morin; Kunikata, Hiroshi; Watanabe, Ryou; Yasuda, Masayuki et al. (2011):** Tumor necrosis factor-alpha mediates photoreceptor death in a rodent model of retinal detachment. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52 (3), S. 1384–1391. DOI: 10.1167/iovs.10-6509.

**Orstavik, Karen Helene (2009):** X chromosome inactivation in clinical practice. In: *Hum Genet* 126 (3), S. 363–373. DOI: 10.1007/s00439-009-0670-5.

**Paquet-Durand, Francois; Silva, Jose; Talukdar, Tanuja; Johnson, Leif E.; Azadi, Seifollah; van Veen, Theo et al. (2007a):** Excessive activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to inherited photoreceptor degeneration in the retinal degeneration 1 mouse. In: *J Neurosci* 27 (38), S. 10311–10319. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1514-07.2007.

**Paquet-Durand, Francois; Silva, Jose; Talukdar, Tanuja; Johnson, Leif E.; Azadi, Seifollah; van Veen, Theo et al. (2007b):** Excessive activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to inherited photoreceptor degeneration in the retinal

degeneration 1 mouse. In: *J Neurosci* 27 (38), S. 10311–10319. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1514-07.2007.

**Pieper, A. A.; Verma, A.; Zhang, J.; Snyder, S. H. (1999):** Poly (ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death. In: *Trends Pharmacol Sci* 20 (4), S. 171–181.

**Polster, Brian M.; Basanez, Gorka; Etxebarria, Aitor; Hardwick, J. Marie; Nicholls, David G. (2005):** Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria. In: *J Biol Chem* 280 (8), S. 6447–6454. DOI: 10.1074/jbc.M413269200.

**Ramamurthy, V.; Cayouette, M. (2009):** Development and disease of the photoreceptor cilium. In: *Clin Genet* 76 (2), S. 137–145.

**Röll, Dorothee (2014):** Morphologische und funktionelle Charakterisierung eines Mausmodells der Augenkrankheit Retinitis Pigmentosa aufgrund einer Mutation im Rprgr Gen; Dissertation 2014; VVB Laufersweiler (Edition scientifique).

**Sahaboglu, A.; Paquet-Durand, O.; Dietter, J.; Dengler, K.; Bernhard-Kurz, S.; Ekstrom, P. Ar et al. (2013):** Retinitis pigmentosa: rapid neurodegeneration is governed by slow cell death mechanisms. In: *Cell Death Dis* 4, S. e488. DOI: 10.1038/cddis.2013.12.

**Sancho-Pelluz, Javier; Arango-Gonzalez, Blanca; Kustermann, Stefan; Romero, Francisco Javier; van Veen, Theo; Zrenner, Eberhart et al. (2008):** Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. In: *Mol Neurobiol* 38 (3), S. 253–269. DOI: 10.1007/s12035-008-8045-9.

**Sanges, Daniela; Comitato, Antonella; Tammaro, Roberta; Marigo, Valeria (2006):** Apoptosis in retinal degeneration involves cross-talk between apoptosis-inducing factor (AIF) and caspase-12 and is blocked by calpain inhibitors. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (46), S. 17366–17371. DOI: 10.1073/pnas.0606276103.

**Schlegel, J. (2011):** Entwicklung eines humanisierten Mausmodells für X-chromosomale Retinitis Pigmentosa, hervorgerufen durch eine Punktmutation im Rprgr Gen.

**Schweichel, J. U.; Merker, H. J. (1973):** The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. In: *Teratology* 7 (3), S. 253–266. DOI: 10.1002/tera.1420070306.

**Strasser, A.; O'Connor, L.; Dixit, V. M. (2000):** Apoptosis signaling. In: *Annu Rev Biochem* 69, S. 217–245. DOI: 10.1146/annurev.biochem.69.1.217.

**Susin, S. A.; Lorenzo, H. K.; Zamzami, N.; Marzo, I.; Snow, B. E.; Brothers, G. M. et al. (1999):** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. In: *Nature* 397 (6718), S. 441–446. DOI: 10.1038/17135.

**Thompson, Debra A.; Khan, Naheed W.; Othman, Mohammad I.; Chang, Bo; Jia, Lin; Grahek, Garrett et al. (2012):** Rd9 Is a Naturally Occurring Mouse Model of a Common Form of Retinitis Pigmentosa Caused by Mutations in RPGR-ORF15. In: *PLoS ONE* 7 (5), S. e35865. DOI: 10.1371/journal.pone.0035865.

**Tinel, Antoine; Tschopp, Jurg (2004):** The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. In: *Science* 304 (5672), S. 843–846. DOI: 10.1126/science.1095432.

**Verhagen, A. M.; Ekert, P. G.; Pakusch, M.; Silke, J.; Connolly, L. M.; Reid, G. E. et al. (2000):** Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. In: *Cell* 102 (1), S. 43–53.

**Vervoort, R.; Lennon, A.; Bird, A. C.; Tulloch, B.; Axton, R.; Miano, M. G. et al. (2000):** Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa. In: *Nat Genet* 25 (4), S. 462–466. DOI: 10.1038/78182.

**Wegscheider, Erika; Preising, Markus N.; Lorenz, Birgit (2004):** Fundus autofluorescence in carriers of X-linked recessive retinitis pigmentosa associated with mutations in RPGR, and correlation with electrophysiological and psychophysical data. In: *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 242 (6), S. 501–511. DOI: 10.1007/s00417-004-0891-1.

**Wenzel, Andreas; Grimm, Christian; Samardzija, Marijana; Reme, Charlotte E. (2005):** Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. In: *Prog Retin Eye Res* 24 (2), S. 275–306. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2004.08.002.

**Wright, Alan F.; Chakarova, Christina F.; Mai M. Abd El-Aziz; Bhattacharya, Shomi S. (2010):** Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait : Article : Nature Reviews Genetics. Nature Publishing Group. Online verfügbar unter <http://www.nature.com/nrg/journal/v11/n4/full/nrg2717.html>, zuletzt aktualisiert am 09.03.2010, zuletzt geprüft am 28.05.2014.

**Wright, Rachel N.; Hong, Dong-Hyun; Perkins, Brian (2011):** Misexpression of the constitutive Rprg(ex1-19) variant leads to severe photoreceptor degeneration. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52 (8), S. 5189–5201. DOI: 10.1167/iovs.11-7470.

**Yang, L.-p; Wu, L.-m; Guo, X.-j; Tso, M. O. M. (2007):** Activation of Endoplasmic Reticulum Stress in Degenerating Photoreceptors of the rd1 Mouse. In: *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48 (11), S. 5191–5198. DOI: 10.1167/iovs.07-0512.

**Yu, Seong-Woon; Wang, Hongmin; Poitras, Marc F.; Coombs, Carmen; Bowers, William J.; Federoff, Howard J. et al. (2002):** Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. In: *Science* 297 (5579), S. 259–263. DOI: 10.1126/science.1072221.

**Zacks, David N.; Boehlke, Christopher; Richards, Ayo-Lynn; Zheng, Qiong-Duan (2007):** Role of the Fas-signaling pathway in photoreceptor neuroprotection. In: *Arch Ophthalmol* 125 (10), S. 1389–1395. DOI: 10.1001/archophth.125.10.1389.

**Zacks, David N.; Hanninen, Virve; Pantcheva, Mina; Ezra, Eric; Grosskreutz, Cynthia; Miller, Joan W. (2003):** Caspase activation in an experimental model of retinal detachment. In: *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 (3), S. 1262–1267.

**Zhao, Yun; Hong, Dong-Hyun; Pawlyk, Basil; Yue, Guohua; Adamian, Michael; Grynberg, Marcin et al. (2003):** The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-interacting protein: subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (7), S. 3965–3970. DOI: 10.1073/pnas.0637349100.

**Zobor, D.; Zrenner, E. (2012):** Retinitis pigmentosa - a review. Pathogenesis, guidelines for diagnostics and perspectives. In: *Ophthalmologe* 109 (5), S. 501-14;quiz 515. DOI: 10.1007/s00347-012-2555-6.

## 10 Anhang

### 10.1 qPCR Ansätze

Standard Ansatz für 60µl		Standard PCR Programm	
ddH <sub>2</sub> O	24,2µl	94°C	5min
Puffer	12µl	Zyklen	40x
dNTP	9,6µl	53-65°C	30s
MgCl <sub>2</sub>	4,8µl	72°C	30s
Primer a	0,8µl	94°C	30s
Primer b	0,8µl	53-65°C	30s
Polymerase	0,6µl	72°C	5min
LCGreen	4,8µl		
cDNA	2,4µl		

Ansatz für <i>gapdh, aif bcl2l1, calpain 1, calpain2, dr 5, parp</i> 60µl		PCR Programm	
ddH <sub>2</sub> O	24,2µl	94°C	5min
Puffer	12µl	Zyklen	40x
dNTP	9,6µl	64,2°C	30s
MgCl <sub>2</sub>	4,8µl	72°C	30s
Primer a	0,8µl	94°C	30s
Primer b	0,8µl	64,2°C	30s
Polymerase	0,6µl	72°C	5min
LCGreen	4,8µl		
cDNA	2,4µl		

Anhang

<b>Ansatz für <i>bcl10</i></b>		<b>PCR Programm</b>	
<b>60µl</b>			
ddH <sub>2</sub> O	22,2µl	94°C	5min
Puffer	12µl	Zyklen	40x
dNTP	9,6µl	64,2°C	30s
MgCl <sub>2</sub>	5,6µl	72°C	30s
Primer a	1µl	94°C	30s
Primer b	1µl	64,2°C	30s
Polymerase	0,6µl	72°C	5min
LCGreen	4,8µl		
cDNA	3,2µl		

<b>Ansatz für <i>caspase 3</i></b>		<b>PCR Programm</b>	
<b>60µl</b>			
ddH <sub>2</sub> O	23,8µl	94°C	5min
Puffer	12µl	Zyklen	40x
dNTP	9,6µl	64,2°C	30s
MgCl <sub>2</sub>	4,8µl	72°C	30s
Primer a	1µl	94°C	30s
Primer b	1µl	64,2°C	30s
Polymerase	0,6µl	72°C	5min
LCGreen	4,8µl		
cDNA	2,4µl		

Anhang

<b>Ansatz für <i>caspase 12</i></b>		<b>PCR Programm</b>	
<b>60µl</b>			
ddH <sub>2</sub> O	23,8µl	94°C	5min
Puffer	12µl	Zyklen	40x
dNTP	9,6µl	64,2°C	30s
MgCl <sub>2</sub>	4,8µl	72°C	30s
Primer a	1µl	94°C	30s
Primer b	1µl	64,2°C	30s
Polymerase	0,6µl	72°C	5min
LCGreen	4,8µl		
cDNA	2,4µl		

<b>Ansatz für <i>c-fos</i></b>		<b>PCR Programm</b>	
<b>60µl</b>			
ddH <sub>2</sub> O	25,2µl	94°C	5min
Puffer	12µl	Zyklen	40x
dNTP	9,6µl	64,2°C	30s
MgCl <sub>2</sub>	4,8µl	72°C	30s
Primer a	0,3µl	94°C	30s
Primer b	0,3µl	64,2°C	30s
Polymerase	0,6µl	72°C	5min
LCGreen	4,8µl		
cDNA	2,4µl		

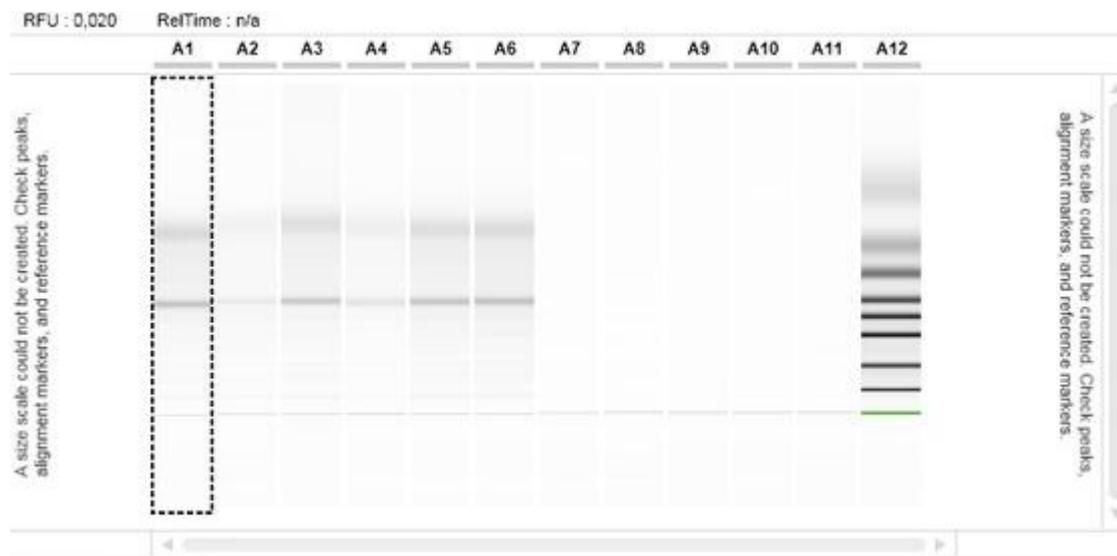
Anhang

<b>Ansatz für <i>c-jun</i></b>		<b>PCR Programm</b>	
<b>60µl</b>			
ddH <sub>2</sub> O	22,6µl	94°C	5min
Puffer	12µl	Zyklen	40x
dNTP	9,6µl	64,2°C	30s
MgCl <sub>2</sub>	6,4µl	72°C	30s
Primer a	0,8µl	94°C	30s
Primer b	0,8µl	64,2°C	30s
Polymerase	0,6µl	72°C	5min
LCGreen	4,8µl		
cDNA	2,4µl		

<b>Ansatz für <i>fas</i></b>		<b>PCR Programm</b>	
<b>60µl</b>			
ddH <sub>2</sub> O	21,8µl	94°C	5min
Puffer	12µl	Zyklen	40x
dNTP	9,6µl	64,2°C	30s
MgCl <sub>2</sub>	5,6µl	72°C	30s
Primer a	1,5µl	94°C	30s
Primer b	1,5µl	64,2°C	30s
Polymerase	0,6µl	72°C	5min
LCGreen	4,8µl		
cDNA	2,4µl		

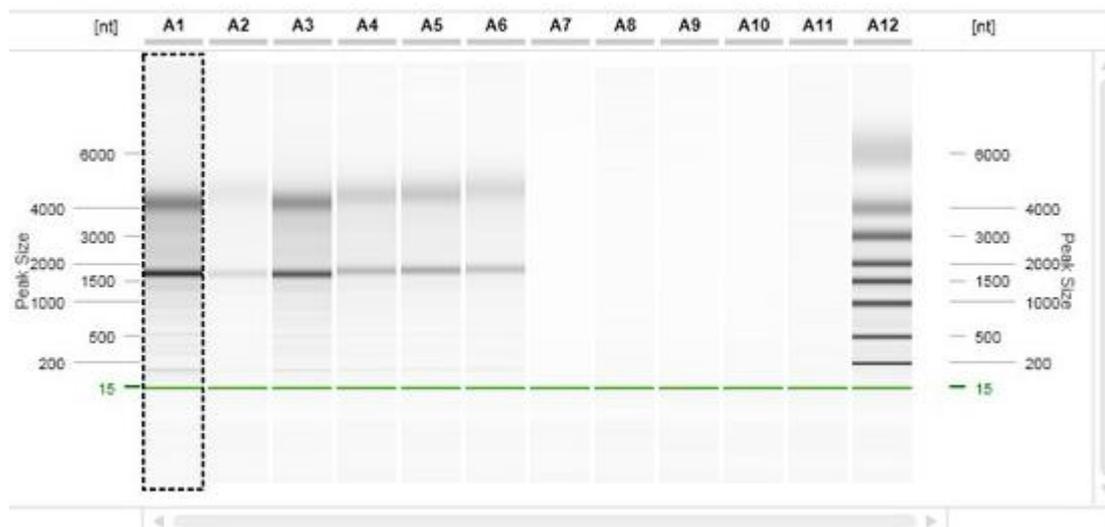
Ansatz für <i>trp63</i>		PCR Programm	
<b>60µl</b>			
ddH <sub>2</sub> O	23,4µl	94°C	5min
Puffer	12µl	Zyklen	40x
dNTP	9,6µl	64,2°C	30s
MgCl <sub>2</sub>	5,6µl	72°C	30s
Primer a	0,8µl	94°C	30s
Primer b	0,8µl	64,2°C	30s
Polymerase	0,6µl	72°C	5min
LCGreen	4,8µl		
cDNA	2,4 µl		

## 10.2 RNA Qualitätskontrolle

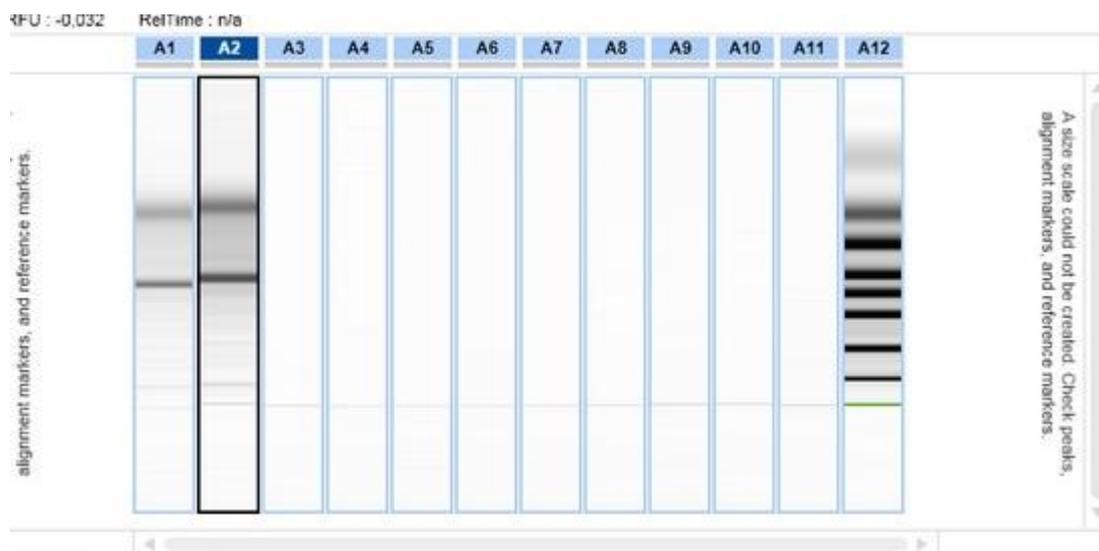


RNA von 9 Monaten heterozygot (A1), 9 Monate Wildtyp (A2), 6 Monate heterozygot (A3), 6 Monate Wildtyp (A4), 21 Monate Wildtyp (A5), 24 Monate Wildtyp (A6)

# Anhang

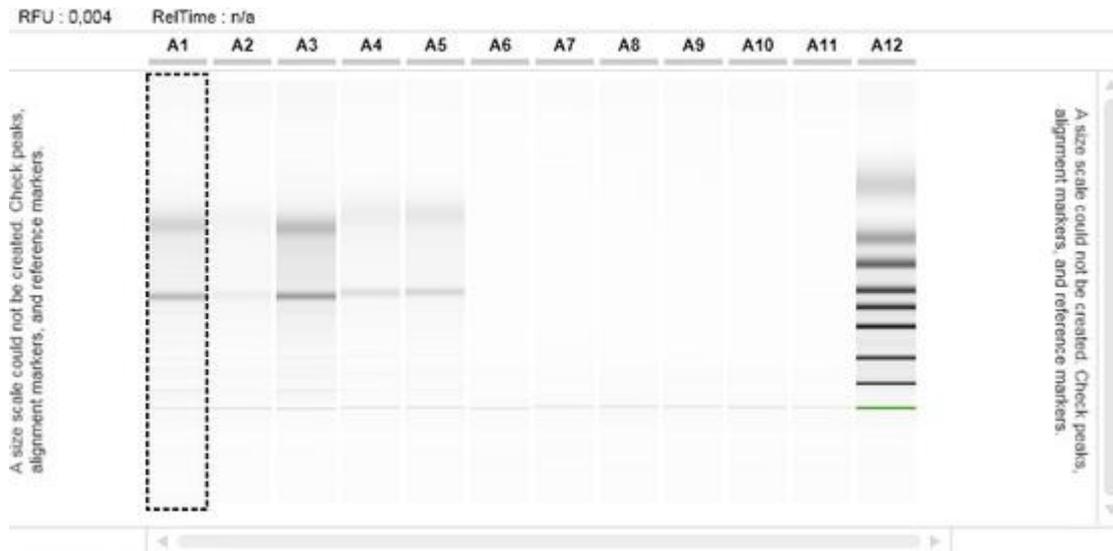


RNA von 3 Monaten heterozygot (A1), 12 Monate mutiert (A2), 15 Monate mutiert (A3), 18 Monate Wildtyp (A4), 21 Monate mutiert (A5), 21 Monate heterozygot (A6)



RNA von 18 Monaten hetero (A1), 18 Monate mutiert (A2)

## Anhang



RNA von 12 Monate heterozygot (A1), 6 Monate mutiert (A2), 15 Monate Wildtyp (A3), 15 Monate heterozygot (A4), 9 Monate mutiert (A5)

### 10.3 PCR-Array für Apoptose

Dieser PCR- Array wurde mit 3 Monate alten mutierten Mäusen durchgeführt. In der Spalte „Symbol“ befinden sich die getesteten Gene. Es wird jeweils der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Wert errechnet. Eine Herabregulation wird blau markiert, eine Hochregulation rot [Schlegel 2011].

Symbol	Well	AVG $\Delta C_t$ (Ct(GOI) - Ave Ct (HKG))		$2^{-\Delta C_t}$		Fold Change	T- TES T	Fold Up- or Down- Regulation	Comment s
		Test Sampl e	Contro l Sampl e	Test Sample	Control Sample	Test Sample /Contro l Sample	p valu e	Test Sample /Control Sample	
Akt1	A01	2,48	2,85	1,8E-01	1,4E-01	1,30	N/A	1,30	OKAY
Apaf1	A02	4,57	5,42	4,2E-02	2,3E-02	1,81	N/A	1,81	OKAY
Api5	A03	1,96	2,22	2,6E-01	2,1E-01	1,20	N/A	1,20	OKAY
Atf5	A04	3,74	4,34	7,5E-02	4,9E-02	1,52	N/A	1,52	OKAY
Bad	A05	4,05	4,71	6,0E-02	3,8E-02	1,58	N/A	1,58	OKAY
Bag1	A06	2,29	2,51	2,0E-01	1,8E-01	1,17	N/A	1,17	OKAY
Bag3	A07	6,48	7,81	1,1E-02	4,4E-03	2,52	N/A	2,52	OKAY
Bak1	A08	5,50	6,09	2,2E-02	1,5E-02	1,51	N/A	1,51	OKAY

## Anhang

Bax	A09	3,03	3,07	1,2E-01	1,2E-01	1,03	N/A	1,03	OKAY
Bcl10	A10	13,77	7,46	7,2E-05	5,7E-03	<b>0,01</b>	N/A	<b>-79,12</b>	OKAY
Bcl2	A11	5,72	5,80	1,9E-02	1,8E-02	1,06	N/A	1,06	OKAY
Bcl2l1	A12	17,84	6,10	4,3E-06	1,5E-02	<b>0,00</b>	N/A	<b>-3411,05</b>	OKAY
Bcl2l10	B01	7,42	8,64	5,8E-03	2,5E-03	2,34	N/A	2,34	OKAY
Bcl2l2	B02	3,15	3,52	1,1E-01	8,7E-02	1,30	N/A	1,30	OKAY
Bid	B03	5,74	6,25	1,9E-02	1,3E-02	1,43	N/A	1,43	OKAY
Naip1	B04	5,58	6,07	2,1E-02	1,5E-02	1,41	N/A	1,41	OKAY
Naip2	B05	6,31	7,09	1,3E-02	7,3E-03	1,72	N/A	1,72	OKAY
Birc2	B06	3,20	3,50	1,1E-01	8,8E-02	1,23	N/A	1,23	OKAY
Birc3	B07	5,39	6,03	2,4E-02	1,5E-02	1,56	N/A	1,56	OKAY
Xiap	B08	0,32	0,03	8,0E-01	9,8E-01	0,82	N/A	-1,22	OKAY
Birc5	B09	9,50	10,09	1,4E-03	9,1E-04	1,51	N/A	1,51	OKAY
Bnip2	B10	2,29	2,08	2,0E-01	2,4E-01	0,87	N/A	-1,15	OKAY
Bnip3	B11	1,33	1,05	4,0E-01	4,8E-01	0,83	N/A	-1,21	OKAY
Bnip3l	B12	4,64	1,85	4,0E-02	2,8E-01	<b>0,14</b>	N/A	<b>-6,90</b>	OKAY
Bok	C01	4,24	4,45	5,3E-02	4,6E-02	1,16	N/A	1,16	OKAY
Card10	C02	7,47	9,46	5,6E-03	1,4E-03	<b>3,98</b>	N/A	<b>3,98</b>	OKAY
Nod1	C03	6,48	7,90	1,1E-02	4,2E-03	2,68	N/A	2,68	OKAY
Card6	C04	6,58	8,25	1,0E-02	3,3E-03	<b>3,19</b>	N/A	<b>3,19</b>	OKAY
Casp1	C05	5,61	6,07	2,0E-02	1,5E-02	1,38	N/A	1,38	OKAY
Casp12	C06	6,48	7,36	1,1E-02	6,1E-03	1,85	N/A	1,85	OKAY
Casp14	C07	5,80	6,84	1,8E-02	8,7E-03	2,06	N/A	2,06	OKAY
Casp2	C08	5,31	5,83	2,5E-02	1,8E-02	1,44	N/A	1,44	OKAY
Casp3	C09	4,27	4,93	5,2E-02	3,3E-02	1,58	N/A	1,58	OKAY
Casp4	C10	6,04	6,62	1,5E-02	1,0E-02	1,50	N/A	1,50	OKAY
Casp6	C11	5,22	6,01	2,7E-02	1,5E-02	1,73	N/A	1,73	OKAY
Casp7	C12	4,55	4,60	4,3E-02	4,1E-02	1,04	N/A	1,04	OKAY
Casp8	D01	5,72	7,18	1,9E-02	6,9E-03	2,76	N/A	2,76	OKAY
Casp9	D02	3,90	4,38	6,7E-02	4,8E-02	1,40	N/A	1,40	OKAY
Cflar	D03	3,64	4,19	8,0E-02	5,5E-02	1,47	N/A	1,47	OKAY
Cidea	D04	6,89	8,05	8,4E-03	3,8E-03	2,24	N/A	2,24	OKAY
Cideb	D05	5,51	6,43	2,2E-02	1,2E-02	1,90	N/A	1,90	OKAY
Cradd	D06	4,29	4,59	5,1E-02	4,1E-02	1,23	N/A	1,23	OKAY
Dad1	D07	7,23	7,61	6,7E-03	5,1E-03	1,30	N/A	1,30	OKAY
Dapk1	D08	9,98	11,30	9,9E-04	4,0E-04	2,50	N/A	2,50	OKAY
Dffa	D09	4,54	4,59	4,3E-02	4,1E-02	1,04	N/A	1,04	OKAY
Dffb	D10	5,54	6,27	2,1E-02	1,3E-02	1,66	N/A	1,66	OKAY
Tsc22d3	D11	3,61	3,23	8,2E-02	1,1E-01	0,77	N/A	-1,30	OKAY
Fadd	D12	6,48	7,93	1,1E-02	4,1E-03	2,74	N/A	2,74	OKAY
Fas	E01	7,63	9,24	5,0E-03	1,6E-03	<b>3,06</b>	N/A	<b>3,06</b>	OKAY
Fasl	E02	7,19	8,83	6,8E-03	2,2E-03	<b>3,13</b>	N/A	<b>3,13</b>	OKAY
Hells	E03	4,93	5,64	3,3E-02	2,0E-02	1,64	N/A	1,64	OKAY

## Anhang

Il10	E04	5,43	6,13	2,3E-02	1,4E-02	1,63	N/A	1,63	OKAY
Lhx4	E05	4,11	5,19	5,8E-02	2,7E-02	2,12	N/A	2,12	OKAY
Ltbr	E06	7,30	8,14	6,3E-03	3,5E-03	1,80	N/A	1,80	OKAY
Mcl1	E07	3,16	4,00	1,1E-01	6,2E-02	1,80	N/A	1,80	OKAY
Nfkb1	E08	4,88	5,28	3,4E-02	2,6E-02	1,32	N/A	1,32	OKAY
Nme5	E09	4,50	4,87	4,4E-02	3,4E-02	1,30	N/A	1,30	OKAY
Nol3	E10	4,37	5,58	4,8E-02	2,1E-02	2,32	N/A	2,32	OKAY
Pak7	E11	3,31	3,38	1,0E-01	9,6E-02	1,05	N/A	1,05	OKAY
Pim2	E12	3,25	3,57	1,1E-01	8,4E-02	1,25	N/A	1,25	OKAY
Polb	F01	2,16	1,74	2,2E-01	3,0E-01	0,75	N/A	-1,33	OKAY
Prdx2	F02	0,69	0,75	6,2E-01	5,9E-01	1,05	N/A	1,05	OKAY
Pycard	F03	5,64	6,59	2,0E-02	1,0E-02	1,94	N/A	1,94	OKAY
Ripk1	F04	5,38	5,66	2,4E-02	2,0E-02	1,22	N/A	1,22	OKAY
Rnf7	F05	1,97	1,71	2,6E-01	3,0E-01	0,84	N/A	-1,19	OKAY
Sphk2	F06	3,31	3,36	1,0E-01	9,7E-02	1,04	N/A	1,04	OKAY
Tnf	F07	7,12	7,74	7,2E-03	4,7E-03	1,54	N/A	1,54	OKAY
Tnfrsf10b	F08	7,44	9,12	5,8E-03	1,8E-03	<b>3,21</b>	N/A	<b>3,21</b>	OKAY
Tnfrsf11b	F09	6,00	7,11	1,6E-02	7,2E-03	2,16	N/A	2,16	OKAY
Tnfrsf1a	F10	6,90	8,03	8,4E-03	3,8E-03	2,19	N/A	2,19	OKAY
Cd40	F11	7,38	7,92	6,0E-03	4,1E-03	1,46	N/A	1,46	OKAY
Tnfsf10	F12	5,51	6,96	2,2E-02	8,0E-03	2,74	N/A	2,74	OKAY
Tnfsf12	G01	1,61	1,83	3,3E-01	2,8E-01	1,17	N/A	1,17	OKAY
Cd40lg	G02	6,98	7,92	7,9E-03	4,1E-03	1,92	N/A	1,92	OKAY
Cd70	G03	6,24	6,75	1,3E-02	9,3E-03	1,43	N/A	1,43	OKAY
Traf1	G04	5,55	6,02	2,1E-02	1,5E-02	1,39	N/A	1,39	OKAY
Traf2	G05	5,18	5,74	2,8E-02	1,9E-02	1,48	N/A	1,48	OKAY
Traf3	G06	4,60	4,61	4,1E-02	4,1E-02	1,01	N/A	1,01	OKAY
Trp53	G07	3,46	3,00	9,1E-02	1,2E-01	0,73	N/A	-1,37	OKAY
Trp53bp2	G08	3,77	3,83	7,3E-02	7,0E-02	1,05	N/A	1,05	OKAY
Trp53inp1	G09	3,91	4,28	6,7E-02	5,1E-02	1,30	N/A	1,30	OKAY
Trp63	G10	6,43	7,86	1,2E-02	4,3E-03	2,70	N/A	2,70	OKAY
Trp73	G11	6,63	8,38	1,0E-02	3,0E-03	<b>3,37</b>	N/A	<b>3,37</b>	OKAY
Zc3hc1	G12	4,29	5,07	5,1E-02	3,0E-02	1,72	N/A	1,72	OKAY
Gusb	H01	4,46	4,86	4,5E-02	3,4E-02	1,32	N/A	1,32	OKAY
Hprt1	H02	-0,25	-0,59	1,2E+0 0	1,5E+0 0	0,79	N/A	-1,26	OKAY
Hsp90ab1	H03	-0,35	-0,57	1,3E+0 0	1,5E+0 0	0,86	N/A	-1,16	OKAY
Gapdh	H04	-3,19	-3,39	9,1E+0 0	1,0E+0 1	0,87	N/A	-1,15	OKAY
Actb	H05	-0,67	-0,33	1,6E+0 0	1,3E+0 0	1,27	N/A	1,27	OKAY

## 11 Publikationsverzeichnis

### Poster:

#### **Quantification of outer retinal changes in a mouse model for XLRP and correlation to functional data and neuronal cell death status**

Knut Stieger, Anne Kronfeldner, Baerbel Fühler, Bettina Gill, Brigitte Müller, Birgit Lorenz; Proceeding of the annual meeting of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Denver, US, 2015, #4635

## **12 Erklärung zur Dissertation**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum Unterschrift

## **13 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger für die Bereitstellung des Themas, die sehr gute und stets zielgerichtete Betreuung und die schnelle Durchsicht meiner Arbeit bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Birgit Lorenz bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die wissenschaftliche Unterstützung während der gesamten Zeit.

Ein besonderer Dank gilt auch Frau Dr. Jutta Schlegel, Frau Dr. Dorothee Röhl und Frau Dr. Janina Steck die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Labors für molekulare Ophthalmologie der Augenklinik für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit bedanken. Ein besonderer Dank gilt hier Frau Annabella Janise und Herrn Tobias Wimmer für die stete Hilfsbereitschaft und Frau Dr. Brigitte Müller und Frau Bettina Gill für die Unterstützung in der Immunhistochemie.

Die vorliegende Arbeit widme ich meinen Eltern in Dankbarkeit.