

Untersuchung der äußeren Mausretina:
Expression von Pannexin1 und Mechanismen genetisch
bedingter Photorezeptordegeneration

Von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften
der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
zur Erlangung des Grades und Titels einer
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
angenommene Dissertation

von Katharina Kranz
geboren am 12.04.1980
in Verden (Aller), Deutschland

Gutachter: Prof. Dr. Reto Weiler

Zweitgutachter: Prof. Dr. Karl-Wilhelm Koch

Tag der Disputation: 24.06.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	6
Anglizismen.....	7
Abbildungsverzeichnis.....	7
Tabellenverzeichnis.....	10
1. Einleitung.....	11
1.1 Die Retina der Säugetiere.....	11
1.2 Zellen der äußeren Mausretina.....	14
1.2.1 Primärneurone der Retina: Photorezeptoren.....	14
1.2.2 Sekundärneurone der Retina: Bipolarzellen.....	17
1.2.3 Sekundärneurone der Retina: Horizontalzellen.....	20
1.3 Zelluläre Interaktionen in der äußeren Retina.....	21
1.3.1 Zelluläre Interaktionen: <i>Gap Junctions</i> und Einzelmembrankanäle.....	21
1.3.2 Elektrische Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen.....	24
1.3.3 Beteiligung von Einzelmembrankanälen am Horizontalzell- feedback-Ephaptischer Mechanismus.....	25
1.4 Pannexine.....	27
1.4.1 Struktur und Funktion von Pannexinen.....	28
1.4.2 Pannexin-Expression in der Retina.....	29
1.5 Retinitis Pigmentosa.....	30
1.5.1 Mechanismen des primären Stäbchenzelltods.....	32
1.5.1.1 Apoptotische Zelltodmechanismen.....	32
1.5.1.2 Alternative Zelltodmechanismen.....	33
1.5.2 Gründe für den sekundären Zapfentod.....	34
1.5.3 Die Bystander-Hypothese.....	35
1.5.4 Mausmodelle für Retinitis Pigmentosa.....	36
1.5.4.1 Rhodopsin-knockout-Maus.....	37
1.5.4.2... <i>Retinal degeneration1</i> -Maus.....	38
1.6 Zielsetzung.....	39
1.6.1 Lokalisation und Funktion von Pannexin1 in der Mausretina.....	40
1.6.2 Mechanismen genetisch bedingter Photorezeptordegeneration.....	40
1.6.2.1 Untersuchungen der primären Stäbchendegeneration in der Rhodopsin-knockout-Maus.....	41
1.6.2.2 Einfluss der Stäbchen-Zapfen Kopplung auf die sekundäre Zapfendegeneration in Mausmodellen für Retinitis Pigmentosa.....	42

2. Material und Methoden	44
2.1 Material.....	44
2.1.1 Geräte, Hilfsmittel, Chemikalien, Reagenzien.....	44
2.1.2 Puffer, Lösungen und Medien.....	44
2.1.3 Versuchstiere.....	47
2.1.4 Generierung der Rho ^{-/-} Cx36- und der Rd1Cx36-Mauslinie.....	47
2.2 Gewebepräparationen.....	48
2.2.1 Augenbecherpräparation und Herstellung von vertikalen Kryoschnitten.....	48
2.2.2 Herstellung von Flachpräparaten (Isolierung der Retina.....	49
2.2.3 Herstellung von isolierten Retinazellen (Gewebedissoziation).....	49
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	49
2.3.1 Genotypisierung der Versuchstiere.....	49
2.3.2 Isolierung von mRNA.....	51
2.3.3 Konzentrationsbestimmungen von RNA und cDNA.....	52
2.3.4 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR).....	52
2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	53
2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	54
2.3.7 Aufreinigung von DNA.....	54
2.3.8 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen.....	55
2.4 Histologische Methoden.....	55
2.4.1 Immunofluoreszenzmarkierungen.....	55
2.4.1.1 Immunofluoreszenzmarkierungen an Gewebeschnitten und isolierten Retinazellen.....	55
2.4.1.2 Immunofluoreszenzmarkierungen an retinalen Flachpräparaten.....	57
2.4.2 Intrazelluläre Farbstoffinjektionen.....	57
2.4.3 β -Galaktosidase-Färbung.....	59
2.4.4 Di-Aminobenzidin (DAB)-Färbung.....	59
2.4.5 Immunoelektronenmikroskopie.....	59
2.4.6 Terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated-dUTP-nick-end-labeling (TUNEL-Assay).....	60
2.5 Enzymatische- <i>in situ</i> -Aktivitätsassays.....	61
2.5.1 Calpain- <i>in situ</i> -Aktivitätsassay.....	61
2.5.2 HDAC- <i>in situ</i> -Aktivitätsassay.....	61
2.5.3 PARP- <i>in situ</i> -Aktivitätsassay.....	61
2.6 Biochemische Methoden.....	62
2.6.1 Subzelluläre Fraktionierung.....	62
2.6.2 Proteinbestimmung (nach Bradford, 1976).....	62

2.6.3	Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; nach Laemmli, 1970).....	63
2.6.4	Western Blotting (nach Towbin, 1979).....	63
2.6.5	Immunonachweis mittels ECL-Technik.....	64
2.7	Mikroskopie, Bildbearbeitung, Quantifizierung, Statistik.....	64
2.7.1	Bildbearbeitung und Bildauswertung.....	64
2.7.2	Zellzählung, Quantifizierung und statistische Auswertung.....	65
2.8	Elektrophysiologische Methoden.....	66
2.8.1	<i>In vivo</i> -Elektroretinographie.....	66
2.8.2	<i>In vitro</i> -Elektroretinographie.....	67
3.	Expression von Pannexin1 in äußeren Mausretina.....	68
3.1	Ergebnisse.....	68
3.1.1	Analyse der Pannexin-knockout-Maus.....	68
3.1.2	Spezifität der verwendeten Pannexin1-Antikörper und Verteilung von Pannexin1 in der Mausretina.....	70
3.1.3	Pannexin1 wird selektiv von einem Bipolarzelltyp exprimiert.....	73
3.1.4	Expression von Pannexin1 in Horizontalzellen.....	80
3.1.5	Funktionelle Untersuchungen von Pannexin1-knockout-Mäuse.....	83
3.2	Diskussion.....	89
3.2.1	Überprüfung der Pannexin1-knockout-Maus.....	89
3.2.2	Spezifität der verwendeten Pannexin1-Antikörper.....	90
3.2.3	Verteilung von Pannexin1 in der Mausretina.....	92
3.2.4	Einfluss der Pannexin1-Defizienz auf die retinale Aktivität.....	94
3.2.5	Beteiligung von Panx1-Einzelmembrankanälen am ephaptischen Feedback-Mechanismus.....	95
3.2.6	Pannexin1 und P2X ₇ -Rezeptoren in der Mausretina.....	97
3.2.7	Fazit und Ausblick.....	98
4.	Mechanismen genetisch bedingter Photorezeptordegeneration.....	100
4.1	Ergebnisse.....	100
4.1.1	Zeitlicher Verlauf der Photorezeptordegeneration in der Rhodopsin-knockout-Maus.....	100
4.1.2	Mechanismen der primären Stäbchendegeneration in der Rhodopsin-knockout-Maus.....	102
4.1.2.1	Ermittlung der Hauptphase des Stäbchensterbens.....	103
4.1.2.2	Untersuchung apoptotischer Zelltodmarker.....	104
4.1.2.3	Untersuchung alternativer Zelltodmarker.....	107
4.1.2.4	Aktivität von Histon-Deacetylasen und Veränderungen im zyklischen Guanosinmonophosphat-Metabolismus.....	110

4.1.3	Einfluss des Bystander-Effekts auf die sekundäre Zapfendegeneration in zwei Mausmodellen für Retinitis Pigmentosa.....	113
4.1.3.1	Erzeugung von Connexin36-defizienten Retinitis Pigmentosa-Mausmodellen.....	113
4.1.3.2	Rhodopsin-knockout- und Rd1-Mäuse besitzen ein normales Connexin36-Verteilungsmuster in der Retina.....	114
4.1.3.3	Einfluss der Connexin36-Defizienz auf den zeitlichen Ablauf der Photorezeptordegeneration.....	116
4.1.3.4	Einfluss der Connexin36-Defizienz auf die Reorganisation der Sekundärneurone.....	119
4.1.3.5	Verlust der Zapfen-Außensegmente zu Beginn der sekundären Zapfendegeneration.....	124
4.1.3.6	Sekundärer Zelltod und Verlust der Zapfen in späten Krankheitsstadien.....	127
4.2	Diskussion.....	131
4.2.1	Mechanismen der primären Stäbchendegeneration in der Rhodopsin-knockout-Maus.....	131
4.2.1.1	Methodische Überlegungen.....	131
4.2.1.2	Bestimmung des optimalen Alters zur Untersuchung aktiver Prozesse beim Stäbchen-Zelltod.....	132
4.2.1.3	Beteiligung apoptotischer Signalwege am primären Stäbchensterben.....	133
4.2.1.4	Beteiligung alternativer Zelltodprozesse am primären Stäbchensterben.....	136
4.2.2	Stäbchensterben in zwei unterschiedlichen Mausmodellen für Retinitis Pigmentosa.....	137
4.2.2.1	In Rhodopsin-knockout- und Rd1-Tieren wird das Stäbchensterben durch unterschiedliche Faktoren induziert.....	137
4.2.2.2	Gemeinsame Stäbchenzelltodmechanismen in der Rhodopsin-knockout- und der Rd1-Maus.....	138
4.2.3	Aktivität von Caspase-3 und detektierte Veränderungen im cGMP-Metabolismus.....	141
4.2.4	Fazit zu den Mechanismen der primären Stäbchendegeneration.....	141
4.2.5	Einfluss der Stäbchen-Zapfen-Kopplung auf die sekundäre Zapfendegeneration in Mausmodellen für Retinitis Pigmentosa.....	142
4.2.5.1	Gründe für die Beteiligung von <i>Gap Junctions</i> am sekundären Zapfensterben.....	143
4.2.5.2	Gibt es einen Einfluss des Bystander-Effekts auf die sekundäre Zapfendegeneration.....	144
4.2.5.3	Der durch <i>Gap Junctions</i> -vermittelte Bystander-Effekt ist nicht in die sekundäre Zapfendegeneration involviert.....	147

4.2.6	Vermittelt die Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen einen positiven Bystander-Effekt.....	149
4.2.7	Wodurch wird das sekundären Zapfensterben induziert?.....	150
4.2.8	Klinische Relevanz der Ergebnisse.....	151
5.	Zusammenfassung.....	153
6.	Summary.....	156
7.	Literaturverzeichnis.....	159
8.	Anhang.....	172
8.1	Pannexin1-Proteinsequenz.....	172
8.2	Geräte, Hilfsmittel, Chemikalien, Reagenzien.....	172
8.3	Kollaborationen.....	176
8.4	Erklärung.....	177
8.5	Danksagung.....	178
8.6	Lebenslauf.....	179
8.7	Publikationen.....	180

Abkürzungen

-/-	Gendefekt, Knockout	OPL	äußere plexiforme Schicht
Abb.	Abbildung	p	postnatal Tag
AIF	Apoptose-induzierender Faktor	P	Probe
AK	Antikörper	Panx	Pannexin
Apaf	<i>apoptotic protease activating factor</i> [engl.]	PAR	Poly-ADP-Ribose
		PARP	Poly-ADP-Ribose-Phosphorylase
AS	Außensegment	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ATP	Adenosintriphosphat	Pde	Phosphodiesterase
Bp	Basenpaare	PK	Proteinkinase
Ca ²⁺	Calcium	pw	postnatal Woche
Ca _v	spannungsabhängiger Calciumkanal	Rd1	<i>retinal degeneration1</i>
		RdCVF	<i>rod-derived cone viability factor</i> [engl.]
Casp	Caspase	Rho	Rhodopsin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat	ROI	<i>region of interest</i> [engl.]
		ROS	reaktive Sauerstoffradikale
Csen	Calsenilin	RP	Retinitis Pigmentosa
Cx	Connexin	RPE	retinales Pigmentepithel
CytC	CytochromeC	Rt	Raumtemperatur
DAB	Di-Aminobenzidin	RT	Reverse Transkriptase
ER	Endoplasmatisches Retikulum	S	lösliche Fraktion
ERG	Elektroretinogramm	SDS	Sodium-Dodecylsulfat
GABA	γ -Aminobuttersäure	Strata	Stratifizierungsebene
GCL	Ganglienzellschicht	Tab	Tabelle
GJ	<i>Gap Junctions</i> [engl.]	TH	Totalhomogenat
Glypho	Glykogenphosphorylase	TUNEL	Terminal-deoxynucleotidyl- Transferase-dUTP-nick-end-labeling
HDAC	Histon-Deacetylasen		
HP2	Homogenisierungspuffer2	ü.N.	über Nacht
INL	innere Kernschicht	Wt	Wildtyp
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat	ZAS	Zapfen-Außensegmente
IPL	innere plexiforme Schicht	ZBx	Zapfen-Bipolarzelltyp x
IR	Immunoreaktivität		
K ⁺	Kalium		
Lsg	Lösung		
M	Membranfraktion		
min	Minute		
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i> [engl.]		
Na ⁺	Natrium		
ONL	äußere Kernschicht		

Anglizismen

<i>Assay</i>	Standardisierter Reaktionsablauf zum Nachweis einer Substanz
<i>downstream</i>	auf einem Genabschnitt „hinter“ dem Promotor gelegen
<i>Cone Arrestin</i>	Zapfen-spezifisches Arrestin
<i>current sink</i>	Stromabfall
<i>Feedforward</i>	Signale von den Horizontalzellen auf die Bipolarzellen
<i>Forward-Primer</i>	Vorwärts-gerichteter Primer
<i>Gap Junctions</i>	elektrische Synapsen
<i>Implicit Time</i>	Zeitspanne zwischen Stimulus und Antwortamplitude
<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>	Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran
<i>Pathway</i>	Signalbahn/Signalweg
<i>Pedicle</i>	Zapfen-Endfuß
<i>region of interest</i>	Bereich von Interesse, <i>hier</i> : definierter Retinabereich
<i>Retinal degeneration1</i>	Mausmodell für RP
<i>Reverse-Primer</i>	Rückwärts-gerichteter Primer
<i>Ribbon</i>	synaptisches Band
<i>Scaffold-Protein</i>	Gerüstprotein
<i>rod-derived cone viability factor</i>	Faktor, der von den Stäbchen freigesetzt wird und vermutlich für die Überlebensfähigkeit der Zapfen notwendig ist
<i>Spherule</i>	Stäbchen-Endfuß
<i>Template</i>	Matrizen-DNA in einem PCR-Ansatz

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1. Aufbau der Säugetierretina.....	12
Abbildung 1-2. Photorezeptoren.....	15
Abbildung 1-3. Schematische Darstellung der Bipolarzelltypen in der Mausretina.....	19
Abbildung 1-4. Struktur und Aufbau von elektrischen Synapsen.....	22
Abbildung 1-5. Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen in der Mausretina.....	25
Abbildung 1-6. Negatives Feedback der Horizontalzellen auf die Photorezeptoren: Schematische Darstellung der zellulären Komponenten des ephatischen Mechanismus.....	26
Abbildung 1-7. Pannexin1 - Genstruktur, Membrantopologie und Kanaleigenschaften.....	28

Abbildung 1-8. Beispiel für die zunehmende Sehbehinderung bei RP-Erkrankungen.....	31
Abbildung 1-9. Apoptotische Zelltodmechanismen.....	33
Abbildung 1-10. Ursachen des sekundären Zapfensterbens.....	35
Abbildung 1-11. Die Bystander-Hypothese.....	36
Abbildung 1-12. Zeitlicher Verlauf der unterschiedlichen Phasen des Stäbchen- und Zapfensterbens im Vergleich zwischen Rhodopsin-knockout- und Rd1-Maus.....	38
Abbildung 2-1. Ablauf der subzellulären Fraktionierung von Retinalysaten.....	62
Abbildung 3-1. Verteilung der Panx1-exprimierenden Zellen in vertikalen Schnitten der Mausretina-Expressionsnachweis mittels β -Galaktosidase-Färbung.....	68
Abbildung 3-2. Überprüfung der Pannexin1-knockout-Maus.....	70
Abbildung 3-3. Spezifität der Pannexin1-Antikörper in der Mausretina.....	72
Abbildung 3-4. Pannexin1-Expression in OFF-Bipolarzellen.....	74
Abbildung 3-5. Pannexin1 wird nicht in ON-Bipolarzellen exprimiert.....	76
Abbildung 3-6. Pannexin1 wird in OFF-Bipolarzellen exprimiert.....	78
Abbildung 3-7. Elektronenmikroskopische Analyse der Pannexin1-Lokalisation in Bipolarzellendendriten.....	79
Abbildung 3-8. Pannexin1 mRNA-Expression in Horizontalzellen.....	80
Abbildung 3-9. Pannexin1-Expression in Horizontalzellen.....	81
Abbildung 3-10. Ultrastrukturelle Lokalisation von Pannexin1 in den terminalen Strukturen der Horizontalzellen.....	83
Abbildung 3-11. Einfluss der Pannexin1-Defizienz auf die Antworteigenschaften des <i>in vivo</i> -ERGs.....	85
Abbildung 3-12. Effekt der Pannexin1-Defizienz auf <i>in vitro</i> -ERG-Ableitungen der inneren Retina.....	87
Abbildung 4-1. Verlauf der Photorezeptordegeneration in der Rhodopsin-knockout-Maus.....	101
Abbildung 4-2. Kinetik des Photorezeptorzelltods in der Rhodopsin-knockout-Maus.....	104
Abbildung 4-3. Untersuchung der Rhodopsin-knockout-Retina auf die Expression von Bax und auf die Freisetzung von CytochromeC (CytC) aus den Mitochondrien.....	105
Abbildung 4-4. Beteiligung von Caspasen am primären Stäbchensterben.....	107

Abbildung 4-5. Nachweis der Aktivität von Calpain und PARP während des primären Stäbchensterbens in der Rhodopsin-knockout-Maus.....	109
Abbildung 4-6. Nachweis von Histon-Deacetylasen (HDAC)- Hyperaktivität und Akkumulation von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) in der ONL.....	110
Abbildung 4-7. Enzyme und Ereignisse, die im Zusammenhang mit der Photorezeptor-degeneration in der Rhodopsin-knockout-Maus detektiert wurden-Darstellung in Relation zu der Anzahl absterbender Stäbchen (TUNEL-positive Zellen).....	112
Abbildung 4-8. Generierung und Genotypisierung der Versuchstiere.....	114
Abbildung 4-9. Verteilung von Connexin36 in Retinitis Pigmentosa-Mausmodellen.....	115
Abbildung 4-10. Temporärer Verlauf der Photorezeptordegeneration in Rhodopsin-knockout- und Rd1- Mausmutanten.....	117
Abbildung 4-11. Die Reorganisation der Horizontalzellen zeigte keine, durch die Connexin36-Defizienz hervorgerufenen, Veränderungen.....	120
Abbildung 4-12. Die Deletion von Connexin36 führte zu keinen Veränderungen in der Reorganisation der ON-Bipolarzellen.....	122
Abbildung 4-13. Der Verlust der Stäbchen-Zapfen- <i>Gap Junctions</i> hatte keine Auswirkung auf die Reorganisation der ZB3b.....	123
Abbildung 4-14. Der Verlust der Zapfen-Außensegmente wurde nicht durch die Deletion von Connexin36 beeinflusst.....	126
Abbildung 4-15. Verlust der Zapfen in Rd1Cx36 ^{+/-} und Rd1Cx36 ^{-/-} -Mäusen verschiedener Altersstufen.....	127
Abbildung 4-16. Auswirkung der Connexin36-Defizienz auf den Verlust der Zapfen in Rd1Cx36 ^{+/-} und Rd1Cx36 ^{-/-} -Mäusen.....	128
Abbildung 4-17. Zeitreihe des Zapfensterbens in Rd1Cx36 ^{+/-} und Rd1Cx36 ^{-/-} -Mäusen.....	130
Abbildung 4-18. Darstellung Caspase-abhängiger und Caspase-unabhängiger apoptotischer Signalwege, deren Beteiligung am Stäbchensterben ausgeschlossen werden kann.....	134
Abbildung 4-19. Putativer Zelltodmechanismus, der gleichermaßen am Absterben der Stäbchen in Rhodopsin-knockout- und in Rd1-Mäusen beteiligt ist.....	140

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1. Verwendete transgene Mauslinien und natürlich entstandene Mausmutanten(*).....	47
Tabelle 2-2. Primer die zur Bestimmung des Panx1-, Cx36-, Rho- und Rd1-Genotyps verwendet wurden.....	50
Tabelle 2-3. Zusammenstellung der verwendeten Primer zur Amplifikation von cDNA.....	53
Tabelle 2-4. Standard-PCR-Protokoll zur Amplifikation von cDNA.....	54
Tabelle 2-5. Verwendete Primärantikörper und ihre Verdünnungen bei Anwendung auf retinalen Flachpräparaten, Kryoschnitten, retinalen Vibratomschnitten und dissoziierten Retinazellen.....	56
Tabelle 2-6. Verwendete Sekundärantikörper und ihre Verdünnungen bei Anwendung auf retinalen Flachpräparaten (F), Kryo-/Vibratomschnitten (KV), dissoziierten Retinazellen (D) und bei elektronenmikroskopischen (EM) und biochemischen Versuchen (B), sowie DAB-Färbung (DAB).....	58
Tabelle 8-1. Geräte und Hilfsmittel, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	172
Tabelle 8-2. Chemikalien und Reagenzien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.....	173

1. Einleitung

Das Sehen ist eine der fünf primären Sinneswahrnehmungen höherer Vertebraten. Es ermöglicht die Aufnahme, Verarbeitung und Interpretation der visuellen Umwelteinflüsse. Das visuelle System besteht aus zwei neuronalen Hauptkomponenten: Die Aufnahme der visuellen Information, die primären Verarbeitungsprozesse und die Aufteilungen der Lichtreize in verschiedene Signalbahnen erfolgen in der Netzhaut (Retina), dem primären Sinnesgewebe. Die finale Prozessierung, die Interpretation und der Abgleich mit bekannten Informationen laufen in den höheren visuellen Zentren des Gehirns ab.

1.1 Die Retina der Säugetiere

Die Retina ist die erste Komponente der visuellen Signalverarbeitung. Das im Durchschnitt ca. 200 µm dicke Gewebe bedeckt den Hintergrund des Augapfels (lat. *Bulbus oculi*). Die Retina entwickelt sich während der Embryogenese als Ausstülpung des Vorderhirns und ist damit Bestandteil des zentralen Nervensystems (Kolb *et al.*, 1995a).

In der menschlichen Retina bilden ungefähr 120 Millionen Nervenzellen ein komplexes Netzwerk, das die Aufnahme visueller Reize, eine umfangreiche, primäre Verarbeitung der Signale und die Weiterleitung in höhere Regionen des Gehirns gewährleistet (Masland, 2001; 2012a). Die ca. 50 neuronalen Subtypen der Retinazellen lassen sich in fünf Hauptklassen untergliedern, die in einer mehrschichtigen Struktur angeordnet sind (Abb. 1-1): Die Somata der retinalen Zellen befinden sich in drei **nukleären Schichten**. Diese werden jeweils durch zwei **plexiforme Schichten** getrennt, in denen die synaptischen Fortsätze der Neurone lokalisiert sind (Wässle, 2004). **Die nukleären Schichten** werden als äußere und innere Kernschicht und Ganglienzellschicht bezeichnet. Die äußere Kernschicht (ONL, *outer nuclear layer* [engl.]) beinhaltet die Somata der lichtabsorbierenden Photorezeptoren. In der inneren Kernschicht (INL, *inner nuclear layer* [engl.]) sind die Nuklei der Bipolarzellen und der inhibitorisch wirkenden Horizontal- (distale INL) und Amakrinzellen (proximale INL) angesiedelt. Die Ganglienzellschicht (GCL, *ganglion cell layer* [engl.]) besteht aus den Kernen der Ganglienzellen, den

Ausgangsneuronen der Retina, sowie den Kernen displatzierter Amakrinzellen. **In den plexiformen** oder „synaptischen“ Schichten bilden die Dendriten und Axone der retinalen Neurone verzweigte Netzwerke aus chemischen und elektrischen Synapsen. In diesen Bereichen erfolgen die vertikale Weiterleitung und die laterale Modulation des visuellen Signals. In der äußeren plexiformen Schicht (OPL, *outer plexiform layer* [engl.]) kontaktieren die Synapsen der Photorezeptoren (PR), die Fortsätze von Horizontalzellen und die Dendriten verschiedener Bipolarzelltypen. In der inneren plexiformen Schicht (IPL, *inner plexiform layer* [engl.]) befinden sich synaptische Kontakte zwischen axonalen Endigungen der Bipolarzellen, den Fortsätzen von Amakrinzellen und den Dendriten der Ganglienzellen.

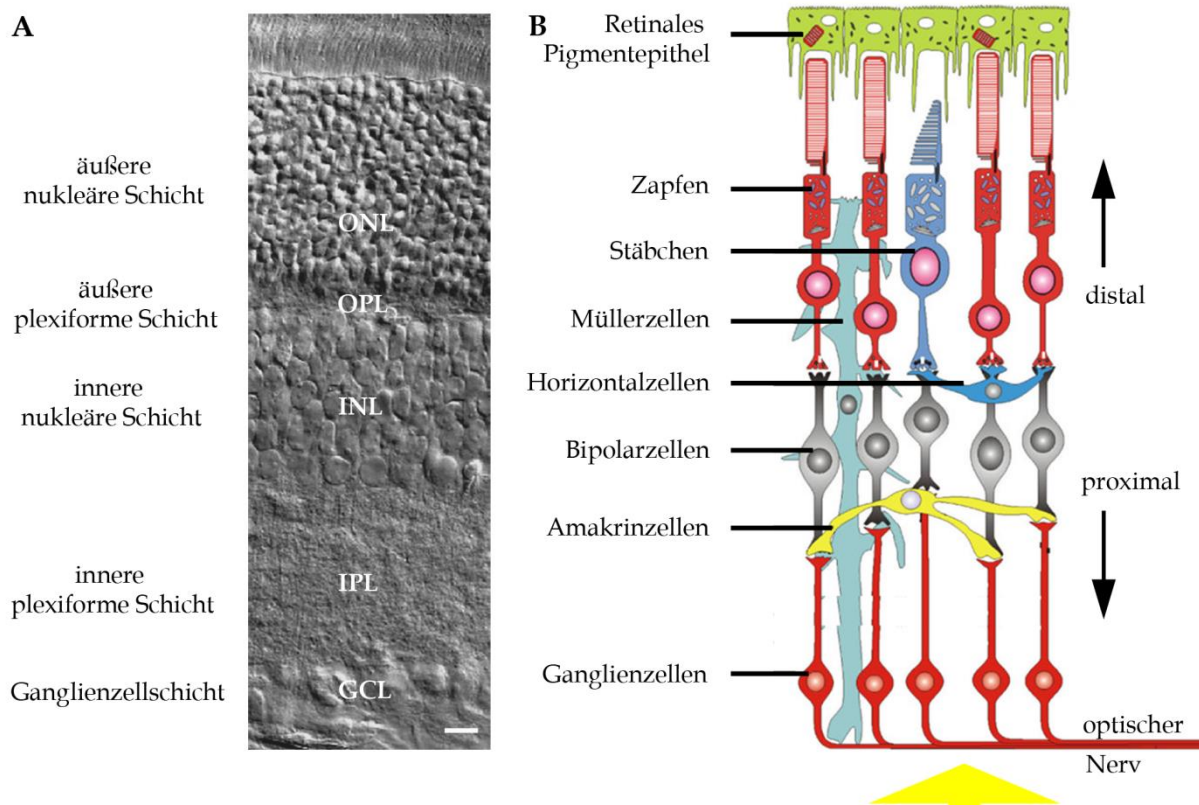


Abbildung 1-1. Aufbau der Säugetierretina. (A) Querschnitt der Mausretina im Transmissionsbild. Die retinalen Schichten sind auf der linken Seite beschriftet, die entsprechenden Abkürzungen befinden sich im Transmissionsbild. (B) Schematische Darstellung eines retinalen Querschnitts. Die Hauptzelltypen sind auf der linken Seite des Schemas beschriftet. Die in der Arbeit verwendeten Lagebezeichnungen distal und proximal sind auf der rechten Seite markiert. Der gelbe Pfeil kennzeichnet die Richtung des Lichteinfalls. Maßstab=5 μm in A. Verändert nach Molday und Zhang, 2010.

Das in das Auge einfallende Licht passiert zunächst die fünf retinalen Schichten, bevor es von den lichtempfindlichen PR, den primären Sinneszellen der Retina,

aufgenommen, transduziert und **vertikal** über chemische (glutamaterge) Synapsen durch die Retina geleitet wird. Der vertikale Signalfluss erfolgt über drei sequentiell geschaltete Zellklassen (PR → Bipolarzellen → Ganglienzellen): Die PR übertragen in der OPL das transduzierte Signal auf unterschiedliche Typen nachgeschalteter Bipolarzellen. Diese leiten die aufgenommene Information von der äußeren in die innere Retina und übertragen sie in der IPL weiter auf die nachfolgenden Dendriten der Ganglienzellen. Die Ganglienzellen nehmen die vertikalen Signale der Bipolarzellen auf und kodieren sie in Form von Aktionspotentialen. Ihre Axone bilden den Sehnerv (lat. *Nervus opticus*), der die retinalen Ausgangssignale direkt in die visuellen Areale des Gehirns projiziert (Wässle, 2004). Der hier sehr vereinfacht dargestellte vertikale Informationsfluss wird in den plexiformen Schichten von **lateral orientierten Interneuronen** beeinflusst: In der OPL modulieren Horizontalzellen die Informationsübertragung und Signalaufnahme zwischen PR und Bipolarzellen (siehe Abschnitt 1.2.3 und 1.3.3; Thoreson und Mangel, 2012). In der IPL übernehmen verschiedene Subtypen von Amakrinzellen, durch synaptische Interaktionen mit Bipolar- und Ganglienzellen, die Weiterleitung und Modulation der visuellen Signale (MacNeil und Masland, 1998; Masland, 2012b).

Neben den genannten neuronalen Zellen gibt es weitere Zelltypen, die für die Funktionalität der Retina notwendig sind. Hierzu zählen die Zellen des retinalen Pigmentepithels (RPE) und die Müllerzellen, die essentielle Funktionen in der Retina übernehmen. Das RPE ist ein einschichtiges Gewebe, das die Retina dorsal abdichtet und vor dem Eintritt toxischer Moleküle schützt. Es versorgt die Retina mit Nährstoffen und anderen essentiellen Faktoren und unterstützt die Funktionalität der PR (Simo *et al.*, 2010). Müllerzellen sind die Hauptgliazellen der Retina. Ihre Zellkörper erstrecken sich durch alle Schichten und stabilisieren die retinale Struktur. Sie unterstützen durch Freisetzung neuroaktiver und trophischer Substanzen und durch die Entfernung überflüssiger extrazellulärer Metaboliten die Vitalität und Funktionalität des retinalen Gewebes (Bringmann *et al.*, 2006; de Melo Reis *et al.*, 2008).

1.2 Zellen der äußeren Mausretina

Die vorliegende Dissertation fokussiert sich auf die äußere Mausretina, die im folgenden Kapitel näher beschrieben werden soll. Als die äußere Retina wird der zur Hirnseite gelegene, dorsale Bereich des Gewebes bezeichnet. Entsprechend der Signalverarbeitungssequenz werden die unterschiedlichen Zelltypen der äußeren Retina in Primär- und Sekundärneurone unterteilt: **Die Primärneurone** der Retina sind die PR. Zwei verschiedene Photorezeptorklassen vermitteln die selektive Aufnahme der visuellen Information bei unterschiedlichen Beleuchtungsverhältnissen (siehe Abschnitt 1.2.1). Durch eine komplexe Signaltransduktionskaskade wandeln die PR den physikalischen Lichtreiz in ein chemisch-elektrisches Signal um (Fu und Yau, 2007) und übertragen es durch Änderungen der Glutamatfreisetzung an den Terminalien auf die nachgeschalteten **Sekundärneurone** (Bipolar- und Horizontalzellen). In der OPL, der ersten retinalen Verschaltungsebene, beginnt die vertikale und laterale Verarbeitung des visuellen Reizes: Die Informationen der PR werden in parallele ON- und OFF-Signalwege eingespeist, die durch ca. zehn verschiedene Bipolarzelltypen repräsentiert werden (siehe Abschnitt 1.2.2). Der Signaltransfer zwischen PR und Bipolarzellen wird in der OPL von den lateral orientierten Horizontalzellen beeinflusst (siehe Abschnitt 1.2.3).

1.2.1 Primärneurone der Retina: Photorezeptoren

Stäbchen und Zapfen nehmen visuelle Reize bei verschiedenen Lichtverhältnissen auf und unterscheiden sich in funktionellen (Licht- und spektrale Empfindlichkeit) und strukturellen Eigenschaften (Häufigkeit, Morphologie, postsynaptische Kontakte). **Die Stäbchen** sind sehr **lichtsensitiv** und vermitteln die visuelle Wahrnehmung bei geringen Beleuchtungsverhältnissen. Die **weniger lichtempfindlichen Zapfen** sind bei Umgebungskonditionen mit hoher Photonendichte aktiv und vermitteln das photopische Sehen und Farbwahrnehmungen (Fu und Yau, 2007). In der höherer Primatenretina (wie der humanen Retina) gibt es einen zentral liegenden Bereich, in dem die Zapfendichte maximal ist (lat. *Fovea centralis*). Die Zapfen in der *Fovea centralis* besitzen eine sehr geringe Konvergenz auf nachgeschaltete Neurone, wodurch in diesem Bereich der

Retina das maximale Auflösungsvermögen erreicht wird und damit die Sehschärfe am größten ist (Wässle, 2004). In der Mausretina gibt es keine entsprechende Anordnung der Zapfen. Sie besteht zu 97,2% aus Stäbchen und zu 2,8 % aus Zapfen, die homogen innerhalb des Gewebes verteilt sind (Jeon *et al.*, 1998; Carter-Dawson und LaVail, 1979). **Die Morphologie** von Stäbchen und Zapfen lässt sich grob in vier strukturelle Kompartimente gliedern (Abb. 1-2 A): 1. Das Außensegment (AS), das die molekularen Komponenten für die Aufnahme und Umwandlung der Lichtsignale beinhalten, 2. das Innensegment, das über ein dünnes Zilium mit dem AS verbunden ist und in dem die mitochondriale Energieerzeugung, der Hauptteil der Proteinbiosynthese und der allgemeine Zellmetabolismus erfolgt, 3. das Zellsoma, das den Zellkern beinhaltet und damit auch der Ort der Transkriptionsregulation ist, und 4. das Endfüßchen, an dem die Weitergabe der Lichtsignale durch eine streng regulierte Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat erfolgt (Fu und Yau, 2007) .

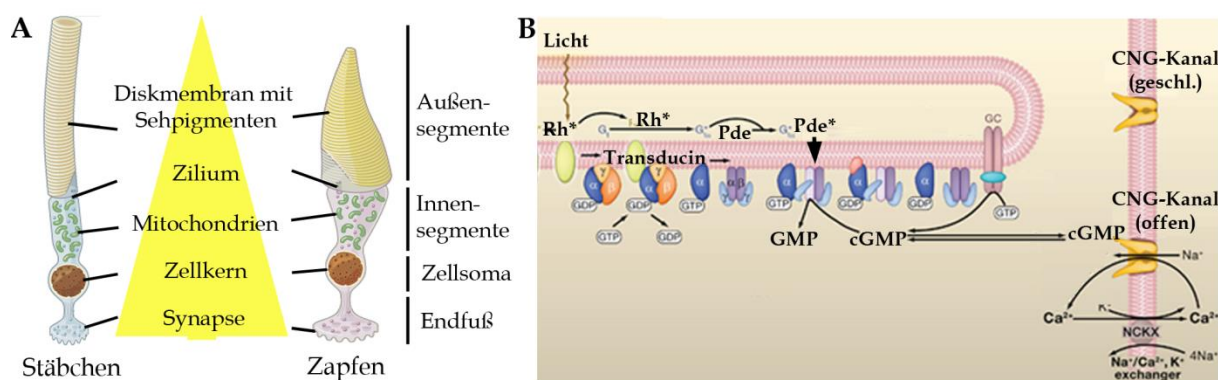


Abbildung 1-2. Photorezeptoren. (A) Schematische Darstellung der Stäbchen- (links) und der Zapfenstruktur (rechts). Unterteilung der Photorezeptoren in vier Bereiche (Beschriftung rechte Seite). Funktionelle Komponenten dieser Bereiche sind im Zentrum beschriftet. Der gelbe Pfeil kennzeichnet die Richtung des Lichteinfalls. Verändert nach <http://www.britannica.com>. (B) Vereinfachte schematische Darstellung des, durch Licht-induzierten, Signaltransduktionsprozesses in den Außensegmenten der Stäbchen. Die essentiellen Komponenten wurden durch eine größere Beschriftung hervorgehoben: Während der Dunkelheit sind cGMP-gesteuerte CNG-Kanäle geöffnet, die einen Dunkelstrom hervorrufen, der die Depolarisation der Stäbchen bei ca. -30 mV aufrecht hält. Durch Lichtabsorption wird Rhodopsin (Rh) aktiviert (Rh*), wodurch über das aktivierte heterotrimere G-Protein Transducin, die Aktivierung einer Phosphodiesterase6 (Pde) induziert wird. Die Pde hydrolysiert cGMP zu GMP, wodurch die cGMP-Konzentration in den Außensegmenten sinkt und die cGMP-gesteuerten CNG-Kanäle, die während der Dunkelheit geöffnet sind, schließen und die Hyperpolarisation der Zelle induziert wird. Verändert nach Yau und Hardie, 2009.

Für die Aufnahme des visuellen Reizes sind spezialisierte Sehpigmente zuständig, die in den vergrößerten Oberflächenstrukturen der AS eingelagert sind. Beide Photorezeptorklassen exprimieren unterschiedliche, lichtabsorbierende Sehpigmente, die durch verschiedene Photonensensitivitäten und Absorptionsmaxima die physikalischen Eigenschaften der PR definieren: Das Sehpigment der Stäbchen ist **Rhodopsin**. Es ist sehr sensitiv und kann selbst einzelne Photonen im skotopischen und mesopischen Bereich detektieren (Baylor *et al.*, 1979). Die Zapfen der Mausretina exprimieren zwei unterschiedliche, auf hohe Leuchtdichten spezialisierte, Sehpigmente (**Zapfenopsine**): M- und S-Opsine, die chromatische Reize vor allem in den mittel- („grün“, maximale spektrale Sensitivität: 508 nm) und kurzwelligen („blau bis UV“; max. spektrale Sensitivität: 360 nm) Lichtbereichen absorbieren (Fu und Yau, 2007; Jacobs *et al.*, 1991). Die Mehrheit der Zapfen in der Mausretina sind Dualpigmentzapfen, die beide Zapfenopsine in variierenden Konzentrationen koexprimieren (Applebury *et al.*, 2000; Haverkamp *et al.*, 2005). Die Aktivierung der Sehpigmente durch Photonenabsorption induziert eine intrazelluläre Signaltransduktion (Abb. 1-2 B), die letztendlich zu einer Potentialänderung der, im Grundzustand (bei Dunkelheit) depolarisierten, Photorezeptormembran führt (Fu und Yau, 2007; Stephen *et al.*, 2008).

Die Signaltransduktion soll am Beispiel der Stäbchen kurz erläutert werden (Abb. 1-2 B): Die Depolarisation im Grundzustand wird durch einen Dunkelstrom hervorgerufen, der durch Kationen-permeable CNG-Kanäle aufrechterhalten wird. Die nicht-selektiven CNG-Kanäle sind im Dunkeln durch Bindung an das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP) geöffnet, wodurch ein Einstrom von Natrium (Na^+) und Calcium (Ca^{2+}) in die AS der PR erfolgt. Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, Kalium-Austauscher NCKX sorgt für einen Stromausgleich, indem er Ca^{2+} und Kalium (K^+) aus, und Na^+ in die AS transportiert, wodurch die Depolarisation der PR in der Dunkelheit aufrechterhalten wird. Durch Lichtabsorption wird das Stäbchen-Sehpigment Rhodopsin (Rho) aktiviert. Das aktivierte Rho führt über Transducin zur Aktivierung einer Phosphodiesterase6 (Pde6), welche cGMP zu GMP hydrolysiert und dadurch die cytosolische cGMP-Konzentration reduziert. Dies hat zur Folge, dass cGMP von den CNG-Kanälen abdissoziiert und diese schließen. Die NCKX-Kanäle sind

allerdings weiterhin aktiv und transportieren Ca^{2+} und K^+ aus den AS, wodurch die Hyperpolarisation der AS induziert wird (Yau und Hardie, 2009).

Entsprechend der Reizintensität werden die PR zunehmend hyperpolarisiert. Die Reizweiterleitung auf die nachgeschalteten Bipolar- und Horizontalzellen erfolgt an den Terminalien der PR über einen spezialisierten chemischen Synapsentyp, die Bandsynapse (Regus-Leidig und Brandstätter, 2012). Die Bandsynapse ist durch eine spezielle Struktur gekennzeichnet: Das Zentrum bildet ein senkrecht zur Membran ausgerichtetes präsynaptisches Proteinband (*Ribbon* [engl.]), an dem sich Transmittervesikel aufreihen, die Ca^{2+} -abhängig mit der präsynaptischen Membran verschmelzen und Glutamat in den intersynaptischen Spalt freisetzen (Raviola und Gilula, 1975; Sterling und Matthews, 2005). In einer universellen Anordnung ragen im Bereich des *Ribbons* die Fortsätze der Sekundärneurone in die präsynaptische Endigung der PR hinein: Zentral arrangierte Dendriten von ON-Bipolarzellen (siehe Abschnitt 1.2.2) und laterale Horizontalzellfortsätze bilden innerhalb der Invagination eine funktionelle, postsynaptische Triade (Haverkamp *et al.*, 2000). Der, durch die Invaginationen bedingte, sehr kleine intersynaptische Raum bildet die Grundlage zur präzisen und schnellen Signalweitergabe, aber auch zur Modulation und Inhibition der Transmission (siehe Abschnitt 1.3.3).

1.2.2 Sekundärneurone der Retina: Bipolarzellen

Die Bipolarzellen sind die Ausgangsneurone der äußeren Retina. Sie erhalten in der OPL Eingang von PR und Horizontalzellen und leiten die Signale in die innere Retina, wo sie Amakrin- und Ganglienzellen innervieren. Die Mausretina besitzt einen Stäbchen-kontaktierenden und neun, hauptsächlich Zapfen-kontaktierende Bipolarzelltypen (Ghosh *et al.*, 2004; Haverkamp *et al.*, 2003; Pignatelli und Strettoi, 2004; Wässle *et al.*, 2009). Durch die neun verschiedenen Zapfen-Bipolarzellen (ZB1-9) werden die Zapfensignale in der OPL bereits in verschiedene parallele Signalwege eingespeist. Eine individuelle Zapfen-Bipolarzelle kontaktiert dabei fünf bis zehn verschiedene *Zapfenpedicles*, während ein einzelnes *Zapfenpedicle* postsynaptische Kontakte zu über 500 Dendriten von Zapfen-Bipolarzellen ausbildet (Regus-Leidig und Brandstätter, 2012; Wässle, 2004; Wässle *et al.*, 2009). Die Signale der Stäbchen

hingegen werden hauptsächlich über den einen Stäbchen-Bipolarzelltyp in die innere Retina geleitet. Im Gegensatz zu den Zapfen-Bipolarzellen bildet die Stäbchen-Bipolarzelle keine synaptischen Kontakte mit Ganglienzellen aus. Sie übertragen die Stäbchensignale in der IPL über AII-Amakrinzellen auf Zapfen-Bipolarzellen und integrieren sie so in den Zapfensignalweg (Völgyi *et al.*, 2004; Wässle, 2004).

Für einige Zapfen-Bipolarzellen (ZB3a und b; ZB4; ZB7) sind zusätzliche synaptische Kontakte an den Stäbchenterminalien beschrieben (Haverkamp *et al.*, 2008; Mataruga *et al.*, 2007; Tsukamoto *et al.*, 2007). Sie stellen einen alternativen Weg zur Integration der Stäbcheninformation in den Zapfensignalweg dar (Hack *et al.*, 1999; Soucy *et al.*, 1998; Tsukamoto *et al.*, 2001).

Aufgrund ihrer Antworteigenschaften auf Licht, ihrer Morphologie und der Expression verschiedener Markerproteine werden die Bipolarzellen weiter in vier OFF-Bipolarzelltypen (ZB 1-4) und sechs ON-Bipolarzelltypen (ZB 5-9; Stäbchen-Bipolarzelltyp) unterteilt (Abb. 1-3; Ghosh *et al.*, 2004; Wässle *et al.*, 2009).

Die **funktionelle Einteilung** in ON- und OFF-Bipolarzellen erfolgt aufgrund des inversen Antwortverhaltens der Zelltypen auf Licht (Kolb, 1995b). ON-Bipolarzellen depolarisieren bei der, durch Licht verringerten, Glutamatfreisetzung der PR und leiten das invertierte Signal der PR an Amakrin- und Ganglienzellen weiter. OFF-Bipolarzellen hingegen hyperpolarisieren durch den reduzierten Glutamateingang und übertragen ein konserviertes Photorezeptorsignal auf die nachfolgenden Neurone. Die unterschiedliche Reaktion der ON- und OFF-Bipolarzellen auf die Veränderung der Glutamatfreisetzung an der synaptischen Triade resultiert aus der Expression unterschiedlicher Glutamatrezeptoren. ON-Bipolarzellen exprimieren den metabotropen Glutamatrezeptoren 6 (mGluR6), während die durch Glutamat erzeugte Depolarisation der OFF-Bipolarzellen durch ionotrope Glutamatrezeptoren (AMPA- und Kainat-Rezeptoren) hervorgerufen wird (Ghosh *et al.*, 2001; Vardi *et al.*, 2002). **Morphologisch** lassen sich OFF- und ON-Bipolarzellen vor allem durch die synaptischen Kontakte in der OPL und durch die unterschiedlichen axonalen Stratifizierungsebenen (Strata) in der IPL unterscheiden (Ghosh *et al.*, 2004). **In der OPL** sind die ON-Bipolarzellen ein Bestandteil der synaptischen Triade in den Invaginationen der PR, während die dendritischen Fortsätze der OFF-Bipolarzellen

die Potentialänderungen der PR ausschließlich über sogenannte flache Kontakte an der Basis der Terminalien aufnehmen (Dowling und Boycott, 1966; Haverkamp und Wässle, 2000). **Innerhalb der IPL** stratifizieren die Axone der ON-Bipolarzellen in die innere, proximale Hälfte (Abb. 1-3; Strata 3-5; ON-Schichten). Die Axone der OFF-Bipolarzellen sind kürzer und enden im äußeren, distalen Bereich der IPL (Abb. 1-3; Strata 1 und 2; OFF- Schichten; Abb. 4; Ghosh *et al.*, 2004).

Seit einigen Jahren sind zunehmend Proteine identifiziert wurden, die selektiv von einzelnen Bipolarzelltypen exprimiert werden. Dadurch sind mittlerweile für die unterschiedlichen Bipolarzellen der Mausretina entsprechende Antikörper definiert, die gegen verschiedene Zelltyp-spezifische **Markerproteine** gerichtet sind (Mataruga *et al.*, 2007; Wässle *et al.*, 2009). Die Möglichkeit selektiv einzelne Zelltypen zu markieren hat histologische Untersuchungen an der Retina enorm erleichtert (Haverkamp *et al.*, 2003; Wässle *et al.*, 2009). In der vorliegenden Arbeit werden die in Abb. 1-3 dargestellten Marker zur Identifizierung der verschiedenen Bipolarzelltypen verwendet.

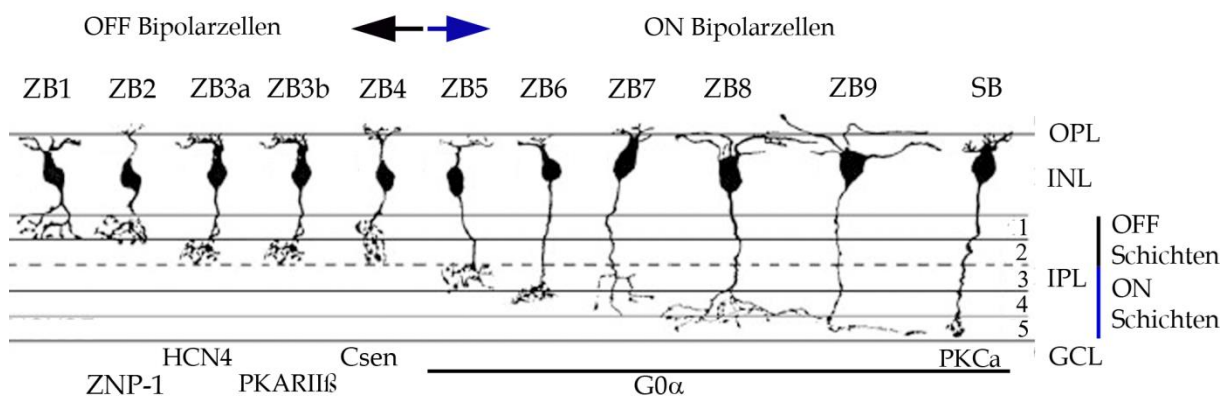


Abbildung 1-3. Schematische Darstellung der Bipolarzelltypen in der Mausretina. Die neun verschiedenen Zapfen-Bipolarzellen (ZB1-9) und der Stäbchen-Bipolarzelltyp (SB) können anhand ihrer Stratifizierungsebene innerhalb der IPL als OFF- (ZB1-4) und ON- (ZB5-9, SB) Bipolarzellen identifiziert werden: OFF-Bipolarzellen stratifizieren in die OFF-Schichten (Strata 1, 2), ON-Bipolarzellen in die ON-Schichten (Strata 3-5). In der unteren Reihe sind die Antikörper genannt, die den darüber liegenden Zelltyp spezifisch markieren und in den histologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Verändert nach Ghosh *et al.*, 2004.

1.2.3 Sekundärneurone der Retina: Horizontalzellen

Horizontalzellen sind den PR nachgeschaltete Sekundärneurone, die durch ihre Aktivität die Signaltransmission zwischen PR und Bipolarzellen beeinflussen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei lichtadaptiven Prozessen, sowie bei Kontrast- und Farbwahrnehmungen und sind damit entscheidend an der primären Verarbeitung des visuellen Signals beteiligt (Thoreson und Mangel, 2012). In der Mausretina gibt es einen Horizontalzelltyp, der sich lateral organisiert (He *et al.*, 2000). Die Somata befinden sich in der distalen ONL, die dendritischen und axonalen Fortsätze stratifizieren in die OPL (Abb. 1-1).

Der Horizontalzelltyp der Mausretina besteht aus einem kernnahen, Zapfenkontaktierenden Dendritenbaum und einem sehr langen Axon mit einem stark verästelten, ausschließlich Stäbchenkontaktierenden Terminal (Kolb, 1974; Peichl und Gonzalez-Soriano, 1993). Untereinander sind die Dendriten und die Axonterminalien der Horizontalzellen über elektrische Synapsen (siehe Abschnitt 1.3.1) verbunden und bilden jeweils individuelle Netzwerke aus (Hombach *et al.*, 2004; Janssen-Bienhold *et al.*, 2009). Die Kopplung der Horizontalzellen wird lichtabhängig durch die Freisetzung von Neuromodulatoren (Retinsäure, Dopamin, Stickstoffmonoxid) kontrolliert (He *et al.*, 2000; Pottek *et al.*, 1997; Weiler *et al.*, 2000). Durch die starke elektrische Kopplung besitzen einzelne Horizontalzellen rezeptive Felder, die sich über große Bereiche der Retina erstrecken (Bloomfield *et al.*, 1995; Dacheux und Raviola, 1982; Janssen-Bienhold *et al.*, 2009; Shelley *et al.*, 2006; Weiler *et al.*, 1996). Die ausgedehnten Netzwerke sammeln die Signale der PR und integrieren die daraus extrahierte Information durch laterale Interaktionen mit PR (Feedback) und Bipolarzellen (*Feedforward* [engl.]) in die retinalen Schaltkreise (Bloomfield *et al.*, 1995; Dacheux und Raviola, 1982). Durch exzitatorische Signaleingänge über ionotrope Glutamatrezeptoren (Hack *et al.*, 2001) geben die Horizontalzellen inhibitorische Feedbacksignale zurück an die Terminalien der Stäbchen (Thoreson *et al.*, 2008) und Zapfen (Kamermans *et al.*, 2001; Klaassen *et al.*, 2011). Die negative Rückkopplung moduliert die Aktivität der PR (siehe Abschnitt 1.3.3) und fördert die Adaption an wechselnde Beleuchtungsdichten der Umgebung (Kamermans und Spekrijse, 1999; Shelley *et al.*, 2006; Thoreson und Mangel, 2012).

Der Signaleingang auf die Bipolarzellen wird vermutlich zusätzlich durch die Freisetzung inhibitorischer Neurotransmitter (γ -Aminobuttersäure (GABA)) reduziert, wodurch die Horizontalzellen an der Generierung antagonistisch organisierter rezeptiver Felder der Bipolarzellen mitwirken. Die rezeptiven Felder der Bipolarzellen sind im Wesentlichen an der Verbesserung der Kontrastwahrnehmung und damit an der räumlichen Auflösung beteiligt (Burkhardt *et al.*, 2011; Kamermans und Spekreijse, 1999; Thoreson und Mangel, 2012; Wu, 1992).

1.3 Zelluläre Interaktionen in der äußeren Retina

Synaptische Signaltransmission und interzelluläre Signalmodulation sind in der Retina wichtige Bestandteile der primären Verarbeitung aufgenommener Lichtreize. Die Verarbeitung der visuellen Signale in der äußeren Retina basiert hauptsächlich auf drei verschiedenen Arten der zellulären Interaktion:

1. **Chemische Signaltransmission** zwischen PR und Sekundärneuronen, die durch Glutamatfreisetzung vermittelt wird
2. **Signaltransfer durch elektrische Synapsen (*Gap Junctions*)**, die die Terminalien der PR miteinander und die Dendriten und Axone der Horizontalzellen untereinander verbinden
3. **Ephaptische Interaktionen**, die die negative Rückkopplung der Horizontalzellen auf die PR durch Einzelmembrankanäle vermitteln

Im folgenden Kapitel soll speziell auf die beiden letzten Wege der interzellulären Kommunikation näher eingegangen werden.

1.3.1 Zelluläre Interaktionen: *Gap Junctions* und Einzelmembrankanäle

Eine Möglichkeit der synaptischer Interaktion besteht in der interzellulären Kommunikation benachbarter Zellen durch *Gap Junctions* (GJ). GJ sind verdichtete Membranstrukturen, in denen es zu einer Anhäufung von bis zu 1000 einzelnen interzellulären Kanälen kommt, die das Cytoplasma benachbarter Zellen direkt untereinander verbinden (Kumar und Gilula, 1996) und einen sehr schnellen und direkten Austausch von Molekülen bis zu einer Größe von 1 kDa ermöglichen (Abb. 1-4 A). Der Austausch von Ionen (z.B. Na^{2+} , K^+ , Ca^{2+}), ist vor allem für die Funktion

elektrisch erregbarer Zellen notwendig (Bloomfield und Völgyi, 2009). Aber auch kleinere Metaboliten und sekundäre Botenstoffe, wie Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), können GJ passieren und entlang ihres Konzentrationsgradienten zwischen den gekoppelten Zellen diffundieren, wodurch metabolische Prozesse benachbarter Zellen synchronisiert werden können (Spray, 1994).

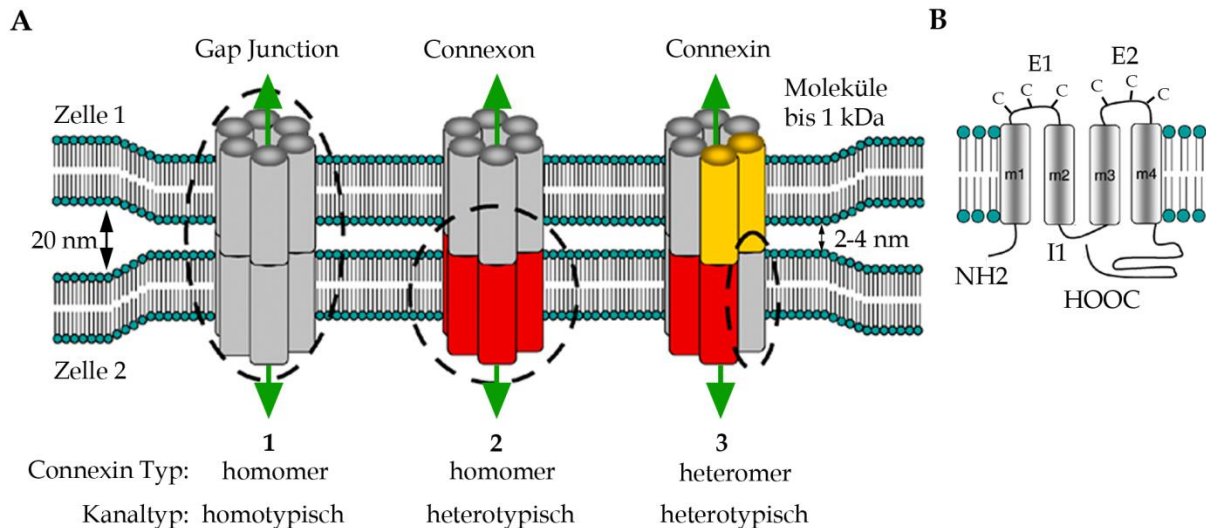


Abbildung 1-4. Struktur und Aufbau von elektrischen Synapsen. (A) *Gap Junction*-Kanäle entstehen an verdichteten Membranstrukturen (2-4 nm) benachbarter Zellen, durch den Zusammenschluss einander gegenüberliegender, hexamerer Hemikanäle (Connexone). Connexone entstehen durch Oligomerisierung von sechs Connexinen. Die Zusammensetzung der interzellulären Kanäle kann aus Connexonen des gleichen Typs (homotypischer Kanal, 1) oder aus unterschiedlichen Connexonen bestehen (heterotypisch, 2 und 3). Auch die Connexone können aus identischen (homomer, 1 und 2) oder verschiedenen Connexin-Untereinheiten (heteromer, 3) aufgebaut sein. (B) Sekundärstruktur der Connexine. Connexine besitzen 4 transmembrane Domänen (m1-m4), mit intrazellulärem Amino- (NH₂) und Carboxylterminus (HOOC). Die beiden extrazellulären Schleifen (E1, E2) weisen je drei Cysteinreste (C) auf, die durch Ausbildung von Disulfidbrücken an der Kopplung benachbarter Connexine zu einem interzellulären Kanal beteiligt sind. I1 kennzeichnet die intrazelluläre Schleife. Verändert nach Wagner, 2008.

Die **funktionellen Untereinheiten** der GJ-Kanäle sind hexamere Hemikanäle (Connexone), die sich aus Proteinen der Connexin (Cx)-Familie zusammensetzen (Bloomfield und Völgyi, 2009). Connexine sind integrale Membranproteine mit vier transmembranen Domänen, einem intrazellulär gelegenen Carboxyl- und Aminoterminal, zwei extrazellulären Domänen und einer cytoplasmatischen Schleife (Abb. 1-4 B). An den extrazellulären Domänen der Connexine befinden sich drei konservierte Cysteinreste. Sechs Connexinuntereinheiten oligomerisieren zu einem Connexon. Die extrazellulären Domänen von Connexonen benachbarter

Zellmembranen interagieren und begünstigen, durch Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den extrazellulären Cysteinresten, die Bildung der transmembranen Kanalpore (Dahl *et al.*, 1994).

In ihrer **Zusammensetzung** sind Connexone und GJ-Kanäle sehr variabel (Abb. 1-4 A): Connexone können sich aus gleichartigen (homomere Connexone) oder unterschiedlichen (heteromomere Connexone) Connexin-Untereinheiten zusammensetzen. Gleiches gilt für die Zusammensetzung der interzellulären Kanalpore, die aus zwei Connexonen gleichen Typs (homotypische Kanäle) oder unterschiedlicher Art (heterotypische Kanäle) gebildet werden kann (Bloomfield und Völgyi, 2009). Trotzdem sind nur bestimmte Kombinationen der Connexone bzw. der Connexin-Untereinheiten möglich (Segretain und Falk, 2004; Söhl *et al.*, 2005).

Die physiologischen Eigenschaften der GJ-Kanäle sind von den Cx-bildenden Untereinheiten abhängig. Jedes Cx besitzt spezifische Eigenschaften in Bezug auf Selektivität, Leitfähigkeiten und Regulation der Öffnungswahrscheinlichkeit. Durch die vielen Kombinationsmöglichkeiten im Aufbau der Connexone und der interzellulären Kanäle besteht eine enorme Vielfalt an individuellen Regulationsmöglichkeiten (Bloomfield und Völgyi, 2009; Söhl *et al.*, 2005).

In der Mausretina ist die Expression von **20 verschiedenen Cx-Isoformen** beschrieben (Söhl und Willecke, 2003). Die unterschiedlichen Connexine werden abhängig vom Zelltyp in jedem der ca. 50 zellulären Subtypen der Retina exprimiert (Bloomfield und Völgyi, 2009; Söhl *et al.*, 2005). Durch die spezifische Ausbildung von GJ zwischen bestimmten retinalen Zellpopulationen bilden sich innerhalb der Retina individuelle, elektrische Netzwerke, die es ermöglichen, Informationen über weite Bereiche der Retina zu sammeln (z.B. Netzwerke zwischen Horizontalzellen) oder durch Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses zu verstärken (z.B. GJ zwischen Zapfen). Außerdem wird in der Retina die elektrische Kopplung zur schnellen Weiterleitung der Signale genutzt, wie z.B. beim primären Stäbchensignalweg zwischen AII-Amakrin- und ON-Zapfen-Bipolarzellen oder bei der Einspeisung der Stäbchensignale direkt in den Zapfensignalweg, durch die Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen (siehe Abschnitt 1.3.2; Bloomfield und Völgyi, 2009; Söhl *et al.*, 2005).

In manchen Fällen koppeln Connexone nicht aneinander, sondern bilden funktionelle **Einzelkanäle** in der Zellmembran. Diese verbinden das Cytoplasma mit dem umgebenden extrazellulären Medium (Chandrasekhar und Bera, 2012; Goodenough und Paul, 2003; Kar *et al.*, 2012; Spray *et al.*, 2006). Einzelmembrankanäle werden nicht nur von Connexinen, sondern auch von der Proteinfamilie der Pannexine gebildet (Sosinsky *et al.*, 2011; siehe Abschnitt 1.4). Funktionelle Einzelmembrankanäle vermitteln im ZNS die parakrine Signalausbreitung und sind in physiologische und pathologische Ereignisse involviert (Evans *et al.*, 2006; Spray *et al.*, 2006). In der äußeren Retina ist die Gegenwart von Einzelmembrankanälen auf den Fortsätzen der Horizontalzellen beschrieben (DeVries und Schwartz, 1992; Hombach *et al.*, 2004), wo sie mit den Rückkopplungssignalen der Horizontalzellen auf die PR in Verbindung gebracht werden (siehe Abschnitt 1.3.3; Kamermans *et al.*, 2001).

1.3.2 Elektrische Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen

Die elektrische Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen ist in der Primatenretina (Hornstein *et al.*, 2005; O'Brien *et al.*, 2012; Schneeweis und Schnapf, 1995) und auch in anderen Vertebratenspezies gut untersucht (Raviola und Gilula, 1973; Smith *et al.*, 1986). Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit ist die elektrische Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen in der Mausretina, die bereits in vielen Studien nachgewiesen wurde (Abb. 1-5 A; Cangiano *et al.*, 2012; Heikkinen *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2004; Ribelayga *et al.*, 2008; Trümppler *et al.*, 2008; Tsukamoto *et al.*, 2001).

Die GJ werden von den Telodendrien der Zapfen gebildet, die die *Spherules* der Stäbchen kontaktieren. In der Maus bildet Cx36 die GJ-Kanäle auf der Seite der Zapfen (Abb. 1-5 B; Deans *et al.*, 2002; Feigenspan *et al.*, 2004; Trümppler *et al.*, 2008), während der Kopplungspartner der Cx36-Halbkanäle auf der Stäbchenseite von einem bisher noch nicht identifizierten Protein gebildet wird. Die Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen bildet die Grundlage für den sekundären Signalweg (*Pathway* [engl.]) der Stäbchen und dient der direkten Einspeisung der

Stäbcheninformation in den Zapfenpathway (Bloomfield und Völgyi, 2009; Cook und Becker, 1995; Hansen *et al.*, 2005; Söhl *et al.*, 2005).

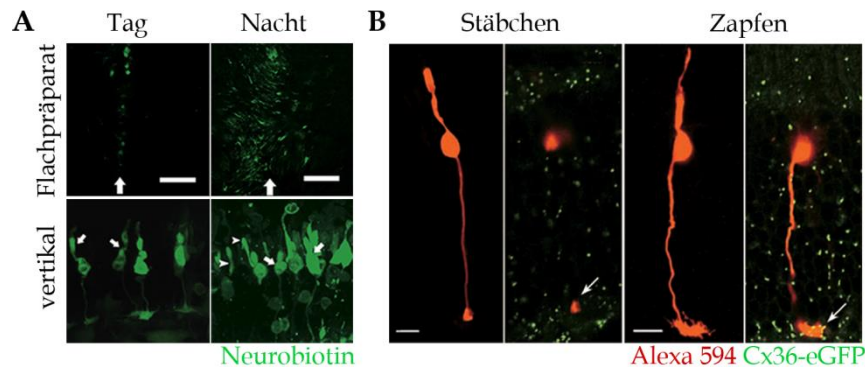


Abbildung 1-5. Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen in der Mausretina. (A) Nachweis der Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen in der Mausretina durch „Cut-loading“-Experimente. Die Pfeile (obere Abbildungen) zeigen in retinalen Flachpräparaten die Bereiche des Schnitts an, durch den Neurobiotin in die Photorezeptoren gelangt. Neurobiotin diffundiert durch offene *Gap Junctions* in benachbarte, unbeschädigte Photorezeptoren und visualisiert dadurch die Kopplung benachbarter Zellen. Links: Bei Tag sind Photorezeptoren (hauptsächlich Zapfen, Pfeile unten) schwach gekoppelt. Rechts: Nachts wurde eine starke Kopplung zwischen Stäbchen (Pfeilköpfe, unten) und Zapfen (Pfeile, unten) nachgewiesen. Verändert nach Ribelayga *et al.*, 2008. (B) Farbstoffinjektionen (A594; rot) in Stäbchen (links) und Zapfen (rechts) zeigen die Morphologie beider Photorezeptorsubtypen. Cx36-eGFP- (grün) Markierungen sind ausschließlich in den Terminalien der Zapfen (Pfeil rechts) aber nicht in den *Spherules* (Pfeil, links) vorhanden. Demnach handelt es sich bei der Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen um heterotypische *Gap Junction*-Kanäle, die in den Zapfen von Cx36 gebildet werden. Verändert nach Feigenspan *et al.*, 2004.

Die elektrische Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen wird abhängig von der Tageszeit durch den zirkadiären (Tag-Nacht-) Rhythmus mittels des Transmitters Dopamin gesteuert (Ribelayga *et al.*, 2008). Nachts ist die Kopplung am stärksten und ermöglicht die Detektion von Objekten bei Dämmerlicht. Eine Reduzierung der Kopplung während des Tages verhindert, dass Zapfensignale in das Stäbchensystem gelangen und deren Sensitivität verringern (Abb. 1-5 A; Bloomfield und Völgyi, 2009; Ribelayga *et al.*, 2008; Xin und Bloomfield, 1999). Unter pathologischen Bedingungen wird eine Beteiligung der Stäbchen-Zapfen-Kopplung bei der Verbreitung von Zelltodfaktoren diskutiert (siehe Abschnitt 1.5.3).

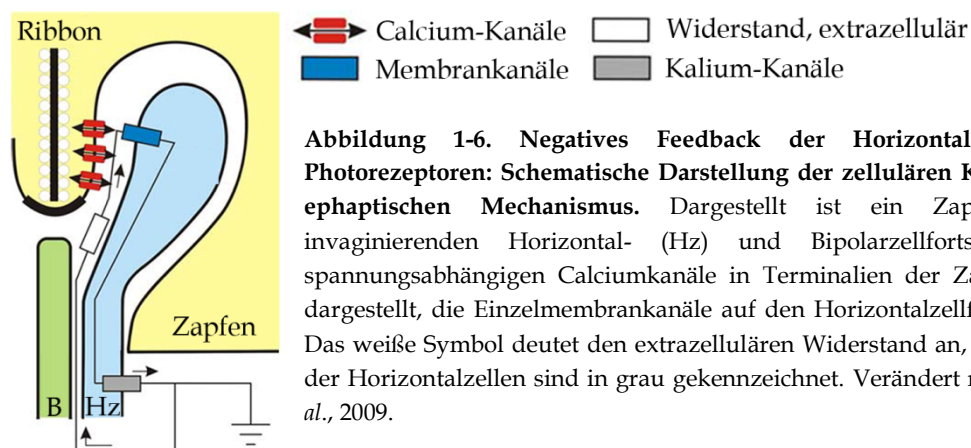
1.3.3 Beteiligung von Einzelmembrankanälen am Horizontalzellfeedback-

Ephaptischer Mechanismus

Das negative Horizontalzellfeedback bildet durch die Generierung der antagonistisch organisierten rezeptiven Felder der Bipolarzellen (Center-Surround-

Organisation) eine wichtige Grundlage für das Kontrast- und Farbsehen (Thoreson und Mangel, 2012). Die durch Licht-induzierte Beendigung der Glutamatfreisetzung aus den PR, führt zu einer Hyperpolarisation der nachgeschalteten Horizontalzellen und löst dadurch das negative Feedback auf die PR aus (Burkhardt et al., 2011; Kamermans et al., 2001; Kolb, 1995b; Thoreson und Mangel, 2012; Wässle, 2004). Die negative Rückkopplung auf die Endfüßchen der Stäbchen (Thoreson *et al.*, 2008) und Zapfen (Verweij *et al.*, 1996) wird durch einen bisher noch umstrittenen Mechanismus hervorgerufen, der zu einem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration innerhalb der Photorezeptorterminalien führt und folglich die Freisetzung von Glutamat verstärkt (Klaassen *et al.*, 2011).

Bisher sind verschiedene Mechanismen beschrieben, deren Beteiligung an dem negativen Feedback diskutiert wird. Neben der Freisetzung des Neurotransmitters GABA (Burkhardt, 1993; Kamermans und Spekreijse, 1999; Kaneko und Tachibana, 1986; Schwartz, 1987) und Veränderungen des intersynaptischen pH-Wertes (DeVries, 2001; Hirasawa und Kaneko, 2003; Vessey et al., 2005), könnten vor allem die, durch Hemikanäle-vermittelten, ephaptische Interaktionen zwischen Horizontalzellen und PR (Kamermans *et al.*, 2001; Kamermans und Spekreijse, 1999), am negativen Feedback beteiligt sein.



Eine Ephapse ist definiert als ein Bereich, in dem zwei oder mehrere Nervenfortsätze (in diesem Fall die Dendriten und Axone der Horizontalzellen und die Terminalien der PR) miteinander agieren, ohne dabei typische synaptische Kontakte auszubilden

(Söhl *et al.*, 2005). Abb. 1-6 verdeutlicht das Zusammenspiel der, in den ephaptischen Mechanismus, involvierten Komponenten:

Nahe dem präsynaptischen *Ribbon* in den Terminalien der PR befinden sich spannungsabhängige Calcium-Kanäle (Ca_v -Kanäle). Auf den Fortsätzen der Horizontalzellen sind Einzelmembrankanäle lokalisiert, die sich in unmittelbarer Nähe zu den Ca_v -Kanälen organisieren. Durch das Licht-induzierte Aussetzen der Glutamatausschüttung von den Photorezeptoren wird der ephaptische Mechanismus induziert: Die auf den Horizontalzellfortsätzen lokalisierten Einzelmembrankanäle werden geöffnet und positive Ionen strömen (Ca^{2+} , K^+) aus dem intersynaptischen Raum in das Innere der Horizontalzellen. Da das extrazelluläre Medium einen hohen Widerstand und dadurch eine begrenzte Leitfähigkeit aufweist, kommt es, durch den Einstrom positiver Ionen in die Horizontalzellen, zu einem lokalen Spannungsabfall zwischen dem Photorezeptorterminal und dem intersynaptischen Raum. Durch die Reduzierung des Membranpotentials der PR wird die Aktivierungskurve der Ca_v -Kanäle in negativere Potentiale verschoben und bewirkt deren Öffnung. Dies führt zum Calciumeinstrom in die PR und induziert die Freisetzung von Glutamat (Fahrenfort *et al.*, 2005; Kamermans *et al.*, 2001; Kamermans und Spekreijse, 1999; Pottek *et al.*, 2003).

1.4 Pannexine

Pannexine sind eine im Jahr 2000 erstmals beschriebene Familie membranständiger Proteine (Panchin *et al.*, 2000). Aufgrund ihrer Sequenzhomologie bilden sie eine gemeinsame, übergeordnete Proteinfamilie mit den Invertebraten GJ-Proteinen, den Innexinen (Yen und Saier, 2007). Es sind im humanen und murinen Genom mittlerweile drei verschiedene Pannexin (Panx)-kodierende Gene identifiziert wurden (Panx1, Panx2, Panx3), von denen Panx1 das am häufigsten vorkommende Mitglied dieser Proteinfamilie ist (Baranova *et al.*, 2004). Das Panx1-Gen (Abb. 1-7 A) besteht aus fünf Exonen und wird in zwei verschiedenen Isoformen exprimiert (Bruzzone *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2009; MacVicar und Thompson, 2010). Panx1 wird in neuronalem Gewebe und in verschiedenen nicht-neuronalen Organen in unterschiedlichen Konzentrationen synthetisiert (Barbe *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2009).

Die Expression von Panx2 beschränkt sich hauptsächlich auf neuronale Zellen (Bruzzone *et al.*, 2003). Panx3 wurde bisher in Osteoblasten, Fibroblasten und im Hippokampus nachgewiesen (Baranova *et al.*, 2004).

1.4.1 Struktur und Funktion von Pannexinen

Die **Membranstruktur der Pannexine** besitzt auffallende Ähnlichkeiten zu der Topologie der Connexine (vergleiche Abb. 1-4 B mit 1-7 B), wie die vier transmembranen Domänen, mit dem cytosolischen Amino- und Carboxylterminus, und die konservierten Cysteinreste an den extrazellulären Domänen (Sosinsky *et al.*, 2011).

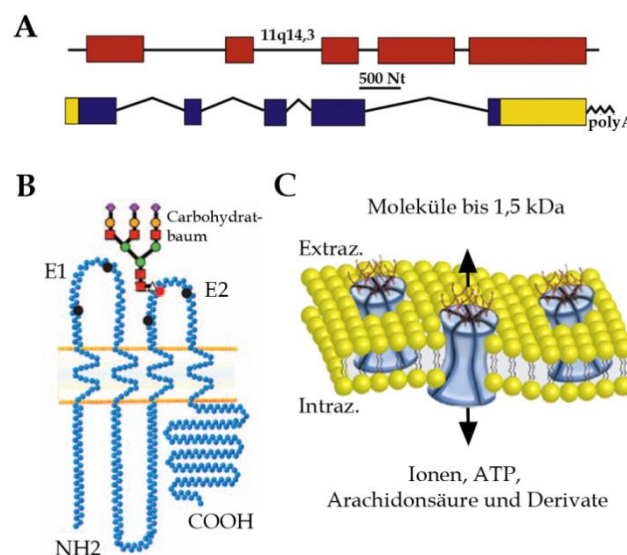


Abbildung 1-7. Pannexin1 - Genstruktur (A), Membrantopologie (B) und Kanaleigenschaften (C). (A) Das murine Panx1-kodierende Gen ist auf Chromosom 11q14,3 lokalisiert. Es besteht aus fünf Exonen (oben). Die Panx1-mRNA (unten) ist 2,2 Kilobasen groß und besitzt im C- und N-Terminus nicht translatierte Bereiche (gelbe Boxen). Abbildung aus MacVicar und Thompson, 2010. (B) Panx1-Sekundärstruktur. Das Panx1-Protein besitzt vier transmembrane Domänen und cytosolisch liegende N- und C-Termini. An den extrazellulären Domänen (E1, E2) befinden sich jeweils zwei konservierte Cysteinreste (schwarze Kreise), an der E2 besitzt Panx1 eine Glykosylierungsstelle (roter Kreis mit Carbohydratbaum). Verändert nach Sosinsky *et al.*, 2011. (C) Panx1 bildet hexamere, großporige Einzelmembrankanäle, die einen Austausch von Molekülen bis zu einer Größe von 1,5 kDa zwischen dem Intrazellulärraum (Intraz.) und dem extrazellulären Medium (Extraz.) ermöglichen. Verändert nach Penuela *et al.*, 2012.

Allerdings besitzen die Pannexine hiervon zwei und nicht drei, wie die Connexine. Ebenfalls unterscheiden sich die Pannexine von den Connexinen durch mehrere Glykosylierungsstufen, die sich nachweislich in den extrazellulären Schleifen von Panx1 und Panx3 befinden (Penuela *et al.*, 2007).

Auch die **physiologischen Eigenschaften der Panx-Kanäle** heben sich deutlich von denen der Connexine ab. Panx1 bildet großporige, nicht-selektive Einzelmembrankanäle, die sehr hohe Einzelkanalleitfähigkeiten (500pS; Bao, 2004) aufweisen und ähnlich wie die Cx-Kanäle, kleinere Moleküle bis zu einer Größe von 1,5 kDa, wie z.B. ATP (Adenosintriphosphat), durchlassen (Abb. 1-7 C; Bosco *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2007). Es ist davon auszugehen, dass sie unter physiologischen Bedingungen geschlossen sind, da es sonst zum Verlust essentieller Metabolite und dem Zusammenbruch des intrazellulären Milieus kommen würde (Bao *et al.*, 2004). Eine Öffnung der Kanäle wird durch verschiedene Prozesse induziert, die häufig mit pathologischen Ereignissen in Verbindung gebracht werden (Bao *et al.*, 2004; Bruzzone *et al.*, 2005; Dvorianchikova *et al.*, 2012). Es wurde mehrfach gezeigt, dass Panx-Kanäle auch als Folge einer Aktivierung purinerger Rezeptoren (P2X₇, P2Y) öffnen (Iglesias *et al.*, 2008; Locovei *et al.*, 2007; Locovei *et al.*, 2006; Pelegrin und Surprenant, 2009; Spray *et al.*, 2006), wodurch ihnen eine Rolle bei interzellulären Kommunikationsmechanismen, durch Ausbreitung neuronaler Calciumwellen im zentralen Nervensystem, zugeordnet wird (Scemes *et al.*, 2007; Thompson und Macvicar, 2008).

1.4.2 Pannexin-Expression in der Retina

Die Expression von Panx1 und Panx2 ist auf mRNA (Panx1, Panx2) und Proteinebene (Panx1) in der Mausretina nachgewiesen (Dvorianchikova *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2005). Mittels *in situ*-Hybridisierungsstudien wurde die Expression beider Pannexine in den verschiedenen Schichten der Retina gezeigt (Dvorianchikova *et al.*, 2006). Quantitative PCR-Analysen zeigten eine besonders starke Akkumulation der Panx1- und Panx2-mRNA-Transkripte in den Ganglienzellen (Dvorianchikova *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2005). Histologische Untersuchungen der Panx-Proteinexpression in der Retina wurden bisher ausschließlich für Panx1 durchgeführt. Dvorianchikova *et al.* (2006) schildern eine besonders starke Expression von Panx1 in neonataler und junger, ca. 3 Wochen alter, Mausretina. In diesem Stadium ist die Panx1-Immunoreaktivität in allen nukleären Schichten der Retina sowie in der IPL und OPL lokalisiert und wird der Panx1-Synthese in Ganglien-, Amakrin- und

Horizontalzellen zugeordnet (Dvorianchikova *et al.*, 2006). Mit zunehmendem Alter verringert sich das Expressionslevel. In den älteren Tieren wurde vor allem in den Ganglienzellen eine erhöhte Panx1-Expression festgestellt (Dvorianchikova *et al.*, 2006). Die Panx1-Proteinexpression in adulten Tieren ist innerhalb der Zellsomata und in der IPL beschrieben (Dvorianchikova *et al.*, 2006).

Eine etwas genauere, subzelluläre Zuordnung der Panx1-Proteinexpression innerhalb der retinalen Zellen erfolgte im Zebrafisch (Prochnow *et al.*, 2009). Es wurde gezeigt, dass Panx1 in den Dendriten der Horizontalzellen lokalisiert ist, wo das Protein mutmaßlich am ephaptischen Feedbackmechanismus beteiligt sein könnte (siehe Abschnitt 1.3.3).

1.5 Retinitis Pigmentosa

Der Begriff Retinitis Pigmentosa (RP) beschreibt eine Gruppe erblicher, degenerativer Retinaerkrankungen, die durch einen irreversiblen Verlust der PR gekennzeichnet sind und aufgrund von Gemeinsamkeiten in Bezug auf klinische Symptome, elektroretinographische Phänotypen und genetische Ursachen zu diesem Begriff zusammengefasst wurden (Phelan und Bok, 2000). Mit einer Prävalenz von 1:4000 ist RP weltweit die häufigste, zur irreversiblen Erblindung führende Form degenerativer Erkrankungen der Netzhaut (Zobor und Zrenner, 2012). Der Beginn und der zeitliche Verlauf der Erkrankung sind individuell unterschiedlich und abhängig von dem genetischen Ursprung der retinalen Degeneration (Busskamp und Roska, 2011). Dieser ist sehr variabel und wird durch Mutationen in einer Vielzahl unterschiedlicher Gene verursacht (heterogen), die spezifisch in Stäbchen, Zapfen und Zellen des RPE exprimiert werden können (Phelan und Bok, 2000). Bisher sind 62 RP-verursachende Gene identifiziert worden (<https://sph.uth.edu/retnet>, Stand: Dezember 2012). In dieser Arbeit geht es um die am häufigsten auftretende RP-Erscheinungsform, die sogenannten **Stäbchen-Zapfen-Dystrophien** (Busskamp und Roska, 2011), die durch Defekte in Stäbchen-spezifischen Genen induziert werden (Phelan und Bok, 2000). Diese RP-Variante ist charakterisiert durch ein mutationsbedingtes primäres Absterben der Stäbchen, gefolgt von einer sekundären Degeneration der genetisch gesunden Zapfen. Die Gründe, die zu einem sekundären

Absterben der funktionellen Zapfen führen, sind bisher noch weitestgehend unklar (Buskamp und Roska, 2011). Dieser Punkt wird in Abschnitt 1.5.2 näher erläutert. Visuell führt der sequentielle Verlust der PR zu einem, zunächst bei Dunkelheit, verringerten Sehvermögen (Nachtblindheit) und anfänglichen Störungen des peripheren Gesichtsfeldes (Abb. 1-8 A, B).

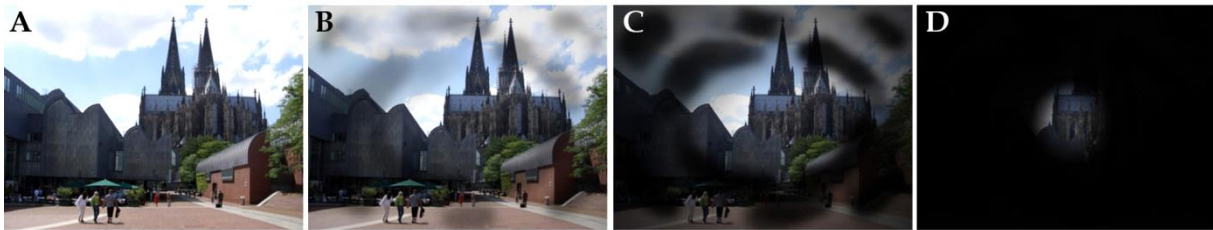


Abbildung 1-8. Beispiel für die zunehmende Sehbehinderung bei RP-Erkrankungen. (A) zeigt die Originalabbildung. (B-D) Wahrnehmung bei Patienten im anfänglichen (B), mittleren (C) und späten (D) RP-Stadium. Verändert nach <http://www.pro-retina.de/simulation/retinitis-pigmentosa>.

Die Einschränkungen in der Peripherie weiten sich zunehmend aus (Abb. 1-8 C), bis hin zu einem sich immer weiter verengenden Tunnelblick (Abb. 1-8 D). Diese ersten Symptome sind durch den primären Ausfall des Stäbchensystems bedingt (Phelan und Bok, 2000). In späteren Krankheitsstadien folgt mit dem Verlust des Zapfensystems eine Reduzierung der photopischen Wahrnehmung, der Sehschärfe und des räumlichen Auflösungsvermögens. Die Sehkraft lässt allmählich immer weiter nach und führt letztendlich zur vollständigen Erblindung der Patienten (Phelan und Bok, 2000).

Als eine sehr häufige Ursache der humanen Stäbchen-Zapfen-Dystrophien sind vor allem Mutationen innerhalb des *Rhodopsin*-Gens zu nennen (mehr als 10% aller humanen RP-Fälle; Berson *et al.*, 2001; Colley *et al.*, 1995; Rivolta *et al.*, 2002; Sohocki *et al.*, 2001). Rho ist als Sehpigment und Strukturprotein der AS essentiell für den Aufbau und die Funktionalität der Stäbchen (siehe Abschnitt 1.2.1; Mendes *et al.*, 2005). Über 120 verschiedene RP-auslösende Mutationen innerhalb dieses Gens sind mittlerweile identifiziert wurden (Krebs *et al.*, 2009). Abhängig von der Position des Gendefekts innerhalb des Moleküls, kommt es zu unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen der Erkrankung (Bessant *et al.*, 2001; Humphries, 1993; Wright, 1992).

1.5.1 Mechanismen des primären Stäbchenzelltods

1.5.1.1 Apoptotische Zelltodmechanismen

Die grundlegenden, zum Stäbchentod führenden zellulären Mechanismen sind bis heute nicht ausreichend aufgeklärt und werden kontrovers diskutiert. Da die Ausführung des Stäbchensterbens im retinalen Gewebe keine Anzeichen für entzündliche Reaktionen, wie bei der Nekrose zeigt, wurde ursprünglich angenommen, dass es sich um apoptotische Prozesse handelt (Chang *et al.*, 1993; Cottet und Schorderet, 2009; Doonan *et al.*, 2003; Reichel *et al.*, 2001). Apoptose ist eine aktive und energieverbrauchende Form des programmierten Zelltods. Durch extrinsische oder intrinsische Faktoren wird der zelluläre Abbau von beschädigten oder überflüssigen Zellen gesteuert, ohne dabei die Vitalität der benachbarten Zellen zu beeinflussen (Edinger und Thompson, 2004; Hengartner, 2000). Generell werden zwei verschiedene Apoptoseformen unterschieden, in denen entweder Caspasen im Zentrum des Zelltods agieren (Caspase-abhängige Apoptose; Abb. 1-9, grüne Umrandung) oder andere Proteine, die ausführenden Funktionen übernehmen (Caspase-unabhängige Apoptose; Abb. 1-9, magenta Umrandung).

Ein zentrales Ereignis apoptotischer Prozesse ist die Permeabilisierung der Mitochondrien, eingeleitet durch proapoptotische Proteine (z.B. Bax), wodurch mitochondriale Bestandteile, wie Cytochrome C (CytC) und der Apoptose-induzierender Faktor (AIF) in das Cytosol freigesetzt werden (Jürgensmeier *et al.*, 1998; Okuno *et al.*, 1998). AIF ist ein zentrales Protein bei der Ausführung des Caspase-unabhängigen Zelltods und translokalisiert nach Freisetzung aus den Mitochondrien in den Zellkern, wo es den Abbau der DNA (DNA-Fragmentierung) induziert (Sevrioukova, 2011). Im Zentrum der Caspase-abhängigen Apoptose stehen die Caspase-Proteasen, die als Proenzyme ubiquitär in Zellen exprimiert und u.a. durch CytC aktiviert werden (Kulikov *et al.*, 2012). Einige Caspasen agieren als Initiatoren (Casp-8, -9, -10, -12), die weitere proapoptotische Enzyme aktivieren oder als Effektorproteasen (Casp-3, -6, -7), die zum Abbau lebensnotwendiger Struktur- und Reparaturenzyme führen (Würstle *et al.*, 2012; Assuncao *et al.*, 2004; Slee *et al.*, 2001).

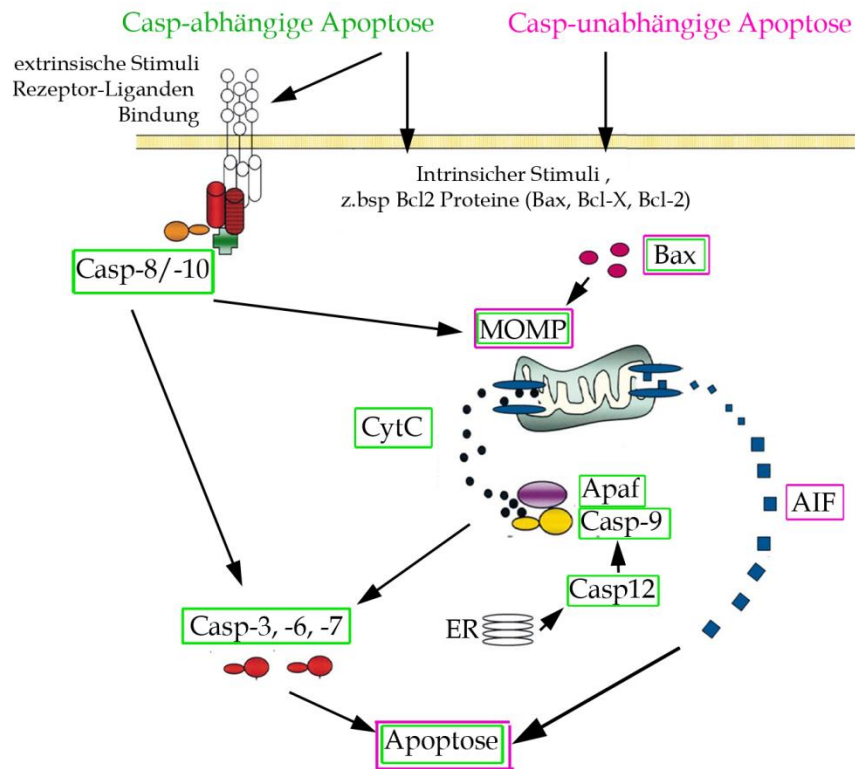


Abbildung 1-9. Apoptotische Zelltodmechanismen. Die Abbildung zeigt zelluläre Signalwege, die über Caspase-abhängige (grün umrandet) und Caspase-unabhängige (pink umrandet) Signalwege den apoptotischen Zelltod induzieren. Die Abbildung soll die Positionen, der in dieser Arbeit untersuchten Enzyme, verdeutlichen und zeigt vereinfacht dargestellt, die zum Verständnis der Arbeit wichtigen Proteine dieser Kaskaden. Caspase: Casp; CytochromeC: CytC; Apoptosis-Inducing Factor: AIF [engl], Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation: MOMP [engl.], Apoptosis-protease activating factor: Apaf [engl.]; Endoplasmatisches Retikulum: ER. Abbildung verändert nach Zeiss, 2003.

Basierend auf histologischen Untersuchungen und Analysen der DNA-Fragmentierung wurden apoptotische Prozesse für den Zelltod der Stäbchen vorgeschlagen (Chang *et al.*, 1993; Cottet und Schorderet, 2009; Doonan *et al.*, 2003; Reichel *et al.*, 2001). Neuere Studien zeigen allerdings, dass eine Inhibierung einzelner Bestandteile der apoptotischen Kaskade nicht die erwarteten neuroprotektiven Ergebnisse erzielen (Donovan und Cotter, 2002; Gomez-Vicente *et al.*, 2005; Yoshizawa *et al.*, 2002; Zeiss *et al.*, 2004). Demnach scheinen primär andere Prozesse in den Stäbchentod involviert zu sein.

1.5.1.2 Alternative Zelltodmechanismus

Ein alternativ vorgeschlagener, nicht-apoptotischer Zelltodmechanismus basiert auf umfangreichen enzymatischen Untersuchungen, die bisher verstärkt an der *Retinal*

degeneration1 (Rd1) -Maus durchgeführt wurden. Die Studien zeigen eine besonders starke Aktivierung von Enzymen, die nicht im klassischen Sinne mit apoptotischen Prozessen in Verbindung gebracht werden, wie den genregulatorisch agierenden Histon-Deacetylasen (HDAC; Sancho-Pelluz *et al.*, 2010; Sancho-Pelluz und Paquet-Durand, 2012). Zum Zeitpunkt der Stäbchendegeneration wurde außerdem eine Überaktivierung des Kernenzym Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP) und der cytosolischen Ca²⁺-abhängigen Cystein-Protease Calpain festgestellt (Kaur *et al.*, 2011; Paquet-Durand *et al.*, 2007a; Paquet-Durand *et al.*, 2007b; Sahaboglu *et al.*, 2010). Eine Hyperaktivierung dieser Enzyme wird auch im Zusammenhang mit nekrotischen Prozessen diskutiert (Baines, 2010; Paquet-Durand *et al.*, 2007a). Als „begriffliches Gegenstück“ zur Apoptose beschreibt die klassische Nekrose einen passiven Prozess, der durch den Verlust der Zellmembranintegrität gekennzeichnet ist, wodurch cytosolische Bestandteile in den extrazellulären Raum freigesetzt werden und entzündliche Reaktionen der Umgebung hervorrufen können (Baines, 2010; Edinger und Thompson, 2004). Zusammengefasst deuten die neueren Studien auf einen nicht-apoptotischen, alternativen und durch nekrotische Prozesse beeinflussten Zelltodmechanismus hin (Lohr *et al.*, 2006; Nicotera, 2002; Paquet-Durand *et al.*, 2007a; Sancho-Pelluz *et al.*, 2008).

1.5.2 Gründe für den sekundären Zapfentod

Auch die Mechanismen, die die Ausbreitung des Zelltods von den degenerierenden Stäbchen auf die funktionellen und gesunden Zapfen übertragen, sind nicht vollständig aufgeklärt (Busskamp und Roska, 2011). Es gibt verschiedene Ansätze, die eine Beteiligung unterschiedlicher Mechanismen am sekundären Zapfensterben vorschlagen (Abb. 1-10).

Die Studien von Punzo *et al.* (2009) lassen vermuten, dass der zunehmende Verlust der Stäbchen die Interaktionen zwischen Zapfen und RPE stört. Die dadurch **fehlende physikalische und physiologische Unterstützung** der Zapfen durch die RPE-Zellen und das Stäbchenumfeld, führt zu einer allmählichen Energieverarmung und Instabilität der Zapfen und induziert ihren sekundären Untergang (Punzo *et al.*, 2009). Eine andere Möglichkeit könnte der **Entzug eines neurotrophischen Faktors**

(*Rod-derived cone viability factor*, RdCVF [engl.]) sein, der in einer gesunden Retina kontinuierlich über Sekretion von den Stäbchen freigesetzt wird und essentiell für die Vitalität der Zapfen ist (Leveillard *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2009).

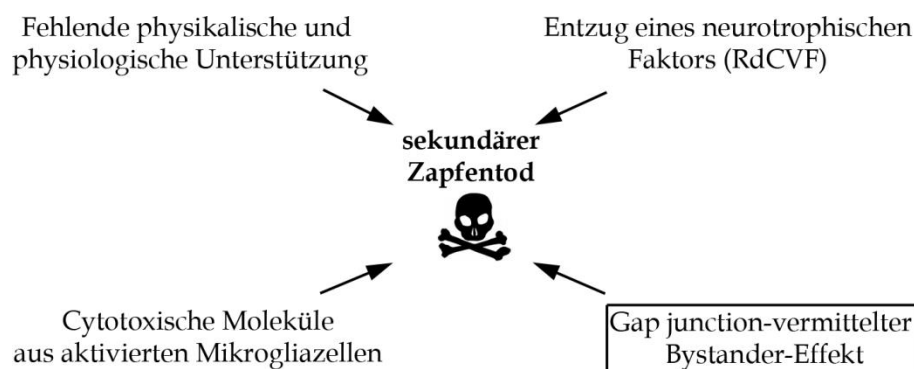


Abbildung 1-10. Ursachen des sekundären Zapfentods. Überblick über die verschiedenen Mechanismen, die als Erklärung für den Übergang des Zellsterbens von den Stäbchen auf die Zapfen diskutiert werden. Die Bystander-Hypothese ist ein zentraler Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Andere Studien beschreiben, dass die Freisetzung **cytotoxischer Moleküle aus aktivierten Mikrogliazellen** in den Prozess der sekundären Zapfendegeneration involviert sein könnte (Gupta *et al.*, 2003; Roque *et al.*, 1999). Eine andere, häufig in Betracht gezogene Möglichkeit liefert der durch **GJ-vermittelte Bystander-Effekt** (Ripps, 2002). Dieser soll im nächsten Kapitel näher erläutert werden.

1.5.3 Die Bystander-Hypothese

Die Existenz eines Bystander-Effekts ist *in vitro* und *in vivo* in verschiedenen Studien gezeigt worden und ist allgemein als Mechanismus der Ausbreitung des Zelltods anerkannt (Peixoto *et al.*, 2009; Cotrina *et al.*, 1998; Frantseva *et al.*, 2002; Freeman *et al.*, 1995; Rami *et al.*, 2001). Der Bystander-Effekt beschreibt die Übertragung toxischer Substanzen zwischen benachbarten Zellen (Freeman *et al.*, 1995). Dies kann über endo- und phagocytotische Prozesse oder durch direkten Signaltransfer über GJ- Kanäle erfolgen.

Die Hypothese, dass ein Bystander-Effekt den Zelltod von den Stäbchen auf die Zapfen übertragen könnte, wurde 2002 von H. Ripps aufgestellt. Die Bystander-Hypothese besagt, dass während des Absterbens der Stäbchen, cytotoxische Faktoren

generiert werden, die durch GJ in benachbarte Zapfen gelangen und dort ebenfalls den Zelltod induzieren (Abb. 1-11).

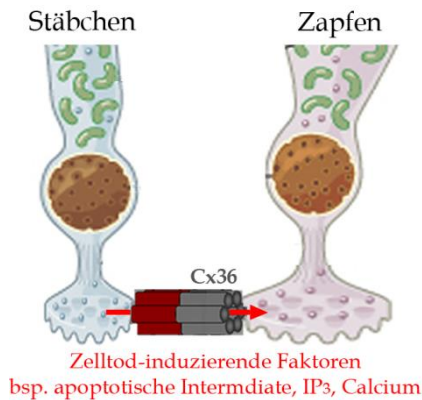


Abbildung 1-11. Die Bystander-Hypothese. Schematische Darstellung der elektrischen Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen. Die *Gap Junction*-Kanäle werden in den Zapfenpedicles von Cx36 gebildet (grau). Der Kopplungspartner von Cx36 auf der Stäbchenseite (rot) wurde bisher nicht identifiziert. Der Bystander-Hypothese besagt, dass durch diese Kanäle Zelltod-induzierende Faktoren von den Stäbchen auf die gesunden Zapfen übertragen werden und so den sekundären Zelltod der genetisch gesunden Zapfen einleiten. Inositol-1,4,5-trisphosphat: IP₃. Verändert nach <http://www.britannica.com>.

Die Bystander-Hypothese wird durch Studien unterstützt in denen die Beteiligung der Stäbchen-Zapfen-GJ beim retinalen Zelltod in einem anderen Zusammenhang untersucht wurde (Cusato *et al.*, 2003; Paschon *et al.*, 2012). Entwicklungsstudien zeigten, dass in absterbenden Neuroblasten GJ-permeable Signale generiert werden und während der retinalen Entwicklung den Zelltod auf benachbarte Zellen übertragen (Cusato *et al.*, 2003). Studien an einem Traumamodell der Hühnerretina zeigten, dass die Ausbreitung des Zelltods nach mechanischer Läsion über GJ erfolgt. Eine Blockierung der GJ-Kanäle mit Chinin wirkt dabei neuroprotektiv auf die angrenzenden Zellen (Paschon *et al.*, 2012).

Eine Untersuchung des Bystander-Effekts im Zusammenhang mit dem sekundären Zapfensterben bei RP ist bisher noch nicht beschrieben.

1.5.4 Mausmodelle für Retinitis Pigmentosa

Da RP sehr vielfältig in Bezug auf die Ursache und den Phänotyp ist und auch das Material für zelluläre Untersuchungen der humanen RP-Erkrankungen limitiert ist, stellen Tiermodelle eine adäquate Alternative zur Grundlagenforschung von RP dar (Sancho-Pelluz *et al.*, 2008). Gegenwärtig gibt es viele unterschiedliche, transgene und natürlich entstandene Modelle, die verschiedene Situationen der humanen RP-Erkrankung repräsentieren. In der vorliegenden Dissertation werden zur Untersuchung der RP-Mechanismen zwei Mausmodelle (Rhodopsin-knockout-Maus,

Rd1-Maus) verwendet, in denen verschiedene Mutationen die rezessive Form einer humanen RP-Variante hervorrufen (Rosenfeld *et al.*, 1992). Der Phänotyp des Rhodopsin-knockout-Modells unterscheidet sich von dem der Rd1-Maus vor allem durch den Zeitpunkt des Krankheitsbeginns und den temporären Verlauf der Photorezeptordegeneration.

1.5.4.1 Rhodopsin-knockout-Maus

Die Rhodopsin-knockout ($Rho^{-/-}$)-Mauslinie ist ein transgenes RP-Mausmodell (Humphries *et al.*, 1997). Durch gezielte Entfernung des *Rhodopsin*-Gens wird die Expression des Stäbchensehpigments und Strukturproteins vollständig inhibiert, wodurch eine langsame Form der Photorezeptordegeneration induziert wird (Humphries *et al.*, 1997). Bis auf das Fehlen von Stäbchenaußensegmenten entwickelt sich die Retina in der $Rho^{-/-}$ -Maus zunächst normal. Erst nach Beendigung der retinalen Entwicklung setzt die Degeneration der Stäbchen ein, gefolgt von einem späteren Beginn und langsamen Verlauf des sekundären Zapfensterben (Abb. 1-12; Humphries *et al.*, 1997).

Physiologische Studien zeigten, dass die Stäbchen aufgrund des fehlenden Sehpigments in keiner Lebensphase funktionsfähig sind, während das vollständig entwickelte Zapfensystem im Alter zwischen vier und sechs Wochen eine normale Funktionalität aufweist (Humphries *et al.*, 1997; Jaissle *et al.*, 2001). In älteren Tieren zeigt das photopische Elektroretinogramm (ERG) Beeinträchtigungen, die mit dem einsetzenden Abbau der Zapfen-Außensegmente einhergehen und die beginnende Zapfendegeneration anzeigen (Jaissle *et al.*, 2001). Der Beginn der Zapfendegeneration ab der 6. Lebenswoche überschneidet sich demnach zeitlich mit der Hauptphase des Stäbchensterbens, die bis zu einem Alter von 17 Wochen beschrieben ist (Abb. 1-12; Punzo *et al.*, 2009). Aufgrund der normalen Entwicklung des Zapfensystems, bei gleichzeitiger „nicht-Funktionalität“ der Stäbchen, wird dieses Modell häufig zur Untersuchung der reinen Zapfenfunktion verwendet (Jaissle *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu sind in dieser Mauslinie, der exakte Verlauf, die Reaktion der nachgeschalteten Neurone und die zellulären Mechanismen während der Photorezeptordegeneration noch nicht detailliert untersucht.

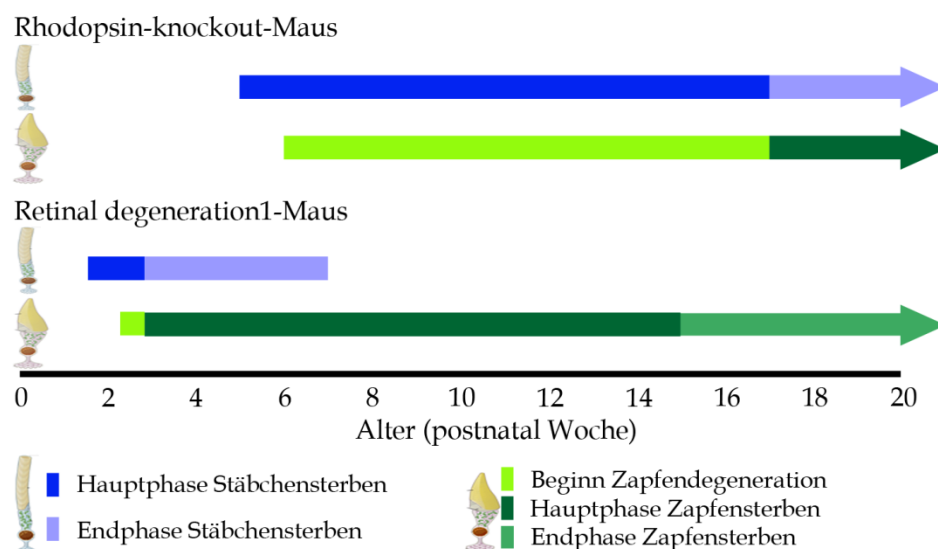


Abbildung 1-12. Zeitlicher Verlauf der unterschiedlichen Phasen des Stäbchen- (blau) und Zapfensterbens (grün) im Vergleich zwischen Rhodopsin-knockout- und Rd1-Maus. Die Hauptphase des Stäbchensterbens ist mit einem dunkelblauen Balken, die Endphase mit einem hellblauen Balken dargestellt. Der Beginn der Zapfendegeneration (hellgrüner Balken) ist durch den einsetzenden Verlust der Zapfenfunktionalität und der Zapfen-Außensegmente geprägt. Die Hauptphase der Zapfensterbens ist dunkelgrün gekennzeichnet und die Endphase, in der noch wenige Zapfen vorhanden sind, in olivgrün dargestellt. Die Pfeile an der rechten Seite deuten an, dass die entsprechenden Phasen in 20 Wochen alten Tieren noch nicht abgeschlossen sind. Aus dem Diagramm wird der unterschiedliche zeitliche Degenerationsverlauf zwischen dem Rhodopsin-knockout- und dem Rd1-Modell deutlich. Eine Überlappung der Hauptphase des Stäbchensterbens mit dem Einsatz der Zapfendegeneration ist in beiden Modellen ersichtlich. Photorezeptoren verändert nach <http://www.britannica.com>.

1.5.4.2 *Retinal degeneration1*-Maus

Die Rd1-Maus besitzt eine natürlich entstandene Mutation in Exon 7 der β -Untereinheit der Stäbchen-spezifischen Phosphodiesterase6 (*Pde6b*). Durch die Mutation im *Pde6b*-Gen kommt es zum Funktionsverlust dieses Enzyms, das (wie Rho) in die Signaltransduktionskaskade der Stäbchen involviert ist (siehe Abschnitt 1.2.1; Bowes *et al.*, 1990). Die Dysfunktion der *Pde6b* führt zu einem sehr frühen, bereits während der Entwicklung einsetzenden, Absterben der PR und zeigt einen aggressiven und sehr schnellen Verlauf der retinalen Degeneration. Bereits im Alter von postnatal Tag (p) 11 beginnt die Hauptphase des Stäbchensterbens, die bis p20 definiert ist (Punzo *et al.*, 2009). Die Hauptphase des Zapfensterbens beginnt ebenfalls sehr früh an p21 und erfolgt über einen Zeitraum von ca. 4 Wochen (Abb. 1-12; Punzo *et al.*, 2009). Aufgrund des Defekts in dem *Pde6b*-Gen zeigt die Rd1-Retina keine Antworten im Stäbchen-ERG. Eine reduzierte, durch Zapfen hervorgerufene,

ERG-Antwort ist bis zu einem Alter von p16 detektierbar. Der Verlust des Zapfen-ERGs nach p16 deutet auf die ersten, in diesem Alter stattfindenden, degenerativen Veränderungen des Zapfensystems hin (Strettoi *et al.*, 2003; Strettoi *et al.*, 2002). Dadurch überschneidet sich auch in diesem Modell die Hauptphase des Stäbchensterbens (p11 bis p20) mit dem Beginn des Zapfenuntergangs (ab p16; Abb. 1-12).

Die Rd1-Maus repräsentiert das, bis heute, am besten charakterisierte Tiermodell, das zur Erforschung von RP verwendet wird (Sancho-Pelluz *et al.*, 2008). Der Verlauf der Photorezeptordegeneration, die dadurch induzierte Reorganisation der Sekundärneurone und die am Zelltod-beteiligten Mechanismen, sind in der Rd1-Maus bereits sehr gut beschrieben, wodurch sich dieses Modell zur Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die Photorezeptordegeneration eignet und Vergleiche zur gängigen Literatur möglich sind.

1.6 Zielsetzung

In der äußeren Retina findet mit der Aufnahme der Lichtreize und den ersten retinalen Verschaltungsstationen in der OPL eine primäre Selektion und Einteilung der visuellen Information statt. Intrazelluläre Signalwege und interzelluläre Kommunikation über Einzelmembran- und GJ-Kanäle spielen bei den physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle, können unter pathologischen Bedingungen aber auch am Absterben von retinalen Zellen beteiligt sein. Die vorliegende Arbeit ist in zwei, voneinander unabhängige Hauptprojekte unterteilt, die unterschiedliche Aspekte der zellulären Kommunikation beleuchten. Im 1. Hauptprojekt sollte die Lokalisation und Funktion des Einzelmembrankanalbildenden Proteins Panx1 unter physiologischen Bedingungen charakterisiert werden. Im 2. Hauptprojekt sollten zelluläre Mechanismen und die Auswirkung interzellulärer Kommunikation durch GJ-Kanäle vor dem Hintergrund pathologischer Ereignisse untersucht werden.

1.6.1 Lokalisation und Funktion von Pannexin1 in der Mausretina

Die mRNA-Expression des Kanal-bildenden Proteins Panx1 ist in verschiedenen Zelltypen der Mausretina nachgewiesen (Dvorianchikova *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2005). Panx1-Immunoreaktivität wurde in den verschiedenen retinalen Schichten gezeigt und grob der Proteinexpression in Ganglien-, Amakrin- und Horizontalzellen zugeordnet (Dvorianchikova *et al.*, 2006). Dennoch ist bis heute keine genaue, subzelluläre Lokalisation der Panx1-Proteine in der Mausretina erfolgt. Auch die physiologische Rolle der Panx1-Expression in der Retina ist bisher ungeklärt. Mit einer zur Verfügung stehenden Panx1-LacZ-Mauslinie (Anselmi *et al.*, 2008) und im Zellsystem etablierten Panx1-Antikörpern (Penuela *et al.*, 2007), sollten in diesem Projekt die folgenden Ziele erreicht werden:

- Untersuchung der Panx1-LacZ-Maus auf eine putative Expression von Panx1-Isoformen
- Spezifitätsanalyse der Panx1-Antikörper in retinalem Gewebe
- Identifizierung Panx1-exprimierender Zellen in der Mausretina
- Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Panx1
- Untersuchung der physiologischen Auswirkungen einer Panx1-Defizienz auf das retinale Netzwerk
- Aufstellung einer Hypothese zur physiologischen Funktion von Panx1 in der Mausretina

Um die Ziele zu erreichen, sollten verschiedene histologische Techniken, sowie molekularbiologische und biochemische Untersuchungen durchgeführt werden. Für die funktionellen Untersuchungen sollten unterschiedliche ERG-Messverfahren (*in vivo*- und *in vitro*-ERGs) angewandt werden.

1.6.2 Mechanismen genetisch bedingter Photorezeptordegeneration

RP bis heute nicht therapierbar, wenngleich die Forschung im letzten Jahrzehnt, vor allem durch die Verfügbarkeit verschiedener humaner RP-Tiermodelle, enorme Fortschritte erzielt hat. Durch Verwendung von RP-Mausmodellen sollten Mechanismen, die am **primären Stäbchensterben** beteiligt sind, identifiziert (1.6.2.1)

und die Beteiligung der Stäbchen-Zapfen-Kopplung auf die **sekundäre Zapfendegeneration** untersucht werden (1.6.2.2).

1.6.2.1 Untersuchungen der primären Stäbchendegeneration in der Rhodopsin-knockout-Maus

Um therapeutische Ansätze zu entwickeln, die das primäre Absterben der Stäbchen aufhalten, ist es notwendig, die dazu führenden zellulären Mechanismen auf molekularer Ebene zu verstehen. Durch die Vielfalt der RP-verursachenden Gendefekte ist es notwendig, vor allem die Mechanismen zu kennen, die unabhängig vom auslösenden Gendefekt, in den verschiedenen RP-Formen das Absterben der Stäbchen induzieren und dadurch als putative therapeutische Ziele in Frage kommen (Chang *et al.*, 1993; Doonan *et al.*, 2003). Zu diesem Zweck wurde eine umfangreiche Studie an verschiedenen RP-Mausmodellen durchgeführt. Meine Aufgabe in dieser Studie war die Identifizierung aktiver Zelltodmechanismen beim primären Stäbchensterben in der Rho^{-/-}-Maus. Folgende Ziele wurden für dieses Projekt definiert:

- Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs der Degeneration
- Quantifizierung des Photorezeptorzelltods in verschiedenen Altersstufen, um einen geeigneten Zeitpunkt zu ermitteln, an dem die am Stäbchensterben beteiligten Prozesse untersucht werden können
- Untersuchung verschiedener Zelltodmarker, um die beim primären Stäbchensterben aktiven Zelltodmechanismen zu identifizieren:
 - Beteiligung apoptotischer Zelltodmechanismen
 - Beteiligung alternativer Zelltodmechanismen
 - Untersuchung metabolischer Veränderungen
- Beschreibung eines putativen Zelltodmechanismus in der Rho^{-/-}-Maus

Die Untersuchungen in der Rho^{-/-}-Maus sollten quantitativ mit immunhistologischen Methoden und verschiedenen Enzymaktivitätsassays durchgeführt werden.

1.6.2.2 Einfluss der Stäbchen-Zapfen-Kopplung auf die sekundäre Zapfendegeneration in Mausmodellen für Retinitis Pigmentosa

Wie in Abschnitt 1.5.2 erläutert, gibt es verschiedene Ansätze, die das sekundäre Absterben der Zapfen bei RP erklären. In diesem Projekt sollte die Beteiligung eines durch GJ-vermittelten Bystander-Effekts (Bystander-Hypothese) untersucht werden (siehe Abschnitt 1.5.3).

Um den mutationsunabhängigen Einfluss der GJ auf **verschiedene Phasen der sekundären Zapfendegeneration** zu untersuchen, sollten zwei Mausmodelle analysiert werden, die sich im Gendefekt, dem Einsatz und dem temporären Verlauf der Photorezeptordegeneration deutlich unterscheiden:

1. Die Rhodopsin-knockout-Maus als langsames Modell der Photorezeptordegeneration sollte verwendet werden, um den **Beginn der sekundären Zapfendegeneration** zu untersuchen
2. Die Mausmutante mit der Rd1-Mutation sollte aufgrund des sehr frühen Einsatzes und des schnellen Degenerationsverlaufs zur Untersuchung **späterer Ereignisse der Zapfendegeneration** verwendet werden.

Um den Effekt der GJ-Kommunikation auf den Verlauf der sekundären Zapfendegeneration zu untersuchen, sollten immunohistologische Vergleiche und quantitative Analysen zwischen RP-Modellen mit intakter Kopplung und Tieren mit defizienter Stäbchen-Zapfen-Kopplung durchgeführt werden. Eine Unterbrechung der Kopplung zwischen den beiden Photorezeptorsubtypen kann durch Deletion des Zapfenconnexins Cx36 hervorgerufen werden (siehe Abschnitt 1.3.2; Deans *et al.*, 2002; Trümppler *et al.*, 2008).

Zum Testen der Bystander-Hypothese in der Mausretina wurden folgende Ziele definiert:

- Untersuchung der Cx36-Expression in Rho^{-/-} und Rd1-Mäusen zum Nachweis der Stäbchen-Zapfen-Kopplung
- Generierung von Rho^{-/-} und Rd1-Mäusen, in denen die Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen unterbrochen ist (Kreuzung mit Cx36-knockout-Mäusen)
- Untersuchung der Auswirkungen einer Cx36-Defizienz auf unterschiedliche Ereignisse der sekundären Zapfendegeneration (Beginn, Endphase):

- Morphologische Veränderungen der äußeren Retina und der Sekundärneurone
- Verlust der Zapfen-AS (frühes Ereignis; Beginn der Zapfendegeneration)
- Verlust der Zapfen (spätes Ereignis; Endphase der Zapfendegeneration)
- Zapfensterberate (spätes Ereignis; Endphase der Zapfendegeneration)

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte, Hilfsmittel, Chemikalien, Reagenzien

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Hilfsmittel, Chemikalien und Reagenzien sind im Anhang 8.2 in den Tab. 8-1 und Tab. 8-2 zusammengefasst.

2.1.2 Puffer, Lösungen und Medien

Die verwendeten Lösungen wurden ausschließlich in bidestilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. Sofern in Tab. 8-2 nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von Carl Roth GmbH, Karlsruhe verwendet.

3xSDS Probenpuffer: 0,9 M Tris-HCl, pH6,8, 3 ml Glycerin, 0,1% Bromphenolblau, 0,3 ml β -Mercaptoethanol, 90 mg/ml SDS, auf 10 ml auffüllen

β -Galaktosidase-Färbelösung: β -Galaktosidase-Lösung mit 5 mM K₃[Fe(CN₅)], 5 mM K₄[Fe(CN₆)], 1 mg/ml 5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranoside (X-Gal)

β -Galaktosidase-Lösung: 0,1 M PB, pH 7,4; 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA; 0,01% Natriumdeoxycholat; 0,02% Nonidet P40

Bradfordreagenz: 0,1 mg/ml Coomassie-Blau G-250, 5% Ethanol, 8,5% Phosphorsäure

Blockierlösungen:

ECL-Nachweis: 5% Milchpulver in 0,1% TBS-Tween

TUNEL-Blockierung: 10% NGS, 1% BSA, 1% Fisch-Gelatin in 0,003% PBST

Immunohistologie: 10% NDS oder 10% NGS in 0,3% TBST

CTA-Blockierung: 5% ChemiBLOCKER, 0,5% Triton X-100, 0,05% NaN₃

Calpain-Reaction-Buffer (CRB): 25 mM HEPES, 65 mM, KCl, 2 mM MgCl₂, 1,5 mM CaCl₂, 2 mM DTT in ddH₂O

Concanavalin A- (ConA-) Lösung: 1 mg/ml ConA in 0,1 M PBS

DAB-Reaktionsmix: 400 μ l 20% Glucose, 400 μ l 0,4 % NH₄Cl, 3,2 ml 1% Nickelammoniumsulfat, 40 mg DAB, 40 μ l Glucoseoxidase in 40 ml PB

DEPC-H₂O: 0,1% DEPC (v/v) in ddH₂O

DMEM-Zellkulturmedium: 1 x DMEM, 7,5% Natrium Bicarbonat, 100 U Penicillin/Streptomycin, 200 mM Glutamin, 100 mM Hepes

DMEM/FCS/DnaseI-Lösung: 25,6 ml DMEM, 10% FCS, 100 U/ml DnaseI; steril filtrieren

Extrazellulärlösung: 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1,6 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 10 mM D-Glucose, pH-Einstellung auf pH 7,4 durch Carbogen-Begasung

HDAC-Assaypuffer: 50 mM Tris/HCl, pH 8, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA

HDAC-Entwickler: 0,5 µl HDAC Developer, 500 µM NAD⁺, 0,1% Nonidet P40 in HDAC- Assaypuffer

HDAC-Substratmix: 200 µM Fluor de Lys Substrat, 500 µM NAD⁺, 0,1% NP₄₀ in HDAC-Assaypuffer

Homogenisierungspuffer 2, pH 7,4: 50 mM Tris/HCl, 2 µg/ml Leupeptin, 2 mM EGTA, 5 µg/ml Aprotinin, 2 mM EDTA, 2 mM PMSF, 0,1 mM Na₃VO₄, 1 mM DTT

Lösung A: 0,1 mM EDTA, 100 mM Hepes, 1 ml Antibiotika, 100 U Antibiotika in HBSS ohne Calcium und Magnesium

PB-Puffer (pH 7,4), 0,2M: 0,2 M Na₂HPO₄-Lsg, pH einstellen mit 0,2 M NaH₂PO₄, Verhältnis ca. 4:1

PBS-Puffer (pH, 7,4): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,4 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄

0,3%/0,03% PBST, pH 7,4: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,4 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 0,3%/0,03% Triton X-100

Papain-Lösung: 20 U/ml Papain, 1 mM Cystein (pH 7,3), auf 1 ml auffüllen mit HBSS-Lsg (beinhaltet 0,1 mM EDTA, 100 mM Hepes, 100 U Antibiotika)

PARP-Reaktionsmix: 10 mM MgCl₂, 1 mM Dithiothreitol, 5 µM biotinyliertes NAD⁺ in 100 mM Trispuffer mit 0,2% Triton X-100, pH 8,0

Ponceau-S-Färbelösung: 2% Ponceau-S, 3% Essigsäure

ProteinaseK-Lösung (Genotypisierung): 1,21 g Tris, 3,73 g KCl, 10 mg Gelatine in 5 ml ddH₂O, pH auf 8,3 einstellen, autoklavieren, anschließend 450 µl 0,45% Nonidet P40, 450 µl 0,45% Tween 20 hinzufügen

ProteinaseK/Tris-HCl-Lösung (TUNEL-Assay): 2 µg/ml ProteinaseK in Tris/HCl-Lsg, pH 7,6

Ponceau-S-Lösung: 2% Ponceau-S, 3% Essigsäure in ddH₂O

Quenching-Lösung.: 36% Methanol, 9% 30%-iges H₂O₂ in 0,1% PBST

Ringer-Lösung, pH 7,4: 137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 1,8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM D-Glucose, 5 mM HEPES

Ringer-Lösung, pH 7,4 (Carbogen begast): 125 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1,6 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 10 mM D-Glucose

Sammelgel: 2,9 ml ddH₂O, 0,75 ml 30% Acrylamid, 1,25 ml 1,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 40 µl 10% APS, 20 µl TEMED

SDS-Laufpuffer: 14,4 mg/ml Glycin, 3 mg/ml Tris, 1 mg/ml SDS

SDS-Probenpuffer: 3 ml Glycin, 0,3 ml β-Mercaptoethanol, 0,9 g SDS, 3,75 ml 0,5 M Tris, pH 6,8, ad. 10 ml mit ddH₂O

Stripp1-Lösung, pH 8,8: 0,01 M Tris/HCl, pH 6,8 (w/v), 1% SDS (w/v), 10 mM β-Mercaptoethanol

Stripp2-Lösung, pH 3: 0,1 M Tris-Natriumcitrat Dihydrat (w/v), 1 % SDS (w/v), 15 mM β-Mercaptoethanol

TBS, pH 7,4: 20 mM Tris, 150 mM NaCl

0,3%/0,03% TBST, pH 7,4: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,3%/0,03% Triton X-100

TBE-Puffer, pH 8,2: 89 mM Tris (w/v), 89 mM Borsäure (w/v), 2 mM EDTA (w/v)

Tris-HCl, pH 7,6: 0,05 M Tris-HCl (w/v)

TTBS, pH 7,4: 20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,2 % Tween 20

Transferpuffer: 3 mg/ml Tris, 14,4 mg/ml Glycin, 0,01% SDS

Trenngel, 8%: 4,35 ml ddH₂O, 2,4 ml 30% Acrylamid, 2,25 ml 1,5M Tris/HCl, pH 8,8, 15 µl 10% APS, 15 µl TEMED

Trenngel 10%: 3,75 ml ddH₂O, 3 ml 30% Acrylamid, 2,25 ml 1,5M Tris/ HCl, pH 8,8, 15 µl 10% APS, 15 µl TEMED

2.1.3 Versuchstiere

Die Haltung und das Töten der Versuchsmäuse für die Untersuchungen des retinalen Gewebes erfolgten in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland und wurden entsprechend der Tierschutzrichtlinien der Universität Oldenburg und der Universität Tübingen durchgeführt. In dieser Arbeit wurden verschiedene transgene Mauslinien und eine natürlich entstandene Mausmutante verwendet, die in Tab. 2-1 aufgelistet sind. Für Kontrollexperimente wurden jeweils gleichaltrige Tiere von zwei unterschiedlichen Wildtyp (Wt) - Stämmen verwendet: C57Bl6/N (Charles River, Wilmington, USA) und C3A.BliA-PDE6b+/J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME).

Tabelle 2-1. Verwendete transgene Mauslinien und natürlich entstandene Mausmutanten(*)

Name	Wildtyp-Hintergrund	Alter der Versuchstiere	Referenz
Panx1-knockout-Maus (Panx1 ^{-/-} -Maus)	C57Bl6/N	2 - 6 Monate	Anselmi et al., 2008; Bargiotas et al., 2011
Connexin36-knockout-Maus (Cx36 ^{-/-} -Maus)	C57Bl6/N	siehe 2.1.4	Güldenagel et al., 2001
Rhodopsin-knockout-Maus (Rho ^{-/-} -Maus)	C57Bl6/N	2, 4, 6, 9, 12, 17, 20 Wochen	Humphries et al., 1997
Retinal degeneration1-Maus(*) (Rd1-Maus)	C3A.BliA-PDE6b+/J	siehe 2.1.4	Bowes et al., 1990

2.1.4 Generierung der Rho^{-/-}Cx36- und der Rd1Cx36-Mauslinie

Um zu untersuchen, welche Auswirkung die unterbrochene Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen auf die sekundäre Zapfendegeneration hat, wurden die Rho^{-/-}- und Rd1-Maus mit Cx36^{-/-}-Tieren gekreuzt, wodurch Rho^{-/-}- und Rd1-Tiere

entstanden, die eine heterozygote Deletion von Cx36 trugen. Die Rho^{-/-}Cx36^{+/-} bzw. Rd1Cx36^{+/-}-Generation wurde jeweils untereinander gekreuzt, um homozygote Cx36-exprimierende und Cx36-defiziente Geschwistertiere der beiden RP-Modelle zu erhalten. Um Unterschiede im genetischen Hintergrund zu reduzieren, wurden die vergleichenden Untersuchungen ausschließlich an Geschwistertieren durchgeführt. Rho^{-/-}Cx36^{-/-} und Rho^{-/-}Cx36^{+/+}-Tiere wurden im Alter von 5, 9, 12 und 17 Wochen analysiert, die Rd1Cx36^{-/-} und Rd1Cx36^{+/+}-Geschwistertiere mit 15, 21 und 30 Tagen.

2.2 Gewebepräparationen

2.2.1 Augenbecherpräparation und Herstellung von vertikalen Kryoschnitten

Die Versuchstiere wurden mit CO₂ narkotisiert und durch anschließenden Genickbruch getötet. Die Augen der Mäuse wurden beidseitig entnommen und in Ringer-Lösung präpariert. Entlang der *Ora serrata* wurde der Augenbecher geöffnet. Kornea, Linse und Glaskörper wurden entfernt. Die Augenbecher wurden:

- für immunohistologische Markierungen 2 × 10 Minuten (min) in 2% PFA in 0,1 M PBS oder für 60 min in 4% PFA in 0,1 M PBS fixiert
- für den TUNEL-*Assay* und HDAC-Aktivitätsnachweis wurden die Augenbecher ebenfalls 60 min in 4% PFA in 0,1 M PBS fixiert

Anschließend wurden die Augenbecher in PBS (3 × 10 min) gewaschen und zum Gefrierschutz in ansteigender sucrosehaltiger PBS-Lösung (Lsg; 10%, 20%, 30%) inkubiert und über Nacht in 30%-iger Sucrose-PBS-Lsg bei 4°C gelagert. Unter der Atmosphäre von flüssigem Stickstoff wurden die Augenbecher in Kryomatrix eingebettet und bei -20°C gelagert. Zum Aktivitätsnachweis von PARP und Calpain wurden die Augen entnommen, direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend unfixiert in Kryomatrix eingebettet. Am Gefriermikrotom wurden vertikale Gefrierschnitte (18-20 µm für immunohistologische Markierungen; 12 µm für quantitative Analysen) hergestellt.

2.2.2 Herstellung von Flachpräparaten (Isolierung der Retina)

Um die Retina zu isolieren, wurde zunächst eine Augenbecherpräparation, wie unter 2.2.1 beschrieben, durchgeführt. Der Augapfel wurde seitlich eingeschnitten und die Retina vorsichtig von der umgebenden Sklera abgetrennt. Der Optische Nerv wurde durchgeschnitten und die Retina aus dem Augapfel gehoben. Die isolierte Retina wurde flach auf einem Objektträger ausgebreitet. Die dorsale Orientierung wurde durch einen kleinen Einschnitt markiert und die Retina anschließend für 40 min mit 2% PFA-PBS-Fixierlsg inkubiert, anschließend mit der Photorezeptorschicht nach oben, auf ein Filterpapier transferiert und in 0,1 M PB gelagert. Die folgenden Antikörper-Inkubationen der Retinen von Geschwistertieren und gleichaltrigen Wt-Kontrolltieren wurden parallel in der gleichen 6-Well-Platte durchgeführt.

2.2.3 Herstellung von isolierten Retinazellen (Gewebedissoziation)

Zur Herstellung isolierter Retinazellen wurde eine Retinadissoziation entsprechend der Beschreibung bei Feigenspan und Weiler (2004) durchgeführt. Die Retinen von einer Maus wurden hierzu aus dem Augenbecher isoliert und 10 min in Lsg A inkubiert. Zur Denaturierung von Adhäsionsproteinen wurden die Retinen für 45 min in einer Papain-Lsg bei 37°C inkubiert. Die Papain-Lsg wurde abgenommen und die Zellen 5 min in DMEM/FCS/DNaseI-Lsg inkubiert und anschließend in DMEM gewaschen (10 min). Das Zellsuspensat wurde in 3 ml MEM aufgenommen und mittels fraktioniertem Triturieren mit einer Pasteurpipette dissoziiert. Zum Absetzen wurden jeweils 500 µl der dissoziierten Zellen auf ConA-beschichteten Deckgläschen ausgebracht und zur Anheftung der Zellen 30 min bei 37°C in einem CO₂-begasten Brutschrank inkubiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Genotypisierung der Versuchstiere

Die Genotypisierung der Versuchstiere erfolgte anhand von Schwanzspitzenbiopsien. Zur Extraktion der DNA wurden die Schwanzspitzen der Versuchstiere über Nacht (ü.N.) bei 55°C im Hybridisierungsofen in eine ProteinaseK-Lsg inkubiert. Anschließend wurde die ProteinaseK durch 10 min

kochen inaktiviert und der Schwanzspitzenansatz 5 min bei 13.000 rpm/Raumtemperatur (Rt) zentrifugiert. Die Polymerase-Kettenreaktion zur Genotypisierung der Versuchstiere wurde mit der *Top Taq DNA-Polymerase* entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt und in 2%-igen Agarosegelen ausgewertet (siehe Abschnitt 2.3.5 und 2.3.6). Die verwendeten Primer sind in Tab. 2-2 aufgelistet.

Genotypisierung der *Panx1*^{-/-}-Maus: Zum Nachweis des *Panx1*-Wt-Allels wurde ein Primerpaar verwendet, das innerhalb des *Panx1*-Gens einen Bereich zwischen dem *Panx1*-Intron und dem ersten Exon (*Panx1* Wtin und *Panx1* Wtex) amplifiziert. Diese PCR ergab ein Amplikon mit einer Größe von 300 Basenpaaren (Bp). Um das *Panx1*^{-/-}-Allel nachzuweisen, wurde der *Forward*-Primer (*Panx1*Wtin) mit einem, innerhalb des inserierten *LacZ*-Gens bindenden *Reverse*-Primer (*Panx1* lac) kombiniert. Die daraus resultierende Amplifikation ergab eine Bande von 630 Bp (Anselmi *et al.*, 2008). Die Genotypisierung der *Panx1*^{-/-}-Mauslinie wurde von Birthe Dorgau durchgeführt.

Tabelle 2-2. Primer die zur Bestimmung des *Panx1*-, *Cx36*-, *Rho*- und *Rd1*-Genotyps verwendet wurden. * in Bezug auf die verwendeten PCR Konditionen und / oder die Primersequenzen

Primerbezeichnung	Primersequenz 5'→3'	Referenz*
<i>Panx1</i> Wtin	GGA AAG TCA ACA GAG GTA CCC	Anselmi <i>et al.</i> , 2008
<i>Panx1</i> Wtex	CTT GGC CAC GGA GTA TGT GTT	
<i>Panx1</i> lac	GTC CCT CTC ACC ACT TTT CTT ACC	
<i>Cx36</i> I F	CTG TTC AAG GAC TGG TAA GCG CTG	Güldenagel <i>et al.</i> , 2001
<i>Cx36</i> E2 R	GTC TCC TTA CTG GTG GTC TCT GTG	
<i>Cx36</i> HPRT R	CAG TAA ATC GTT GTC AAC AGT TCC	
<i>Rho</i> E2 F	TCT CTC ATG AGC AGC CTA AAG	Humphries <i>et al.</i> , 1997
<i>Rho</i> E2 R	ATG CCT GGA ACC AAT CCG AG	
<i>Rho</i> pol2:neo R	TTC AAG CCC AAG CTT TCG CG	
<i>Rd1</i> -2.1 F	TGT TGC TCT GCG GTA AGA TG	Gimenez und Montoliu, 2001
<i>Rd1</i> -2.1 R	TCC CTG AGT CTG GGA TCA AT	
RD3	TGA CAA TTA CTC CTT TTC CCT CAG TCT G	
RD4	GTA AAC AGC AAG AGG CTT TAT TGG GAA C	

Genotypisierung der *Cx36*^{-/-}-Maus: Der PCR-Ansatz zum Nachweis des *Cx36*-Genotyps enthielt drei verschiedene Primersequenzen: einen *Cx36*-Intron-spezifischen *Forward*-Primer (*Cx36*I F) und einen *Cx36*-Exon2-spezifischen *Reverse*-

Primer (Cx36E2 R). Diese Kombination führte zu einem 510 Bp großen Wt-Amplikon. Ein alternativer *Reverse*-Primer (Cx36 HPRT R) bindet das transgen eingefügte *HPRT*-Minigen des mutierten Cx36-Allels und führte zur Synthese eines 230 Bp großen Amplikons (Güldenagel *et al.*, 2001).

Genotypisierung der *Rho*^{-/-}-Maus: Zur Genotypisierung wurden Kombinationen aus den in Tab. 2-2 dargestellten Primer verwendet. Primer, die an das Exon2 (RhoE2 F und RhoE2 R) des *Rhodopsin*-Gens binden, amplifizierten einen Bereich auf dem Exon2 des Wt-Allels mit einer Größe von 480 Bp. Eine Primerkombination aus den Exon2-spezifischen *Forward*-Primern und *Reverse*-Primern, die innerhalb der zum Expressionsabbruch-führenden transgenen Insertion binden, wurden verwendet, um das Rhodopsin-knockout-Allel mit einer Größe 304 Bp zu amplifizieren (Humphries *et al.*, 1997).

Genotypisierung der *Rd1*-Maus: Die Mutation der *Rd1*-Maus basiert unter anderem auf einer, in das erste Intron des *Pde6b*-Gens eingefügten viralen Sequenz, die zur Genotypisierung dieses Gendefekts genutzt wurde. Die PCR mit Primern, die innerhalb des Wt-Introns binden (*Rd1* 2.1F und *Rd1* 2.1R), ergab ein Amplikon mit einer Fragmentgröße von 204 Bp. Der Primer RD3 bindet ebenfalls innerhalb des Wt-Introns, während RD4 spezifisch an die virale Sequenz bindet. Entsprechend wurde durch die Primerkombination aus RD3 und RD4, das mutierte *Pde6b*-Gen detektiert. Die Kombination dieser Primer führte zu einer Vervielfältigung eines 533 Bp großen Amplikons (Gimenez und Montoliu, 2001).

2.3.2 Isolierung von mRNA

Zur Herstellung von cDNA der Mausretina wurden 2 Mausretinen isoliert (siehe Abschnitt 2.2.2). Unter Anwendung des *NucleoSpin RNA II Kits* wurde die retinale mRNA isoliert und entsprechend der Herstellerangaben extrahiert. Zur Herstellung von Einzelzell-cDNA wurden einzelne Zellen mit einer Patchpipette aufgesaugt. Die Pipette wurde hierzu mit 2,5 µg/µl TCEP in *RA1 lysis buffer*, aus dem oben genannten Kit, gefüllt. Die Zellen wurden anhand ihrer Morphologie den entsprechenden Zelltypen zugeordnet und eingesammelt: In den Proben der Bipolarzellen wurden jeweils 3-4 Zellen vereint, die Horizontalzell-Proben enthielten jeweils 1 Zelle. Nach

dem Einsaugen der Zellen wurde die Elektrode in einem 500 µl Reaktionsgefäß mit 20 U Rnase-Inhibitor (Rnasin) abgebrochen. Die Isolierung der mRNA aus den einzelnen Zellen erfolgte mittels des *NucleoSpin Kit RNA XS* entsprechend der Herstellerangaben. Nach der RNA-Isolierung wurde zum Verdau von Resten genomischer DNA-Kontaminationen eine DNaseI-Behandlung durchgeführt. Der Ansatz zum DNA-Verdau setzte sich wie folgt zusammen: 1 µg RNA; 1 µl Rnasin Plus® (40 U/µl), 1 µl *Dnase I-Reaktionspuffer*, 1 µl 10 x *DNase I Amplification Grade* (10 U/µl), ad. 10 µl mit nukleasefreiem Wasser. Der Ansatz wurde 15 min bei Rt inkubiert und durch Zugabe von 1 µl EDTA (25 mM) für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Sofern sie nicht im Anschluss gleich weiterverarbeitet wurde, wurde die isolierte RNA bei -80°C gelagert.

2.3.3 Konzentrationsbestimmungen von RNA und cDNA

Zur Bestimmung von der RNA- und cDNA-Konzentration in den Proben wurden photometrische Konzentrationsbestimmungen bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt.

2.3.4 Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Um die isolierte und verdaute Maus-mRNA aus der Retina bzw. den verschiedenen Zellproben in cDNA umzuschreiben, wurde die *Superscript III Polymerase* verwendet. Das Umschreiben erfolgte sofort am Anschluss an die, in 2.3.2 beschriebene, Isolierung der mRNA. Die Reaktionsansätze beinhalteten jeweils:

1 µg isolierte RNA, 1 µl Oligo(dT)-Primer (500 µg/µl), 1 µl dNTP-Mix, ad. 13 µl mit DEPC-H₂O. Der Reaktionsansatz wurde 5 min bei 65°C inkubiert und 1 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die folgenden Komponenten hinzugefügt: 4 µl 5x *First-strand Buffer*, 1 µl DTT (0,1 M), 1 µl Rnasin Plus ® (40 U/µl), 1 µl *Superscript III Reverse Transkriptase* (200 U/µl). Entsprechend der Herstellerangaben wurde der Transkriptionsansatz zum Umschreiben der RNA 60 min bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion für 15 min bei 70°C inaktiviert.

2.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation bestimmter Gene wurden Primerpaare hergestellt, die Bereiche des gewünschten Gens umspannen und spezifisch an das Zielgen binden, welches in der PCR-Reaktion amplifiziert werden sollte. Die Auswahl der Primersequenzen erfolgte mit dem Programm *Primer3 OligoAnalyzer 3.1* (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>). Die Synthese der Primerpaare wurde bei der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) in Auftrag gegeben. Die in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare zur Amplifikation von Panx1- (NM_019482), Cx57- (NM_010289) und β -Aktin-Sequenzen (NM_007393) aus cDNA sind in Tabelle 2-3 zusammengefasst.

Zur Detektion von Cx57 in den Horizontalzellen und zum Nachweis der Panx1-Expression in den Einzelzell-Proben wurde eine Nested-PCR durchgeführt, um unspezifische Amplifikationen möglichst gering zu halten und auch geringste Mengen an cDNA nachweisen zu können. Bei der Nested-PCR wird zunächst eine herkömmliche PCR durchgeführt, dessen Produkte als *Template* für eine zweite PCR mit den Nested-Primern eingesetzt wird (siehe Tabelle 2-3).

Tabelle 2-3. Zusammenstellung der verwendeten Primer zur Amplifikation von cDNA. Die Primerpaare, die für die Einzelzell-PCR Analysen eingesetzt wurden, sind mit einem Sternchen gekennzeichnet. Primer für die „Nested“-PCR sind entsprechend bezeichnet.

Primerbezeichnung	Primersequenz 5'→3'	Amplikongröße cDNA/ gDNA (Bp)
β -Aktin F*	tgttaccaactgggacgaca	-
β -Aktin R*	aaggaaggctggaaaagagc	573/1,027
Cx57F*	catctcggcatcaggaaaat	-
Cx57R*	cagatgatggacgggtgtga	451
Cx57 nestedF*	cagcagtgggaactgaga	-
Cx57 nested R*	aagccgtcattgtaccgaac	386
Panx1 E1F	g caccggg ggccttgac catg	-
Panx1E1R	tattgccgtg ggctactctc	159
Panx1 E2F	gct tctccccgag ttctttc	-
Panx1 E2R	agtctggaaa cctccactg	113
Panx1 E3F	cactcttct ggcgttctc t	-
Panx1 E3R	actgaga atgtggggca gag	172
Panx1E4F	atcgtggagc agt	-
Panx1 E4R	cctct cttactctc ggacg	152
Panx1 E5F	taatggccaa cagcgcata	-
Panx1 E5R	acc tggggcttct agagagc	167
Panx1 exon5F *	gcaacaatggggagaagaa	-
Panx1 exon5R*	gctcttagaagccccagggt	349
Panx1 nested exon5R*	tcctctagcacctgccagtc	330

Die PCR-Analysen wurden mit der *HotStar Taq DNA-Polymerase* durchgeführt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: x µl DNA-Template (variabel), 2,5 µl *Hotstar PCR-Reaktionspuffer* (10x), 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), 2 µl *Forward-Primer* (10 pmol/µl), 2 µl *Reverse-Primer* (10 pmol/µl), 0,2 µl *HotStar Taq DNA Polymerase* (5 U/µl), ad. 25 µl mit DEPC-H₂O. Die cDNA-Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler unter Anwendung des in Tab. 2-4 dargestellten Programms.

Tabelle 2-4. Standard-PCR-Protokoll zur Amplifikation von cDNA. *Die optimale Anlagerungstemperatur der verwendeten Primer wurde in Vorversuchen durch PCR-Analysen mit Temperaturgradienten ermittelt.

Phase	Temperatur (°C)	Zeit	Zyklen (Anzahl)
Aktivierung	94-95	15 min	1
Denaturierung	94	30 s	30-34
Anlagerung	* (variabel)	30 s	
Elongation	72	1 min / kb	
Finale Elongation	72	10	1

2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der amplifizierten cDNA- und gDNA-Transkripte wurden 15 – 20 µl der Amplikons elektrophoretisch in 1%- oder 2%-igen Agarosegelen aufgetrennt. Zur späteren Visualisierung der DNA-Banden wurde den Agarosegelen Roti® Gelstain, entsprechend der Herstellerangaben, hinzugefügt. Die cDNA-Proben wurden zuvor mit einem Ladepuffer (5x „*GelPilot*“) entsprechend der Herstellerangaben versetzt. Dies war bei der Analyse der Genotypisierungsamplikons nicht notwendig, da die Proben bereits im PCR-Ansatz mit einem Ladepuffer der *Top Taq Polymerase* versetzt wurden. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde als Größenstandard der *peqGOLD DNA-Leiter Mix* verwendet. Der Marker wurde nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Der Lauf der Agarosegele erfolgte ca. 45-60 min bei 120 V in Gelkammern mit TBE-Puffer. Mittels eines UV-Tansilluminators wurden die Banden der PCR-Amplikons dokumentiert.

2.3.7 Aufreinigung von DNA

Die Aufreinigung von PCR-Amplikons erfolgte mit dem *Quiaquick PCR Purification Kit*. Die Verwendung des Kits erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.3.8 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalysen

Die PCR-Produkte der cDNA-Amplifikation wurden von der Firma AGOWA Genomics (Berlin) sequenziert. Hierzu wurden 200 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 14 µl in nukleasefreiem H₂O eingeschickt. Der DNA-Lsg wurden noch 2 µl Primer hinzugefügt, die als Startpunkt der Sequenzierung verwendet wurden. Eine anschließende Sequenzanalyse erfolgte durch das Programm Chromas, welches auf der Seite der Sequenzierfirma (<http://www.agowa.de/>) heruntergeladen werden kann, sowie mittels des Sequenzanalyseprogramms Finch TV (www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml). Zum Abgleich von Nukleinsäure- und Proteinsequenzen wurden Alignments und BLAST-Analysen durchgeführt, die auf den folgenden Server genutzt wurden: EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/>), NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und ExPASy (*Molecular Biology Server*, <http://us.expasy.org/>).

2.4 Histologische Methoden

2.4.1 Immunfluoreszenzmarkierungen

2.4.1.1 Immunfluoreszenzmarkierungen an Gewebeschnitten und isolierten

Retinazellen

Die vertikalen Kryoschnitte sowie die isolierten Retinazellen wurden gewaschen. Als Waschlösungen wurden verschiedene Puffer verwendet (0,1 M PB, PBS sowie TBS, pH 7,4 ohne oder mit verschiedenen TritonX-100-Konzentrationen (0,3 oder 0,03% PBST/TBST)). Eine Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation mit CTA, 10% NDS oder 10% NGS in 0,3% PBST oder TBST. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dem Entfernen ungebundener primärer Antikörper durch mehrere Waschschritte (3 x 10 min) wurden die Schnitte 2 Stunden (Std) bei Rt mit den Sekundärantikörpern inkubiert. Die überschüssigen Sekundärantikörper wurden durch erneutes Waschen entfernt (3 x 10 min). Anschließend wurden die Präparate in Vectashield® eingebettet und eingedeckelt. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind mit ihren Verdünnungen in Tab. 2-5 und Tab. 2-6 aufgelistet. Die Verdünnung

der Antikörper erfolgte in der jeweils verwendeten Blockierlg (CTA, 3% NDS oder 3% NGS in 0,3% PBST oder TBST). Zur Kontrolle der Antikörperbindungsspezifität wurden gleiche Versuche ohne Primärantikörper durchgeführt. Die Markierung von Zellkernen erfolgte mittels der Nukleinsäurefarbstoffe DAPI und TO-PRO3. Beide Farbstoffe sind affin für DNA-Doppelstränge und markieren den gesamten Zellkern. TO-PRO3 wurde 1:2.000 verdünnt und zusammen mit den Sekundäreantikörpern angewendet. Zur Markierung der Zellkerne mit DAPI wurde Vectashield® mit DAPI eingesetzt.

Tabelle 2-5. Verwendete Primärantikörper und ihre Verdünnungen bei Anwendung auf retinalen Flachpräparaten (F), Kryoschnitten (K), retinalen Vibratomschnitten (V), dissoziierten Retinazellen (D).

Bezeichnung	Immunogen	Spezies, Typ, Verdünnung	Hersteller (Katalog Nummer)
Bax	Sequenz aus dem N-Terminus des humanen Bax-Proteins	Kaninchen, polyklonal, 1:25 (K)	Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA (Sc-493)
Calbindin D-28 K	Calbindin-D28K, Huhn, komplette Aminosäuresequenz	Maus, monoklonal, 1:5.000 (K), 1:2500 (D)	Swant, Marly, Switzerland (300)
Calbindin D-28K	Rekombinantes Ratten Calbindin, D28K	Kaninchen, polyklonal, 1:1.000 (K)	Swant, Marly, Switzerland (CB-38a)
Calretinin	Ratten Calretinin, komplette Aminosäuresequenz	Ziege, polyklonal, 1:1000 (V)	Millipore, Billerica, MA, USA (AB 1550)
Calsenilin	Rekombinantes Human Calsenilin	Maus, monoklonal, 1:2.000 (K)	W.Wasco, Harvard Medical School, charleston, MA Millipore, Billerica, MA, USA (AB 1550)
Caspase-3, aktive Form	Synthetisches Peptid, dass Aminosäureresten im humanen Aminoterminal entspricht, die sich in der Näher des Asparagin 175 befinden	Kaninchen, monoklonal, 1:300 (K)	Cell Signalling Technology, MA, USA (#9664)
Caspase-9, aktive Form	Synthetisches Peptid der murinen Caspase-9	Kaninchen, polyclonal, 1:100 (K)	Abcam®, Cambridge, UK (Ab 52298)
ChAT	Cholinazetyltransferase aus humaner Plazenta	Ziege, polyclonal, 1:500 (V)	Chemicon International Inc., Hofheim (AB 144P)
Cone Arrestin	Synthetisches Peptid, Aminosäuren 369-389 von XXX Cone Arrestin	Kaninchen, polyklonal, 1:1.000 (K)	Millipore, Billerica, MA, USA (AB 15282)
Connexin36	C-terminale Region von Ratten und Maus Cx36, Aminosäuren 286-303	Kaninchen, polyklonal, 1:500 (K)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (51-6300)
cGMP	keine Angaben verfügbar	Schaf, polyklonal, 1:500 (K)	Gift from Jan de Vente, Maastricht University, Netherlands
CytochromC	Synthetisches Peptid von CytochromeC aus der Taube	Maus, monoklonal, 1:2000 (K)	BD Bioscience, San José, CA, USA (556433)
Glykogen Phosphorylase	Meerschweinchen Glykogenphosphorylase	Meerschweinchen, polyklonal, 1:1.000 (K)	B.Pfeiffer-Guglielmi, Universität Tübingen
G0 α	Bovines Gehirn G0 α	Maus, monoklonal, 1:500 (K); 1:250 (D)	Chemicon International Inc., Hofheim (AB 144P)

HCN4	Maus HCN4 Ionenkanal, Aminosäuren 1.116-1.201	Meerschweinchen, monoklonal, 1:25 (K); 1:10 (D)	F. Müller, Forschungszentrum Jülich
Panx1	Maus Panx1, Aminosäuren 395-409	Kaninchen, polyklonal, 1:2.000 (K); 1:1000 (V); 1:500 (D)	D.W. Laird, University of Western Ontario, Canada
Poly-ADP-Ribose (PAR)	aufgereinigte Poly-ADP-Ribose	Maus, monoklonal, 1:200	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach (LX-804-220-R100)
PKARI β	Humanes, rekombinante ProteinkinaseA, regulatorische Untereinheit I β , Aminosäuren 1-418	Maus, monoklonal, 1:2.000 (K)	BD Bioscience, San José, CA, USA (610625)
PKC α	C-Terminus von PKC α , humaner Ursprung	Ziege, polyklonal, 1:500 (K)	Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA (Sc-208-G)
OPN1SW (N-20)	C-Terminus des Opsin Proteins, kodiert durch <i>OPN1SW</i> , humaner Ursprung	Ziege, polyklonal, 1:500 (F)	Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA (Sc-14363)
Opsin Red/Green	Rekombinantes humaes Rot/Grün Opsin, beinhaltet die letzten 38 Aminosäuren des C-Terminus	Kaninchen, polyklonal, 1:500 (F)	Millipore, Billerica, MA, USA (AB 5405)
Velis-3	Synthetisches Peptid aus dem C-Terminus von Ratten Velis-3 (MALS-3)	Kaninchen, polyklonal, 1:500 (K)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA (51-5600)
ZNP-1	Synaptotagmin II aus 1-5 Tage alten Zebrafischembryos	Maus, monoklonal, 1:500 (K)	Zebrafish International Resource Center, OR, USA (081002-25)

2.4.1.2 Immunfluoreszenzmarkierungen an retinalen Flachpräparaten

Die retinalen Flachpräparate wurden entsprechend Abschnitt 2.2.2 angefertigt. Anschließend wurden die Flachpräparate in 0,1 M PB gewaschen und 1 Std in CTA-Lsg blockiert. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte 5 Tage bei 4°C. Anschließende Waschschrte (3 x 20 min) wurden mit PBS durchgeführt. Die Inkubation mit dem sekundären AK erfolgte ü.N. bei 4°C. Nach weiteren Waschschrten (3 x 20 min) mit PBS wurden die Flachpräparate in Vectashield® eingebettet und anschließend eingedeckelt.

2.4.2 Intrazelluläre Farbstoffinjektionen

Die intrazellulären Farbstoffinjektionen wurden durchgeführt wie bei Hilgen et al. (2011) beschrieben: Vorfixierte Agarose-Schnitte wurden in eine Injektionskammer auf den Träger eines Mikroskops transferiert. Bipolarzellen wurden unter visueller Kontrolle mittels einer Mikroelektrode (Widerstand: 120-220 M Ω) aus Borosilikat-Glasröhrchen (äußerer Durchmesser 1,5 mm; Glas-Stärke: 0,225 mm), injiziert. Die

Elektroden waren jeweils mit 7,5 mM Alexa Fluor 594 Natriumhydrazit in 0,2 M KCl-Lsg gefüllt. Der Farbstoff wurde ionophoretisch mittels eines EPC-9 Verstärkers mit einem Strom von 1 nA für 3-6 min injiziert. Nach der Injektion wurden die Schnitte 3-5 min in 4% PFA in 0,1 M PB fixiert und in Ringer-Lsg gewaschen, bevor mit der Antikörperinkubation fortgefahren wurde.

Tabelle 2-6. Verwendete Sekundärantikörper und ihre Verdünnungen bei Anwendung auf retinalen Flachpräparaten (F), Kryo-/Vibratomschnitten (KV), dissoziierten Retinazellen (D) und bei elektronenmikroskopischen (EM) und biochemischen Versuchen (B), sowie DAB-Färbung (DAB).

Konjugat	Art	Verdünnung	Hersteller
A488	Maus anti-Kaninchen (IgG)	1:500 (KV), 1:1000 (D)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	Ziege anti-Kaninchen (IgG)	1:500 (KV)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	Esel anti-Schaf (IgG)	1:500 (K)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	Esel anti-Kaninchen (IgG)	1:300 (F)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	Kaninchen anti-Maus (IgG)	1:500 (KV)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
A568	Maus anti-Kaninchen (IgG)	1:500 (KV)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	Kaninchen anti-Maus (IgG)	1:500 (KV)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	Ziege anti-Kaninchen (IgG)	1:500 (KV)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	Ziege anti-Maus (IgG)	1:500 (KV), 1:1000 (D)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	Maus anti-Meerschweinchen (IgG)	1:500 (KV), 1:1000 (D)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
A647	Maus anti-Kaninchen (IgG)	1:500 (KV)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	Esel anti-Ziege (IgG)	1:500 (KV), 1:1000 (D)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	Kaninchen anti-Maus (IgG)	1:500 (KV)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Cy3	Esel anti-Ziege (IgG)	1:500 (KV)	Jackson Immunoresearch; Suffolk, England
	Maus anti-Ziege (IgG)	1:500 (KV), 1:300 (F)	Jackson Immunoresearch; Suffolk, England
	Ziege anti-Maus (IgG)	1:500 (KV)	Jackson Immunoresearch; Suffolk, England
Biotin	Ziege anti-Esel AK (IgG)	1:500 (EM)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	Ziege anti-Maus (IgG)	1:500 (DAB)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Meerrettichperoxidase	Ziege anti-Kaninchen (IgG)	1:3000 (B)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.4.3 β -Galaktosidase-Färbung

Das in die *Panx1^{-/-}*-Maus eingebaute *LacZ*-Gen kodiert für das Enzym β -Galaktosidase. Mittels einer enzymatischen Reaktion kann die Aktivität der β -Galaktosidase sichtbar gemacht und dadurch die Zellen markiert werden, die das Enzym exprimieren. Die durchgeführte Prozedur ist bei Güldenagel et al. (2000) beschrieben: Retinale Querschnitte wurden kurz mit einer β -Galaktosidase-Lösung behandelt und für 48 h bei 37°C mit einer β -Galaktosidase-Färbelösung inkubiert. Nach erneuter Behandlung mit der β -Galaktosidase-Lösung wurden die Schnitte abschließend mit PBS (3 x 10 min) gewaschen. Nach Einbettung in Glycerol/PBS wurden die Schnitte an einem Zeiss Axiophot 2 Lichtmikroskop ausgewertet.

2.4.4 Di-Aminobenzidin (DAB)-Färbung

Fixierte Kryoschnitte wurden mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Fluoreszenzlöschung in einer Quenching-Lösung bei Rt. Eine Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte in 10% NGS in 0,1% PBST. Der primäre Antikörper wurde in der Blockierlsg verdünnt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach Entfernung überschüssiger Antikörper durch Waschen in PBS (3 x 10 min) erfolgte für 1 Std bei Rt die Inkubation mit einem biotinylierten, sekundären Antikörper (AK, verdünnt in 5% NGS in 0,1%PBST). Die Einstellung der optimalen Bedingungen für die anschließende DAB-Färbung erfolgte durch 30-minütige Vorinkubation unter Anwendung des *Vector-ABC-Kits* entsprechend der Herstellerangaben. Die anschließende Inkubation mit dem DAB-Reaktionsmix wurde nach Sichtkontrolle für 4-6 min durchgeführt. Die Schnitte wurden anschließend in Aquatex® eingebettet und eingedeckelt. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop.

2.4.5 Immunoelektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wurde durchgeführt wie bei Janssen-Bienhold et al. (2009) beschrieben: Isolierte Retinen wurden 30 min bei Rt in 2% PFA/3% Sucrose in 0,1 M PB fixiert, danach gründlich in 0,1 M PB gewaschen (3 x 20min) und ü.N. bei 4°C in Gefrierschutzlsg (30% Sucrose in 0,1 M PB) inkubiert. An einem

Kryomikrotom wurden tangentielle und vertikale Schnitte mit einer Dicke von 60 µm angefertigt und anschließend, zur Maskierung unspezifischer Bindungsstellen, für 3 Std bei Rt in Blockierlsg (10% NGS in PB) inkubiert. Die Inkubation mit dem primären AK (Kaninchen anti-Panx1, 1:200 verdünnt in PB) erfolgte für 5 Tage bei 4°C. Die ungebundenen Primärantikörper wurden durch anschließende Waschschrte in 0,1 M PB (3 x 20 min) entfernt. Die Applikation der Sekundärantikörper (Ziege anti-Kaninchen IgG, biotinyliert) erfolgte über Nacht bei 4°C. Ungebundene sekundäre AK wurden durch mehrfache Waschschrte (3 x 20 min) in 0,1 M PB entfernt. Die Panx1-Immunoreaktivität wurde unter Anwendung des *VectaStain Elite ABC Kits*, entsprechend der Herstellerangaben visualisiert. Eine zusätzliche Behandlung wurde mit 0,1% DAB und 30% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) durchgeführt (7 min). Nach einem anschließenden Waschschrte (10 min) in 0,1 M PB wurden die Schnitte 1 Std in 2,6% Glutaraldehyd, 1% PFA, 97,6 mM Sucrose in 0,1 M PB nachfixiert und zur Kontrastverstärkung 1 Std mit 1% Osmiumtetroxid in 0,1 M PB behandelt. Nach einem weiteren Waschschrte in 0,1 M PB (20 min) wurden die Schnitte durch eine ansteigende Acetonreihe (50-100%) dehydriert und anschließend in Epox Resin eingebettet. Ultradünne Schnitte wurden am Vibratom hergestellt und an einem Zeiss 902 Transmissionselektronenmikroskop ausgewertet.

2.4.6 Terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated-dUTP-nick-end-labeling (TUNEL-Assay)

Zur Ermittlung absterbender Zellen wurde eine Markierung von, beim Absterben entstehenden, DNA-Strangbrüchen durchgeführt. Die Markierung der Strangbrüche erfolgte an vertikalen Retinaschnitten. Zunächst wurden die fixierten Kryoschnitte 15 min in PBS gewaschen und anschließend 5 min bei 37°C in einer ProteinaseK/Tris-HCl-Lsg inkubiert. Nach anschließenden Waschschrten (3 x 10 min) in TBS-Puffer erfolgte eine Nachfixierung (5 min) in einem Ethanol-Essigsäuregemisch bei -20°C. Nach 3 weiteren Waschgängen in TBS-Puffer (je 10 min) wurden die Schnitte für 1 Std bei Rt in TUNEL-Blockierlsg inkubiert. Die enzymatische Markierung der Strangbrüche erfolgte für 1,5-2 Std bei 37°C mittels des *In Situ Cell Detection Kits*

entsprechend der Herstellerangaben. Anschließend wurde die TUNEL-Lsg mit PBS abgewaschen, die Schnitte in Vectashield® einbettet und eingedeckelt.

2.5 Enzymatische-*in situ*-Aktivitätsassays

Die enzymatischen Aktivitätstests basieren auf der Applikation von Enzymsubstraten, die nach ihrem Umsatz eine detektierbare Färbung aufweisen.

2.5.1 Calpain-*in situ*-Aktivitätsassay

Der Nachweis der Calpain-Aktivität wurde auf unfixiertem retinalem Gewebe nach der Beschreibung bei Paquet-Durand *et al.* (2006) durchgeführt: Die Einstellung der optimalen Enzymbedingungen erfolgte durch mehrere Waschstschritte in Calpain-Reaction-Buffer (CRB; 15 min bei RT). Durch Hinzugabe des Calpain-Substrates (7-amino-4-chloromethylcoumarin, t-BOC-L-leucyl-L-methionine amide) wurde die Enzymreaktion gestartet. Die Inkubation erfolgte für 2 Std bei 35°C. Anschließend wurden die Schnitte erneut in CRB gewaschen (2 x 10 min), in Vectashield® eingebettet, eingedeckelt und im Anschluss sofort am Axio Imager Z1 ApoTome Mikroskop ausgewertet, da die Fluoreszenz sehr schnell ausbleicht.

2.5.2 HDAC-*in situ*-Aktivitätsassay

Der durchgeführte HDAC-Aktivitätsassay ist bei Sancho-Pelluz *et al.* (2010) beschrieben: Zum Nachweis der HDAC-Aktivität wurden fixierte Kryoschnitte verwendet. Die Schnitte wurden zur Vorbereitung in HDAC-Assaypuffer (2 x 10 min) gewaschen. Anschließend 2 Std bei 37°C mit einem HDAC-Substratmix inkubiert. Die Schnitte wurden erneut in HDAC-Assaypuffer gewaschen (3 x 10 min) und 20 min bei -20°C in eiskaltem Methanol nachfixiert, anschließend in HDAC-Entwickler eingebettet, eingedeckelt und sofort am Axio Imager Z1 ApoTome-Mikroskop ausgewertet.

2.5.3 PARP-*in situ*-Aktivitätsassay

Für den Nachweis der PARP-Aktivität wurde eine Technik verwendet, die bei Paquet-Durand *et al.* (2007b) beschrieben ist: Das unfixierte Gewebe wurde in TBS-Puffer gewaschen. Ein *Avidin-Biotin Blockierkit* wurde entsprechend der

Herstellerangaben verwendet, um endogenes Biotin zu blockieren. Anschließend wurden die Schnitte mit TBS-Puffer gewaschen (2 x 5 min) und bei 37°C für 2,5 Std mit dem PARP-Reaktionsmix inkubiert. Nach gründlichem Spülen mit PBS (3x10 min) erfolgte die Biotin-Avidin Reaktion durch Inkubation mit Avidin-AK (1:80 verdünnt in TBS), konjugiert an A488, über Nacht bei 4°C. Die Schnitte wurden gewaschen und anschließend mit Vectashield® und DAPI eingebettet und eingedeckelt.

2.6 Biochemische Methoden

2.6.1 Subzelluläre Fraktionierung

Die subzelluläre Fraktionierung von Retinalysaten erfolgte mittels differentieller Zentrifugation von retinalen Totalhomogenaten. Zur Herstellung eines Retinalysats wurden vier Retinen von zwei Mäusen eines Genotyps verwendet, die in 300 µl Homogenisierungspuffer² (HP2) aufgenommen und homogenisiert wurden. Entsprechend dem Schema in Abb. 2-1 erfolgte die differentielle Zentrifugation in mehreren Schritten, jeweils in einer Kühlzentrifuge bei 4°C.

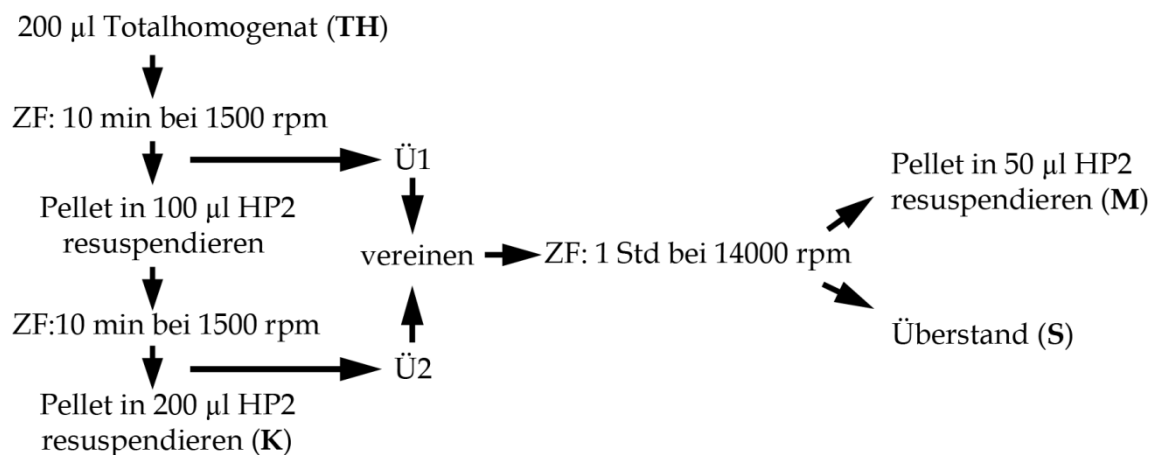


Abbildung 2-1. Ablauf der subzellulären Fraktionierung von Retinalysaten. Durch mehrere Zentrifugationsschritte (ZF) bei 4°C erfolgte eine Auftrennung des in HP2-Puffer (HP2) vorliegenden retinalen Totalhomogenats (TH) in Fraktionen mit unterschiedlichen Zellbestandteilen: K: Kernfraktion; M: Membranfraktion; S: Fraktionen mit hauptsächlich löslichen Zellbestandteilen. min: Minute; rpm: rounds per minute; Std: Stunde, Ü: Überstand.

2.6.2 Proteinbestimmung (nach Bradford, 1976)

Die Konzentrationsbestimmung der Proteinproben erfolgte nach Bradford (1976). Zur Bestimmung des Proteingehalts, wurden 2 µl der Probe mit 3 ml Bradford-

Reagenz versetzt und 20 min inkubiert. Die Absorption wurde anhand eines Zweistrahlphotometers gemessen. Mittels einer vorher erstellten Kalibrierkurve mit Rinderserumalbumin als Proteinstandard wurde aus den gemessenen Werten, die Proteinkonzentration der subzellulären Fraktionen errechnet.

2.6.3 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; nach Laemmli, 1970)

Zur Auftrennung der Proteine in den verschiedenen subzellulären Fraktionen wurde eine denaturierende SDS-Gelelektrophorese an 8-10%igen Gradientengelen durchgeführt. Zur Herstellung der Gradientengele wurden zwei Trenngellösungen mit unterschiedlichen Acrylamidkonzentrationen (8% und 10% Acrylamidgele) verwendet, die mittels eines Gradientenmischers zu einem Gel gegossen wurden. Bei den verwendeten Gelen nimmt die Acrylamidkonzentration von oben nach unten zu, wodurch sich ein immer enger werdendes Acrylamidnetzwerk bildet. Nach der Auspolymerisation des Trenngels wurde es mit einem Sammelgel überschichtet. Ein 10-fähriger Gelkamm wurde zur Bildung der Geltaschen benutzt. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Proben jeweils mit 15 µl SDS-Probenpuffer beladen und zu einem Gesamtvolumen von 30 µl mit dem HP2 aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben 3 min gekocht und abzentrifugiert (3 min bei 6.000 rpm). Es wurden jeweils 30 µg Protein pro Probe aufgetragen. Als Referenz wurden jeweils ein *Low Molecular Weight Marker* und ein *High Molecular Weight Marker* aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte 1,5 bis 2 Std bei 160 V in einer Gelelektrophoresekammer, die mit SDS-Laufpuffer gefüllt war.

2.6.4 Western Blotting (nach Towbin, 1979)

Mittels des Western Blot-Verfahrens wurden die aufgetrennten Proteine von dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Übertragung erfolgte über Nacht bei einer Spannung von 40 V bei 4°C in einer mit Transferpuffer gefüllten Trans-Blot-Kammer. Das Blotting-Ergebnis wurde mittels einer PonceauS-Färbung überprüft.

2.6.5 Immunonachweis mittels ECL-Technik

Der Nachweis von Panx1-Proteinen auf der Blotting-Membran wurde mittels des ECL-Nachweisverfahrens durchgeführt. Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran für 1 Std bei 37°C mit einer Blockierlsg maskiert. Die Inkubation mit den Panx1-AK (1:5.000 verdünnt in Blockierlsg) erfolgte über Nacht bei 4°C. Die ungebundenen AK wurden durch mehrere Waschgänge mit TBS-Tween (3 x 10 min) entfernt, bevor der Blot für 2 Std bei Rt mit dem sekundären AK (Ziege anti-Kaninchen IgG, konjugiert an das Enzym Meerrettichperoxidase, verdünnt in TBS-Tween) inkubiert wurde. Nach erneuten Waschschritten (3 x 10 min mit TBS-Tween) zur Entfernung der überschüssigen AK wurden die immunoreaktiven Proteine mittels des *Chemiluminescence Detection Kits* entsprechend der Herstellerangaben visualisiert.

Zur Entfernung der gebundenen AK wurde die Blot-Membran 1 Std in Strip1-Lsg inkubiert und anschließend 2 Std bei 37°C in Strip2-Lsg. Nach 5 weiteren Waschgängen (je 10 min) mit TBS-Tween konnte die Blot-Membran erneut verwendet werden.

2.7 Mikroskopie, Bildbearbeitung, Quantifizierung, Statistik

2.7.1 Bildbearbeitung und Bildauswertung

Die Auswertung der morphologischen Untersuchungen erfolgte am TCS SL Konfokalen Mikroskop. Zum Scannen wurde entweder ein 40x/1.25 Öl-Plan-Apochromat oder ein 63x/1.32 Öl-Plan-Apochromat-Objektiv verwendet. Die Schrittgröße auf der Z-Achse betrug jeweils 0,2 µm. Die konfokalen Aufnahmen zur Quantifizierung der Zapfen-Außensegmente wurden mit einem 20x/0.5 Plan-Fluotar-Objektiv oder einem 40x/0.7 Plan-Fluotar-Objektiv mit einer Schrittgröße auf der Z-Achse von 0,5-0,8 µm aufgenommen.

Die Aufnahmen für quantitative Analysen von Zelltodmarkern wurden mit einem Axio Imager Z1 ApoTome-Mikroskop durchgeführt. Dieses ist mit einer Zeiss-Axiocam-Digitalkamera und der Software ZEISS Axiovision 4.7 ausgestattet. Im Mosaik-Modus wurde der gesamte, vertikale Retinaschnitt bei 20x oder 40x Vergrößerung aufgenommen. Kontrast und Helligkeit der Abbildungen wurden mit

der Software Photoshop CS4 (Adobe, San Jose, CA) und dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ, Macbiophotonics (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>) nachjustiert. Sofern nicht anders unter den jeweiligen Abbildungen angegeben, handelt es sich bei den gezeigten Bildern um repräsentative Projektionen mit einer Dicke von 2-3 μm aus dem zentralen Retinabereich.

2.7.2 Zellzählung, Quantifizierung und statistische Auswertung

Bei den quantitativen Untersuchungen wurden für jeden Zeitpunkt, Nachweis und Genotyp Retinen von 3 bis 6 Tieren analysiert. Geschwister- und Kontrolltiere wurden sequentiell am gleichen Tag präpariert und weiter behandelt. Flachpräparate der Geschwistertiere wurden nach der Präparation und Fixierung gemeinsam in den nachfolgenden Wasch- und AK-Lösungen inkubiert. Vertikale Gefrierschnitte von Geschwistertieren wurden auf demselben Objektträger gesammelt, um eine identische Anschlussbehandlung zu gewährleisten. Die mikroskopischen und quantitativen Auswertungen von Geschwister- und Kontrolltieren erfolgten jeweils am gleichen Tag.

Für die Quantifizierung der Zapfen-Außensegmente wurden überlappende konfokale Aufnahmen mit einer Projektionsdicke von 3-5 μm hergestellt und als Bildmontage zusammengestellt. So konnten die, für die Quantifizierung erforderlichen, definierten Bereiche mit einer Größe von 100 x 200 μm^2 (50%, 75% dorsal bzw. ventral vom Optischen Nerv) ermittelt werden. Die Quantifizierungen der Zelltodmarker wurden in vertikalen Retinaschnitten durchgeführt. Die TUNEL- und Zelltodmarker-Quantifizierungen in der Rho^{-/-}-Retina erfolgte in dem gesamten Schnitt. In den Rd1Cx36-Mutanten wurden ausschließlich die zentralen Retinabereiche (TUNEL- und Zapfenquantifizierung) ausgewertet, die bis zur Peripherie in einer Entfernung von 1.000 μm vom Optischen Nerv definiert wurden. Die Quantifizierungen der Zapfen-Außensegmente und der Zellzahlen wurden jeweils manuell durchgeführt.

Zur Ermittlung des prozentualen Anteils von positiven Zellen (bei der Untersuchung des Stäbchenzelltodmechanismus) wurde zunächst die Fläche der äußeren Retina und die durchschnittliche Größe der Photorezeptorsomata mit der Zeiss Axiovision

4.2 Software (Jena, Germany) bestimmt. Aus diesen Werten und der Anzahl der markierten Zellen wurde der prozentuale Anteil der Marker-positiven Zellen ermittelt:

1. Bestimmung der Gesamtzahl der Zellen in der Retina = Fläche der ONL / durchschnittliche Größe der Photorezeptorsomata
2. Bestimmung des prozentualen Anteils positiver Zellen = Gesamtzahl der Zellen in der Retina / Anzahl der quantifizierten, positiven Zellen

T-Test: Zur Untersuchung statistischer Unterschiede innerhalb eines Genotyps und zwischen den Genotypen wurde für die quantifizierten Daten ein zweifacher T-Test für ungepaarte Stichproben durchgeführt. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Die Daten repräsentieren das durchschnittliche Ergebnis von 3 bis 6 verschiedenen Geschwistertieren und entsprechenden Kontrolltieren pro Genotyp und Alter. Die Fehlerbalken in den Abbildungen zeigen die Standardabweichung an.

2.8 Elektrophysiologische Methoden

2.8.1 *In vivo*-Elektroretinographie

Für die *in vivo*-ERG Versuche wurden 3 Monate alte Panx1^{+/-} und Panx1^{-/-}-Mäuse verwendet. Vor den Versuchen wurden die Tiere über Nacht dunkel adaptiert. Die Anästhesie der Tiere erfolgte durch intraperitoneale Injektion von Xylazine (50 mg/kg) und Ketamin (20 mg/kg). Die Dilatation der Pupillen wurde durch 1% Atropinsulfat herbeigeführt. Diese und weitere präparatorische Prozeduren (siehe Frank et al., 2010) wurden unter Rotlicht (> 620 nm) durchgeführt. Die elektrischen Potentiale wurden als Antworten auf einen weißen Lichtblitz (Dauer: 5 ms) abgeleitet, Bandpass-gefiltert (1-1.000 Hz) und durch einen ML132 Bioamplifier verstärkt. 20 Lichtblitze bei 0,4 Hz repräsentierten die schwächsten Lichtreize. Die Antworten der Reize pro Lichtintensität wurden gemittelt und dargestellt. Die Stimulusfrequenzen wurden bis auf 5 Lichtblitze bei 0,066 Hz für den hellsten Stimulus verringert. Die Ableitung des photopischen ERGs erfolgte gegen eine einheitlich weiße Hintergrundbeleuchtung von 25 cds/m².

2.8.2 *In vitro*-Elektroretinographie

Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn für mindestens 3 Std dunkeladaptiert und anschließend durch Genickbruch getötet. Die Präparation der Retina erfolgte unter Rotlicht (>690 nm) in Carbogen-begaster Ringer-Lsg. Die isolierte Retina wurde mit der Ganglienzellseite nach unten auf einer ringförmigen Ag-AgCl Referenzelektrode ausgebreitet. Diese befand sich auf einem Glasboden der Ableitkammer in der Präparateebene eines Mikroskops. Die Retina wurde kontinuierlich mit aufgewärmter (35°C) Extrazellulärlsg (Flussrate: 5 ml/min) superfundiert und vor dem Beginn der Ableitungen 30 min in Dunkelheit gelassen. Die ERGs wurden mit Mikroelektroden aus Borosilikat-Glasröhrchen (äußerer Durchmesser 1,5 mm; Glas-Stärke: 0,225 mm) abgeleitet. Die mit Ringer-Lsg gefüllten Elektroden besaßen einen Widerstand von 4-10 MΩ. Unter visueller Kontrolle durch Infrarot-Lichtmikroskopie wurde die Ableitelektrode auf die Außensegmente der Stäbchen gesteuert. Tiefere retinale Schichten wurden durch Vortreiben der Elektrode mittels eines Mikromanipulators erreicht. Weiße, 5 ms lange, Ganzfeldlichtblitze wurden von einer Stimulations-Software (QDS; Thomas Euler, Universität Tübingen) generiert. Die Blitze wurden auf einem CRT-Monitor präsentiert und durch den Kondensator des Mikroskops auf die Retina projiziert. Die elektrischen Potentiale wurden amplifiziert (SEC-05LX), Bandpass-gefiltert, digitalisiert (BNC-2090) und mittels Analysesoftware (WinWCP; John Dempster, University of Scotland, Glasgow, Vereinigtes Königreich) ausgewertet. Die Antworten von 20 Lichtblitzen (0,1 Hz) wurden pro Stimuluskondition gemittelt.

Statistische Analysen der ERG-Ergebnisse erfolgten mit dem Programm Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Die Ergebnisse wurden einer zweifaktoriellen ANOVA-Varianzanalyse unterzogen. Gepaarte Vergleiche wurden mit dem post-hoc Bonferroni-Test durchgeführt. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes (S.E.M.) an. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

3. Expression von Pannexin1 in der äußeren Mausretina

Im ersten Projekt dieser Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation von Panx1 in der Mausretina untersucht. Durch elektoretinographische Messungen an Panx1^{-/-}-Mäusen wurde der physiologische Einfluss der Panx1-Defizienz auf die retinale Aktivität analysiert. Diese Ergebnisse sind bereits im Journal of Comparative Neurology veröffentlicht (Kranz *et al.*, 2012).

3.1 Ergebnisse

3.1.1 Analyse der Pannexin1-knockout-Maus

In dem Genom der Panx1^{-/-}-Mauslinie wurde ein *LacZ*-Gen integriert, welches anstelle des *Panx1*-Gens exprimiert wird (Anselmi *et al.*, 2008; Bargiotas *et al.*, 2011). Die integrierte Gensequenz kodiert eine β -Galaktosidase. In einem enzymatischen Reporter-gen-Assay [engl.] lassen sich *in situ*- β -Galaktosidase-positive Zellen anfärben, die bei dieser Maus einen groben Überblick über die Verteilung Panx1-positiver Zellen in der Retina geben. Der Nachweis der β -Galaktosidaseaktivität wurde an Querschnitten der Mausretina durchgeführt (Abb. 3-1).

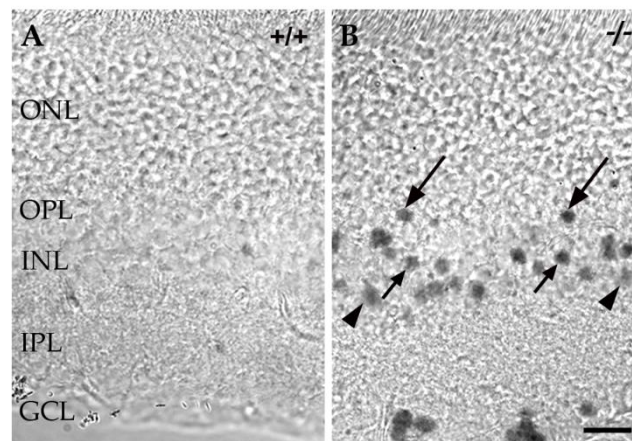


Abbildung 3-1. Verteilung der Panx1-exprimierenden Zellen in vertikalen Schnitten der Mausretina-Expressionsnachweis mittels β -Galaktosidase-Färbung. (A) In der, dem Wt entsprechenden, Panx1^{+/+}-(+/+; A) Retina wurde keine β -Galaktosidase exprimiert. (B) Panx1^{-/-}-Tiere exprimierten anstelle des Proteins Panx1, das Enzym β -Galaktosidase, dass durch eine enzymatische Reaktion nachgewiesen wurde. Die Aktivität des Enzyms war in Zellen der inneren Kernschicht und der Ganglienzellschicht lokalisiert. Aufgrund ihrer Form und Lage innerhalb der Schichten wurden die β -Galaktosidase- (Panx1-) positiven Zellen putativen Horizontal- (langer Pfeil), Bipolar- (kurzer Pfeil), Amakrin- (Pfeilkopf) und Ganglienzellen (Zellen in der GCL) zugeordnet. In der groben Morphologie waren keine Unterschiede zwischen Panx1-exprimierenden und Panx1-defizienten Retinen erkennbar. Die retinalen Schichten sind in A beschriftet. Maßstab in B=10 μ m (gehört zu A, B).

β -Galaktosidase-positive Zellen wurden in der INL und der GCL detektiert. Aufgrund ihrer Lage in der distalen und proximalen INL, konnte die Panx1-Expression in diesen Zellen, putativen Horizontal- (Abb. 3-1 B; langer Pfeil) und Amakrinzellen (Abb. 3-1 B; Pfeilkopf) zugeordnet werden. Die Lokalisation von markierten Zellen im Zentrum der INL deutete auf die Panx1-Synthese in einem oder mehreren Bipolarzelltypen hin (Abb. 3-1 B; kurzer Pfeil). Die β -Galaktosidase-reaktiven Zellen in der GCL ließen vermuten, dass Panx1 auch in Ganglienzellen exprimiert wird. Auffallend waren die unterschiedlichen Intensitäten der β -Galaktosidase-Markierungen, die auf nicht homogene Panx1-Expressionslevel in den verschiedenen Zelltypen hindeuten könnten. Die Kontrolle der β -Galaktosidasefärbung an vertikalen Schnitten der Wt-Retina (Abb. 3-1 A) zeigten keine entsprechenden Markierungen. Abb. 3-1 zeigt weiterhin, dass die grobe retinale Morphologie durch die Panx1-Defizienz nicht verändert wurde.

Das in Exon1 des Panx1^{-/-}-Genoms eingefügte *LacZ*-Gen schließt mit einem Stop-Codon ab, sodass die Expression des nachfolgenden Panx1-Exons inhibiert wird (Anselmi *et al.*, 2008; Bargiotas *et al.*, 2011). Durch zusätzliche Promotoren in nicht-kodierenden Bereichen, unterhalb (*downstream* [engl.]) von Exon1, könnte es dennoch zur Expression einzelner Exone und/oder der Synthese von Panx1-Isoformen kommen. Da die Panx1^{-/-}-Mauslinie in den nachfolgenden Versuchen als Knockout-Kontrolle verwendet werden sollte, wurde sie zuvor mittels RT-PCR-Analysen auf die Expression der einzelnen Exone überprüft (Abb. 3-2). Für die Untersuchungen wurden Primer verwendet, die spezifisch an die fünf Panx1-kodierenden Exone (E1-E5) binden. In der Panx1^{+/+}-Retina wurde die mRNA jedes einzelnen Panx1-Exons amplifiziert (Abb. 3-2 A), während in der Panx1^{-/-}-Maus keines der Exone detektiert werden konnte (Abb. 3-2 B). Kontrollexperimente mit Intron-umspannenden β -Aktin Primern zeigten, dass die Detektion der Panx1-Exone in der Panx1^{+/+}-Maus auf Amplifikationen von cDNA basierte (Größe der β -Aktin-Bande: 573 Bp) und die Proben nicht mit genomischer DNA (Größe der β -Aktin-Bande: 1027 Bp) kontaminiert waren. Die in den cDNA-Proben der Panx1^{-/-}-Maus ebenfalls detektierte 573 Bp große β -Aktin-Bande bestätigte ebenfalls die Gegenwart von cDNA in diesen Proben. Negativkontrollexperimenten ohne *cDNA-Template*

schlossen weitere Verunreinigungen aus (Abb. 3-2 C). Die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse bestätigten, dass in der *Panx1*^{-/-}-Mauslinie keine *Panx1*-mRNA mehr synthetisiert wird und entsprechend kein *Panx1*-Protein mehr gebildet werden kann. Dadurch konnte die *Panx1*^{-/-}-Maus als Kontrolle in den nachfolgenden histologischen und funktionellen Untersuchungen eingesetzt werden.

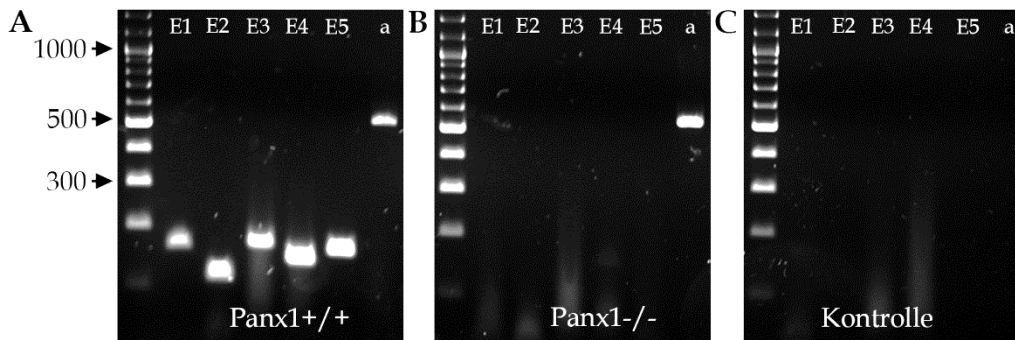


Abbildung 3-2. Überprüfung der Pannexin1-knockout-Maus. (A, B) RT-PCR-Analysen mit *Panx1*-Exon-spezifischen Primern und cDNA aus *Panx1*^{+/+} (A) und *Panx1*^{-/-} (B) Retinen. In der *Panx1*^{+/+}-Retina wurde jedes der fünf *Panx1*-kodierenden Exone (E1-E5) amplifiziert (A). Die Positivkontrollen mit Intron-umspannenden β-Aktin-Primern (a) bestätigten, dass die Bandendetektion auf der Amplifikation von cDNA basierte (Amplikongröße: 537 Bp) und schlossen eine Verunreinigung mit genomischer DNA aus (Amplikongröße: 1027 Bp). In cDNA-Proben der *Panx1*^{-/-}-Maus wurde keines der fünf *Panx1*-Exone amplifiziert (B). Die β-Aktin-Kontrolle (a) zeigte auch in diesen Proben die Gegenwart von cDNA an. (C) Negativkontrollenexperimente ohne cDNA schlossen Verunreinigungen der PCR-Proben aus. Die Zahlen auf der linken Seite geben die Größen der Markerbanden an (in Bp).

3.1.2 Spezifität der verwendeten Pannexin1-Antikörper und Verteilung von Pannexin1 in der Mausretina

Für die immunohistologischen Untersuchungen der *Panx1*-Proteinexpression in der Mausretina wurden polyklonale AK verwendet, die gegen das C-terminale Ende des murinen *Panx1*-Proteins gerichtet sind. Die Spezifität der verwendeten AK wurde in verschiedenen Zellsystemen gezeigt (Penuela *et al.*, 2007). Für Untersuchungen an retinalem Gewebe wurde der AK bisher noch nicht eingesetzt. Daher war es zu Beginn der Lokalisationsstudie notwendig, die Spezifität der AK in der Mausretina zu untersuchen. Die Charakterisierung der AK wurde biochemisch und immunohistologisch an der Retina durchgeführt (Abb. 3-3). Für die biochemischen Analysen wurden Retinalysate von *Panx1*^{+/+}- und *Panx1*^{-/-}-Geschwistertieren hergestellt (Abb.

3-3 A). Durch eine grobe subzelluläre Fraktionierung der Proben konnte die Immunoreaktivität (IR) der Panx1-AK im **Totalhomogenat** (entspricht dem Retinalysat), in einer **Membranfraktion** (Anreicherung von Zellmembranen und Membranen der Zellorganellen) und in einer **cytosolischen Fraktionen** (Anreicherung der löslichen Zellinhalte) der Retina untersucht werden.

In den Western Blot-Analysen detektierte der Panx1-AK eine Bande mit einem ermittelten Molekulargewicht von 47 kDa, die ausschließlich in den Fraktionen der Panx1^{+/+}-Tiere vorhanden waren (Abb. 3-3 A, Sternchen). Dieses Molekulargewicht liegt in einem Bereich, das für die Panx1-Grund- und Glykosylierungsform (41 - 48 kDa) beschrieben wurde (Penuela *et al.*, 2007). Die Bande war im Totalhomogenat und in der Membranfraktion vorhanden, während sie in der cytosolischen und in den verschiedenen Fraktionen der Panx1^{-/-}-Retinen nicht vorkam. Das Immunoreaktivitätssignal zeigte zudem eine Anreicherung dieser Bande in der Membranfraktion, die für ein integrales Membranprotein wie Panx1, zu erwarten war.

Der AK detektierte eine weitere Bande in einem Molekulargewichtsbereich von 58 kDa. Diese war ausschließlich im Totalhomogenat der Panx1^{+/+}-Tiere vorhanden. Zusätzliche, in der Membranfraktion angereicherte, Doppelbanden mit einem Molekulargewicht von über 205 kDa wurden im Totalhomogenat beider Genotypen detektiert. Da diese Banden in der Panx1^{+/+}- und in der Panx1^{-/-}-Retina vorhanden waren, handelte es sich wahrscheinlich um unspezifische Bindungen des Panx1-AK. Die biochemischen Untersuchungen zeigten, dass der verwendete AK retinales Panx1 mit einem Molekulargewicht von 47 kDa erkannte. Zusätzliche unspezifische AK-Bindungen in der Retina konnten aufgrund der Markierungen im hohen Molekulargewichtsbereich, die ebenfalls in den Panx1^{-/-}-Tieren auftraten, nicht ausgeschlossen werden.

Um die immunohistologische Spezifität der Panx1-AK zu testen, wurde die IR in vertikalen Retinaschnitten zwischen Panx1^{+/+}- und Panx1^{-/-}-Mäusen verglichen (Abb. 3-3 B-D). Das von dem AK erzeugte Immunoreaktivitätsmuster in Panx1^{+/+}-Retinen zeigte, in Übereinstimmung mit den β -Galaktosidase-Färbungen (Abb. 3-1 B), markierte Zellen in der INL (Abb. 3-3 C). Ein auffallend punktuell Panx1-

Muster befand sich überwiegend in der Membran verschiedener, innerhalb der INL verteilter Zellsomata, sowie in den Axonen und den dendritischen Strukturen dieser Zellen, die in die OPL stratifizierten. Die Anzahl, Form und Lokalisation der Zellen ließ vermuten, dass es sich um einen oder mehrere Bipolarzelltypen handeln könnte (Abb. 3-3 C, Pfeil). Zusätzliche, sehr feine Immunosignale, wurden distal der, in die OPL ragenden, Dendritenmarkierungen festgestellt, die eine mögliche Expression in den Terminalien von Horizontalzellen andeuteten (Abb. 3-3 C, umrandeter Bereich, waagerechter Pfeil). Das beschriebene Immunreaktivitätsmuster war in der Panx1^{-/-}-Retina nicht vorhanden (Abb. 3-3 D) und konnte daher der spezifischen Detektion von Panx1 in der Mausretina zugeordnet werden.

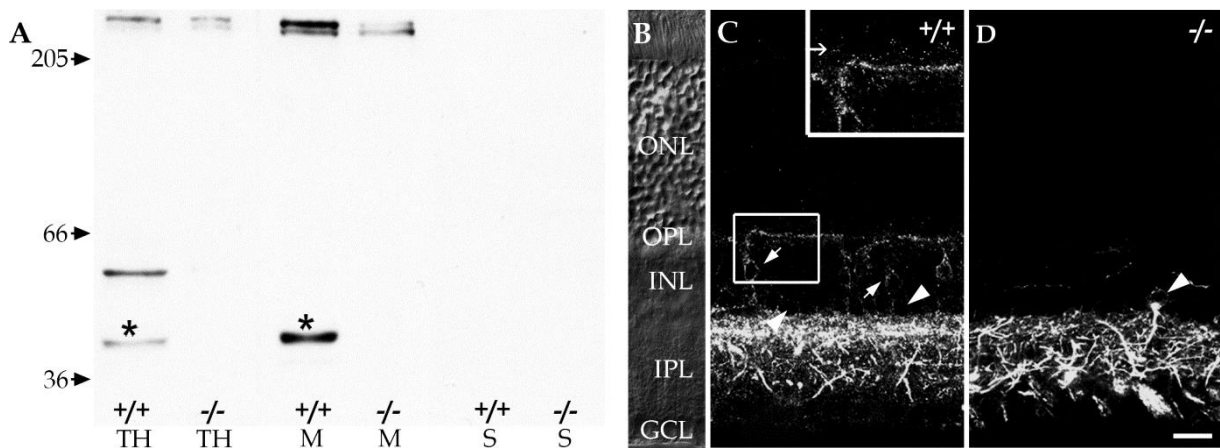


Abbildung 3-3. Spezifität der Pannexin1-Antikörper in der Mausretina. (A) Western Blot-Analysen an subzellulären Fraktionen von Panx1^{+/+} (+/+) und Panx1^{-/-} (-/-) Retinen. Der Panx1-AK detektierte im Totalhomogenat (TH) der Panx1^{+/+}-Retinen eine Bande in einem Molekulargewichtsbereich von 47 kDa (Sternchen). Diese Bande wurde in der Membranfraktion (M) angereichert. In der cytosolischen Fraktion (S) und den verschiedenen Fraktionen der Panx1^{-/-}-Tiere war diese Bande nicht vorhanden. Eine weitere Bande bei 58 kDa wurde ausschließlich im TH der Panx1^{+/+}-Retina detektiert. Der AK erkannte eine zusätzliche unspezifische Bande mit einem Molekulargewicht über 205 kDa im TH und der M-Fraktion beider Genotypen. (B-D) Panx1-IR in vertikalen Retinaschnitten. In der INL von Panx1^{+/+}-Tieren produzierte der Panx1-AK ein punktuell Muster, dass sich in der Membran einzelner Zellsomata und in den dazugehörigen Dendriten dieser Zellen befand (C, kleiner Pfeil). Zusätzliche, etwas schwächere, Markierungen waren in der distalen OPL, oberhalb der Dendriten vorhanden (Vergrößerung in C). In der Panx1^{-/-}-Retina war die beschriebene IR in der OPL und INL nicht vorhanden (D). Beide Genotypen zeigten sehr starke Markierungen in der IPL und GCL und um einzelne Somata in der proximalen INL (putative Amakrinzellen, Pfeilkopf). Abb. B verdeutlicht die retinale Schichtung im Nomarski-Transmissionsbild. Maßstab=10 µm in D (gehört zu B-D); 5 µm in der Vergrößerung in D.

Eine auffallend starke IR wurde zusätzlich in der inneren Retina beider Genotypen detektiert. Dabei waren vereinzelte Markierungen großer Somata in der proximalen INL aufgrund ihrer Größe und Lage vermutlich Amakrinzellen zuzuordnen (Abb. 3-

3 C, D, Pfeilkopf). Die Signale in der IPL stammten von stark markierten, putativen Bipolarzellaxonen, sowie Amakrin- und Ganglienzellfortsätzen. Da die beschriebene IR in der inneren Retina keine Unterschiede zwischen Panx1^{+/-}- und Panx1^{-/-}-Retinen zeigte, wurde sie unspezifischen AK-Markierungen zugeordnet und in diesem Projekt nicht weiter verfolgt. Der Fokus der folgenden Untersuchungen lag auf den spezifischen Markierungen in der OPL und INL, und der Klärung, auf welche Zelltypen diese spezifischen Panx1-Markierungen zurückzuführen waren.

3.1.3 Pannexin1 wird selektiv von einem Bipolarzelltyp exprimiert

Die β -Galaktosidasefärbung (Abb. 3-1) und die immunhistologische Spezifitätsanalyse (Abb. 3-3 B-D) haben einen ersten Überblick über die Verteilung von Panx1 in der Mausretina gegeben. Die Ergebnisse deuteten auf eine Expression in einem oder mehreren Bipolarzelltypen hin, die mit verschiedenen Methoden näher definiert werden sollte. Wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, standen für die Versuche der vorliegenden Arbeit verschiedene AK zur Verfügung, die zur spezifischen Markierung einzelner Bipolarzelltypen verwendet wurden (ZB2-9; Stäbchen-Bipolarzellen). Um den oder die Panx1-exprimierenden Bipolarzelltypen zu identifizieren, wurden Doppelmarkierungen an retinalen Querschnitten mit Panx1-AK und den verschiedenen Bipolarzellmarkern durchgeführt und auf eine Kolo-kalisation untersucht (Abb. 3-4 A-E; 3-5 A-C). Ergänzend zu den immunhistologischen Analysen, wurden die Panx1-Antikörpermarkierungen mit zusätzlichen Farbstoffinjektionen einzelner Bipolarzellen verbunden (Abb. 3-4 F-M; 3-5 D-K). Die in dieser Arbeit gezeigten AK-Injektionsversuche und die entsprechenden Auswertungen dazu, wurden von Birthe Dorgau durchgeführt. Bei der Auswertung der Farbstoffinjektionen sind die Bipolarzelltypen anhand ihrer axonalen Stratifizierungsebene innerhalb der IPL-Sublamina identifiziert worden. Um die einzelnen Strata zu visualisieren, wurden Gegenfärbungen mit ChAT- oder Calretinin-AK durchgeführt (Yip *et al.*, 1991; Wässle *et al.*, 2009).

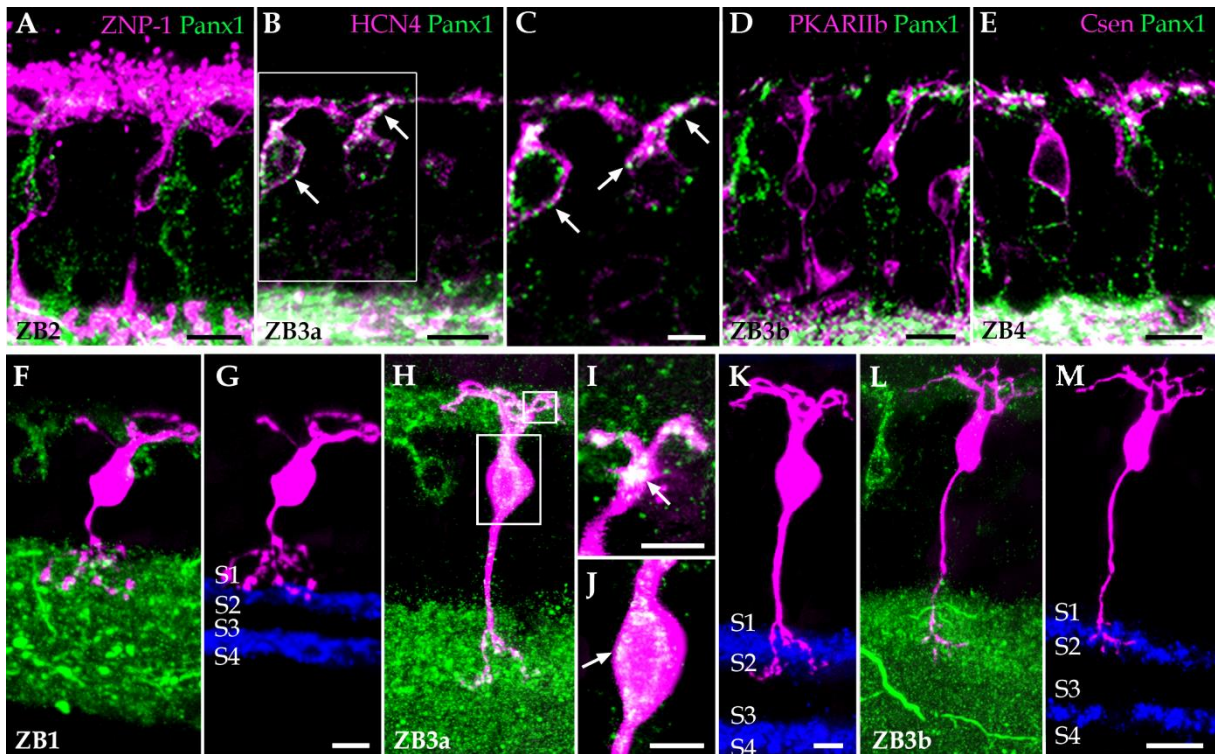


Abbildung 3-4. Pannexin1-Expression in OFF-Bipolarzellen. (A-E) Immunhistologische Doppelmarkierungen mit Panx1-AK (grün) und verschiedene Bipolarzellmarkern (magenta) in vertikalen Retinaschnitten. Panx1-IR wurde ausschließlich in HCN4-positiven Typ 3a Bipolarzellen (ZB3a) lokalisiert (B, C). In den anderen OFF-Bipolarzellen, ZB2 (A), ZB3b (D) und ZB4 (E) war keine Panx1-IR vorhanden. (C) Vergrößerter Einzelscans aus dem markierten Bereich in B zeigten Panx1-immunoreaktive Punkte in der Plasmamembran, dem Somata und den Dendriten der ZB3a (Pfeile in B, C). (F-M) Kombination aus Panx1-Immunhistologie (grün) und Farbstoffinjektionen der verschiedenen OFF-Bipolarzelltypen (magenta). Panx1-IR war mit injizierten, putativen ZB3a kolokalisiert (H). Konfokale Einzelscans aus dem markierten Bereich in H verdeutlichten die Lokalisation der Panx1-AK in den Dendriten (Pfeil in I) und dem Soma (Pfeil in J) der ZB3a. In injizierten ZB1- (F) und ZB3b-Zellen (L) war keine Panx1-Immunomarkierung vorhanden. Die blauen Banden in der IPL markierten die verschiedenen Strata. Die Markierungen wurden mit ChAT-AK (G, K, M) erzeugt. Maßstab=20 μm in A, B, D, E; 10 μm in C, G (entspricht F), in I, in K (entspricht H), in M (entspricht L); 5 μm in J.

Zunächst wurde die Expression von Panx1 in OFF-Bipolarzellen (ZB1-4) untersucht. Für die ZB1 standen keine AK zur Verfügung, die als spezifische Marker verwendet werden konnten. Deshalb wurde eine putative Panx1-Expression in diesem Zelltyp ausschließlich mit der Kombination aus Panx1-IR und Farbstoffinjektionen untersucht. Zwei verschiedene OFF-Bipolarzelltypen, ZB1 und ZB2, stratifizieren in die Strata 1 (S1) der IPL (Ghosh *et al.*, 2004). Drei in S1 stratifizierende Farbstoffinjizierte Bipolarzellen wurden anhand ihrer kurzen und stämmigen Primärdendriten und den spärlichen, axonalen Verzweigungen als putative ZB1 klassifiziert (Abb. 3-4 F, G; Ghosh *et al.*, 2004). In keiner dieser Zellen wurde Panx1 detektiert.

Immunohistologisch wurden AK gegen ZNP-1 und Calsenilin (Csen) verwendet, die spezifisch die Bipolarzelltypen ZB2 (AK gegen ZNP-1) und ZB4 (AK gegen Csen) markieren (Fox und Sanes, 2007; Haverkamp *et al.*, 2008). Die Doppelmarkierungen in Kombination mit den Panx1-AK zeigten jeweils keine Kolo-kalisation (Abb. 3-4 A, E), wodurch eine Expression von Panx1 in ZB2 und ZB4 ausgeschlossen werden konnte.

Für den Bipolarzelltyp 3, sind zwei Subtypen, ZB3a und ZB3b bekannt (Wässle *et al.*, 2009). Beide Subtypen stratifizieren in Strata 2-3 der IPL und besitzen generell sehr ähnliche morphologische Eigenschaften. Allerdings unterscheiden sie sich in der Expression bestimmter Proteine, die als Marker verwendet werden können. ZB3a exprimiert den Ionenkanal HCN4 (*Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channel 4* [engl.]; Mataruga *et al.*, 2007). ZB3b exprimiert spezifisch die RII β -Untereinheit der Proteinkinase A (PKARII β ; Mataruga *et al.*, 2007). Entsprechend wurden zur Unterscheidung dieser Zelltypen AK verwendet, die spezifisch gegen HCN4 oder PKARII β gerichtet sind. Um die Panx1-Expression in beiden ZB3-Subtypen zu untersuchen, wurden jeweils beide Marker mit den Panx1-AK kombiniert. Während ZB3b keine Panx1-IR aufwies (Abb. 3-4 D), wurde die ZB3a als Panx1-positive Zelle identifiziert (Abb. 3-4 B, C). Die Panx1-IR war in der Membran und in den, in die OPL stratifizierenden, Dendriten der ZB3a lokalisiert (Abb. 3-4 B, C, Pfeile). Konfokale Einzelscanaufnahmen zeigten sehr deutlich die auffallenden einzelnen Panx1-positiven Punkte, die überwiegend in der Plasmamembran der ZB3a lokalisiert waren. Die Panx1-Signale waren zum Teil mit den HCN4-AK kolo-kalisiert oder befanden sich in deren unmittelbarer Nähe (Abb.3-4 C). Die Ergebnisse der IR-Farbstoffinjektions-Kombinationsversuche bestätigten diese Beobachtung (Abb. 3-4 H-M). Die ZB3-Zellen wurden in diesen Versuchen anhand ihrer Stratifizierung in Strata 2-3 der IPL identifiziert (Abb. 3-4 K, M). 43% (10 aus 23) der injizierten, putativen ZB3-Zellen zeigten das auffällige, punktuelle Panx1-Muster in ihren Somata (Abb. 3-4 J) und Dendriten (Abb. 3-4 I). Die gedrungenen, welligen Dendriten, das stämmige Axonterminal und die Varikositäten der Terminalien der Panx1-positiven Zellen, entsprachen der, für die ZB3a beschriebenen Zellmorphologie (Mataruga *et al.*, 2007; Wässle *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu

besaßen die Panx1-negativen ZB3 stärker verzweigte Dendritenbäume und ein schlankeres Axonterminal. Beide Merkmale wiesen darauf hin, dass es sich bei den Panx1-negativen Zellen um den ZB3b-Typ handelt (Mataruga *et al.*, 2007; Wässle *et al.*, 2009).

Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression von Panx1 ein weiteres ZB3a-spezifisches Merkmal ist, das zur Unterscheidung der beiden ZB3-Subpopulationen verwendet werden kann.

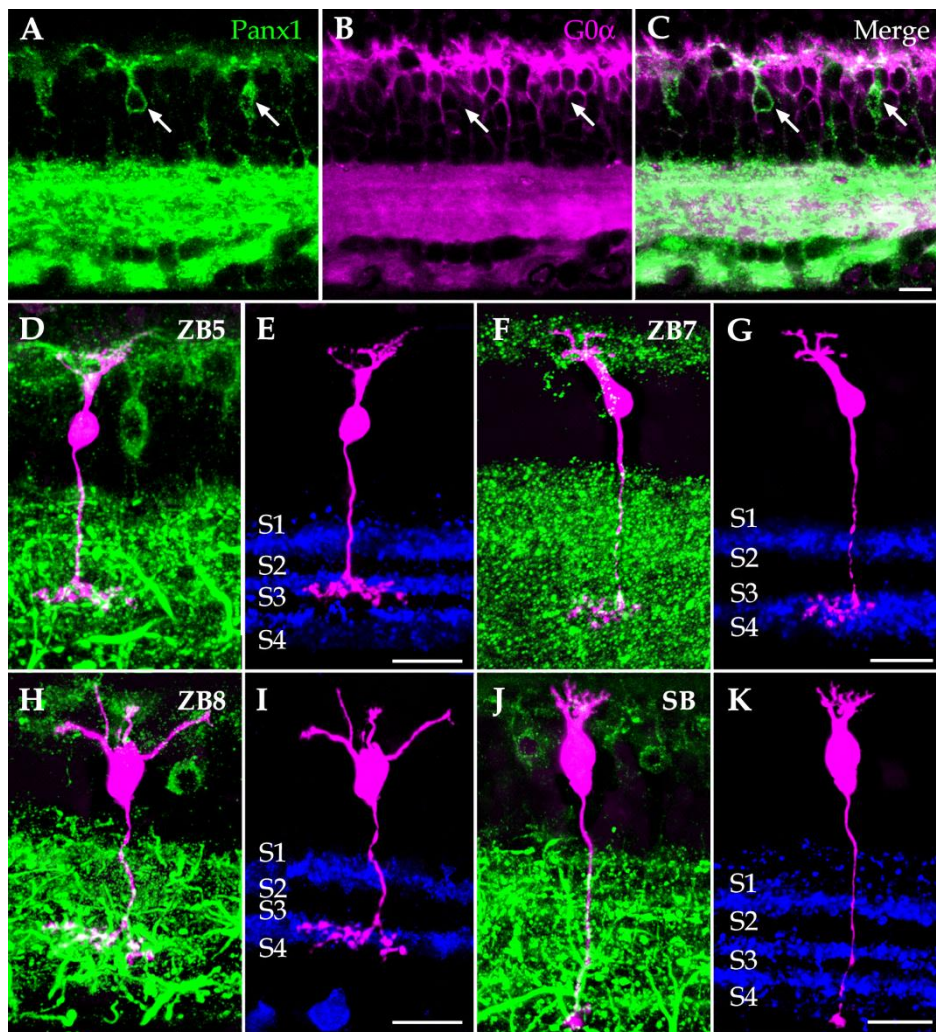


Abbildung 3-5. Pannexin1 wird nicht in ON-Bipolarzellen exprimiert. (A-C) Doppelmarkierungen mit Panx1- (A, grün) und ON-Bipolarzell-spezifischem G0 α -AK (B; magenta) zeigten keine Kolo-kalisation (C). Die Pfeile in A-C deuten auf die Positionen der Panx1-positiven Zellen. (D-K) Farbstoffinjektionen (magenta) verschiedener ON-Bipolarzellen. In keiner der putativen ZB5 (D), ZB7 (F), ZB8 (H) oder Stäbchen-Bipolarzellen (J) wurde Panx1-IR (grün) detektiert. Die Visualisierung der IPL-Sublamina wurde mit Calretinin- (E, K) oder ChAT- (G, I) Markierungen erzeugt. Maßstab=20 μ m in C (gehört zu A-C), 10 μ m in E (gehört zu D, E), in G (gehört zu F, G) in I (gehört zu H, I), in K (gehört zu K, J).

Die Expression von Panx1 in ON-Bipolarzellen wurde immunohistologisch durch gemeinsame Applikation von Panx1 und G0 α -AK analysiert. Die verwendeten G0 α -AK wurden als Marker für die gesamte ON-Bipolarzellpopulation verwendet (Ghosh *et al.*, 2004). Die Panx1-IR zeigte in den Doppelmarkierungen die punktuellen Panx1-Signale in der Membran und den Dendriten einzelner Bipolarzellen (Abb. 3-5 A). Die G0 α -Gegenfärbung visualisierte besonders intensiv die Somata und die Dendriten der Zellen (Abb. 3-5 B). In keiner der G0 α -markierten ON-Bipolarzellen wurden Panx1-positive Signale detektiert (Abb. 3-5 C). In den ergänzenden Farbstoffinjektionsexperimenten konnte diese Beobachtung bestätigt werden: Die Panx1-IR konnte keiner der injizierten ZB5 (n=13; Abb. 3-5 D, E), ZB6 (n=8; nicht gezeigt), ZB7 (n=17; Abb. 3-5 F, G), ZB8 (n=4; Abb. 3-5 H, I) und Stäbchen-Bipolarzellen (n=11; Abb. 3-5 J, K) zugeordnet werden. Der Typ ZB9 wurde wegen seiner Seltenheit nicht mit Farbstoff injiziert. Allerdings konnte die Expression von Panx1 in den ZB9 durch die Ergebnisse der Doppelmarkierungen mit G0 α -AK (Abb. 3-5 A-C) ausgeschlossen werden.

Molekularbiologische (Abb. 3-6 A-C) und immunohistologische (Abb. 3-6 D-G) Untersuchungen an isolierten Bipolarzellen sowie elektronenmikroskopische Analysen (Abb. 3-7) vertikaler Retinaschnitte unterstützten die bisherigen Ergebnisse. Die Herstellung der cDNA einzelnen Zellen und die molekularbiologischen Untersuchungen der Einzelzell-Proben wurden in diesem Projekt von Dr. Petra Bolte und Regina Herrling durchgeführt. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden dissoziierte OFF-Bipolarzellen anhand ihres verkürzten Axons identifiziert (Abb. 3-6 B, C). Zur Herstellung von cDNA wurden zwei bis drei isolierte OFF-Bipolarzellen in einer Probe vereint. Die cDNA der Proben (P1-P8) wurden für Panx1-Expressionsanalysen in OFF-Bipolarzellen mittels RT-PCR-Untersuchungen verwendet. Panx1-mRNA-Transkripte wurden in drei von acht Proben (37,5%) amplifiziert (Abb. 3-6 A). Das Ergebnis bestätigte, dass die Expression von Panx1 nicht ubiquitär in OFF-Bipolarzellen vorhanden war, sondern sich auf einen oder wenige Subtypen beschränkte.

Die Wiederholung der immunhistologischen Doppelmarkierungen an isolierten Bipolarzellen reproduzierte die Ergebnisse der vertikalen Kryoschnitte. Panx1-IR wurde ausschließlich in HCN4-positiven ZB3a lokalisiert (Abb. 3-6 D-F), während die mit G0 α -markierten ON-Bipolarzellen, auch als dissoziierte Zellen keine Kolo-kalisation mit den Panx1-AK aufwiesen (Abb. 3-6 G). Die Panx1-IR in der isolierten ZB3a entsprach der subzellulären Lokalisation, die bereits in den retinalen Gefrierschnitten beobachtet wurde: Punktuelle Panx1-Signale waren in der Membran des Zellsomas vorhanden und reiheten sich entlang der dendritischen Strukturen auf (Abb. 3-6 F, oberer Pfeil). Zusätzliche intensive Panx1-Punkte konnten in den Axonterminalien der isolierten ZB3a beobachtet werden (Abb. 3-6 F, unterer Pfeil). In den vertikalen Retinaschnitten konnten diese Signale nicht wahrgenommen werden, weil sie durch die massiven, unspezifischen Markierungen in der IPL maskiert wurden.

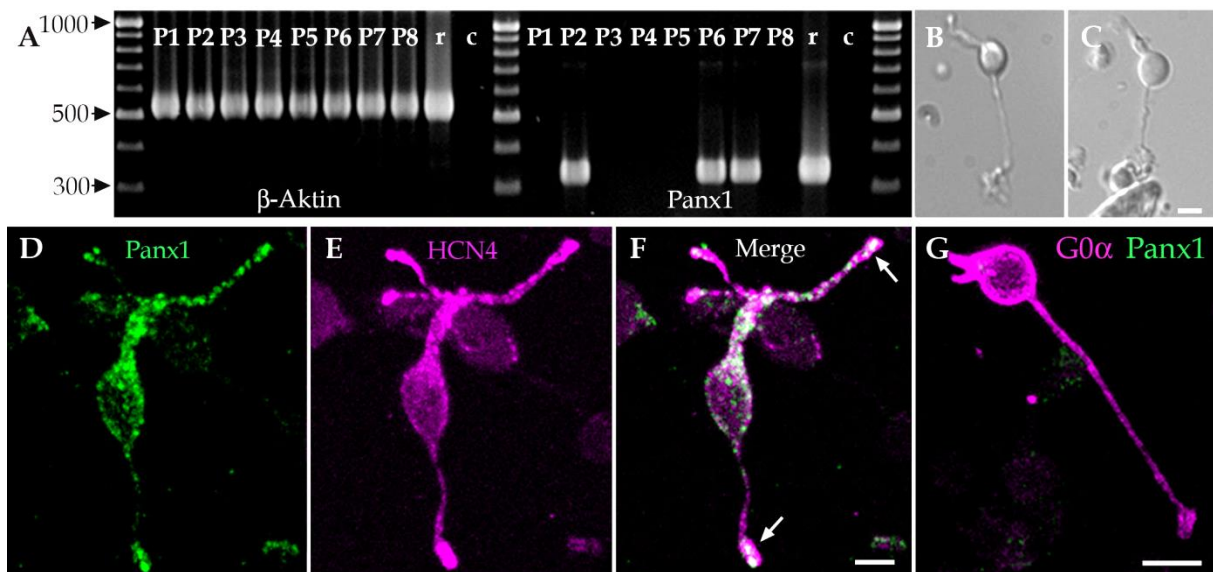


Abbildung 3-6. Pannexin1 wird in OFF-Bipolarzellen exprimiert. (A) RT-PCR-Analysen von OFF-Bipolarzellen. Panx1-cDNA wurde in 3 von 8 Proben (P1-P8) amplifiziert. Intron-umspannende β -Aktin Primer bestätigten die Amplifikation von cDNA (Amplikongröße: 573 Bp) und schlossen Kontaminationen mit genomischer DNA (Amplikongröße: 1.027 Bp) aus. Retinale cDNA (r) diente als Positivkontrolle. Die Negativkontrolle (c) ohne *Template*-cDNA zeigte keine Verunreinigungen. (B, C) Beispiele für gesammelte Bipolarzellen, die anhand des kurzen Axons der OFF-Bipolarzellpopulation zugeordnet wurden. (D-F) Immunhistologische Panx1-Markierungen in dissoziierten OFF-Bipolarzellen. Das Panx1-Immunosignal (grün, D) war in HCN4-positiven ZB3a (magenta, E) lokalisiert. Der Panx1-AK erzeugte ein punktuell-muster in der Zellmembran, auf den Dendriten (oberer Pfeil in F) und im Axonterminal (unterer Pfeil in F) der ZB3a. (G) In keiner G0 α -markierten ON-Bipolarzelle (magenta) wurde Panx1-IR (grün) detektiert. Maßstab=10 μ m in F (gehört zu D-F), G.

Ultrastrukturelle Untersuchungen an vertikalen Retinaschnitten im Bereich der Stäbchenterminalien dienten der weiteren Aufklärung der Panx1-Lokalisation in den Dendriten der Bipolarzellen (Abb. 3-7). Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen in diesem Projekt wurden von Dr. Konrad Schultz durchgeführt und ausgewertet. Zur Überprüfung der spezifischen Antikörpermarkierungen wurden die Versuche parallel an Panx1^{+/+}- (Abb. 3-7 A, C) und Panx1^{-/-}-Tieren (Abb. 3-7 B, D) durchgeführt.

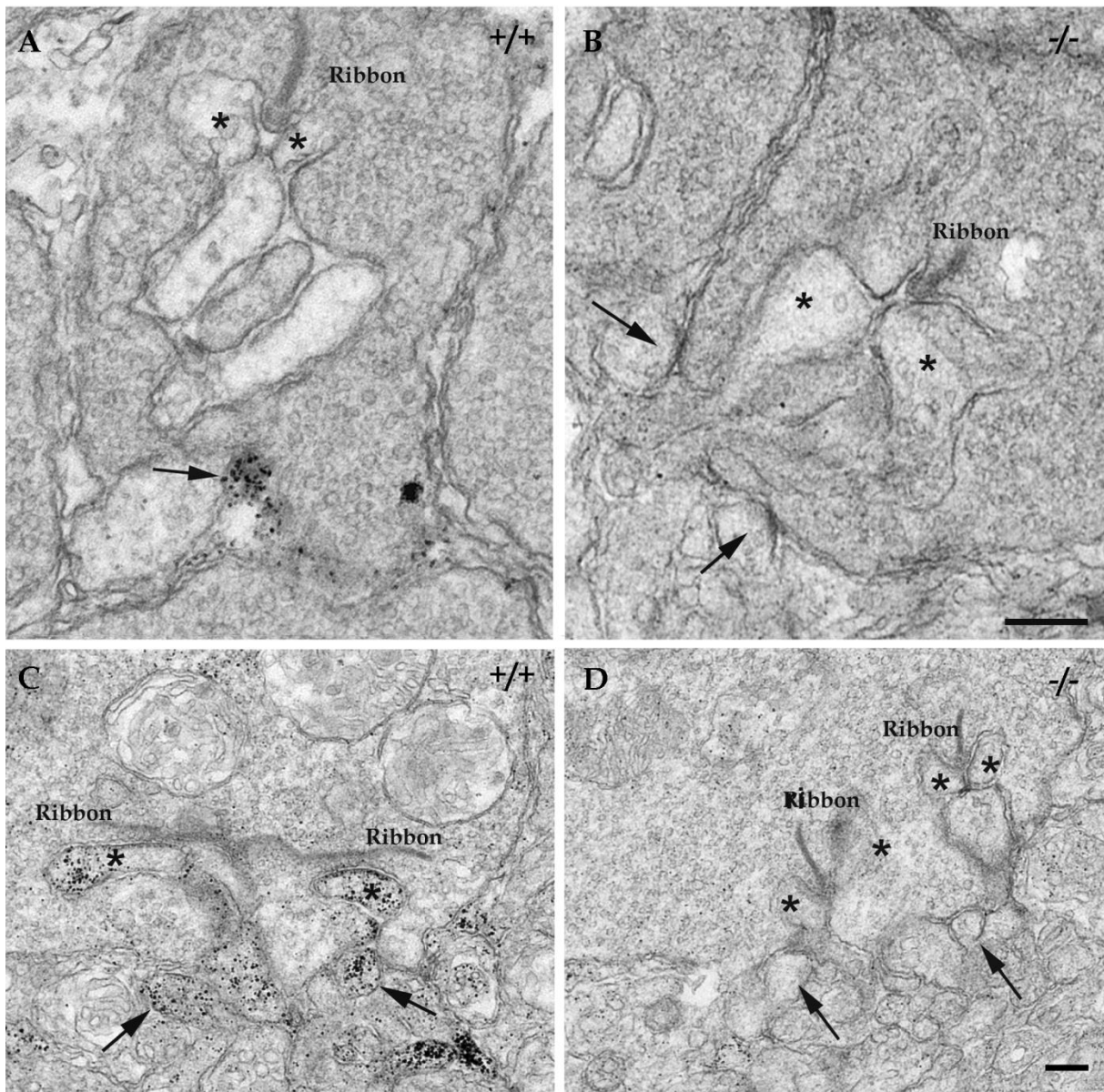


Abbildung 3-7. Elektronenmikroskopische Analyse der Pannexin1-Lokalisation in Bipolarzeldendriten. (A-D) Elektronenmikroskopische Darstellung vertikaler Retinaschnitte durch die Terminalien von Stäbchen (A, B) und Zapfen (C, D). In der Panx1^{+/+}-Retina (+/+) ist Panx1-IR in putativen Bipolarzeldendriten lokalisiert, die flache Kontakte an der Basis der Stäbchenspherules (A, Pfeile) und Zapfenedicles (B, Pfeile) ausbilden. In ähnlichen Strukturen in der Panx1^{-/-}-Maus wurden keine vergleichbaren Markierungen gefunden (B, D). Äquivalente flache Kontakte der OFF-Bipolarzellen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Sternchen markieren die Horizontalzellfortsätze, die zum synaptischen Ribbon aufsteigen. Maßstab=250 nm in B (gehört zu A, B); in D (gehört zu C, D).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus den Bereichen der distalen OPL zeigten die Panx1-IR in den, für OFF-Bipolarzellen typischen, nicht-invaginierenden Fortsätzen an der Basis der Stäbchenspherules (Abb. 3-7 A, Pfeil). Die markierten Strukturen ähnelten den flachen Kontakten, die für ZB3a an den Stäbchenterminalien beschrieben sind (Mataruga *et al.*, 2007). Zusätzliche Panx1-IR an putativen *Pedicle*-kontaktierenden Fortsätzen erinnerte sehr stark an ultrastrukturelle Aufnahmen von flachen Kontakten der OFF-Bipolarzellen an den Terminalien der Zapfen (Abb. 3-7 C, Mataruga *et al.*, 2007). Die beschriebene IR in der Panx1^{+/+}-Retina konnte in ähnlich positionierten Strukturen in der Panx1^{-/-}-Maus nicht beobachtet werden (Abb. 3-7 B, D) und scheint auf spezifische Markierung der Panx1-AK zurückzuführen zu sein.

3.1.4 Expression von Pannexin1 in Horizontalzellen

Die feinen, punktuellen Panx1-Signale, die in der distalen OPL zusätzlich zu den auffällig markierten Bipolarzellendendriten beobachtet wurden (Abb. 3-3 C; Vergrößerung, Pfeil), könnten von den in Stäbchen und Zapfen invaginierenden Fortsätzen der Horizontalzellen stammen. Untersuchungen mittels Einzelzell-RT-PCR bestätigten die ubiquitäre Expression von Panx1-mRNA in den Horizontalzellen (Abb. 3-8). In jeder der sieben cDNA-Proben aus isolierten Horizontalzellen (P1-P7) wurde Panx1 amplifiziert (Abb. 3-8, linkes Feld).

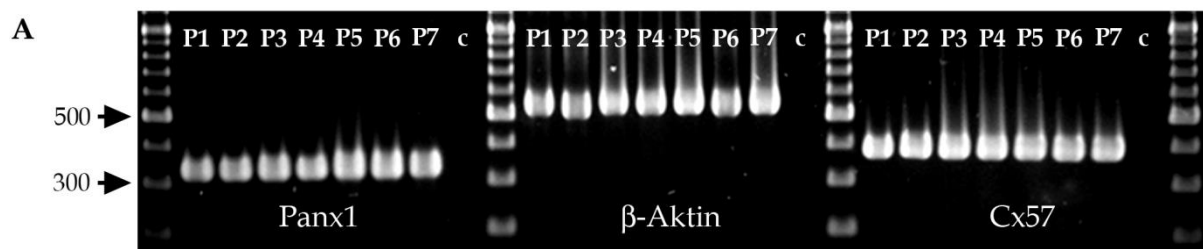


Abbildung 3-8. Pannexin1-mRNA-Expression in Horizontalzellen. Mittels Einzelzell-RT-PCR-Analysen wurde Panx1-cDNA in sieben aus sieben cDNA-Proben (P1-P7) amplifiziert (links). Intron-umspannende β -Aktin Primer bestätigten die Amplifikation von cDNA (Amplikongröße: 573 Bp) und schlossen Kontamination mit genomischer DNA (Amplikongröße: 1.027 Bp) aus (Mitte). Die Amplifikation von Connexin57 (Cx57) garantierte, dass die verwendete cDNA aus mRNA der Horizontalzellen hergestellt wurde (rechts). Durch die Negativkontrollen (c) wurden Verunreinigungen der Proben ausgeschlossen.

Die zusätzliche Detektion des Horizontalzell-spezifischen Cx57 (Hombach *et al.*, 2004) in den einzelnen Proben bestätigte die Gegenwart von Horizontalzell-cDNA (Abb. 3-8, rechtes Feld). Kontaminationen mit genomischer DNA konnten durch den Einsatz der Intron-umspannenden β -Aktin-Primer ausgeschlossen werden (Abb. 3-8, mittleres Feld).

Histologische Untersuchungen an vertikalen Gefrierschnitten der Retina (Abb. 3-9 A, B) und dissoziierten Horizontalzellen (Abb. 3-9 C-F) sollten zur Aufklärung der Panx1-Lokalisation innerhalb der Horizontalzellen beitragen. Die Horizontalzellen wurden mit AK gegen das Horizontalzell-spezifische Ca^{2+} -bindende Protein Calbindin markiert (Rohrenbeck *et al.*, 1987). Panx1-Calbindin-Doppelmarkierungen in vertikalen Retinaschnitten zeigten neben den Panx1-markierten Bipolarzellen (Abb. 3-9 A; kurzer Pfeil), die bereits beschriebenen, distal der Bipolarzeldendriten liegenden Signale, die in unmittelbarer Nähe zu den Calbindin-positiven Horizontalzellfortsätzen positioniert waren (Abb. 3-9 A; lange Pfeile).

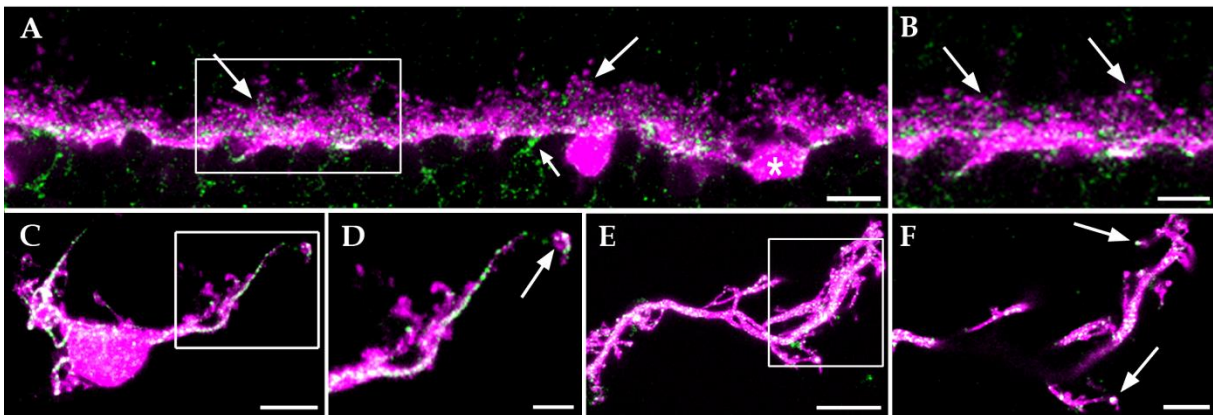


Abbildung 3-9. Pannexin1-Expression in Horizontalzellen. Immunohistologische Doppelmarkierungen mit Panx1-AK (grün) und AK, die gegen das Horizontalzell-spezifische Protein Calbindin (magenta) gerichtet sind. (A, B) Panx1-Calbindin-Doppelmarkierungen in der OPL vertikaler Retinaschnitte. Der kurze Pfeil in A zeigt auf die Panx1-IR in den Bipolarzeldendriten. Zusätzliche Panx1-Signale wurden distal der markierten Dendriten lokalisiert (lange Pfeile). Marginale Panx1-Markierungen befanden sich in den Somata (Sternchen) der Horizontalzellen (A). Ein einzelner konfokaler Scan (B) aus dem gekennzeichneten Bereich in A verdeutlichte die feinen Panx1-Signale, die hauptsächlich in unmittelbarer Nähe zu und gelegentlich auf den Fortsätzen der Horizontalzellen vorkamen (lange Pfeile). (C-F) Panx1-Calbindin-Doppelmarkierungen an dissoziierten Horizontalzellen zeigten die Kolokalisation der Panx1-immunoreaktiven Signale auf den Dendriten der Horizontalzellen (C, D, weiße Punkte) und auf den axonalen Fortsätzen (E, F, weiße Punkte). Vergrößerungen einzelner konfokaler Scans der angezeigten Bereiche in C und E deuteten eine Clusterbildung der Panx1-AK auf den Dendriten (D, Pfeil) und in den Axonterminalien (F, Pfeil) an. Maßstab=10 μm in A, C, E; 5 μm in B, D, F.

Vereinzelte Panx1-IR wurde ebenfalls in den Somata der Horizontalzellen beobachtet (Abb. 3-9 A; Sternchen). Vergrößerungen einzelner konfokaler Aufnahmen verdeutlichten die, direkt an den Fortsätzen lokalisierten, sehr feinen Panx1-Signale in der distalen OPL (Abb. 3-9 B; langer Pfeil). Die immunhistologischen Markierungen der Querschnitte enthielten allerdings keine direkte Information über die subzelluläre Panx1-Verteilung innerhalb der Horizontalzellkompartimente.

Es wurden daher äquivalente Untersuchungen an isolierten Horizontalzellen und Horizontalzellaxonterminalien durchgeführt, um zusätzliche Informationen über den genauen Expressionsort von Panx1 innerhalb der dendritischen Strukturen und/oder der Axonterminalien zu erhalten (Abb. 3-9 C-F). Die Doppelmarkierungen der isolierten Zellen zeigten Panx1-Immunosignale in den Dendriten (Abb. 3-9 C) und in den axonalen Terminalien (Abb. 3-9 E) der Horizontalzellen und in geringerer Konzentration ebenfalls in den Somata. Konfokale Einzelscanaufnahmen der Dendriten zeigten eine auffallende Aneinanderreihungen der punktuellen Panx1-Markierungen (Abb. 3-9 D, Pfeil). In einzelnen konfokale Scans der Axonterminalien waren ähnliche Markierungen mit auffallenden Panx1-Clustern vorhanden, die vermuten ließen, dass Panx1 in den Endigungen der Horizontalzellen exprimiert wird (Abb. 3-9 F, langer Pfeil).

Elektronenmikroskopische Analysen tangentialer Retinaschnitte ermöglichten eine noch genauere Auflösung der Panx1-Verteilung in der distalen OPL (Abb. 3-10). Die Fortsätze der Horizontalzellen (Abb. 3-10; Sternchen) befinden sich an den synaptischen Bändern (Abb. 3-10; *Ribbon*) der Photorezeptorterminalien. Während die dendritischen Fortsätze lateral in die *Pedicles* (Abb. 3-10 A, B) invaginieren, befinden sich die Endigungen der Axonterminalien innerhalb der *Spherules* (Abb. 3-10 C, D; Kolb, 1974; Peichl und Gonzales, 1993). Signale der Panx1-AK wurden in der Panx1^{+/+}-Maus, in den Dendriten (Abb. 3-10 A) und ebenfalls in den apikalen, axonalen Endigungen (Abb. 3-10 C) der Horizontalzellen detektiert, während in äquivalenten Bereichen in den Panx1^{-/-}-Retinen (Abb. 3-10 B, C) keine Panx1-IR gefunden wurde. Die Abwesenheit der Panx1-Markierungen in den Panx1-defizienten Mäusen verdeutlichte die Spezifität dieser Signale.

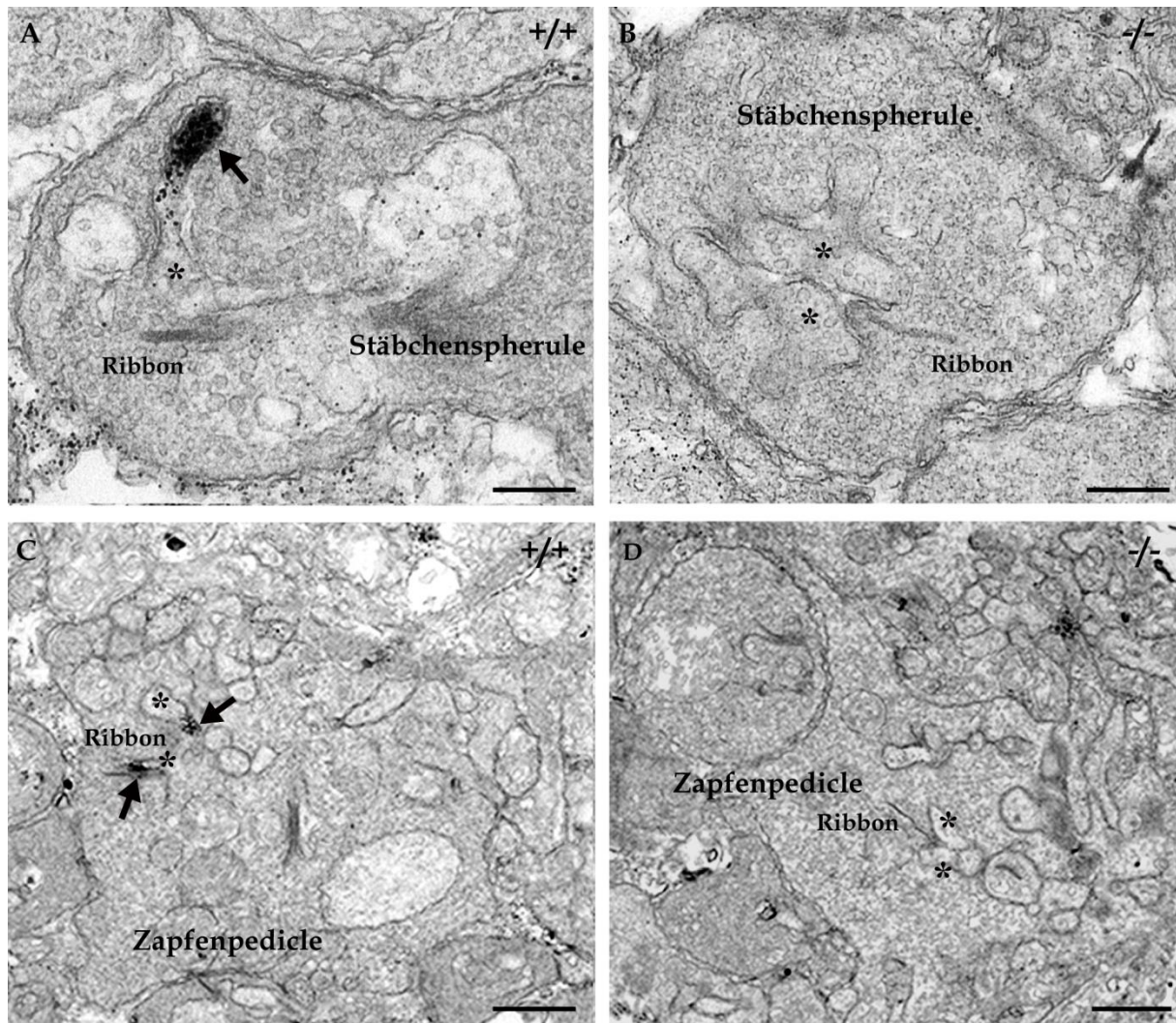


Abbildung 3-10. Ultrastrukturelle Lokalisation von Pannexin1 in den terminalen Strukturen der Horizontalzellen. Tangentiale Schnitte durch die OPL. Sternchen markieren die Horizontalzellfortsätze an der Bandsynapse (*Ribbon*). (A, C) Panx1-IR wurde in den, in die Stäbchen-invaginierenden Axonterminalien der Horizontalzellen (A, Pfeil) und in Horizontalzellendendriten innerhalb der Zapfeninvaginationen (C, Pfeil) lokalisiert. (B, D) Äquivalente Bereiche in der Panx1^{-/-}-Retina zeigten keine vergleichbaren Markierungen in den Horizontalzellfortsätzen. Maßstab=0,2 µm in A, B; 0,1 µm in C, D.

3.1.5 Funktionelle Untersuchungen von Pannexin1-knockout-Mäusen

Durch funktionelle Untersuchungen an Panx1^{-/-}-Mäusen sollten, im Vergleich zu Panx1-exprimierenden Geschwistertieren (Panx1^{+/+}), mögliche Defizite im visuellen System herausgefiltert werden, die Rückschlüsse auf eine putative Funktion von Panx1 in der Wt-Retina zulassen. Die physiologischen Untersuchungen der Retinen wurden mittels *in vivo*- (Abb. 3-11) und *in vitro*-Elektroretinographie (Abb. 3-12; Pinto *et al.*, 2007; Green und Kapousta, 1999b) von Birthe Dorgau und Dr. Mark Pottek durchgeführt.

In vivo-ERG-Antworten, die in den Panx1^{+/+}-Mäusen abgeleitet wurden, zeigten den typischen Verlauf des skotopischen und photopischen ERGs (Abb. 3-11 A, D): Das skotopische ERG bestand aus einer initialen, negativen a-Welle, die die hyperpolarisierende Aktivität der PR reflektierte, und einer positiven b-Welle, die die Depolarisation von ON-Bipolarzellen widerspiegelte. Die photopischen ERG-Antworten (Abb. 3-11 D) besaßen ausschließlich die positive Komponente (b-Welle), da die Stäbchen durch die Hintergrundbeleuchtung der photopischen ERG-Bedingungen in einen Sättigungszustand versetzt wurden (Peachey und Ball, 2003). Im Vergleich zu der Panx1^{+/+}-Maus war in der Panx1^{-/-}-Maus das skotopische *in vivo*-ERG beeinflusst (Abb. 3-11 A-C): Die Amplituden der a- und der b-Welle des skotopischen ERGs waren in den Panx1^{-/-}-Tieren erhöht (Abb. 3-11 B). Bei ansteigenden Lichtintensitäten wurden die vergrößerten Antworten besonders deutlich. Die offensichtlichen Abweichungen in Bezug auf den Genotyp (a-Welle: $F_{(1,180)}=4,04$, $p<0,05$; b-Welle: $F_{(1,180)}=18,54$, $p<0,001$) und auf die Lichtintensitäten (a-Welle: $F_{(9,180)}=71,01$, $p<0,001$; b-Welle: $F_{(9,180)}=0,42$, $p<0,092$) wurden durch statistische Auswertung mit einer zweifaktoriellen ANOVA (Varianzanalyse) bestätigt. Es wurde kein Interaktionseffekt festgestellt (a-Welle: $F_{(9,180)}=0,87$, $p=0,55$; b-Welle: $F_{(9,180)}=0,42$, $p=0,92$).

Die Zeitspanne zwischen Stimulus und Antwortamplitude (*Implicit Time* [engl.]) der a- und b-Welle verringerte sich bei ansteigender Reizintensität gleichermaßen in den beiden Genotypen, zeigte aber keine signifikanten Abweichungen zwischen den beiden Genotypen (a-Welle: $F_{(1,180)}=0,29$, $p=0,59$; b-Welle: $F_{(1,180)}=3,41$, $p=0,067$; Abb. 3-11 C).

Die photopischen ERG-Antworten (Abb. 3-11 D-F) waren in den Panx1^{-/-}-Mäusen nicht beeinflusst. Unabhängig von der Panx1-Expression erhöhte sich bei zunehmenden Reizintensitäten die b-Wellen-Amplitude (Abb. 3-11 E), die im Vergleich zum skotopischen ERG verringert war. In Bezug auf die Amplitudenhöhe ($F_{(1,90)}=1,19$, $p=0,28$, Abb. 3-9 E) und die *Implicit Time* ($F_{(1,90)}=1,55$, $p=0,22$, Abb. 3-9 F) waren keine signifikanten Unterschiede im Antwortverhalten zwischen Panx1^{+/+}- und Panx1^{-/-}- Tieren ersichtlich. Während die b-Wellen-Amplitude bei erhöhter Lichtintensität anstieg ($F_{(4,90)}=80,98$, $p<0,001$), blieb die *Implicit Time* unverändert

($F_{(4,90)}=2,08$, $p=0,09$). Auch unter den photopischen Konditionen wurde kein Effekt von Interaktionen detektiert (Amplitude: $F_{(4,90)}=0,46$, $p=0,77$; *Implicit Time*: ($F_{(4,90)}=1,31$, $p=0,27$).

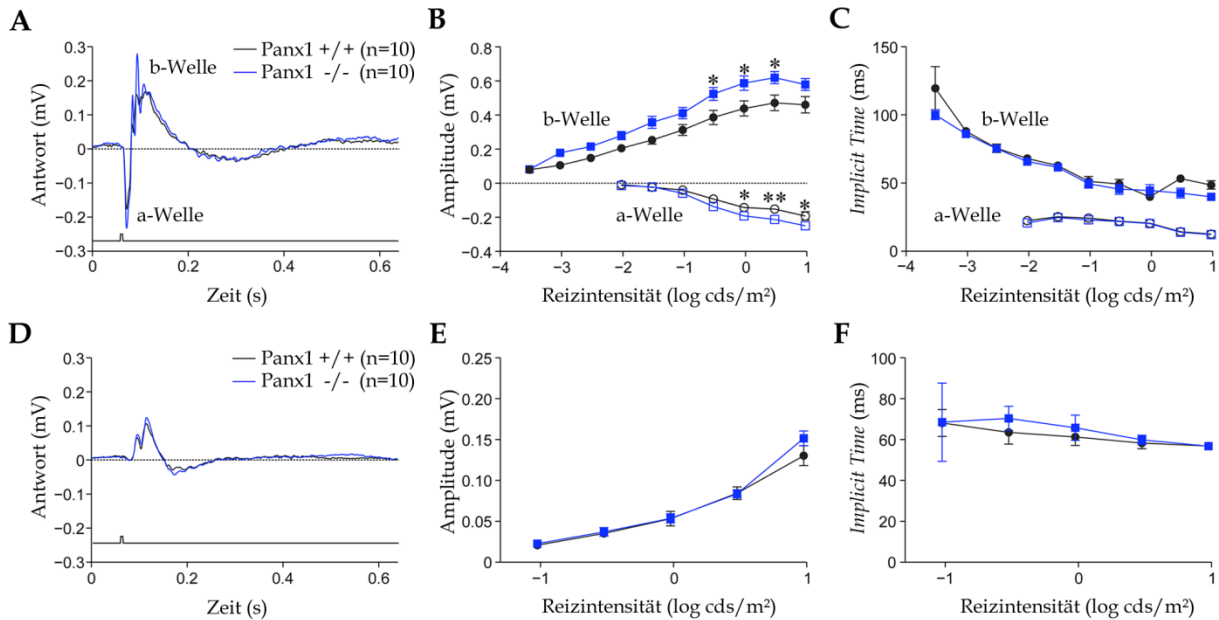


Abbildung 3-11. Einfluss der Pannexin1-Defizienz auf die Antwortigenschaften des *in vivo*-ERGs. (A-C) Einfluss der Panx1-Defizienz auf das skotopische ERG. **(A)** Durchschnittliches, skotopisches ERG von Panx1^{+/+} (schwarz) und Panx1^{-/-} (blau) Mäusen, das durch einen Lichtblitz (repräsentiert durch die untere Spur) von 9,5 cds/m² hervorgerufen wurde. **(B)** Verhältnis der skotopischen Lichtantworten (Amplituden) auf ansteigende Reizintensitäten. Die A- und B-Wellenamplitude war bei der Panx1^{-/-}-Maus erhöht. **(C)** *Implicit Time* der ERG-Komponenten: Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt. **(D-F)** Einfluss der Panx1-Defizienz auf das photopische ERG, das durch einen Lichtblitz mit der Intensität von 9,5 cds/m² gegen eine Hintergrundbeleuchtung von 25 cds/m² hervorgerufen wurde. Die B-Welle des photopischen ERGs zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Panx1^{+/+}- und Panx1^{-/-}-Tieren in Bezug auf Wellenform (D), das Antwortverhalten bei ansteigenden Reizintensitäten (E) und der *Implicit Time* (F). Die Fehlerbalken geben S.E.M. an. Zweifaktorielle ANOVA mit Boniferroni-post-hoc-Test: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Die Ergebnisse der *in vivo*-ERG-Studien zeigten, dass die photopischen Seheigenschaften durch den Panx1-Knockout nicht beeinflusst wurden. Im Gegensatz dazu veränderte sich durch die Panx1-Defizienz die retinale Aktivität unter dunkel-adaptierten Bedingungen (skotopisch). Es zeigten sich dabei allerdings keine Auswirkungen auf die temporalen Komponenten der skotopischen Lichtantworten (*Implicit Time*), die auf Beeinträchtigungen in der Signaltransmission hindeuten könnten.

Zur Untermauerung der *in vivo*-ERG-Ergebnisse wurde mit der Durchführung von ERGs an isolierten Retinen (*in vitro*-ERG) eine andere elektroretinographische

Methode durchgeführt. Das *in vitro*-ERG ist eine Technik, die verwendet werden kann, um transretinale Signale abzuleiten. Es enthält zusätzliche Informationen über die Zellaktivitäten in den unterschiedlichen retinalen Schichten (Green und Kapousta-Bruneau, 1999a; b). Die abgeleiteten *in vitro*-ERG Antworten bestanden aus einer transienten, positiven Welle und einer darauffolgenden langsameren Welle mit gleicher Polarität und Amplitude (Abb. 3-12 A, 1. Spur). Durch Lageveränderungen der Ableitelektrode veränderte sich auch das detektierte ERG: Wurde die Elektrode tiefer in das Gewebe eingebracht, veränderte sich die Polarität der Antwort. Unter diesen Ableitbedingungen besaß die zweite Antwortkomponente eine große Welle mit negativer Polarität. Die transiente, positive Komponente, die die ERG-Antwort initiierte, blieb dabei erhalten (Abb. 3-12 A; Spur 2-7).

Bei Inhibierung der glutamatergen Transmission (durch 50 μ M APB, 10 μ M CNQX; hier nicht dargestellte Daten von Dr. Mark Pottek) zeigte die initiale ERG-Antwortkomponente keine Veränderungen und konnte daher auf die Aktivitäten der PR zurückgeführt werden. Die zweite Antwortkomponente wurde durch die Blockierung des glutamatergen Systems inhibiert und entsprach daher Aktivitäten, die durch Glutamat hervorgerufen wurden und dementsprechend postsynaptisch der PR abliefen. Da durch die *in vitro*-ERG Untersuchungen der Einfluss der Panx1-Defizienz in den Horizontalzellen und Bipolarzellen untersucht werden sollte, sind in Abb. 3-12 B-D ausschließlich die relevanten Ergebnisse der zweiten Antwortkomponente dargestellt. Die Ableitelektrode wurde für die Messungen jeweils in eine definierte Tiefe der Retina gefahren (ca. 165 μ m), die in etwa einer Position in der proximalen INL entsprach.

Das *in vitro*-ERG-Antwortverhalten der Panx1^{-/-}-Mäuse zeigte, unter den gegebenen Ableitbedingungen, deutliche Veränderungen in Bezug auf die zweite Antwortkomponente. Im Vergleich zu den Ableitungen der Panx1^{+/+}-Mäuse war die Amplitude in Panx1^{-/-}-Mäusen deutlich erhöht (Abb. 3-12 B, C). Zweifaktorielle ANOVA-Auswertungen bestätigten die Signifikanz dieser Unterschiede in Bezug auf den Genotyp ($F_{(3,69)}=18,66$, $p<0,001$) und auf die Reizintensität ($F_{(3,69)}=5,01$, $p<0,005$; Abb. 3-10 D). Es gab keinen Interaktionseffekt ($F_{(3,69)}=0,37$, $p=0,78$).

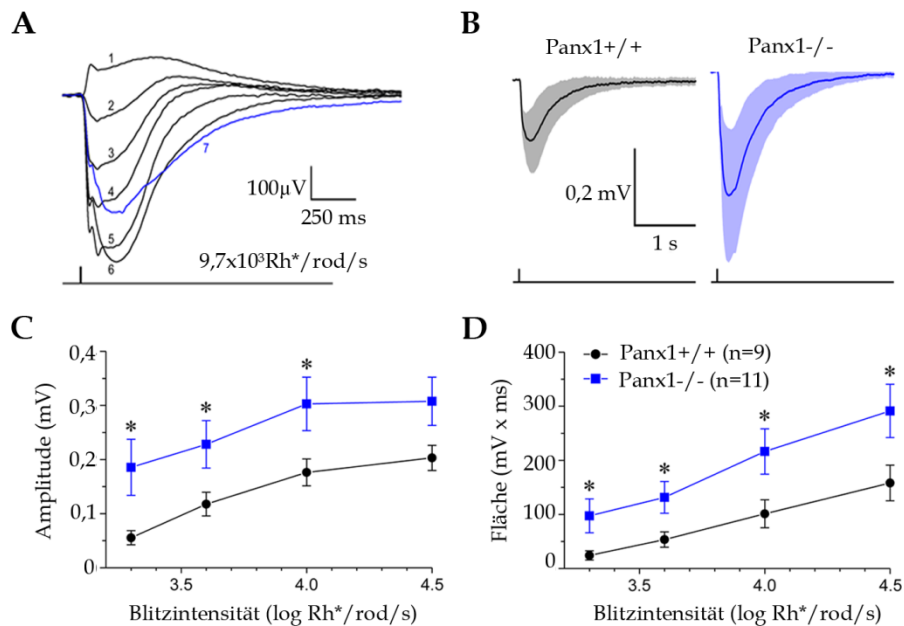


Abbildung 3-12. Effekt der Pannexin1-Defizienz auf *in vitro*-ERG-Ableitungen der inneren Retina. (A) Beispiel der *in vitro*-ERG-Antworten von isolierten Retinen bei einer Reizintensität von $9,7 \times 10^3 \text{ Rh}^*/\text{rod/s}$ (Rhodopsin-Photoisomerisierung pro Stäbchen pro Sekunde). Das ERG wurde zuerst als transretinale Spannung abgeleitet (1. Spur). Angefangen von der Photorezeptorseite wurde die Elektrode zunehmend in die Retina gefahren. Veränderungen der ERG-Antworten wurden nach jeweils 25-30 μm (Spuren 2-7) gemessen. Die blaue Spur entsprach einer Elektroden-tiefe von 165 μm und repräsentierte die Ableitbedingungen für die Ergebnisse in B-D. (B) Die durchschnittlichen *in vitro*-ERG-Antworten der *Panx1*^{+/+} (grau) und *Panx1*^{-/-} (blau) Mäuse zeigten sichtbare Unterschiede. Unter den *Panx1*^{-/-}-Konditionen wurden erhöhte Antwortamplituden festgestellt. Der schattierte Bereich gibt die Standardabweichungen an. (C) Antwortamplitude bei unterschiedlichen Reizintensitäten. Die Amplitude der *Panx1*^{-/-}-Mäuse (blau) war gegenüber der *Panx1*^{+/+}- (schwarz) Antworten signifikant erhöht. (D) Die Antworten der *Panx1*^{-/-}-*in vitro*-ERGS waren in ihrer Fläche größer als die in den *Panx1*^{+/+}-Mäusen gemessenen Antworten. Die Fehlerbalken geben S.E.M. an. Zweifaktorielle ANOVA mit Boniferroni-post-hoc-Test: *p < 0,05; **p < 0,01.

Die Fläche der Amplitudenkurve war bei den *Panx1*^{-/-}-Antworten im Vergleich zu den Antworten der *Panx1*-exprimierenden Tiere auffallend vergrößert (Abb. 3-12 D). Dies bestätigte die bereits festgestellte, erhöhte Amplitude und zeigte eine leichte Verzögerung der Antwort unter den Knockout-Konditionen an.

Die Ergebnisse der *in vitro*-ERGs bestätigten die durch den *Panx1*-Knockout hervorgerufenen Veränderungen der Antwort-eigenschaften, die bereits für die *in vitro*-ERGs beschrieben wurden. Zusammenfassend zeigten die physiologischen Daten, dass die *Panx1*-Defizienz zu Veränderungen in der a- und b-Welle der skotopischen Lichtantworten führte. Die *in vitro*-ERGs bestätigten diese Befunde und deuteten an, dass der detektierte Effekt durch Veränderungen in der Aktivität von Zellen der inneren Retina hervorgerufen wurde.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse in diesem Projekt, dass Panx1 in der Mausretina selektiv in Typ3a-Bipolarzellen und in den axonalen und dendritischen Kompartimenten der Horizontalzellen exprimiert wird. Eine Defizienz von Panx1 beeinflusst die retinale Aktivität unter skotopischen Bedingungen.

3.2 Diskussion

Die Ergebnisse in diesem Projekt beschreiben detailliert die immunhistologische Lokalisation von Panx1 in der Mausretina. Die Spezifität der verwendeten AK wurde erstmals durch Parallelversuche an Panx1^{-/-}-Mäusen bestätigt. Die Ergebnisse zeigten, dass Panx1 homogen in der Zellmembran des Bipolarzelltyps 3a verteilt ist. Daneben wurde die Expression von Panx1 in den Dendriten und Axonterminalien von Horizontalzellen nachgewiesen. Funktionelle ERG-Untersuchungen der Panx1^{-/-}-Retina zeigten, dass die Panx1-Defizienz unter skotopischen Bedingungen die retinale Aktivität verändert.

3.2.1 Überprüfung der Pannexin1-knockout-Maus

Die Panx1^{-/-}-Maus ist ein wichtiger Bestandteil des Projekts. Die Mauslinie diente zum Spezifitätsnachweis für die verwendeten Panx1-AK und wurde genutzt, um den physiologischen Effekt der Panx1-Defizienz auf die retinale Aktivität zu untersuchen. In der Panx1^{-/-}-Mauslinie ist die Expression von Panx1 durch die Insertion eines *LacZ*-Gens direkt hinter dem Startcodon des Exons1 unterbrochen. Anstelle von Panx1 wird dementsprechend eine, durch das *LacZ*-Gen kodierte, β -Galaktosidase exprimiert. Das *LacZ*-Gen endet mit einem Stop-Codon, sodass die Transkription nach dem *LacZ*-Gen beendet wird. Da allerdings das *Panx1*-kodierende Gen fünf Exon- und vier Intronstrukturen aufweist (Bruzzone *et al.*, 2003), besteht die Möglichkeit, dass alternativ gespleißte Panx1-Isoformen trotz der Deletion des 1. Exons in den Panx1^{-/-}-Tieren exprimiert werden könnten. Die Expression von verschiedenen Panx1-Isoformen wurde bereits in Ratten- und in humanem Gewebe beschrieben (Li *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2009). Durch Promotoren innerhalb der nicht-kodierenden Bereiche wäre es daher möglich, dass verschiedene Panx1-Isoformen in der Mausretina exprimiert werden, die z.B. aus Exon 2-5 bestehen könnten. Um dies auszuschließen, war eine Kontrolle der Mauslinie notwendig. In den RT-PCR-Analysen der Panx1^{-/-}-cDNA wurde keines der fünf Panx1-kodierenden Exone amplifiziert, sodass die Expression von Panx1 in diesen Tieren ausgeschlossen werden und die Panx1^{-/-}-Maus in den Versuchen als Knockout-Kontrolltier

eingesetzt werden konnte. Die Expression von verschiedenen Panx1-Isoformen in der Wt-Retina kann aufgrund dieser Versuche allerdings nicht ausgeschlossen werden.

3.2.2 Spezifität der verwendeten Pannexin1-Antikörper

Bei den in diesem Projekt verwendeten Panx1-AK handelt es sich um einen nicht-kommerziellen AK, der von D. W. Laird und S. Penuela (University of Western Ontario, London Ontario, Canada) für die Untersuchungen der Panx1-Lokalisation in der Mausretina zur Verfügung gestellt wurde. Der polyklonale Panx1-AK wurde bisher lediglich für Analysen in Zellkulturen eingesetzt. Der AK ist gegen das cytosolische Ende des murinen Panx1-Proteins gerichtet und detektiert im Zellsystem Panx1 in der Grundform und zusätzlich in zwei Glykosylierungsstufen (Penuela *et al.*, 2007). Da der AK bisher noch nicht für Untersuchungen im Mausgewebe verwendet wurde, war es notwendig die Spezifität zunächst mittels biochemischer und histologischer Analysen in der Mausretina zu untersuchen.

In der biochemischen Spezifitätsanalyse markierte der Panx1-AK zwei Banden, die ausschließlich in den Fraktionen der Panx1^{+/+}-Retina detektiert wurden und daher auf spezifische Markierungen zurückzuführen sind:

Die erste, im Western Blot, detektierte Bande besitzt ein Molekulargewicht von **47 kDa**. Dies entspricht dem für Panx1 beschriebenen Molekulargewicht (Penuela *et al.*, 2007; Dvorientchikova *et al.*, 2012). Die übereinstimmende Größe und die Abwesenheit in den Fraktionen der Panx1^{-/-}-Mauslinie sprechen dafür, dass es sich bei dieser Bande um Panx1 handelt, das auch in der Mausretina als membranständiges Protein exprimiert wird, wie die Anreicherung der Bande in der Membranfraktion zeigt (Abb. 3-2).

Eine zweite Bande von **58 kDa** wurde ausschließlich im Totalhomogenat der Panx1^{+/+}-Mäuse detektiert. Die 58 kDa-Bande wurde in einer anderen Studie (Dvorientchikova *et al.*, 2006) unter anderem in Fraktionen der Retina und des Gehirns beschrieben. Dies verstärkt die Vermutung, dass es sich trotz des zu großen Molekulargewichts um spezifische Bindungen der AK handelt. Die Größe der Bande könnte durch posttranslationale Prozessierungen von Panx1 in Form von Glykosylierungen oder Phosphorylierungen hervorgerufen werden

(Dvorianchikova *et al.*, 2006): Eine Modifikation in Form von Glykosylierungen ist wahrscheinlich, da im Zellsystem bereits zwei Panx1-Glykosylierungsformen nachgewiesen wurden (Penuela *et al.*, 2007), die die Zielsteuerung des Proteins beeinflussen (Boassa *et al.*, 2008; Penuela *et al.*, 2007). Aber auch Phosphorylierungen sind denkbar, da innerhalb der Panx1-Aminosäuresequenz verschiedene Konsensussequenzen für putative Phosphorylierungen vorhanden sind (Penuela *et al.*, 2007; Prochnow *et al.*, 2009).

Eine andere Erklärung für die 58 kDa Bande wäre, dass es sich um einen Proteinkomplex aus Panx1 und einem interagierenden Protein handelt. Auch dies ist wahrscheinlich, da der cytosolische Panx1-Terminus ein PDZ-Bindemotiv aufweist (Dolmatova *et al.*, 2012), wodurch Interaktionen mit *Scaffold*-Proteinen sehr wahrscheinlich sind (Zhang und Wang, 2003). *Scaffold*-Proteine sind an der Organisation und Komplexbildung von Proteinen beteiligt, die innerhalb einer gemeinsamen Signalkaskade miteinander interagieren. Entsprechend könnten Panx1-Interaktionen mit *Scaffold*-Proteinen auf eine Beteiligung von Panx1-Kanälen an Proteinkaskaden hindeuten. Dafür spricht auch die postsynaptische Lokalisation in den Terminalien der PR.

Es stellt sich allerdings die Frage, warum die 58 kDa Bande nicht in der Membranfraktion detektiert wurde. Möglicherweise wurde der Proteinkomplex durch die weitere Behandlung des Totalhomogenats mit Detergenzien und die anschließende mechanische Belastung durch die subzelluläre Fraktionierung aufgetrennt oder die Modifikationen von der Panx1-Sequenz abgespalten. Bei Dvorianchikova *et al.* (2006) wurde diese Bande allerdings auch in der Membranfraktion detektiert. Die Diskrepanz kann auf unterschiedliche methodische Verfahrensweisen bei der Herstellung der verschiedenen subzellulären Fraktionen zurückgeführt werden.

Eine Bande von über **200 kDa** wurde zusätzlich in dem Totalhomogenat und der Membranfraktion detektiert. Die Bande ist gleichermaßen in den Wt- und den Panx1^{-/-}-Lysaten vorhanden und zeigt an, dass der AK neben Panx1 auch unspezifische Proteine in der Retina detektiert.

In den immunohistologischen Untersuchungen der Mausretina wurden spezifische Signale der AK lediglich für bestimmte Bereiche festgestellt: Die Panx1-Immunosignale, die ausschließlich in Wt-Schnitten vorhanden waren, zeigten Markierungen in der äußeren Retina. Zusätzliche Markierungen in der GCL und IPL, die sowohl in der Panx1^{+/+}- als auch in der Panx1^{-/-}-Retina vorhanden waren, können auf die unspezifische Detektion anderer Proteine zurückgeführt werden.

Durch die starken Markierungen in der inneren Retina könnte die Vermutung aufkommen, dass der verwendete AK zwei Panx1-Isoformen erkennt: „Isoform1“ ist in der äußeren Retina lokalisiert, „Isoform2“ markiert die IPL sowie Amakrin- und Ganglienzellen. Während „Isoform1“ ausschließlich in Panx1^{+/+}-Retinen exprimiert wird und durch die Deletion des Exons 1 in Panx1^{-/-}-Tieren nicht vorkommt, könnte „Isoform2“ weiterhin in Panx1^{-/-}-Mäusen exprimiert werden und dadurch die Markierungen in der inneren Retina erklären. Aufgrund der Überprüfung der Panx1^{-/-}-Maus kann diese Möglichkeit jedoch ausgeschlossen werden: Das Epitop der Panx1-AK ist eine Sequenz, die von Exon 4 und 5 des *Panx1*-Gens kodiert wird (siehe Anhang 8.1), die beide in der Panx1^{-/-}-Mauslinie nicht exprimiert werden. Demnach sind die Markierungen in der Panx1^{-/-}-Maus nicht auf die Detektion einer putativ exprimierten zweiten Panx1-Isoform zurückzuführen, sondern auf die unspezifische Detektion eines oder mehrerer retinaler Proteine. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass spezifische Markierungen in diesen Bereichen durch die starke IR maskiert wurden. Diese Markierungen konnten allerdings im Rahmen des Projekts nicht weiter verfolgt werden.

Basierend auf den Ergebnissen ist die Spezifität der Panx1-AK in den Zellen der INL und in der OPL eindeutig nachgewiesen. Dementsprechend wurde die Panx1-Expression in der äußeren Retina weiter untersucht.

3.2.3 Verteilung von Pannexin1 in der Mausretina

Die detektierte Panx1-Expression in der OPL und in der INL stimmt mit früheren Beschreibungen der Panx1-Verteilung in der Retina überein (Dvorianchikova *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2005). In dem **Zapfen-Bipolarzelltyp 3a** scheint Panx1 kein bestimmtes Kompartiment zu bevorzugen. Die Panx1-Expression ist homogen und

punktuell in der gesamten Zellmembran verteilt. Die Lokalisation innerhalb der Axonterminalien, die in den isolierten Zellen detektiert wurde, ist nicht eindeutig, da die Spezifität des Antikörpers in der IPL aufgrund der massiven unspezifischen Markierungen nicht gezeigt werden konnte. ZB3a-Zellen unterscheiden sich von den meisten anderen Bipolarzelltypen, da sie nicht nur Zapfen, sondern auch Stäbchenterminalien kontaktieren und dadurch einen alternativen *Pathway* (tertiärer Signalweg) für die Stäbchensignale bieten (Mataruga *et al.*, 2007). Die ZB3a repräsentieren einen eigenständigen Bipolarzelltyp, der sich morphologisch und funktionell von ZB3b unterscheidet. Dies wird zum einen dadurch deutlich, dass die Stratifizierungen der Dendriten und der Axonterminalien beider Typ 3-Zellen in der Retina keine einander ergänzenden Territorien besitzen, sondern sich überlappen und jeweils die gesamte Retina abdecken (Mataruga *et al.*, 2007). Auch die unterschiedliche Morphologie der Zellen (Form und Ausbreitung der Dendriten, Lokalisation der Somata, Verzweigung des Axonterminals) spricht dafür (Mataruga *et al.*, 2007). Besonders deutlich wird die Individualität der beiden Zelltypen durch die spezifische Expression der verschiedenen Proteine: Der Ionentransporter NCBE wird in den ZB3a und ZB3b unterschiedlich exprimiert (Hilgen *et al.*, 2012): Während die ZB3a den NCBE-Transporter in den Dendriten und Axonterminalien exprimieren, ist dieser in den ZB3b ausschließlich in den Axonterminalien lokalisiert. Zusätzlich verdeutlicht die Expression des Ionenkanals HCN4 und die in dieser Arbeit beschriebene, selektive Lokalisation des Einzelkanal-bildenden Proteins Panx1 die spezifische Funktion der ZB3a. Die benachbarte Lokalisation von HCN4 und Panx1 und die spezifische Expression der beiden Proteine in diesem Bipolarzelltyp könnten gemeinsam zur speziellen Funktion der ZB3a in den retinalen Schaltkreisen beitragen.

Die Lokalisation von Panx1 in **Horizontalzellen** zeigt eine andere subzelluläre Verteilung als in den ZB3a. Panx1 ist in diesen Zellen fast ausschließlich in den Fortsätzen lokalisiert. In den Somata der Horizontalzellen wurden nur gelegentlich sehr schwache Markierungen festgestellt. Der Horizontalzelltyp in der Mause retina erhält Stäbcheneingang an den Axonterminalien und kontaktiert die Zapfen ausschließlich mit den Dendriten (Peichl und Gonzalez-Soriano, 1993). Die

Axonterminalien und die Dendriten repräsentieren individuelle Kompartimente innerhalb der Horizontalzellen (Hombach *et al.*, 2004; Janssen-Bienhold *et al.*, 2009). Panx1 ist Bestandteil der beiden Kompartimente und in den Fortsätzen der Horizontalzellen lokalisiert, die in die Stäbchenspherules und in die Zapfenpedicles invaginieren. Dies stimmt mit früheren Beschreibungen der Panx1-Lokalisation in der Maus- und Zebrafischretina überein (Dvorianchikova *et al.*, 2006; Prochnow *et al.*, 2009; Ray *et al.*, 2005) und deutet auf eine Rolle von Panx1 beim Feedback von Horizontalzellen auf die Photorezeptoren hin (siehe Abschnitt 3.2.5).

3.2.4 Einfluss der Pannexin1-Defizienz auf die retinale Aktivität

Die ERG-Untersuchungen haben gezeigt, dass die Abwesenheit von Panx1 in der Retina die Lichtantworten der a- und der b-Welle im skotopischen Bereich verändert. Beide Komponenten sind in der Panx1^{-/-}-Maus verstärkt.

Die gemessene **b-Welle** des skotopischen ERGs reflektiert die durch Licht-induzierte Aktivität von ON-Bipolarzellen. Sie wird durch extrazelluläre Ströme im radialen Umfeld der Bipolarzellen verursacht (Stockton und Slaughter, 1989). Die Panx1-Kanäle in der Zellmembran und entlang der Somata und Dendriten der Zb3a könnten radial um die Zellen einen entgegengesetzten, negativen Strom (*current sink*) produzieren, der die im ERG detektierten extrazellulären Ströme der Stäbchen-Bipolarzellen reduziert. Entsprechend könnte durch die Entfernung der Panx1-Kanäle in der Membran der ZB3a der reduzierende Einfluss wegfallen, wodurch es zu einer Vergrößerung der b-Welle kommen könnte. Da unter photopischen Bedingungen kein Einfluss der Panx1-Defizienz zu verzeichnen war, könnte dies auf eine Schließung der Panx1-Einzelmembrankanäle zurückzuführen sein, die durch die Lichtadaption vor Beginn der Ableitversuche hervorgerufen wurde. Eine ähnliche Modulation bei Lichtadaption ist auch für retinale GJ beschrieben (Bloomfield *et al.*, 1997; Xin und Bloomfield, 1999).

Einen ähnlichen Einfluss könnten die Panx1-Kanäle auch in der OPL ausüben: Die **a-Wellen-Amplitude** repräsentiert Veränderungen in dem Dunkelstrom der PR (siehe Abschnitt 1.2.1). Zusätzlich können zu der a-Welle auch Ströme beitragen, die an der Synapse der PR entstehen (Banat *et al.*, 2008; Hagins *et al.*, 1970). Durch ihre Position

auf den Fortsätzen der Horizontalzellen und den Dendriten der ZB3a, in unmittelbarer Nähe zum Photorezeptorterminal, könnte eine durch Licht hervorgerufene Öffnung der Panx1-Kanäle auch in diesem Bereich der Retina zu einem *current sink* führen, der zur generellen Verringerung der extrazellulären Ströme beiträgt. In Panx1^{-/-}-Retinen entfällt der reduzierende Einfluss und es kommt zu einer leichten Erhöhung der a-Welle.

Die Öffnung von Einzelmembrankanälen auf den Fortsätzen von Horizontalzellen, mit einem anschließenden lokalen Abfall der extrazellulären Ströme, ist auch ein Merkmal des ephaptischen Mechanismus (Kamermans *et al.*, 2001). Die Beteiligung von Panx1 an dieser Form des negativen Feedbacks von den Horizontalzellen auf die Photorezeptoren soll in 3.2.5 weiter diskutiert werden.

3.2.5 Beteiligung von Pannexin1-Einzelmembrankanälen am ephaptischen Feedback-Mechanismus

Durch ephaptische Interaktionen kann das Feedback der Horizontalzellen auf die Photorezeptorterminalien vermittelt werden (siehe Abschnitt 1.3.3). Bisher wurde der ephaptische Mechanismus in der Fisch- (Fahrenfort *et al.*, 2005; Kamermans *et al.*, 2001; Klaassen *et al.*, 2011) und der Schildkrötenretina (Pottek *et al.*, 2003) nachgewiesen und mit Einzelmembrankanälen, die aus Cx55.5 und Cx26 gebildet werden, in Verbindung gebracht.

Obwohl in der Säugetierretina das negative Feedback von den Horizontalzellen auf die PR ebenfalls nachgewiesen ist (Thoreson *et al.*, 2008; Thoreson und Mangel, 2012), konnte bisher die Existenz eines ephaptischen Mechanismus noch nicht bestätigt werden. Auch die Einzelmembrankanäle, die in der Säugetierretina auf den Endigungen der Horizontalzellfortsätze den ephaptischen Mechanismus vermitteln könnten, wurden bisher noch nicht identifiziert (Janssen-Bienhold *et al.*, 2009).

Allerdings ist die Lokalisation von Panx1 auf den invaginierenden Fortsätzen der Horizontalzellen vergleichbar mit der beschriebenen Position von Cx55.5- und Cx26-Einzelmembrankanälen, deren Beteiligung am ephaptischen Mechanismus in der Fisch- und Schildkrötenretina gezeigt wurde (Kamermans *et al.*, 2001; Pottek *et al.*, 2003). Neben dieser, für den ephaptischen Mechanismus, optimalen **Position an den**

Endigungen der Horizontalzellfortsätze deuten weitere Tatsachen auf eine Beteiligung der Panx1-Einzelmembrankanäle am ephaptischen Mechanismus hin:

1. Physiologische Eigenschaften der Panx1-Einzelmembrankanäle:

Wenn auch die Topologie der Panx1-Kanäle der Struktur von Connexonen ähnlich ist, besitzen Panx1-Kanäle dennoch andere Eigenschaften als Connexone, die für eine Beteiligung am ephaptischen Mechanismus besser geeignet sind: Panx1 bildet ausschließlich hexamere Einzelmembrankanäle aus (Sosinsky *et al.*, 2011), die im Gegensatz zu einigen Connexonen nicht durch die hohen extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen blockiert werden. Entsprechend ist keine starke Depolarisation der Membran notwendig, um ihre Leitfähigkeit zu erhöhen (Bruzzone *et al.*, 2005). Dies ist ein wichtiger Punkt, da der ephaptische Mechanismus vor allem durch erhöhte Leitfähigkeiten bei Hyperpolarisation der Horizontalzellen geprägt ist (Kamermans *et al.*, 2001).

2. Existierender Feedback-Strom im Zebrafisch trotz Cx55.5-Deletion:

Möglicherweise ist auch eine Kombination aus Panx1- und Connexin-Kanälen am ephaptischen Mechanismus beteiligt. Untersuchungen an der Zebrafischretina zeigten, dass das Feedback auf die PR nur teilweise durch den Verlust von Cx55.5-Hemikanälen in den Horizontalzellen unterbrochen ist (Klaassen *et al.*, 2011). Ca. 40% der gesamten Leitfähigkeit der Hemikanäle bleibt vorhanden. Dieser Befund lässt vermuten, dass zusätzlich andere Einzelmembrankanäle am ephaptischen Mechanismus beteiligt sind (Klaassen *et al.*, 2011). Panx1 wurde in der Zebrafischretina ebenfalls auf den Horizontalzellendriten lokalisiert (Prochnow *et al.*, 2009) und könnte für die detektierte Leitfähigkeit verantwortlich sein.

3. Negatives Feedback von den Horizontalzellen auf die Stäbchen:

In der Mausretina wurde zusätzlich das Feedback von Horizontalzellen auf Stäbchen gezeigt (Babai und Thoreson, 2009). Da Panx1 ebenfalls in den Stäbchenkontaktierenden Axonterminalien der Horizontalzellen gefunden wurde, spricht auch dies für eine mögliche Beteiligung der Panx1-Einzelmembrankanäle am ephaptischen Mechanismus in der Mausretina.

3.2.6 Pannexin1 und P2X₇-Rezeptoren in der Mausretina

Aufgrund der Lokalisation und basierend auf den bisher beschriebenen Eigenschaften der Kanäle könnte Panx1 in der Retina auch an einem anderen Mechanismus beteiligt sein, der die Aktivität der PR beeinflusst: Die Lokalisation von Panx1 in der Photorezeptorsynapse könnte im Zusammenhang mit den purinergen P2X₇-Rezeptoren stehen, die ebenfalls an dieser Stelle lokalisiert sind (Puthussery und Fletcher, 2004).

P2X₇-Rezeptoren sind ATP-gesteuerte, Ca²⁺-permeable Rezeptoren, die in der Retina auf den Fortsätzen der Horizontalzellen und in den Terminalien der PR lokalisiert sind (Puthussery und Fletcher, 2004; Ralevic und Burnstock, 1998). Funktionelle Untersuchungen mit einem P2X₇-Agonisten zeigten, dass die Stimulation der P2X₇-Rezeptoren die Aktivitäten der PR ansteigen lässt, wodurch eine Beteiligung dieser Rezeptoren an der Signaltransmission der PR vermutet wird (Puthussery *et al.*, 2006). Da die ionotropen P2X₇-Rezeptoren vor allem Ca²⁺-permeabel sind, ist die detektierte Aktivitätssteigerung der PR vermutlich auf einen, durch die aktivierten P2X₇-Rezeptoren induzierten, Ca²⁺-Einstrom in die Photorezeptorterminalien zurückzuführen (Puthussery *et al.*, 2006). Diese Hypothese ist vorstellbar, da P2X-Rezeptoren auch in anderen Bereichen des zentralen Nervensystems die Freisetzung von Glutamat aus neuronalen Zellen induzieren (Robertson, 1998). Allerdings ist in der Retina der Ursprung der ATP-Freisetzung, die zur Aktivierung der P2X₇-Rezeptoren führt, noch nicht identifiziert worden (Puthussery *et al.*, 2006). Die auf den Horizontalzellfortsätzen lokalisierten Panx1-Kanäle könnten in diesen Mechanismus involviert sein. Es ist bekannt, dass Panx1 großporige Einzelmembrankanäle ausbildet, die eine Freisetzung von größeren Molekülen (bis 1,5 kDa), wie ATP, ermöglichen (Bosco *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2007). Die ATP-Freisetzung durch Panx1-Kanäle ist bereits im Zusammenhang mit der Aktivierung von metabotropen P2Y- und den ionotropen P2X-Purinrezeptoren beschrieben (Iglesias *et al.*, 2008; Locovei *et al.*, 2006; Pelegriin und Surprenant, 2006, Locovei *et al.*, 2007): Die Aktivierung der Purinrezeptoren durch ATP induziert den Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und führt dadurch zur Öffnung der Panx1-Kanäle und zur ATP-Freisetzung. Das Zusammenspiel zwischen Panx1 und den

Purinrezeptoren ist als Mechanismus für die ATP-vermittelte Ausbreitung von Ca^{2+} -Wellen im zentralen Nervensystem beschrieben (MacVicar und Thompson, 2010). Panx1-Kanäle können auch als ATP-freisetzende Pore mit den P2X₇-Rezeptoren interagieren (Locovei *et al.*, 2007). Demnach könnten die, auf den Fortsätzen der Horizontalzellen lokalisierten, Panx1-Kanäle auch in der äußeren Retina den Ursprung für die ATP-Freisetzung darstellen: Durch einen cytosolischen Anstieg von Ca^{2+} in den Horizontalzellen könnte es zur Öffnung der Panx1-Kanäle kommen (Barbe *et al.*, 2006; Lai *et al.*, 2007; Shestopalov und Panchin, 2008). ATP wird durch die geöffneten Panx1-Kanäle in die Photorezeptorsynapse freigesetzt. Das ATP bindet und öffnet die P2X₇-Rezeptoren in den Photorezeptorterminalien, wodurch Ca^{2+} in den PR einströmt und die Freisetzung von Glutamat induziert. Durch die zusätzliche Lokalisation von P2X₇-Rezeptoren und Panx1-Kanälen auf benachbarten Horizontalzellfortsätzen könnte dieser Effekt durch zusätzliche Freisetzung von ATP lokal verstärkt werden.

3.2.7 Fazit und Ausblick

In dem vorliegenden Projekt wird zum ersten Mal die selektive Expression von Panx1 in zwei Zelltypen der Mausretina gezeigt und mit funktionellen Analysen der Panx1-Einzelmembranaktivitäten in Verbindung gebracht. Die spezifische Panx1 Expression in ZB3a und Horizontalzellen beeinflusst die retinale Aktivität unter skotopischen Bedingungen, vermutlich durch reduzierende Einflüsse in der OPL und der INL. Um die Funktion von Panx1 in der Retina besser zu verstehen, sind allerdings weiterführende Untersuchungen notwendig:

- Da Panx1 vermutlich mittels der PDZ-Bindedomäne Bestandteil eines funktionellen Proteinkomplexes ist, könnten durch biochemische Immunopräzipitationsversuche putative Interaktionspartner identifiziert werden, die wichtige Hinweise auf die Funktion von Panx1 in der Retina geben könnten. Eine Untersuchung der putativen Panx1-P2X₇-Rezeptor-Interaktion wäre in Bezug auf die in 3.2.6 aufgestellte Hypothese sehr interessant.

- Die Isolierung und Charakterisierung von Panx1-Einzelmembrankanalströmen in isolierten Horizontal- und ZB3a-Zellen könnten wichtige Informationen über die Kanaleigenschaften (Spannungs-, Ca^{2+} -Abhängigkeit, etc.) geben.

Die Lokalisation von Panx1 auf den Horizontalzellendendriten deutet auf eine Beteiligung der Panx1-Kanäle bei der Modulation der Photorezeptoraktivitäten hin. Dies könnte über den ephaptischen Mechanismus erfolgen und/oder durch Interaktionen zwischen Panx1 und P2X₇-Rezeptoren. In nachfolgenden Versuchen wäre es interessant, diesen Vermutungen weiter nachzugehen:

- Um die Beteiligung am ephaptischen Mechanismus näher zu untersuchen, wären Ableitungen, in Analogie zu der Arbeit von Babai und Thoreson (2009), an der Panx1^{-/-}-Maus interessant, um zu überprüfen, ob sich die Feedback-Antworten durch die Panx1-Defizienz verändern.
- Des Weiteren wäre sicherlich auch die Durchführung von immunohistologischen Panx1-P2X₇-Rezeptor-Doppelmarkierungen interessant, um die aufgestellte Hypothese der Panx1-P2X₇-Interaktion weiter zu verfolgen. Auch Messungen der ATP-Konzentration innerhalb der OPL der Panx1^{+/+}- und Panx1^{-/-}-Mäuse könnten zu weiteren Erkenntnissen der ATP-freisetzenden Funktion von Panx1 führen.

4. Mechanismen genetisch bedingter Photorezeptordegeneration

In dem zweiten Projekt dieser Arbeit wurde die Mausretina vor dem Hintergrund der Erkrankung RP untersucht. Das Projekt gliederte sich in zwei Unterprojekte: Im ersten Unterprojekt wurden die Mechanismen der **primären Stäbchendegeneration** (siehe Abschnitt 4.1.2) analysiert, im zweiten Unterprojekt eine Hypothese überprüft, die als putative Erklärung für das **sekundären Zapfensterben** dient (siehe Abschnitt 4.1.3). Es wurden zwei RP-Mausmodelle verwendet: Die Rho^{-/-}-Maus (in Abschnitt 4.1.2 und 4.1.3), die hinsichtlich des Degenerationsverlaufs und des Absterbens der PR noch nicht vollständig charakterisiert ist, und die Rd1-Maus (in Abschnitt 4.1.3), die ein etabliertes RP-Mausmodell darstellt.

4.1 Ergebnisse

4.1.1 Zeitlicher Verlauf der Photorezeptordegeneration in der Rhodopsin-knockout-Maus

In beiden Unterprojekten wurden die unterschiedlichen Phasen der Photorezeptordegeneration untersucht (primäre Stäbchen-/ sekundäre Zapfendegeneration). Da der morphologische Verlauf der retinalen Degeneration in der Rho^{-/-}-Maus bisher lediglich ansatzweise beschrieben ist (Humphries *et al.*, 1997; Jaissle *et al.*, 2001; Punzo *et al.*, 2009), wurde zu Beginn eine immunohistologische Zeitreihe der Photorezeptordegeneration anhand vertikaler Retinaschnitte unterschiedlich alter Rho^{-/-}-Mäuse (postnatal Woche (pw) 2, 4, 6, 9, 12, 17, 20) aufgestellt (Abb. 4-1). Die Markierung der Zapfen erfolgte mit AK gegen das Zapfenspezifische Arrestin (*Cone Arrestin* [engl.]; Nasonkin *et al.*, 2011); Kernfärbungen wurden mit DAPI durchgeführt, um die Schichtung der ONL zu verdeutlichen.

Der bereits beschriebene späte Einsatz und der langsame Verlauf der Photorezeptordegeneration konnten bestätigt werden: In 2 und 4 Wochen alten Tieren (Abb. 4-1 A, B) wurden noch keine Änderungen der Retinamorphologie detektiert. Die Anordnung der ONL-Schichtung war gleichmäßig und entsprach mit 12-14 Kernreihen dem normalen Umfang der äußeren Kernschicht in Wt-Retinen.

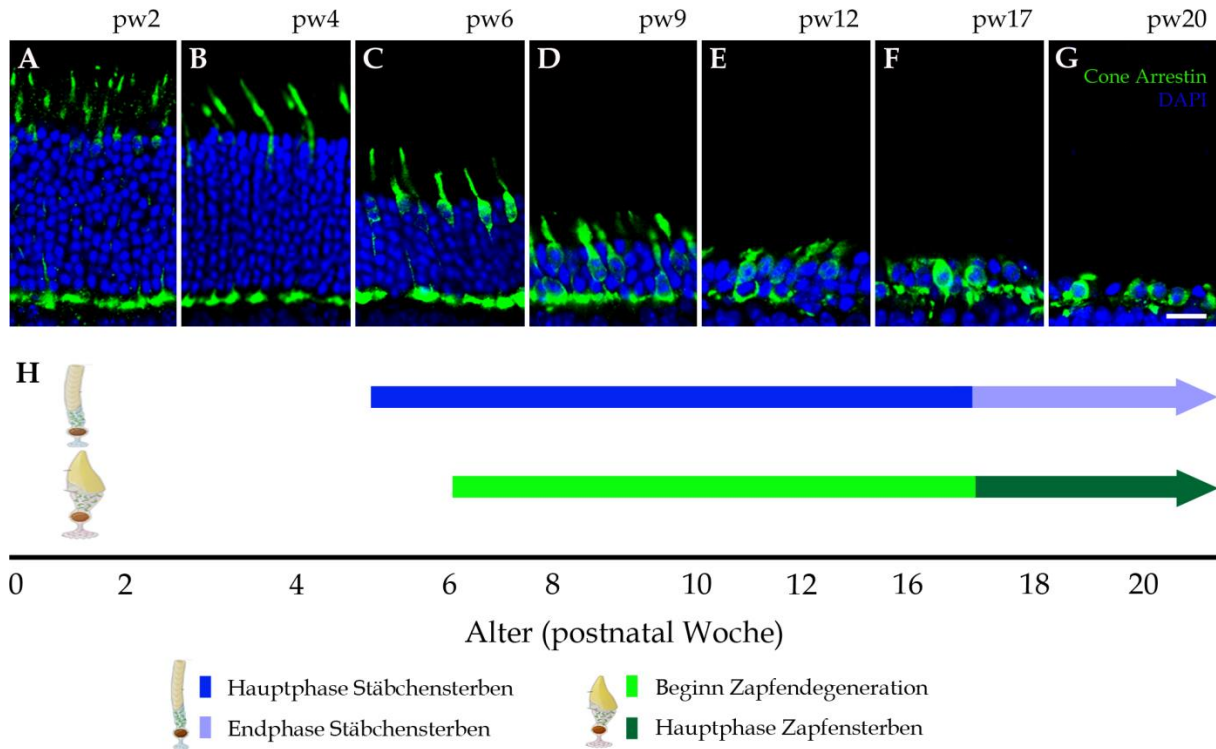


Abbildung 4-1. Verlauf der Photorezeptordegeneration in der Rhodopsin-knockout-Maus. (A-G) Immunohistologische Markierungen der Zapfen mit *Cone Arrestin*-AK (grün) und Visualisierung der Zellkerne mit TO-PRO3 (blau). Die Zeitreihe der unterschiedlich alten *Rho*^{-/-}-Retinen zeigt den langsamen Verlauf der Photorezeptordegeneration zwischen 2 und 20 Wochen (pw2-pw20). Eine Reduzierung der ONL wurde ab pw6 (C) sichtbar. Veränderungen in der Zapfenmorphologie wurden ab pw9 offensichtlich. (H) Schematische Darstellung der Photorezeptordegeneration verdeutlicht die Haupt- (dunkelblau) und Endphase (hellblau) des Stäbchensterbens sowie die frühe (hellgrün) und die Hauptphase (dunkelgrün) der Zapfendegeneration. pw: postnatal Woche. Maßstab in G=20 μ m (entspricht A-G). Photorezeptoren in H verändert nach <http://www.britannica.com>.

Die Auswirkungen des retinalen Abbaus waren im Alter von pw6 offensichtlich. Die Anzahl der ONL-Schichten war in diesen Tieren aufgrund des primären Stäbchensterbens, dessen Hauptphase ab einem Alter von 5 Wochen einsetzt (Punzo *et al.*, 2009), bereits auf sieben Kernreihen reduziert (Abb. 4-1 C). Der fortschreitende Zellverlust wurde mit zunehmendem Alter der Mäuse noch deutlicher (Abb. 4-1 D, E). In 17 Wochen alten Tieren waren lediglich ein bis zwei Reihen von Nuklei in der ONL übrig geblieben (Abb. 4-1 F). Der Hauptteil der Stäbchen war zu diesem Zeitpunkt abgestorben, und die Mehrheit der in der ONL verbleibenden Zellen repräsentierte Zapfen. Während bis zu einem Alter von 9 Wochen die *Cone Arrestin*-positiven Zapfen noch deutlich die Minderheit der ONL-Zellen ausmachten (Abb. 4-1 A-D), waren an pw17 fast alle noch vorhandenen Nuklei durch die *Cone Arrestin*-AK markiert und daher hauptsächlich dem Zapfentyp zuzuordnen (Abb. 4-1 F, G).

Der optische Vergleich der vertikalen Retinaschnitte zwischen 17 und 20 Wochen alten Rho^{-/-}-Mäusen (Abb. 4-1 F, G) zeigte einen Verlust der markierten Zapfen und ließ auf die Hauptphase der Zapfendegeneration schließen, deren Einsatz für dieses Alter beschrieben ist (Punzo *et al.*, 2009). Eine Reduzierung der Zapfengröße und offensichtliche Deformationen wurden als erste Anzeichen der beginnenden Zapfendegeneration bereits ab einem Alter von 6 bis 9 Wochen detektiert (Abb. 4-1 C-G).

Die schematische Darstellung in Abb. 4-1 H fasst die verschiedenen Phasen des Stäbchen- (blau) und Zapfensterbens (grün) für die unterschiedlichen Altersstufen der Rho^{-/-}-Maus zusammen. Der dargestellte Verlauf der Degeneration stimmte mit früheren Beschreibungen des retinalen Abbaus in der Rho^{-/-}-Retina überein und ergänzte die bereits beschriebenen Stadien (Humphries *et al.*, 1997; Jaisle *et al.*, 2001; Punzo *et al.*, 2009).

Da der Verlauf und die verschiedenen Stufen der Photorezeptordegeneration in der Rd1-Maus bereits sehr gut charakterisiert sind (Carter-Dawson *et al.*, 1978; Punzo *et al.*, 2009), wird an dieser Stelle nicht weiter darauf eingegangen (siehe Abschnitt 1.5.4.2).

4.1.2 Mechanismen der primären Stäbchendegeneration in der Rhodopsin-knockout-Maus

Dieses 1. Unterprojekt ist Bestandteil einer umfangreichen Studie der "Cell Death Mechanisms Group" (Institute for Ophthalmic Research, Tübingen), zur Identifizierung der zellulären Mechanismen, die mutationsunabhängig das primäre Absterben der Stäbchen bei RP-Erkrankungen induzieren. Die Aktivität verschiedener Zelltod-induzierender Enzyme sollte innerhalb dieser Studie parallel an einer Vielzahl von RP-Mausmodellen untersucht werden, um die gemeinsamen, in allen Modellen aktiven, zellulären Faktoren herauszufiltern. In der vorliegenden Arbeit wurden Ereignisse der aktiven Zelltodmechanismen in der Rho^{-/-}-Maus identifiziert.

4.1.2.1 Ermittlung der Hauptphase des Stäbchensterbens

Zu Beginn dieses Projekts wurde die Kinetik des Absterbens der PR näher untersucht, um ein passendes Alter für die Charakterisierung der Stäbchenzelltodmechanismen zu definieren. Zu diesem Zweck wurde eine Quantifizierung absterbender Zellen in der ONL von unterschiedlich alten Rho^{-/-}-Mäuse durchgeführt (Abb. 4-2). Die absterbenden Zellen wurden in vertikalen Retinaschnitten mittels des TUNEL-Assays markiert (Abb. 4-2 A-D) und in der gesamten ONL quantifiziert (Abb. 4-2 E). Der TUNEL-Assay basiert auf der Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen, die beim Absterben von Zellen entstehen. Die Markierung der Doppelstrangbrüche erfolgt unabhängig von den ablaufenden Zelltodarten (z.B. Apoptose, Nekrose; Kelly *et al.*, 2003).

In jungen 2 Wochen alten Tieren wurden keine Unterschiede in der Anzahl absterbender Zellen zwischen Wt- und Rho^{-/-}-Retinen festgestellt. Das Absterben der Stäbchen hatte in dieser Altersstufe noch nicht begonnen. Die TUNEL-Quantifizierungen der älteren Tiere zeigten, dass die Anzahl absterbender Zellen in der Rho^{-/-}-Maus ab pw4 gegenüber dem Wt signifikant erhöht waren (Abb. 4-2 E, T-Test: $p < 0,00863$ für alle Vergleiche, $n=3$). Das Maximum an sterbenden Zellen wurde in 6 Wochen alten Rho^{-/-}-Retinen detektiert (Abb. 4-2 B, E). Da in diesem Alter die Zapfen noch teilweise funktionell sind (Jaissle *et al.*, 2001) und deren Absterben nicht eingesetzt hat (Punzo *et al.*, 2009), repräsentierte dieser Zeitpunkt das Alter mit der maximalen Stäbchensterberate. Zwischen pw6 und pw17 reduzierte sich die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen. Die Quantifizierungen von älteren Rho^{-/-}-Retinen zeigten einen weiteren auffallenden Anstieg der TUNEL-markierten Zellen von pw17 auf pw20. Statistische Analysen bestätigten eine Signifikanz dieses Anstiegs (Abb. 4-2 E, T-Test: $p=0,0391$, $n=3$). Die erneut zunehmende Zellsterberate in der ONL deutete vermutlich auf die einsetzende Hauptphase des sekundären Zapfensterbens hin, die in diesem Zeitraum beginnt (Punzo *et al.*, 2009). Weitere Quantifizierungen mit älteren Rho^{-/-}-Tieren wären erforderlich, um diese Aussage zu verifizieren, wurden innerhalb dieses Projekts allerdings nicht durchgeführt. In den Wt-Tieren war die Anzahl TUNEL-positiver Zellen für den gesamten Untersuchungszeitraum konstant (T-Test: $p < 0,06122$ für alle Vergleiche, $n=3$).

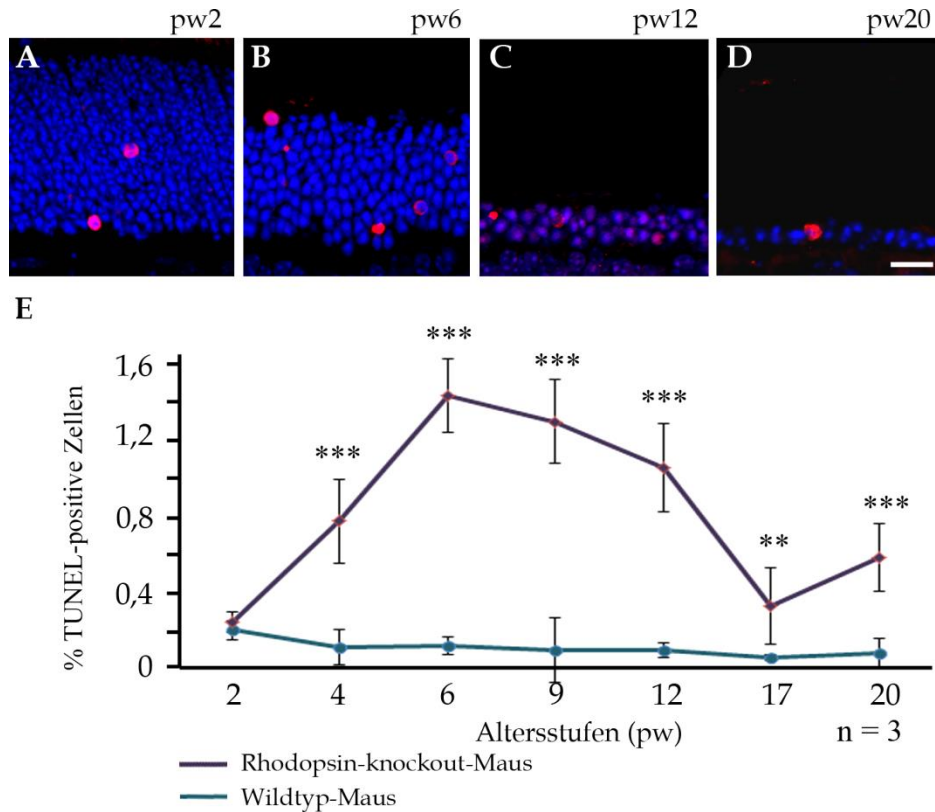


Abbildung 4-2. Kinetik des Photorezeptorzelltods in der Rhodopsin-knockout-Maus. (A-D) Detektion absterbender Zellen in der ONL mittels TUNEL-Markierungen (rot), exemplarisch dargestellt für 2 (A), 6 (B), 12 (C) und 20 (D) Wochen (pw) alte Rho^{-/-}-Retinen. Die Reduzierung der Kerne in der ONL mit zunehmendem Alter wurde durch Markierungen der Zellkerne mit DAPI (blau) visualisiert. (E) Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellen in der ONL. Das Diagramm gibt die prozentuale Anzahl TUNEL-positiver Zellen in der gesamten ONL wieder. Die Quantifizierung wurde in verschiedenen Altersstufen der Rho^{-/-}-Mäuse (lila) durchgeführt und im Vergleich zu gleichaltrigen Wt-Tieren (blau) dargestellt. Die maximale Anzahl TUNEL-positiver Zellen wurde in 6 Wochen alten Rho^{-/-}-Tieren detektiert. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zum Vergleich der Anzahl TUNEL-positiver Zellen zwischen Rho^{-/-}- und Wt-Tieren wurde ein T-Test durchgeführt: **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. n gibt die Anzahl der Tiere wieder. pw: postnatale Woche. Maßstab=20 μ m in D (gehört zu A-D).

Durch die TUNEL-Quantifizierungen wurde festgestellt, dass in der Rho^{-/-}-Maus im Alter von 6 Wochen die maximale Sterberate der Stäbchen erreicht war. Um die bei diesem Prozess aktiven zellulären Mechanismen zu identifizieren, wurden die folgenden Untersuchungen daher ausschließlich an 6 Wochen alten Rho^{-/-}-Tieren durchgeführt.

4.1.2.2 Untersuchung apoptotischer Zelltodmarker

Als ein sehr frühes Merkmal apoptotischer Prozesse wird eine verstärkte Expression des proapoptotischen Enzyms Bax beschrieben (Zeiss, 2003). Die erhöhte Bax-

Konzentration trägt wesentlich zur pathologischen Permeabilisierung der Mitochondrienmembran bei, wodurch unter anderem das Ca^{2+} -bindende Protein CytC in das Zytosol freigesetzt wird. CytC ist normalerweise essentiell an der Energiegewinnung in den Mitochondrien beteiligt, führt im Cytosol jedoch zur Aktivierung proapoptotischer Enzyme. Beide Ereignisse (**verstärkte Expression von Bax, Freisetzung von CytC aus den Mitochondrien**) sind als Schlüsselmerkmale mit klassischen, apoptotischen Prozessen assoziiert (Jürgensmeier *et al.*, 1998; Kulikov *et al.*, 2012). An vertikalen Schnitten der 6 Wochen alten $\text{Rho}^{-/-}$ -Retinen wurde die Expression von Bax und die Lokalisation von CytC in den PR untersucht und innerhalb der gesamten ONL quantifiziert (Abb. 4-3). Die Untersuchungen der Bax-Expression und der CytC-Lokalisation wurden von Mitarbeitern der "Cell Death Mechanisms Group" (Institute for Ophthalmic Research, Tübingen) durchgeführt, ausgewertet und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die Detektion von Bax erfolgte mittels Antikörpermarkierungen. Weder in Wt-Kontrolltieren noch in den $\text{Rho}^{-/-}$ -Retinen konnten viele Bax-positive Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4-3 A, B).

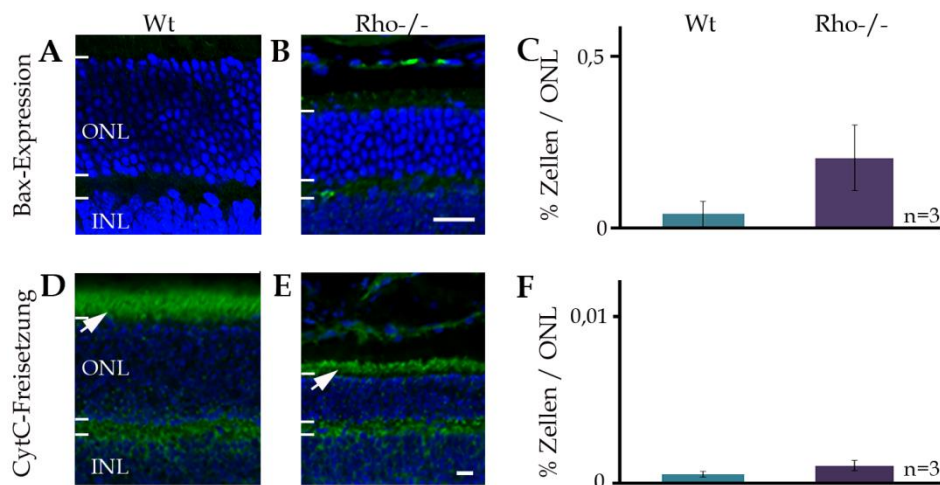


Abbildung 4-3. Untersuchung der Rhodopsin-knockout-Retina auf die Expression von Bax und auf die Freisetzung von CytochromeC (CytC) aus den Mitochondrien. (A, B, D, E) Immunhistologische Markierung vertikaler Retinaschnitte. Die Markierungen der Wt-Retinen (A, D) und der $\text{Rho}^{-/-}$ -Retinen (B, E) zeigten keine Unterschiede in Bezug auf die Bax-Expression (A, B; grün) und die CytC-Lokalisation (D, E; grün). Die Pfeile in D und E deuten auf die Innensegmente der Photorezeptoren, in denen mitochondriales CytC lokalisiert war. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) markiert. (C, F) Quantifizierungen des proapoptotischen Enzyms Bax (C) und der CytC-Freisetzungsrates aus den Mitochondrien (F). Bax und CytC-positive Zellen waren in einem sehr geringen prozentualen Anteil der Zellen in der ONL beider Genotypen vorhanden. Der statistische Vergleich der Werte (T-Test) zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und $\text{Rho}^{-/-}$ -Tieren; *, $p < 0,05$. Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben). Die retinalen Schichten sind in A und D gekennzeichnet. Maßstab=10 μm in B (entspricht A, B); in E (entspricht D, E).

Der statistische Vergleich zwischen den quantifizierten Wt- und Rho^{-/-}-Werten zeigte keine Unterschiede in der Anzahl Bax-immunoreaktiver Zellen, die auf eine Beteiligung dieses Proteins am Stäbchensterben hindeuten könnten (Abb. 4-3 C, T-Test: p=0,051, n=3). Die retinale Lokalisation von CytC wurde ebenfalls immunohistologisch untersucht. Da sich CytC unter physiologischen Bedingungen innerhalb der Mitochondrien in den Innensegmenten der PR befindet, wurde die CytC-Lokalisation in Wt-Tieren innerhalb der Innensegmenten festgestellt (Abb. 4-3 D, Pfeil). Vergleichbare Markierungen wurden in der Rho^{-/-}-Retina detektiert (Abb. 4-3 E, Pfeil). Eine Lokalisation der CytC-IR innerhalb des gesamten PR, wie es unter apoptotischen Konditionen vorkommt (Kaur *et al.*, 2011), wurde nur sehr selten und gleichermaßen häufig in Wt- und Rho^{-/-}-Retinen festgestellt (Abb. 4-3 F, T-Test: p=0,100, n=3).

Caspasen sind weitere Proteine, die mit apoptotisch ablaufenden Prozessen im Zusammenhang stehen. Die Rho^{-/-}-Retina wurde auf die Aktivität von zwei beim Zelltod sehr häufig aktivierten Caspasen, der Initiatorcaspase-9 (Casp-9; Abb. 4-4 A-C) und der Effektorcaspase-3 (Casp-3; Abb. 4-4 D-F) getestet, um die Beteiligung von Caspase-vermittelten apoptotischen Mechanismen beim primären Stäbchensterben zu untersuchen. Da Caspasen ubiquitär in Zellen als Vorläufermoleküle vorliegen, wurden für die Untersuchungen AK verwendet, die ausschließlich die aktiven Formen der Caspasen detektieren. Die Untersuchungen der aktiven Casp-9-Form wurden von Mitarbeitern der "Cell Death Mechanisms Group" (Institute for Ophthalmic Research, Tübingen) durchgeführt, ausgewertet und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Die aktive Form von Casp-9 wurden in Wt- (Abb. 4-4 A) und Rho^{-/-}-Retinen (Abb. 4-4 B) sehr selten detektiert. Der statistische Vergleich der Casp-9-positiven Zellen in der ONL zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Abb. 4-4 C, T-Test: p=0,5, n=3). Zellen, in denen die aktive Form von Casp-3 markiert wurde, waren vereinzelt in der Rho^{-/-}-Retina vorhanden (Abb. 4-4 E, Pfeil). Obwohl die Casp-3-positiven Zellen lediglich einen sehr geringen prozentualen Anteil der Gesamtzellen der ONL ausmachten (Abb. 4-4 F; 0,04%), zeigten die statistischen Auswertungen dennoch gegenüber der Wt-Retina einen signifikanten

Anstieg an Casp-3-positiven Zellen in der Rho^{-/-}-Maus (Abb. 4-4 F; T-Test: p=0,006, n=3).

Zusammengefasst deuten die Untersuchungen der mit Apoptose-assoziierten Enzyme auf keine bzw. eine sehr geringe Beteiligung der untersuchten Enzyme an den Zelltodmechanismen der Stäbchen hin.

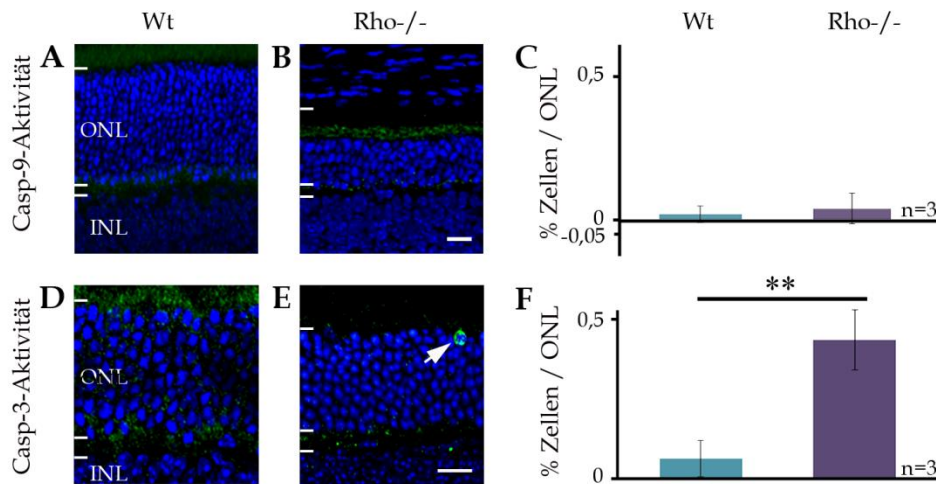


Abbildung 4-4. Beteiligung von Caspasen am primären Stäbchensterben. (A, B, C, D) Immunohistologische Markierungen aktiver Caspasen in vertikalen Retinaschnitten. Als Hauptbestandteil apoptotischer Mechanismen wurde die Aktivierung der Initiatorcaspase-9 (A, B, Casp-9, grün) und der Effektorcaspase-3 (D, E, Casp-3, grün) in den absterbenden Stäbchen untersucht. Eine Markierung der Zellkerne erfolgte mit DAPI (blau). Die vertikalen Schnitte von Wt- (A, D) und Rho^{-/-}-Tieren (B, E) zeigten jeweils repräsentative Ausschnitte der Retinen. Die aktive Form von Casp-9 wurde in beiden Genotypen sehr selten detektiert (A, B). Casp-3 wurde selten in Zellen der Wt-Retina (D) und vereinzelt in Zellen der Rho^{-/-}-Retina (E, Pfeil) lokalisiert. (C, F) Quantifizierungen der Casp-9- (C) und Casp-3- (F) positiven Zellen in der gesamten ONL. Statistische Vergleiche mittels des T-Tests zeigten keine Unterschiede in der Anzahl Casp-9-positiver Zellen zwischen Wt- und Rho^{-/-}-Retinen (C, p=0,5). In den Rho^{-/-}-Retinen war die Anzahl der Zellen, in denen die aktive Form von Casp-3 vorlag, im Vergleich zu der Wt-Retina signifikant erhöht (F, T-Test: p=0,006). Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zum Vergleich zweier Werte wurde ein T-Test durchgeführt: *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. n gibt die Anzahl der Tiere wieder. Die retinalen Schichten sind in A und D gekennzeichnet. Maßstab=20 μ m in B (gehört zu A, B), in E (gehört zu D, E).

4.1.2.3 Untersuchung alternativer Zelltodmarker

Hinweise auf den Ablauf alternativer Zelltodprozesse sollten durch die Untersuchung der Enzymaktivität der Ca²⁺-abhängigen Proteasen der Calpain Proteinfamilie und des nukleären Enzyms PARP erlangt werden (Abb. 4-5). Beide Enzyme sind unter physiologischen Bedingungen funktionell, eine Überaktivierung wird allerdings im Zusammenhang mit nicht-apoptotischen, alternativen Zelltodmechanismen diskutiert (Baines, 2010; Paquet-Durand *et al.*, 2007b).

Enzymatische Aktivitätsassays wurden durchgeführt, um eine Überaktivierung von Calpainen und PARP in der Rho^{-/-}-Retina zu untersuchen. Der *in situ*-Nachweis der Calpaine basierte auf der proteolytischen Aktivität dieser Enzyme (Paquet-Durand *et al.*, 2006). Durch den Umsatz eines Calpain-spezifischen Substrates erfolgte eine fluoreszierende Markierung innerhalb der Zellsomata (Abb. 4-5 A-C). Mittels eines ähnlichen Prinzips wurde auch die zelluläre Aktivität von PARP nachgewiesen (Abb. 4-5 D-F; Paquet-Durand *et al.*, 2007b).

Die Auswertungen der Calpain- und PARP-Aktivitätsassays zeigten in der Wt-Retina sehr wenige Zellmarkierungen (Abb. 4-5 A, D, Pfeil), während in den Retinen der Rho^{-/-}-Tiere sehr viele Zellen positiv waren, in denen folglich eine überdurchschnittliche Aktivierung von Calpain und PARP vorhanden war (Abb. 4-5 B, E Pfeil). Wie bereits für andere RP-Modelle beschrieben (Paquet-Durand 2007 a, b), zeigten auch die statistischen Auswertungen der Quantifizierungsergebnisse in der Rho^{-/-}-Maus eine signifikante Erhöhung in der Anzahl an Calpain- und PARP-aktiven Zellen im Vergleich zur Wt-Retina (Abb. 4-5 C, F, T-Test: Calpain-positive Zellen: p=0,0002; PARP-positive Zellen: p=0,001, n=3). Bestätigt wurde die hohe Anzahl PARP-aktiver Zellen in der Rho^{-/-}-Retina zusätzlich durch die gesteigerte Anzahl an Zellen, in denen eine starke Akkumulation des PARP-Endproduktes Poly-ADP-Ribose (PAR) festgestellt wurde, die mittels einer AK-DAB-Färbung in den Zellen der ONL nachgewiesen wurde (Abb. 4-5 G-I, T-Test: p=0,0001, n=3).

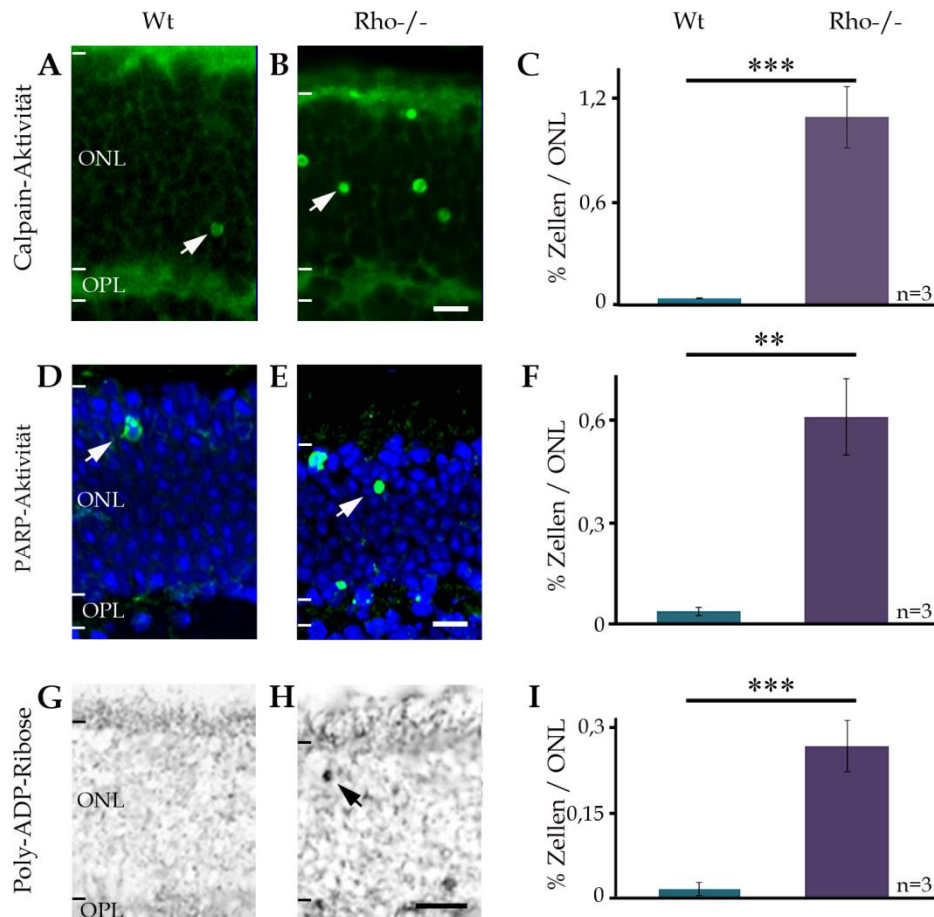


Abbildung 4-5. Nachweis der Aktivität von Calpain und PARP während des primären Stäbchensterbens in der Rhodopsin-knockout-Maus. (A-C) Untersuchung der Calpain-Aktivität. Durch den Umsatz eines Calpain-spezifischen Substrates wurden die Zellen, in denen Calpaine aktiv sind, mit einer Fluoreszenz markiert, die hier in grün dargestellt wurde (A, B). In der Wt-Retina (A) traten im Vergleich zur Rho^{-/-}-Retina (B) sehr wenige Calpain-positive Zellen auf. Quantifizierungen der Calpain-positiven Zellen und statistische Vergleiche bestätigten die signifikante Erhöhung der Calpain-positiven Zellen in der Rho^{-/-}-Retina (C, T-Test: $p=0,0002$). (D-I) Aktivitätsnachweis des Enzyms Poly-ADP-Ribose-Phosphorylase (PARP). Direkter Nachweis der enzymatischen PARP-Aktivität (D-F, grün) und Nachweis der verstärkten Akkumulation des PARP-Endproduktes Poly-ADP-Ribose mittels AK-DAB-Färbungen (G-I, schwarz). Parallel zum PARP-Aktivitätsassays wurde eine Markierung der Zellkerne mit DAPI durchgeführt (blau). Beim visuellen Vergleich der PARP-Enzymaktivität (D, E), bzw. der PAR-Akkumulation (G, H) in vertikalen Retinaschnitten, wurden auffallend viele Zellmarkierungen in der Rho^{-/-}-Retina (E, H) festgestellt, während in der Wt-Retina die Zellmarkierungen seltener auftraten (D, G). Die statistischen Auswertungen zeigten in der Rho^{-/-}-Retina eine signifikante Zunahme an Zellen, in denen die Aktivität von PARP nachgewiesen wurde (F, T-Test: $p=0,001$). Auch die Anzahl PAR-positiver Zellen war in der Rho^{-/-}-Retina signifikant erhöht (I, T-Test: $p=0,0001$). Die retinalen Schichten sind in A, D und G gekennzeichnet. Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zum Vergleich zweier Werte wurde ein T-Test durchgeführt: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. n gibt die Anzahl der Tiere wieder. Maßstab=10 μ m in B (entspricht A, B); E (entspricht D, E); in H (entspricht G, H).

4.1.2.4 Aktivität von Histon-Deacetylasen und Veränderungen im zyklischen Guanosinmonophosphat-Metabolismus

Als zusätzliche Marker, die generell keinem klassischen Zelltodmechanismus zugeordnet werden können, wurde die ONL der $Rho^{-/-}$ -Retina auf eine Hyperaktivität von HDAC und auf ungewöhnlich hohe cGMP-Konzentrationen untersucht (Abb. 4-6). Beide zellulären Merkmale treten während des Stäbchensterbens in anderen Retinadegenerationsmodellen auf (Sancho-Pelluz *et al.*, 2010; Paquet-Durand *et al.*, 2011; Trifunovic *et al.*, 2010). Entsprechend sollten diese Ereignisse auch in der $Rho^{-/-}$ -Retina untersucht werden (Abb. 4-6).

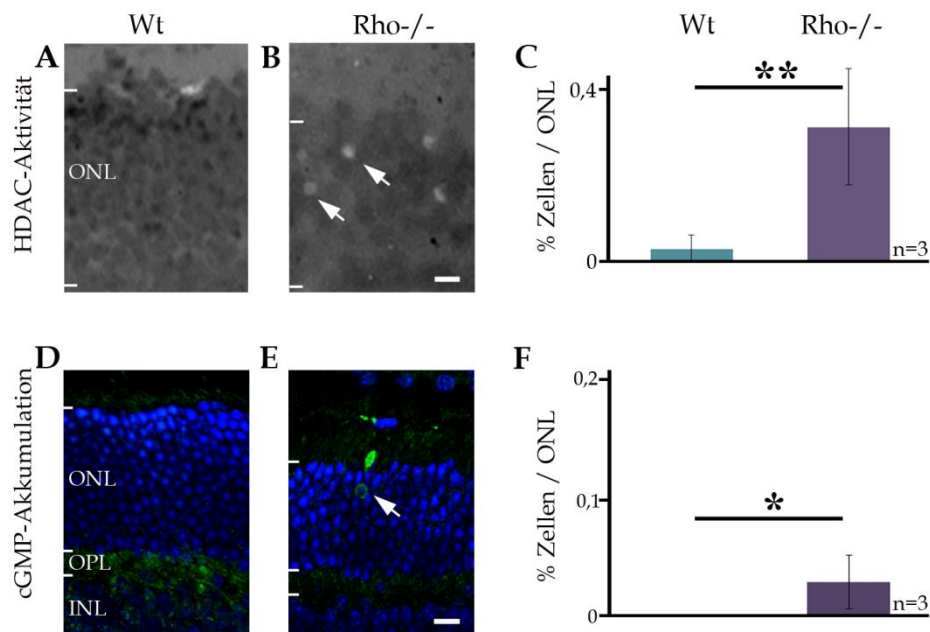


Abbildung 4-6. Nachweis von Histon-Deacetylasen (HDAC)-Hyperaktivität und Akkumulation von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) in der ONL. (A, B, D, E) Repräsentative Ausschnitte aus Wt- (A, D) und $Rho^{-/-}$ -Retinen (B, E), in denen die Aktivität von HDAC (A, B; Pfeil in B) enzymatisch und eine Akkumulation des sekundären Botenstoffmoleküls cGMP (D, E; Pfeil in E, grün) immunohistologisch analysiert wurden. DAPI wurde verwendet, um die Zellkerne zu markieren (D, E, blau). Die retinalen Schichten sind in A und D gekennzeichnet. (C, F) Die Quantifizierungen der positiven Zellen in der ONL zeigten einen starken prozentualen Anstieg an HDAC-positiven Zellen in der $Rho^{-/-}$ -Retina (C, T-Test: $p=0,0024$) und einen geringen, aber im Vergleich zum Wt dennoch signifikanten Anstieg an Zellen, die eine cGMP-Akkumulation aufwiesen (F, T-Test: $p=0,016$). Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zum Vergleich zweier Werte wurde ein T-Test durchgeführt: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. n gibt die Anzahl der Tiere wieder. Maßstab=10 μ m in B (entspricht A, B); in E (entspricht D, E).

HDAC sind Enzyme, die unter physiologischen Bedingungen durch Deacetylierungen von Histonen genregulatorische Funktionen besitzen (Haberland *et al.*, 2009). Die Untersuchung der HDAC-Überaktivierung in der Rho^{-/-}-Retina wurde wieder mittels enzymatischer Nachweisreaktionen durchgeführt (Abb. 4-6 A-C; Sancho-Pelluz *et al.*, 2010). Im Gegensatz zur Wt-Retina (Abb. 4-6 A) zeigten in der ONL der Rho^{-/-}-Tiere sehr viele Zellen eine ungewöhnliche starke Aktivität der HDAC (Abb. 4-6 B, Pfeil). Dies wurde auch durch die statistische Auswertung der Zellquantifizierungen bestätigt (Abb. 4-6 C; T-Test: p=0,0024, n=3).

Eine Akkumulation des sekundären Botenstoffs cGMP wurde in der Rho^{-/-}-Retina lediglich in 0,03% Zellen der ONL detektiert (Abb. 4-6 E, Pfeil, F). Dennoch war die Erhöhung der cGMP-positiven Zellen gegenüber der Wt-Retina signifikant (Abb. 4-6 F; T-Test: p=0,016, n=3), da in keiner der untersuchten Wt-Retinen eine Anreicherung von cGMP in den PR festgestellt wurde (Abb. 4-6 D).

Die im Vergleich zur Wt-Maus, in der Rho^{-/-}-Retina detektierte, signifikante Erhöhung an Zellen mit verstärkten Enzymaktivitäten und Akkumulationen der untersuchten Metaboliten zeigten, dass diese Ereignisse unmittelbar mit der retinalen Degeneration assoziiert sind. Zur besseren Übersicht wurden die, putativ am primären Stäbchensterben, beteiligten Enzyme (Calpain, PARP, HDAC, Casp-3) und Ereignisse (Akkumulation von PAR, cGMP) in Abb. 4-7 zusammengefasst und in Relation zu der Anzahl der absterbenden Stäbchen dargestellt:

Durch den, im Verhältnis zu den TUNEL-positiven Zellen, hohen prozentualen Anteil an Zellen mit starker Calpain- (75,69%), PARP- (42,36%) und HDAC- (21,53%) Aktivität, können diese Enzyme mit dem primären Stäbchensterben in Verbindung gebracht werden.

Im Verhältnis zu den TUNEL-positiven Zellen ist die Anzahl der Casp-3-positiven Zellen (2,78 % in Relation zu den TUNEL-positiven Zellen) und der Zellen, in denen eine starke cGMP-Akkumulation detektiert wurde (2,08 % in Relation zu den TUNEL-positiven Zellen), sehr gering. Dennoch war die Anzahl dieser Zellen in der Rho^{-/-}-Retina gegenüber dem Wt signifikant erhöht, sodass ein Zusammenhang mit dem Zelltod der PR nicht ausgeschlossen werden kann.

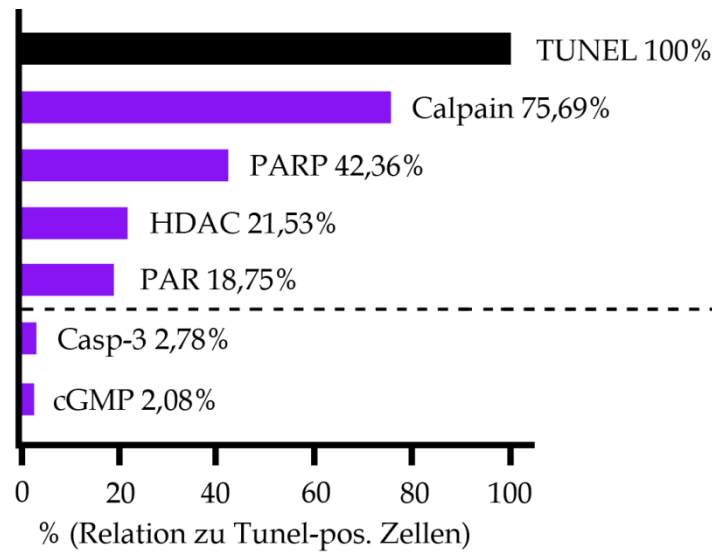


Abbildung 4-7. Enzyme und Ereignisse, die im Zusammenhang mit der Photorezeptordegeneration in der Rhodopsin-knockout-Maus detektiert wurden-Darstellung in Relation zu der Anzahl absterbender Stäbchen (TUNEL-positive Zellen). Im Verhältnis zu den TUNEL-positiven Zellen wurde besonders häufig die Aktivität der Enzyme Calpain (75,69%), PARP (42,36%) und HDAC (21,53%) in Zellen der äußeren Kernschicht nachgewiesen. Seltener wurde die aktive Form von Caspase-3 (Casp-3, 2,78%) und eine Akkumulation von cGMP (2,08%) detektiert. 100% entsprechen in dieser Darstellung der Anzahl absterbender Stäbchen in der 6 Wochen alten *Rho*^{-/-}-Retina.

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse dieses Projekts, dass verschiedene Ereignisse, die mit klassischen Apoptose in Verbindung gebracht werden (CytC-Freisetzung, Bax-Expression, Aktivierung von Casp-9 und Casp-3) marginal während des primären Stäbchensterbens auftraten. Stattdessen wurden häufige Überaktivierungen der Enzyme Calpain, PARP, HDAC festgestellt, die auf einen alternativen Zelltodmechanismus hindeuten (Baines, 2010; Paquet-Durand *et al.*, 2007b; Sancho-Pelluz *et al.*, 2008).

4.1.3 Einfluss des Bystander-Effekts auf die sekundäre

Zapfendegeneration in zwei Mausmodellen für Retinitis Pigmentosa

Im dem zweiten Unterprojekt sollte untersucht werden, ob die Bystander-Hypothese, die eine Beteiligung von GJ an der Ausbreitung des Zelltods von den Stäbchen auf die Zapfen vorschlägt (siehe Abschnitt 1.5.3), einen überzeugenden Erklärungsansatz für das sekundäre Zapfensterben bei RP darstellt. Diese Ergebnisse sind bereits bei PlosONE zur Veröffentlichung angenommen und werden hier zusammengefasst (Kranz *et al.*, 2013; akzeptiert).

4.1.3.1 Erzeugung von Connexin36-defizienten Retinitis Pigmentosa-Mausmodellen

Um den Einfluss der Stäbchen-Zapfen-Kopplung auf die sekundäre Zapfendegeneration zu bestimmen, sollte in den zu untersuchenden RP-Modellen die Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen unterbrochen und der daraus resultierende Effekt auf die sekundäre Zapfendegeneration untersucht werden. Die GJ-Kanäle, die Stäbchen und Zapfen miteinander verbinden, werden auf der Seite der Zapfen von Cx36 gebildet (Cangiano *et al.*, 2012; Heikkinen *et al.*, 2011; Tsukamoto *et al.*, 2001), dessen Expression damit notwendig für die Kopplung der beiden Photorezeptorsubtypen ist.

Durch Verpaarung der RP-Modelle mit Cx36^{-/-}-Mäusen, in denen die Expression von Cx36 inhibiert (Güldenagel *et al.*, 2001) und die Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen nachweislich nicht mehr vorhanden ist (Deans *et al.*, 2002; Trümpler *et al.*, 2008), wurden Rho^{-/-} und Rd1-Tiere generiert werden, die zusätzlich zum RP-auslösenden Gendefekt die Deletion von Cx36 aufwiesen. Die Generierung der Versuchstiere erfolgte jeweils über vier Generationen (Abb. 4-8 A).

Durch Genotypisierungen von Schwanzspitzen-DNA erfolgten die Zuordnungen zum jeweiligen Cx36-, Rho- und Rd1-Genotyp (Abb. 4-8 B-D). Um die genetische Varianz zwischen den Versuchstieren möglichst gering zu halten, wurden in den nachfolgenden Hauptversuchen ausschließlich Cx36-exprimierende und Cx36-defiziente Rho^{-/-} oder Rd1-Geschwisterpaare verwendet.

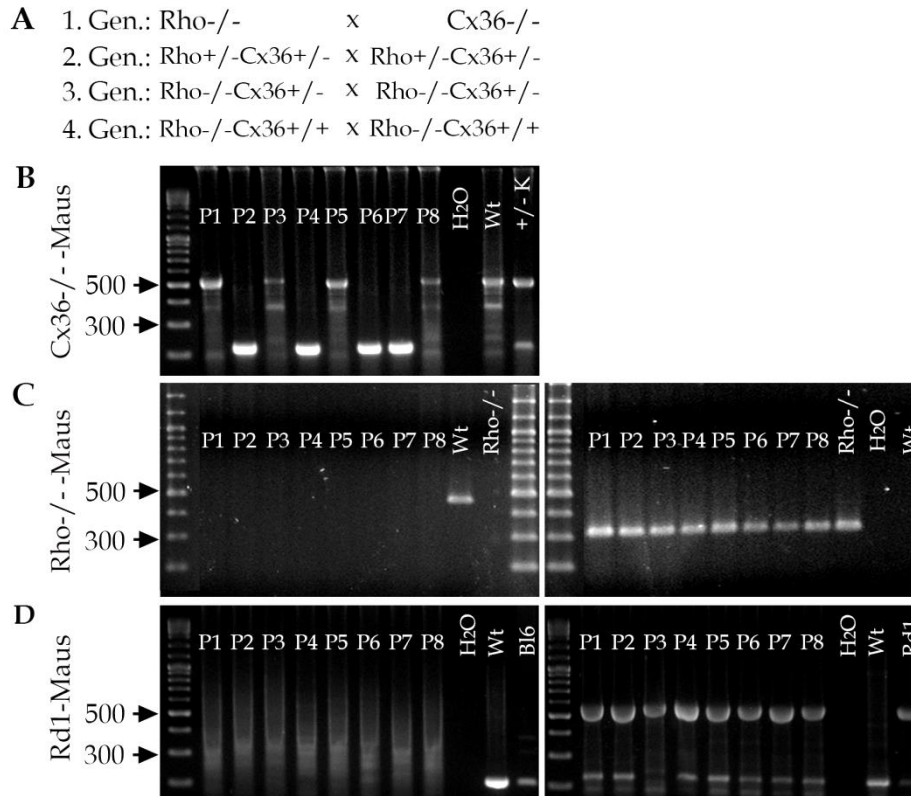


Abbildung 4-8. Generierung und Genotypisierung der Versuchstiere. (A) Darstellung der notwendigen Kreuzungsansätze um, aus vorhandenen Rho^{-/-} und Cx36^{-/-}-Mäusen, in der 4. Generation (Gen.), die für die Versuche notwendigen Rho^{-/-}Cx36^{-/-} und Rho^{-/-}Cx36^{+/+}-Geschwistertiere zu erhalten. (B) Die Cx36-Genotypisierung erfolgte durch einen einfachen PCR-Ansatz mit drei verschiedenen Primertypen: Die Wt-Bande besaß eine Größe von 510 Basenpaare (Bp; P1, P3, P5, P8, Wt, +/+ Kontrolle), bei Amplifikation des Knockout-Allels wurden Amplikons mit einer Größe von 230 Bp generiert (P2, P4, P6, P7, +/- Kontrolle) (C, D) Die Genotypisierung des Rhodopsin- (C) und des Rd1- (D) Genotyps erfolgte in jeweils zwei Ansätzen: Die Rhodopsin-Wt-Amplifikation besaß eine Größe von 480 Bp (C; linke Seite, Wt), die Knockoutbande eine Größe von 304 Bp (C; rechte Seite; P1-P8, Rho^{-/-} Kontrolle). Amplikons der Rd1-Wt-DNA waren 204 Bp groß (D; linke Seite, C3B), die DNA-Amplifikation des mutierten *PDE6b*-Allels führte zu Produkten mit einer Größe von 533 Bp (D; rechte Seite, p1-p8; Rd1 Kontrolle). Die Zahlen auf der linken Seite geben die Größen der Markerbanden an (in Bp).

4.1.3.2 Rhodopsin-knockout- und Rd1-Mäuse besitzen ein normales Connexin36-Verteilungsmuster in der Retina

Die heterologe GJ-Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen wird in den Zapfen durch Cx36 und in den Stäbchen von einem bisher nicht identifizierten Protein vermittelt (Feigenspan *et al.*, 2004). Um einen potentiellen Einfluss der Stäbchen-Zapfen Kopplung auf die sekundäre Zapfendegeneration zu untersuchen, wurde daher zunächst überprüft, ob beide Degenerationsmodelle eine normale Cx36-Verteilung in der äußeren plexiformen Schicht aufwiesen (Abb. 4-9).

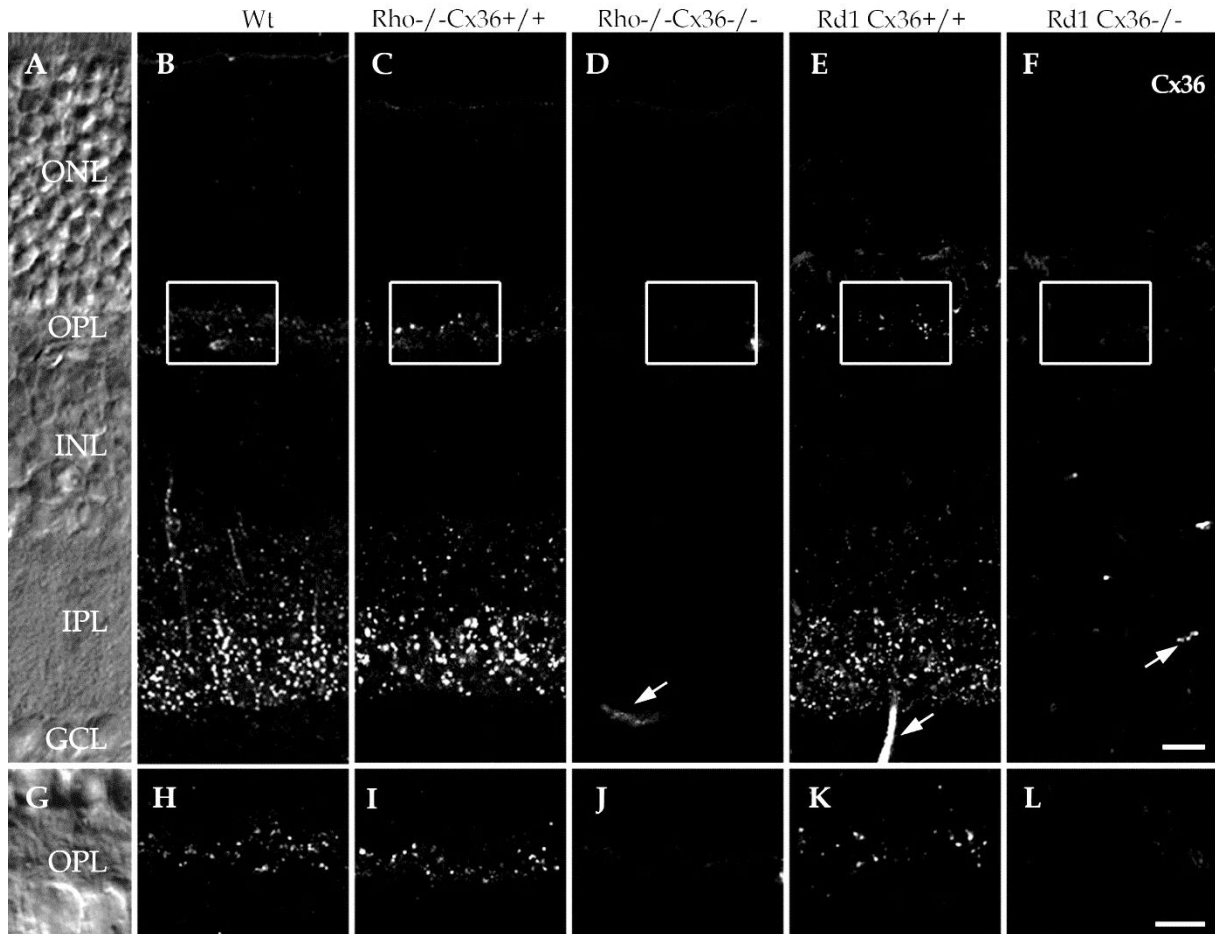


Abbildung 4-9. Verteilung von Connexin36 in Retinitis Pigmentosa-Mausmodellen. (B-F) Cx36-Markierungen in vertikalen Schnitten von Wt- (B), Rho^{-/-} (pw5; C) und Rd1- (p21; E) Mäusen zeigten die normale Cx36-Verteilung in der OPL und der IPL. Die Markierungen waren in Rho^{-/-} (D) und Rd1- (F) Mäusen mit gezielter Cx36-Deletion nicht vorhanden. (H-L) Cx36-Immunoreaktivität in vergrößerten Bereichen der Wt- (H), Rho^{-/-} Cx36^{+/-} (I) und Rd1Cx36^{+/-} (K) Retina zeigten ein feines punktuell Cx36-Staining innerhalb der OPL. In dieser Region vermittelt Cx36 die Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen. Auch diese Markierungen waren in der OPL von Cx36-defizienten Rho^{-/-} (J) und Rd1- (L) Tieren nicht vorhanden. Die Pfeile deuten auf unspezifische Markierungen von Blutgefäßen hin, die durch den sekundären Antikörper hervorgerufen wurden. Diese Markierungen waren ebenfalls in Negativkontrollen (Markierungen ohne primären AK) vorhanden. (A, G) Nomarski-Transmissionbilder mit Beschriftungen der retinalen Schichten. p: postnatal Tag, pw: postnatal Woche. Maßstab=10 µm in F (gehört zu A-F); in L (gehört zu G-L).

Abb. 4-9 B zeigt die charakteristische, punktuelle Cx36-Verteilung in vertikalen Schnitten der Wt-Retina (Feigenspan *et al.*, 2004). Innerhalb der IPL wurde eine sehr intensive IR festgestellt, die die Cx36-beinhaltenen GJ der Bipolar-, Amakrin-, und Ganglienzellen repräsentierte (Söhl *et al.*, 2005). Die Markierungen in der OPL dagegen waren sehr fein und konnten der Cx36-Lokalisation in Dendriten von OFF-Bipolarzellen und in den Terminalien der Zapfen zugeordnet werden (Abb. 4-9 H; Feigenspan *et al.*, 2004). Ein ähnliches Cx36-Immunostaining war zu Beginn der

Photorezeptordegeneration in 5 Wochen alten $Rho^{-/-}$ (Abb. 4-9 C) und in 21 Tage alten $Rd1$ - (Abb. 4-9 E) Mäusen vorhanden.

Vergrößerungen der markierten Bereiche zeigten die feine Cx36-IR in der OPL beider RP-Mausmodelle (Abb. 4-9 I, K), die mit den OPL-Markierungen in den Wt-Mäusen (Abb. 4-9 H) vergleichbar war. Diese Ergebnisse machten deutlich, dass die $Rho^{-/-}$ und die $Rd1$ -Maus normale Cx36-Expressionsmuster (speziell mit Fokus auf die OPL) aufwies und damit die Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen zu Beginn ($Rho^{-/-}$) und in späteren Phasen ($Rd1$) der Photorezeptordegeneration unverändert war. Die komplette Abwesenheit von Cx36 in den $Rho^{-/-}Cx36^{-/-}$ (Abb. 4-9 D, J) und den $Rd1Cx36^{-/-}$ -Mäusen (Abb. 4-9 F, L) implizierte, dass auch die durch Cx36-vermittelte Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen nicht mehr vorhanden war. Basierend auf dieser Feststellung konnte in nachfolgenden Versuchen die Auswirkung der unterbrochenen Stäbchen-Zapfen Kopplung auf die sekundäre Zapfendegeneration untersucht werden.

4.1.3.3 Einfluss der Connexin36-Defizienz auf den zeitlichen Ablauf der Photorezeptordegeneration

Um einen Einfluss der unterbrochenen Photorezeptorkopplung auf die sekundäre Zapfendegeneration zu analysieren, wurde zunächst die Struktur der äußeren Retina in unterschiedlich fortgeschrittenen Stadien der Degeneration untersucht (Abb. 4-10). Die Morphologie der äußeren Retina wurde hierzu zwischen Cx36-exprimierenden (Abb. 4-10 A-E; K-N) und Cx36-defizienten (Abb. 4-10 F-J, O-R) $Rho^{-/-}$ (Abb. 4-10 A-J) und $Rd1$ -Tieren (Abb. 4-10 K-R) verglichen. Die immunohistologischen Doppelmarkierungen der Retina wurden an vertikalen Kryoschnitten durchgeführt. Zur Visualisierung der gesamten Zapfenstruktur wurden anti-Glykogenphosphorylase (Glypho)-AK verwendet (Pfeiffer-Guglielmi *et al.*, 2003). Die OLM und die Endigungen der Stäbchen und Zapfen wurden mit Velis-3 AK markiert (Stöhr *et al.*, 2005). Der Nukleinsäurefarbstoff TO-PRO3 (Pang und Wu, 2011) diente der Visualisierung der Zellkerne und damit der Anzahl der Kernreihen in der ONL. Abb. 4-10 verdeutlicht den sehr unterschiedlichen zeitlichen Verlauf der Photorezeptordegeneration zwischen den beiden RP-Modellen. Die Beobachtungen

in den $Rho^{-/-}Cx36^{+/+}$ -Mäusen entsprachen dem in Abschnitt 4.1.1 beschriebenen Verlauf in $Rho^{-/-}$ -Tieren: Die Degeneration der nicht funktionsfähigen Stäbchen wurde in 5 Wochen alten $Rho^{-/-}Cx36^{+/+}$ -Tieren durch die Reduzierung der ONL auf 10–12 Reihen sichtbar (Abb. 4-10 B, G). In diesen Tieren zeigten die Zapfen noch ihre typische Gestalt und waren von den eingesetzten, degenerativen Prozessen der Stäbchen noch nicht beeinflusst.

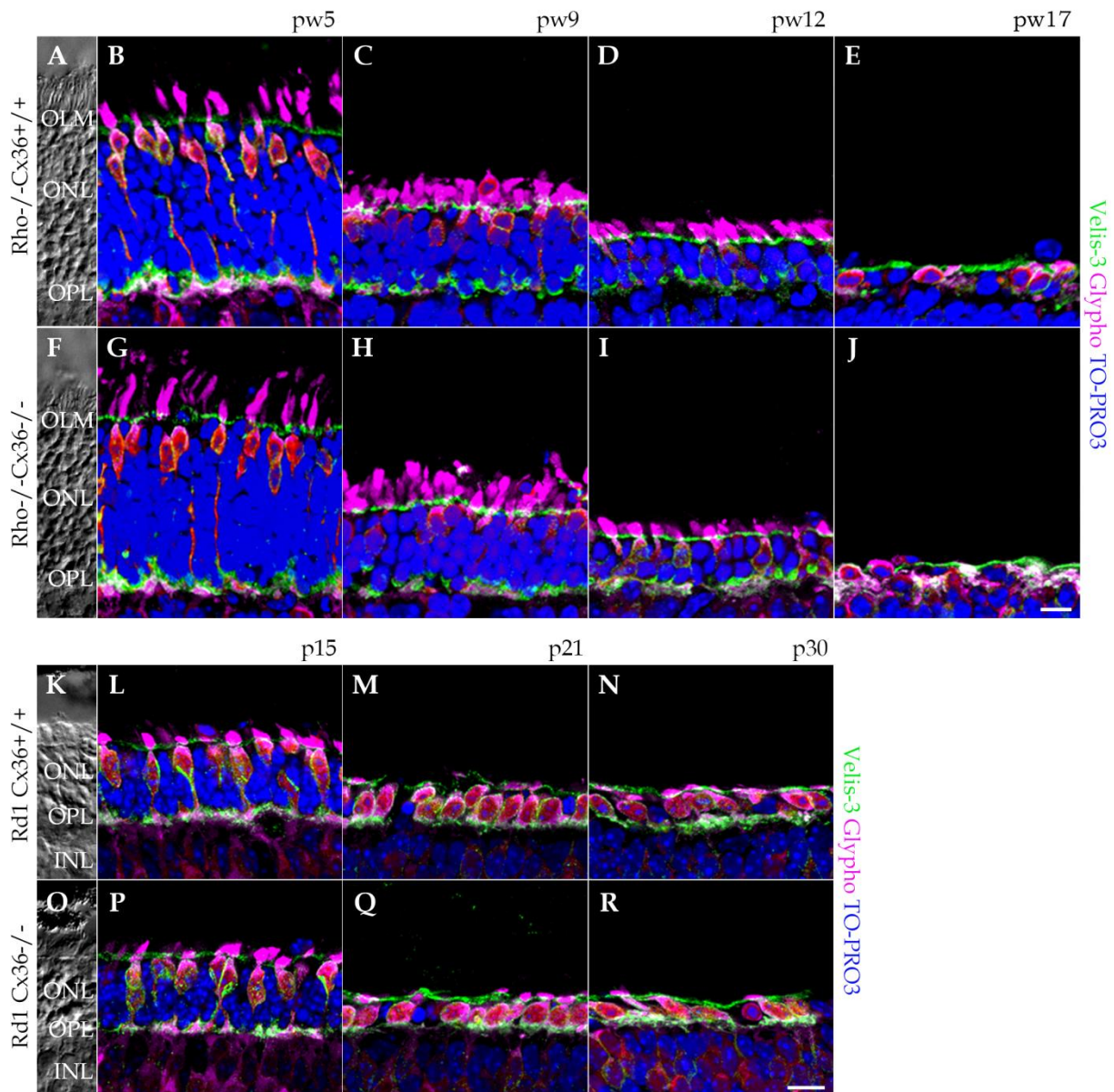


Abbildung 4-10. Temporärer Verlauf der Photorezeptordegeneration in Rhodopsin-knockout- und Rd1- Mausemutanten. (A-R) Projektionen von konfokalen Scans zeigten die Morphologie der äußeren Retina in vertikalen Schnitten von $Cx36$ -exprimierenden (A-E, K-N) und $Cx36$ -defizienten (F-J, O-R) $Rho^{-/-}$ (A-J) und $Rd1$ -Mäusen (K-R) während unterschiedlich weit fortgeschrittener Stadien der Photorezeptordegeneration. Markierungen der Zapfen mit Glypho-AK (magenta) sowie der Photorezeptorterminalien und der äußeren limitierenden Membran mit Velis-3-AK (grün) verdeutlichten den unterschiedlich schnellen Verlauf der retinalen Degeneration. Kerne wurden mit TO-PRO3 (blau) markiert. (A, F, K, O) Nomarski-Transmissionen mit Beschriftungen der retinalen Schichten. p: postnatal Tag, pw: postnatal Woche. Maßstab=10 μ m in J (gehört zu A-J); in R (gehört zu K-R).

Die ersten Anzeichen der Zapfendegeneration wurden an pw9 durch morphologische Veränderungen sichtbar. Die Form der Zapfen verkleinerte sich, die Außen- und Innensegmente wurden abgebaut und der gesamte Zapfen wirkte zunehmend atrophisch. Die Deformation der Zapfen ging mit einer starken, durch den zunehmenden Verlust der Stäbchen induzierten, Reduzierung der ONL einher (Abb. 4-10 C, D). Zu Beginn der Hauptphase des Zapfensterbens (pw17) war die ONL bereits auf ein bis zwei Kernreihen reduziert, die fast ausschließlich aus Glypho-positiven Zapfen bestanden (Abb. 4-10 E); die Velis-3-markierten Terminalien der PR waren kaum noch erkennbar (Abb. 4-10 E). Die Morphologie der äußeren Retina in der $Rho^{-/-}Cx36^{-/-}$ -Maus zeigte, trotz der nicht vorhandenen Stäbchen-Zapfen-Kopplung, einen vergleichbaren strukturellen Abbau (Abb. 4-10 F-J).

Im Gegensatz zu der retinalen Degeneration in $Rho^{-/-}$ -Mäusen erfolgt dieser Prozess in der Rd1-Maus nicht innerhalb von Wochen, sondern von Tagen (Abb. 4-10 K-R). Die primäre Stäbchendegeneration setzte während der retinalen Entwicklung an p11 ein (Punzo *et al.*, 2009) und reduzierte die ONL an p15 bis auf die Hälfte ihrer Breite (Abb. 4-10 L). Die Morphologie der Zapfen war in den $Rd1Cx36^{+/+}$ -Mäusen bereits an p15 beeinträchtigt: Die Größe der Zapfen reduzierte sich und die Innen- und Außensegmente wurden abgebaut (Fig.4-10 L-N). Übereinstimmend mit früheren Studien (Punzo *et al.*, 2009) zeigten die Ergebnisse, dass die Stäbchendegeneration sehr schnell fortschreitet und mit einer starken Reduzierung der ONL einhergeht. Nach der Hauptphase des Stäbchensterbens an p21 war nur noch eine Reihe an Zellkernen vorhanden, die, wie auch in den $Rho^{-/-}$ -Tieren, in diesem Stadium fast ausschließlich aus Zapfen bestand (Abb. 4-10 M). Zu diesem Zeitpunkt begann das sekundäre Zapfensterben in der Rd1-Maus (Punzo *et al.*, 2009). Dementsprechend verringerte sich die Anzahl der Zellen in der ONL weiter (Abb. 4-10 N). Die Zapfen verloren ihre Fortsätze und ihre charakteristische Form (Abb. 4-10 M-N). Die Glypho-IR, um die verbleibenden Nuklei in der ONL, kennzeichnete die noch vorhandenen Zapfen. Bei Untersuchungen der Photorezeptordegeneration in der für die Stäbchen-Zapfen-Kopplung-defizienten Rd1-Maus (Abb. 4-10 P-R) konnten keine

morphologischen Unterschiede zu der Rd1-Maus mit intakter Photorezeptorkopplung (Abb. 4-10 L-N) festgestellt werden.

4.1.3.4 Einfluss der Connexin36-Defizienz auf die Reorganisation der Sekundärneurone

In RP-Mausmodellen wird die Photorezeptordegeneration von morphologischen Veränderungen der nachgeschalteten Neurone begleitet. Die betroffenen Sekundärneurone reagieren auf den Verlust des glutamatergen Eingangs mit struktureller Reorganisation. In der Rho^{-/-} und Rd1-Maus sind entsprechende Reorganisationen von Horizontalzellen und einigen ON- und OFF-Bipolarzellen beschrieben wurden (Claes *et al.*, 2004; Strettoi und Pignatelli, 2000; Strettoi *et al.*, 2003; Strettoi *et al.*, 2002). Um zu untersuchen, ob die strukturellen Veränderungen durch die Cx36-Defizienz beeinflusst wurden, wurde die Morphologie der Horizontalzellen und bestimmter Bipolarzelltypen zwischen den Cx36-exprimierenden und Cx36-defizienten Rho^{-/-} und Rd1-Tieren verglichen.

Der Verlauf der Horizontalzellreorganisation während der fortschreitenden Photorezeptordegeneration wurde in den verschiedenen Versuchstieren durch Markierungen der **Horizontalzellen** in vertikalen Gefrierschnitten mit Calbindin-AK dargestellt (Abb. 4-11). In Übereinstimmung mit früheren Studien (Claes *et al.*, 2004) zeigten die Calbindin-Markierungen in den Rho^{-/-}-Retinen (Abb. 4-11 A-E) massive Auswüchse der Fortsätze in die ONL als initiale Veränderungen der Horizontalzellen (Abb. 4-11 B, C; Pfeilkopf). In älteren Rho^{-/-}-Tieren (pw12, pw17) bildeten sich die Auswüchse aus der ONL zurück und erstreckten sich zunehmend in die INL (Abb. 4-11 D, E; langer Pfeilkopf). Im Alter von pw17 veränderten zusätzlich einige Horizontalzellsomata ihre Position aus der distalen INL in die ONL (Abb. 4-11 E, Sternchen). In Cx36-defizienten Geschwistertieren zeigte die Neuordnung der Horizontalzellfortsätze und Somata vergleichbare Veränderungen (Abb. 4-11 F-J).

Die Reorganisation der Horizontalzellen in den Rd1Cx36^{+/+}- und Rd1Cx36^{-/-}-Tieren zeigten ähnliche Merkmale, wenngleich der temporäre Verlauf der Veränderungen wesentlich schneller voranschritt als in den Rho^{-/-}-Mutanten (Abb. 4-11 K-R). Bereits

an p15 ragten Horizontalzellfortsätze weit in die INL (Abb. 4-11 L; langer Pfeilkopf). Diese Ausläufer waren hauptsächlich axonalen Ursprungs (Strettoi et al., 2002). In dieser Altersstufe waren zusätzlich kleinere Auswüchse in der ONL vorhanden (Abb. 4-11 P, kurzer Pfeilkopf). Während sich die Horizontalzellfortsätze in der ONL an p21 zurückgebildet hatten, blieben die auffällig langen Ausläufer innerhalb der INL über den gesamten Untersuchungszeitraum vorhanden (Abb. 4-11 M, N). Gelegentlich wurden im Alter von 30 Tagen displatzierte Somata der Horizontalzellen in der ONL gefunden (Abb. 11-4 R, Sternchen).

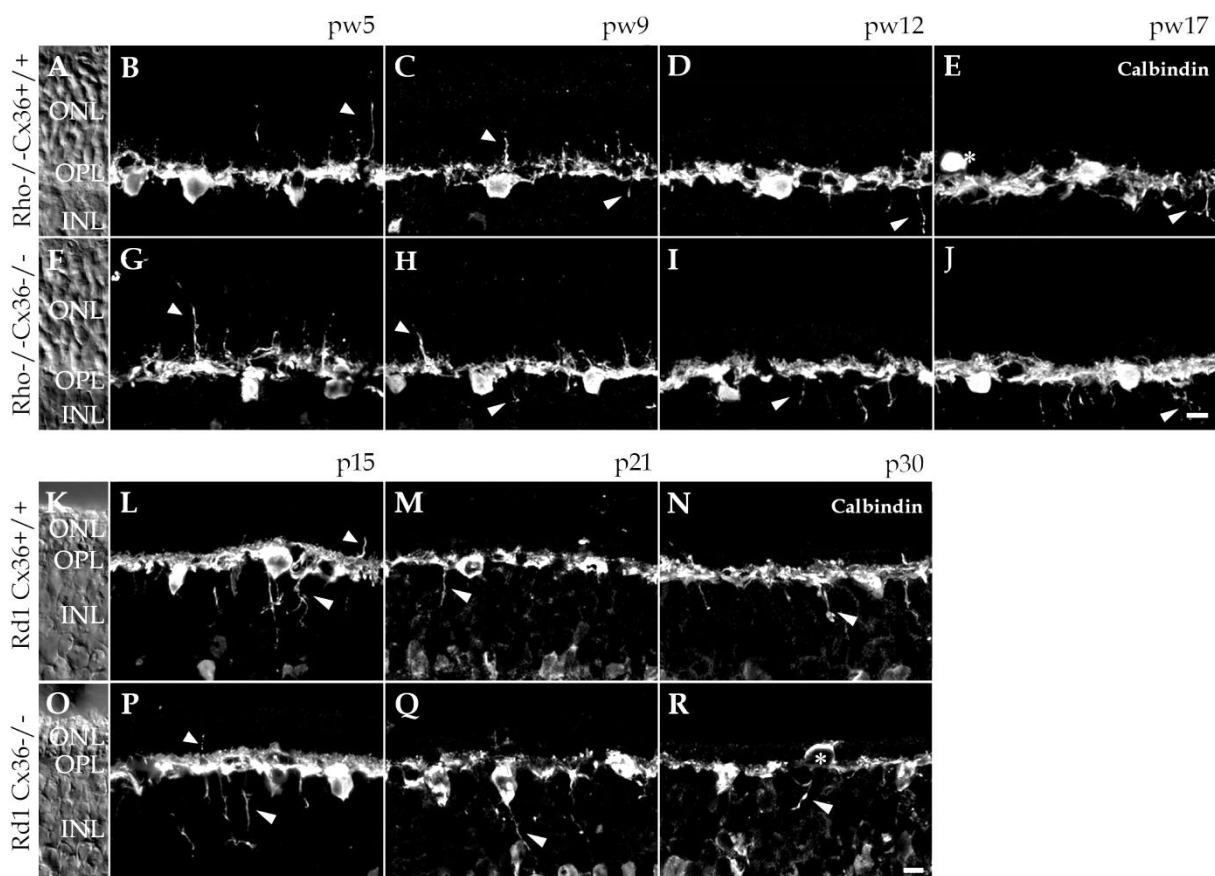


Abbildung 4-11. Die Reorganisation der Horizontalzellen zeigte keine, durch die Connexin36-Defizienz hervorgerufenen, Veränderungen. (A-R) Immunohistologische Calbindin-Einfachmarkierungen an vertikalen Retinaschnitten in unterschiedlich alten Rho^{-/-}Cx36^{+/+} (A-E), Rho^{-/-}Cx36^{-/-} (F-J) und Rd1Cx36^{+/-} (K-N), Rd1Cx36^{-/-} (O-P) Mäuse. Unabhängig von der Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen begann ein primäres Auswachsen der Horizontalzellausläufer in die ONL (B, C, G, H, L, P; kurzer Pfeilkopf). In fortgeschrittenen Degenerationsstadien bildeten sich die Horizontalzellfortsätze aus der ONL zurück und ragten mit zunehmender Intensität in die INL (C-E, H-J, L-N, P-R; langer Pfeilkopf). (A, F, K, O) Nomarski-Transmissionen mit Beschriftungen der retinalen Schichten. p: postnatal Tag, pw: postnatal Woche. Maßstab=10 µm in J (gehört zu A-J); in R (gehört zu K-R).

Die beschriebene Horizontalzellreorganisation in der Rd1-Maus wurde nicht durch das Ausschalten der Stäbchen-Zapfen Kopplung beeinflusst. Die gezeigten Merkmale der morphologischen Horizontalzellveränderungen entsprachen den beschriebenen Sequenzen früherer Studien (Strettoi und Pignatelli, 2000; Strettoi *et al.*, 2003; Strettoi *et al.*, 2002).

Um den Verlauf der Reorganisationen von **ON-Bipolarzellen** zu untersuchen, wurde die ON-Bipolarzellpopulation mit AK gegen G0 α markiert. Um die verschiedenen Zapfen-Bipolarzellen von dem Stäbchen-Bipolarzelltyp zu unterscheiden, wurden die letzteren zusätzlich mit AK gegen PKC α detektiert (Abb. 4-12; Haverkamp und Wässle, 2000).

Die Umorientierung der ON-Bipolarzellen zeigte charakteristische Merkmale, die gleichermaßen in Rho^{-/-}Cx36^{+/+}- und Rho^{-/-}Cx36^{-/-}-Retinen beobachtet wurden. Die Reorganisation der Stäbchen-Bipolarzellen war dabei sehr offensichtlich, während die morphologischen Veränderungen der Zapfen-Bipolarzellen unauffälliger waren. In 5 Wochen alten Tieren erschien die dendritische Organisation, bis auf einzelne PKC α -positive Dendriten in der ONL, normal (Abb. 4-12 B, C, G, H; langer Pfeil). Die Dendriten der PKC α -negativen Zapfen-Bipolarzellen zeigten kein anormales Wachstum. Mit zunehmender Degeneration der PR verloren die Stäbchen-Bipolarzellen ihre Auswüchse in der ONL. An pw12 waren nahezu keine dendritischen Strukturen der gesamten ON-Bipolarzellpopulation mehr vorhanden (Abb. 4-12 D, E, I, J). Ähnlich wie bei den Horizontalzellen zeigten sich ab einem Alter von pw12 häufig Deplatzierungen von ON-Bipolarzellsomata in der ONL (Abb. 4-12 D, E, I, J; Sternchen).

In Übereinstimmung mit früheren Studien an der Rd1-Maus (Strettoi und Pignatelli, 2000; Strettoi *et al.*, 2003; Strettoi *et al.*, 2002) wurden ähnliche Veränderungen auch in den Retinen der Rd1Cx36^{+/+}- und Rd1Cx36^{-/-}-Tiere beobachtet: Zu Beginn der Reorganisation an p15 waren die Dendriten der ON-Bipolarzellen lediglich rudimentär entwickelt. Aufgrund der beeinträchtigten synaptischen Transmission der sterbenden Stäbchen wurden gelegentliche, kleinere Auswüchse der PKC α -markierten Stäbchen-Bipolarzellendriten innerhalb der ONL beobachtet (Abb. 4-12 L, P, Pfeil).

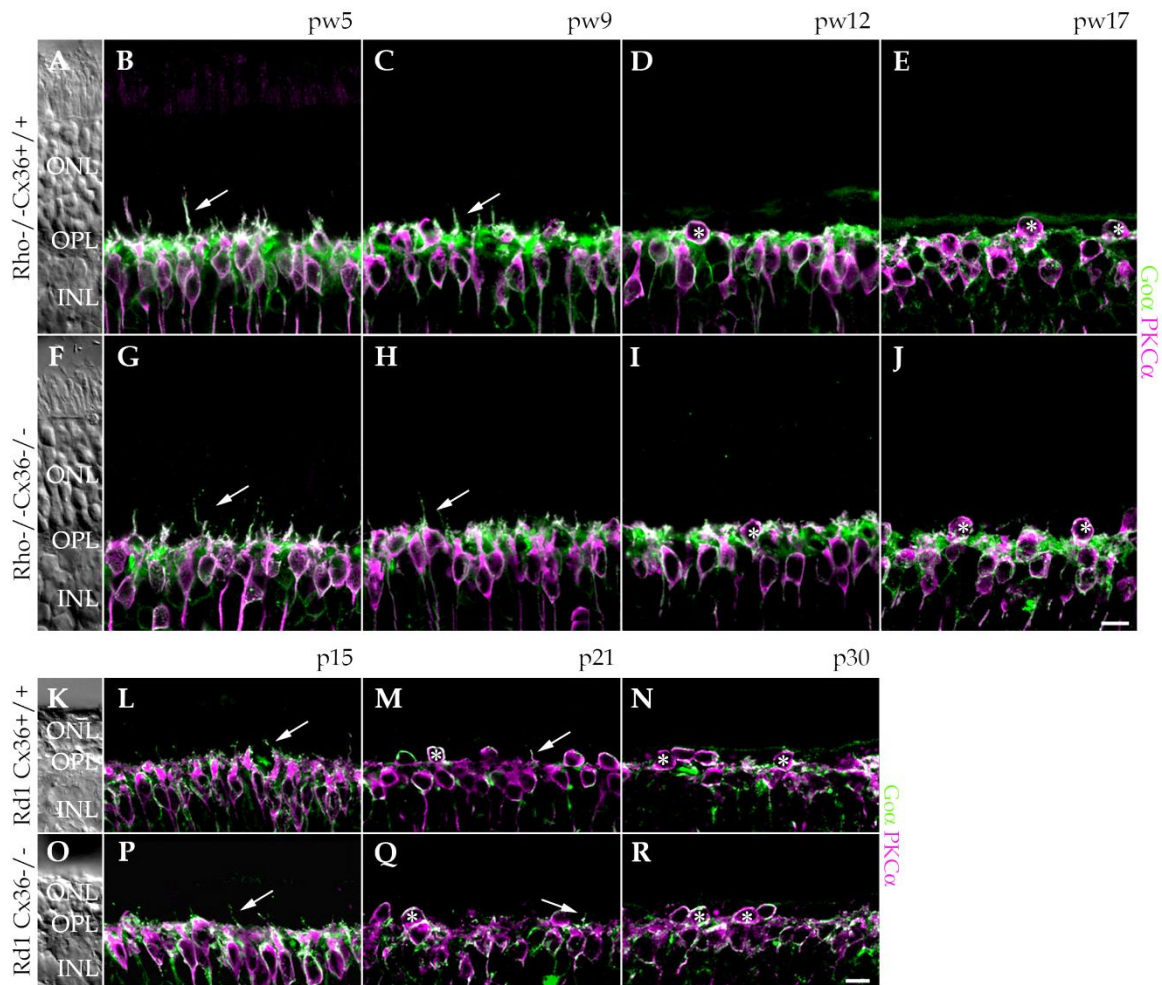


Abbildung 4-12. Die Deletion von Connexin36 führte zu keinen Veränderungen in der Reorganisation der ON-Bipolarzellen. (A-R) Visualisierung der gesamten ON-Bipolarzellpopulation in vertikalen Retinaschnitten mit Antikörpern gegen $Go\alpha$ (grün) und der Stäbchen-Bipolarzellen durch Gegenfärbung mit $PKC\alpha$ -AK (magenta). Zu Beginn der Photorezeptordegeneration wurde in $Rho^{-/-}$ - und $Rd1$ -Retinen ein Auswuchs der Stäbchen-Bipolarzellendriten in die ONL verzeichnet (B, C, L, M; langer Pfeil). Mit zunehmender Degeneration bildeten sich die Dendriten der $Go\alpha$ -markierten ON-Bipolarzellen zurück (D, M). In beiden Mausmodellen wurden $PKC\alpha$ -positive Somata in der ONL beobachtet (D, E, N; Sternchen). Die gleiche Sequenz der Reorganisation war in den $Cx36$ -defizienten $Rho^{-/-}$ (G-J) und $Rd1$ - (P-R) Tieren zu beobachten. (A, F, K, O) Nomarski-Transmissionsabbildungen mit Beschriftungen der retinalen Schichten. p: postnatal Tag, pw: postnatal Woche. Maßstab=10 μm in J (gehört zu A-J); in R (gehört zu K-R).

Die Dendriten bildeten sich mit fortschreitendem Alter zunehmend zurück und waren an p21 komplett abwesend (Abb. 4-12 M, Q; Pfeil). Vergleichbar mit den älteren $Rho^{-/-}$ -Mutanten wurde eine verstärkte Anzahl deplatzierter Somata der ON-Bipolarzellen in fortgeschrittenen Degenerationsstadien festgestellt (Abb. 4-10 N, R; Sternchen).

Um den Einfluss der $Cx36$ -Defizienz auf die morphologischen Veränderungen von **OFF-Bipolarzellen** zu bestimmen, wurden exemplarisch vergleichende

Untersuchungen an der Stäbchen- und Zapfen-kontaktierenden ZB3b durchgeführt. Die ZB3b wurden ausgewählt, da bereits in früheren Studien zelluläre Reorganisationen, aufgrund beeinträchtigter synaptischer Transmission, für diesen Stäbchen- und Zapfen-kontaktierenden Zelltyp beschrieben wurden (Haverkamp *et al.*, 2008; Sonntag *et al.*, 2012). Die ZB3b wurden spezifisch mit AK gegen PKARIIB β markiert. In beiden RP-Mausmodellen antworteten die ZB3b sehr ähnlich auf die stattfindende Photorezeptordegeneration (Abb. 4-13).

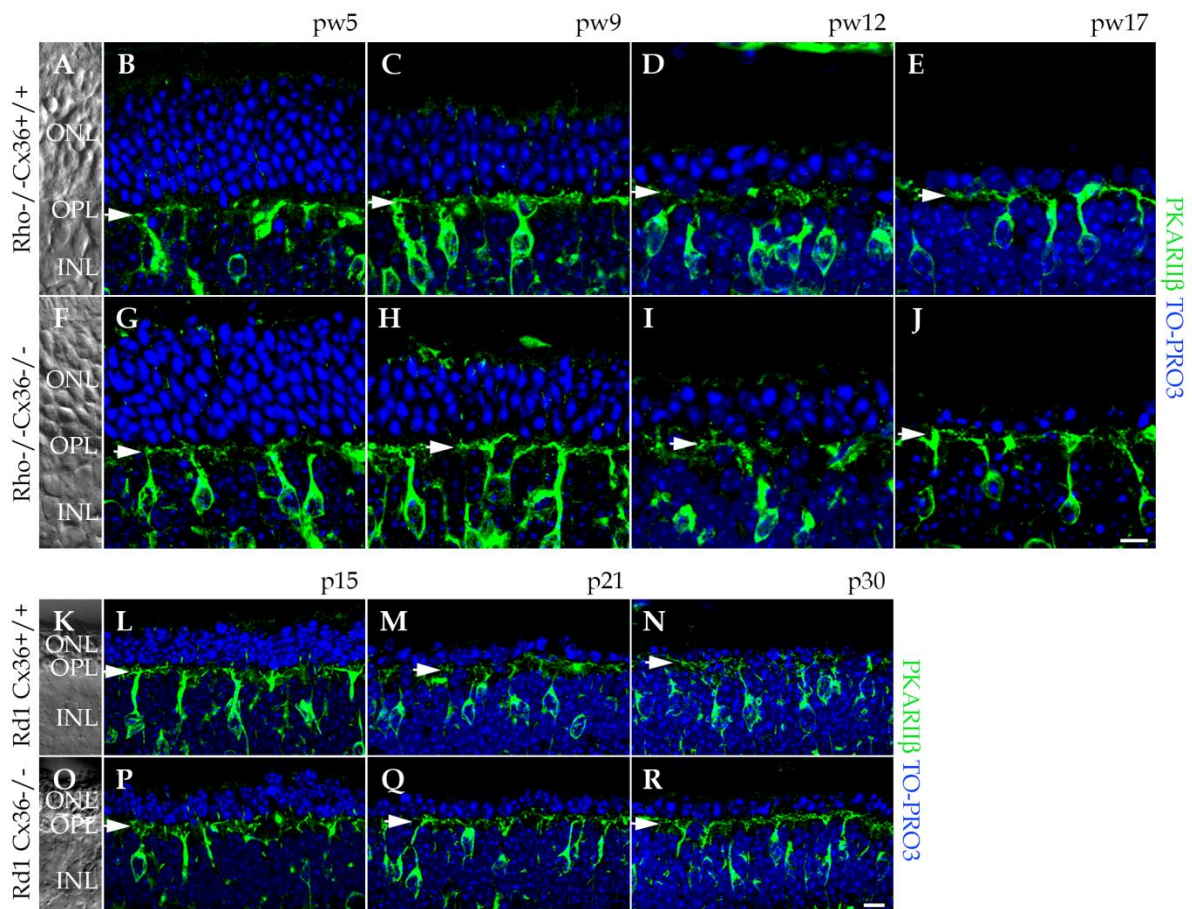


Abbildung 4-13. Der Verlust der Stäbchen-Zapfen-Gap Junctions hatte keine Auswirkung auf die Reorganisation der ZB3b. (A-R) Morphologische Veränderungen der, mit PKARIIB β -AK markierten ZB3b (grün) während der fortschreitenden Photorezeptordegeneration. Zellkerne wurden mit TO-PRO3 (blau) markiert. Während der Photorezeptordegeneration entwickelten die Dendriten der ZB3b sehr feine, bis zur OLM ragende, Ausläufer. Zusammen mit der Reduzierung der ONL bildeten sich auch die dendritischen Fortsätze zurück. In allen untersuchten Altersstufen waren zusätzliche Dendriten der ZB3b in der OPL vorhanden (A-R; Pfeil). Es gab keine morphologischen Unterschiede zwischen Cx36-exprimierenden und Cx36-defizienten Rho $^{-/-}$ respektive Rd1-Mäusen. (A, F, K, O) Nomarski-Transmissionsabbildungen mit Beschriftungen der retinalen Schichten. p: postnatal Tag, pw: postnatal Woche. Maßstab=10 μ m in J (gehört zu A-J); in R (gehört zu K-R).

Dieser Zelltyp entwickelte sehr feine dendritische Ausläufer, die die gesamte Breite der ONL durchzogen und bis zur OLM reichten, vermutlich um nach dem fehlenden glutamatergen Eingang der PR zu „suchen“ (Sonntag *et al.*, 2012). Diese Veränderungen wurden in den Cx36-exprimierenden Rho^{-/-}-Retinen bereits an pw5 und in den Rd1-Mäusen an p15 detektiert (Abb. 4-13 B, L).

Die dendritischen Auswüchse bildeten sich parallel mit dem fortschreitenden Verlust der ONL-Schichtung zurück (Abb. 4-13 C-E; L-N). Auffallend waren dendritische Strukturen der ZB3b, die während der Reorganisation und des gesamten Degenerationsprozesses der PR in der ONL verblieben (Abb. 4-13 B-E, L-N, waagerechter Pfeil). Die beschriebene Reorganisation entsprach den morphologischen Veränderungen, die in den dazugehörigen Cx36-defizienten Rho^{-/-}- und Rd1-Geschwistertieren beobachtet wurden (Abb. 4-13 F-J; O-R). Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse, dass die Photorezeptordegeneration zu massiven morphologischen Veränderungen der Sekundärneurone führte. Dennoch war die Reorganisation der untersuchten Zellen nicht durch die Defizienz von Cx36 beeinflusst. Das Ausschalten der Stäbchen-Zapfen-Kopplung veränderte demnach weder das Ausmaß noch den zeitlichen Verlauf der retinalen Reorganisation in den untersuchten RP-Mausmodellen.

4.1.3.5 Verlust der Zapfen-Außensegmente zu Beginn der sekundären

Zapfendegeneration

Um die Auswirkung der unterbrochenen Stäbchen-Zapfen-Kopplung mit zusätzlichen, sensitiveren und direkteren Messungen zu analysieren, wurde der Einfluss der Cx36-Defizienz auf den Beginn (in Rho^{-/-}-Mutanten) und während späterer Stadien (in Rd1-Mutanten) der Zapfendegeneration untersucht. Dabei wurden unterschiedliche metabolische Stadien analysiert, die die Zapfen während ihrer Degeneration durchlaufen: Ein Ereignis, das sehr früh während der Degeneration einsetzt, ist die Retraktion und der darauf folgende komplette Verlust der Zapfen-Außensegmente (ZAS; Punzo *et al.*, 2009). Die Zeitspanne zwischen dem Beginn der Außensegmentretraktion bis zum tatsächlichen Verlust der Zapfen betrug in der Rho^{-/-}-Maus über 10 Wochen (Abb. 4-1; 4-10 A-J). Aufgrund dieses Merkmals

war das Rho^{-/-}-Modell sehr gut geeignet, um den Einfluss der Stäbchen-Zapfen-Kopplung zu Beginn der Zapfendegeneration zu untersuchen.

Der zunehmende Verlust der ZAS zwischen 5, 9 und 12 Wochen alten Rho^{-/-}-Cx36^{+/+}-, Rho^{-/-}-Cx36^{-/-}- und Wt-Mäusen wurde in retinalen Flachpräparaten untersucht (Abb. 4-14). Die Visualisierung der ZAS erfolgte durch Markierungen mit AK, die gegen die beiden in Mauszapfen exprimierten Opsine (M-, S-Opsin) gerichtet sind (Applebury *et al.*, 2000). Die Anzahl der markierten ZAS wurde in vier unterschiedlich gelegenen Retinabereichen (*region of interest* [engl.], ROI), mit jeweils einer Größe von 100x200 µm², quantifiziert, um putative räumliche Unterschiede in Bezug auf den Beginn und den Fortschritt des ZAS-Verlustes zu berücksichtigen. Die ROI wurden entlang der dorso-ventralen Achse, jeweils in einem 50% bzw. 75% vom Optischen Nerv entfernten Bereich, definiert (Abb. 4-14 A). Dabei entsprachen 100% der Entfernung vom Optischen Nerv bis zum Rand der Retina. Abb. 4-14 B zeigt repräsentative Ausschnitte gleicher ROI (75% dorsal) in 5, 9 und 12 Wochen alte Rho^{-/-}-Mutanten. Während die Bereiche an pw5 noch eine Wt-ähnliche Dichte der ZAS aufwiesen, reduzierte sich die Anzahl der ZAS sichtbar in 9 und noch weiter in 12 Wochen alten Tieren. Zwischen gleichaltrigen Geschwistertieren mit unterschiedlichen Genotypen fielen jedoch keine offensichtlichen Unterschiede in der Menge der ZAS auf. Die ZAS-Quantifizierungen wurden für mindestens drei verschiedene Tiere pro Alter und Genotyp durchgeführt (Abb. 4-14 C-E):

In 5 Wochen alten Tieren zeigten sich zwischen Rho^{-/-}-Cx36^{+/+}-, Rho^{-/-}-Cx36^{-/-}- und Wt-Kontrollen generell keine statistischen Unterschiede in der Anzahl der ZAS (Abb. 4-14 C; T-Test: p>0,0803 für alle Vergleiche, n=3). Eine Ausnahme existierte zwischen den Rho^{-/-}-Mutanten und den entsprechenden Wt-Tieren: Im dorsalen Bereich der zentralen Retina war die ZAS-Anzahl in beiden transgenen Mauslinien gegenüber den Wt-Mäusen signifikant reduziert (Abb. 4-14, T-Test: Rho^{-/-}-Cx36^{+/+}, Wt: p=0,0178, Rho^{-/-}-Cx36^{-/-}, Wt: p=0,0093, n=3). Da die Zapfendegeneration in der zentralen Retina der Rho^{-/-}-Maus beginnt (Punzo *et al.*, 2009), könnte die Reduzierung der ZAS in diesem Bereich den Beginn der Zapfendegeneration repräsentieren.

Während in den Wt-Kontrollen der nachfolgenden Altersstufen die Anzahl der ZAS weitestgehend konstant blieb, ging ein wesentlicher Bestandteil in den 9 (Abb. 4-14

D) und 12 Wochen (Abb. 4-14 E) alten $Rho^{-/-}Cx36^{+/+}$ - und $Rho^{-/-}Cx36^{-/-}$ -Tieren verloren. Statistische Auswertungen belegten die Reduzierung der ZAS zwischen den unterschiedlichen Altersstufen der Genotypen (Abb. 4-14, T-Test: $p < 0,03$ für alle Vergleiche, $n=3$; Ausnahme: in $Rho^{-/-}Cx36^{-/-}$ zwischen pw9 und pw12, $p=0,09$, $n=3$). Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Dichte der ZAS in äquivalenten Bereichen gleichaltriger $Rho^{-/-}$ -Mutanten detektiert ($p > 0.1089$ für alle Vergleiche; $n=5$, pw9, $n=3$, pw12).

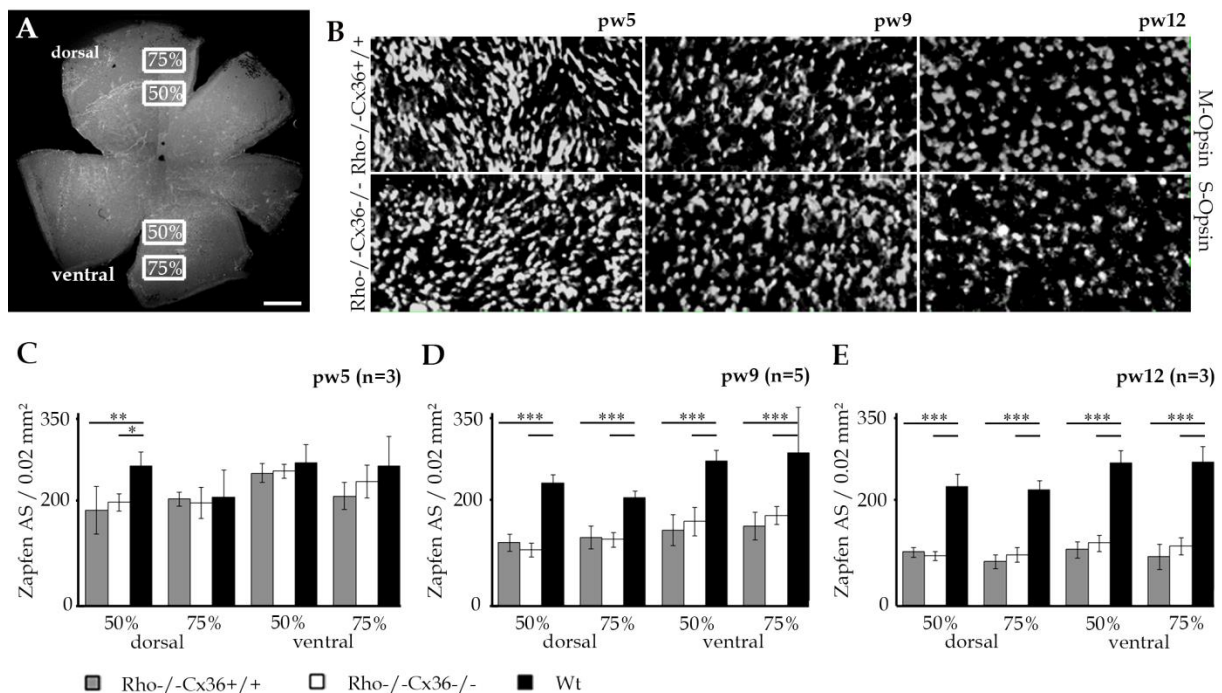


Abbildung 4-14. Der Verlust der Zapfen-Außensegmente wurde nicht durch die Deletion von Connexin36 beeinflusst. (A) Der Beginn der Zapfendegeneration wurde durch eine Quantifizierung der Zapfen-Außensegmente (ZAS) in definierten Bereichen (ROI) der zentralen und peripheren Retina in Flachpräparaten untersucht. Die ROI befanden sich in 50% und 75% Entfernung zum Optischen Nerv, jeweils in dorsaler und ventraler Orientierung. Zur Quantifizierung wurden die ZAS mit AK gegen M- und S-Opsin markiert. (B) Repräsentative Beispiele von äquivalenten, quantifizierten Retinabereichen (75% dorsale Retina) aus 5-, 9- und 12- Wochen alten $Rho^{-/-}Cx36^{+/+}$ (oben) und $Rho^{-/-}Cx36^{-/-}$ (unten) Mäusen. (C-D) Darstellung der ZAS-Quantifizierungsergebnisse der pw5 (C), pw9 (D) und pw12 (E) alten $Cx36$ -exprimierenden (grau) und $Cx36$ -defizienten (weiß) $Rho^{-/-}$ -Mutanten sowie gleichaltrigen Wt-Kontrolltieren (schwarz). Die Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zum Vergleich zweier Werte wurde ein T-Test durchgeführt: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. n gibt die Anzahl der quantifizierten Geschwisterpaare an. pw: postnatal Woche. Maßstab=300 μ m in A; 25 μ m in B.

Die Quantifizierungen zeigten, dass die frühen Anzeichen der Zapfendegeneration zwischen 5 und 12 Wochen alten $Rho^{-/-}$ -Tieren detektiert werden konnten und sich über große Bereiche der Retina erstreckten. Allerdings wurde der Verlust der ZAS

durch das Ausschalten der Stäbchen-Zapfen-Kopplung weder verzögert noch beschleunigt (Abb. 4-14 C-E).

4.1.3.6 Sekundärer Zelltod und Verlust der Zapfen in späten Krankheitsstadien

Der schnelle Verlauf der Photorezeptordegeneration in $Rd1Cx36^{+/-}$ - und $Rd1Cx36^{-/-}$ -Mäusen führte, wie in Abb. 4-10 K-R gezeigt, zu einem sehr frühen und schnellen Verlust der ZAS. Dies wurde für die Rd1-Maus bereits in früheren Studien beschrieben (Lin *et al.*, 2009). Daher war das Rd1-Modell nicht besonders gut geeignet, um den frühen Verlust der ZAS über einen längeren Zeitraum zu analysieren. Stattdessen wurde die Rd1-Maus in dieser Studie verwendet, um den Einfluss der Stäbchen-Zapfen-Kopplung direkt auf Merkmale zu untersuchen, die die späten Stadien der Zapfendegeneration prägen: 1. Verlust der Zapfen (Abb. 4-15, 4-16); 2. Absterben der Zapfen (Abb. 4-17).

Markierungen der Rd1-Zapfen in unterschiedlichen Altersstufen der Tiere wurden mit AK gegen *Cone Arrestin* durchgeführt (Abb. 4-15) und zeigten die zunehmende Deformation der Zapfenmorphologie und den offensichtlichen Verlust der Zapfen zwischen 15, 21 und 30 Tage alten Rd1-Mutanten (Abb. 4-15 B-D; F-H).

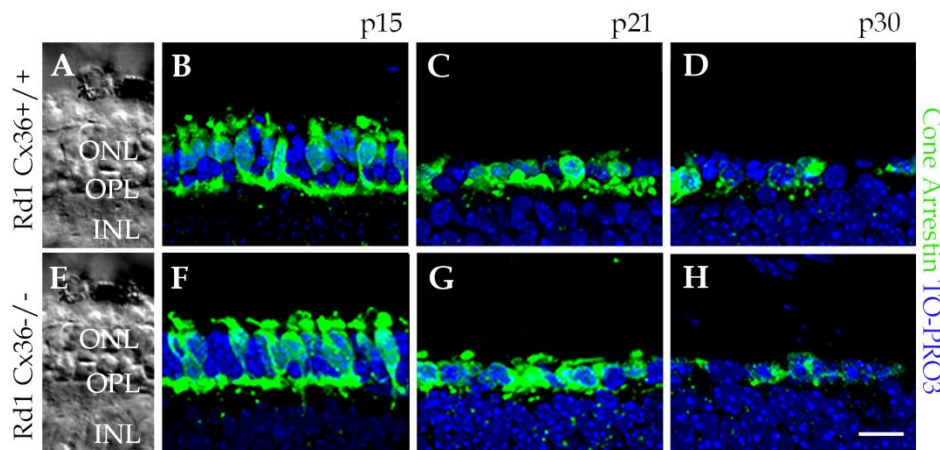


Abbildung 4-15. Verlust der Zapfen in $Rd1Cx36^{+/-}$ - und $Rd1Cx36^{-/-}$ -Mäusen verschiedener Altersstufen. (A-H) Markierung der Zapfen mit AK gegen *Cone Arrestin* (grün) in vertikalen Gefrierschnitten von p15 (B, F), p21 (C, G) und p30 (D, H) alten $Rd1Cx36^{+/-}$ - (A-D) und $Rd1Cx36^{-/-}$ - (E-H) Retinen. Eine Markierung der Kerne erfolgte mit TO-PRO3 (blau). Mit zunehmendem Alter wurde der fortgeschrittene Verlust der Zapfen erkennbar. Offensichtliche Unterschiede der Zapfenzahl und Form waren zwischen gleichaltrigen Cx36-exprimierenden und Cx36-defizienten Tieren nicht ersichtbar. (A, E) Nomarski-Transmissionsabbildungen mit Beschriftungen der retinalen Schichten. p: postnatal Tag. Maßstab=10 μ m in H (gehört zu A-H).

Im visuellen Vergleich von gleichaltrigen Rd1Cx36^{+/-} (Abb. 4-15 A-D) und Rd1Cx36^{-/-} (Abb. 4-15 E-H) Tieren waren keine Unterschiede in Bezug auf die Form und die Häufigkeit der Zapfen ersichtlich.

Eine Quantifizierung der Zapfen wurde durchgeführt, um diese Beobachtung näher zu untersuchen (Abb. 4-16). Da die Degeneration in der Rd1-Retina vom Zentrum zur Peripherie verläuft (Carter-Dawson *et al.*, 1978), erfolgte die Quantifizierung der Zapfen ausschließlich in den zentralen Bereichen von vertikalen Retinaschnitten. Das Zentrum der Retina wurde als der Abschnitt definiert, der sich vom Optischen Nerv bis 1000 μm in die Peripherie erstreckte (Abb. 4-16 A). Die Ergebnisse der Zapfenquantifizierung bestätigten den äquivalenten Verlauf des Zapfenverlustes in Cx36-exprimierenden und Cx36-defizienten Rd1-Mäusen (Abb. 4-16 B). Die Anzahl der Zapfen in den Rd1-Mutanten im Alter von p15 entsprach der Zapfenzahl in den Wt-Kontrollen. Das Ergebnis zeigte, dass die Zapfendegeneration in diesem Alter noch nicht begonnen hatte. In früheren Studien der Rd1-Maus wurde die Hauptphase des Zapfensterbens einem Alter von 21 Tagen zugeschrieben (Punzo *et al.*, 2009).

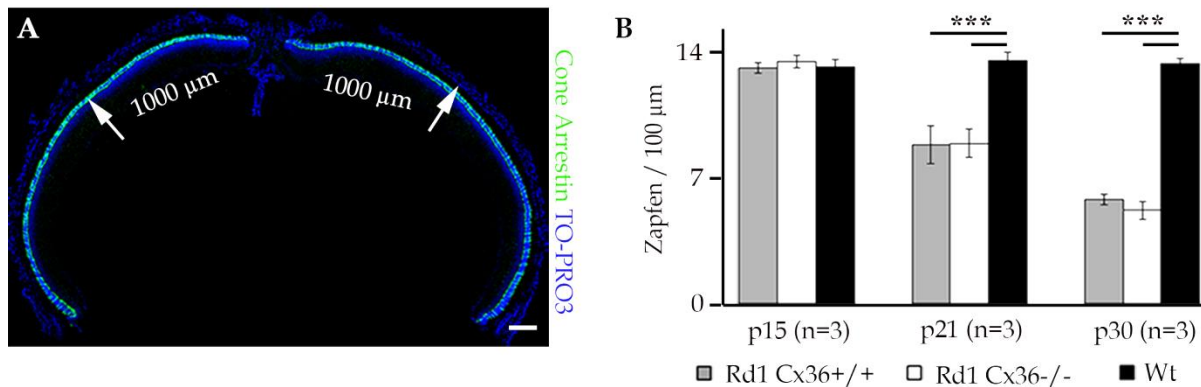


Abbildung 4-16. Auswirkung der Connexin36-Defizienz auf den Verlust der Zapfen in Rd1Cx36^{+/-} und Rd1Cx36^{-/-}-Mäusen. (A) Quantifizierung von *Cone Arrestin*-markierten Zapfen (grün) im Zentrum vertikaler Retinaschnitte. TO-PRO3 visualisierte die retinalen Zellkerne. Der zentrale Bereich der Retina wurde als der Bereich vom Optischen Nerv bis zu einer Entfernung von 1000 μm in die Peripherie definiert. (B) Die Ergebnisse der Zapfenquantifizierung in der zentralen Retina sind als Balkendiagramm dargestellt. Die Anzahl der Zapfen pro 100 μm ist entsprechend der untersuchten Altersstufen in Rd1Cx36^{+/-} (grau), Rd1Cx36^{-/-} (weiß) und Wt-Mäusen (schwarz) dargestellt. In 15 Tage alten Tieren (p15) war die Anzahl der Zapfen in den untersuchten Genotypen gleich. In 21 (p21) und 30 Tage (p30) alten transgenen Tieren war die Anzahl der Zapfen gegenüber gleichaltrigen Wt-Tieren reduziert ($p < 0,002$ für alle Vergleiche, $n=3$). Der Vergleich zwischen gleichaltrigen Rd1Cx36^{+/-} und RdCx36^{-/-}-Tieren zeigte keine statistischen Unterschiede ($p > 0,6296$ für alle Vergleiche, $n=3$). Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zum Vergleich zweier Werte wurde ein T-Test durchgeführt: ***, $p < 0,001$. n gibt die Anzahl der Tiere wieder. Maßstab=200 μm in A.

Die durchgeführte Zapfenquantifizierung der 21 Tage alten Tiere stimmte in etwa mit dieser Beschreibung überein. Die Anzahl der Zapfen reduzierte sich in beiden Rd1-Mutanten von p15 auf p21 um ein Drittel (Abb. 4-16 B, T-Test: $p=7.1 \times 10^{-7}$, $n=3$) und im weiteren Degenerationsverlauf um fast ein weiteres Drittel (Abb. 4-16 B, T-Test: $p=0.5 \times 10^{-5}$, $n=3$). Die Anzahl der Zapfen blieb in den unterschiedlichen Altersstufen der Wt-Kontrolltiere konstant. Zwischen gleichaltrigen Cx36-exprimierenden und Cx36-defizienten Rd1-Mutanten konnten zu keinem untersuchten Zeitpunkt statistische Unterschiede in der Anzahl der Zapfen festgestellt werden, die einen Einfluss der Cx36-Defizienz auf den Verlust der Zapfen andeuten würden (Abb. 4-15 B, T-Test: p15: $p=0.2993$; p21: $p=0.9271$; p30: $p=0.1386$, $n=3$).

Ein weiterer methodischer Ansatz wurde durchgeführt, um die Daten der finalen Zapfendegeneration zu untermauern. Hierzu wurde die Anzahl der absterbenden Zapfen zwischen Rd1Cx36^{+/+}- und Rd1Cx36^{-/-}-Geschwistertieren verglichen (Abb. 4-17). Der Zelltod wurde in diesen Versuchen durch TUNEL-Markierungen nachgewiesen. Um eine Zelltodrate der Zapfen zu bestimmen, wurden 21 und 30 Tage alte Mäuse ausgewählt. In diesen Altersstufen ist die Phase des primären Stäbchentods bereits beendet (Punzo *et al.*, 2009; Sancho-Pelluz *et al.*, 2008) und die meisten in der ONL lokalisierten Zellen waren Zapfen (Abb. 4-10, M, N, Q, R), deren Verlust nachweislich fortschritt (Abb. 4-16). Die genannten Umstände sprachen dafür, dass in diesen Altersstufen die TUNEL-positiven Zellen innerhalb der ONL (Abb. 4-17 A-F) dem Zapfensterben zugeordnet werden konnten.

Wie aus den vorherigen Ergebnissen erwartet, zeigten die statistischen Vergleiche der Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen zwischen gleichaltrigen transgenen und Wt-Tieren einen signifikanten Anstieg der TUNEL-markierten Zellen in beiden RP-Mutanten (Abb. 4-17 G, T-Test: p21: $p < 0,0004$, für alle Vergleiche, $n=3$; p30: $p < 0,0009$, für alle Vergleiche, $n=3$), mit einer höheren Anzahl TUNEL-positiver Zellen an p21 als an p30 (Abb. 4-17 G T-Test: Rd1Cx36^{+/+}: $p=0,002$, $n=3$; Rd1Cx36^{-/-}: $p=0,003$, $n=3$).

Die Anzahl an absterbenden Zapfen wurde durch die Cx36-Defizienz nicht beeinträchtigt (Fig. 4-16 G, T-Test: p21: $p=0,5231$, p30: $p=0,9296$; $n=3$). Dieses

Ergebnis zeigte, dass die Deletion von Cx36 weder den zeitlichen Verlauf noch das Ausmaß der sekundären Zapfendegeneration beeinflusste.

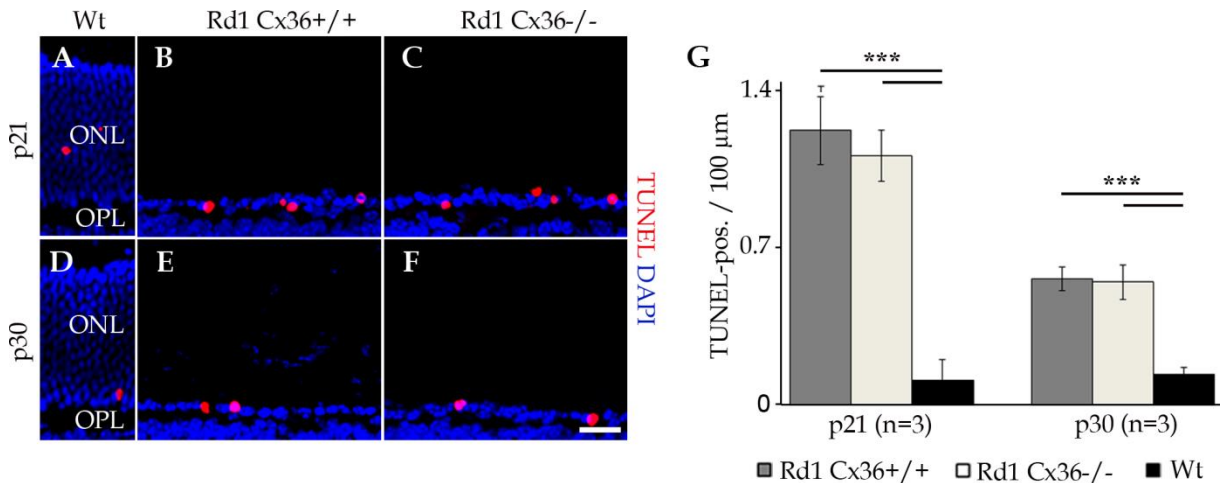


Abbildung 4-17. Zeitreihe des Zapfensterbens in Rd1Cx36^{+/+}- und Rd1Cx36^{-/-}-Mäusen. (A-F) Markierung absterbende Zellen in vertikalen Schnitten der Wt-(A, C), Rd1Cx36^{+/+}- (B, E) und Rd1Cx36^{-/-}- (C, F) Retina mittels des TUNEL-Assays (rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). (A, D) Kennzeichnung der retinalen Schichten in der Wt-Retina. (G) Quantifizierung TUNEL-positiver Zellen in 21 (p21; A-C) und 30 Tage (p30, D-F) alten Rd1Cx36^{+/+}- (grau), Rd1Cx36^{-/-}- (weiß) und Wt- (schwarz) Tieren. Das Balkendiagramm gibt die Menge TUNEL-positiver Zellen pro 100 μm ONL an. Die Anzahl TUNEL-positiver Zellen in beiden transgenen Tieren war im Vergleich zum Wt signifikant erhöht ($p < 0,0009$, für p21 und p30, $n=3$). Der Vergleich zwischen gleichaltrigen Rd1Cx36^{+/+}- und RdCx36^{-/-}-Tieren zeigte keine statistischen Unterschiede ($p > 0,5231$, $n=3$). Werte sind als Mittelwerte \pm SD angegeben. Zum Vergleich zweier Werte wurde ein T-Test durchgeführt: ***, $p < 0,001$. n gibt die Anzahl der Tiere wieder. Maßstab=20 μm in F (gehört zu A-F).

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse in diesem Projekt, dass die, durch eine Deletion von Cx36 induzierte Unterbrechung der Stäbchen-Zapfen-Kopplung, das sekundäre Zapfensterben in zwei unterschiedlichen Mausmodellen für RP, weder verhinderte noch verzögerte. Trotz der Entfernung der GJ zwischen beiden Photorezeptorsubtypen konnten keine Veränderungen auf den Beginn oder auf spätere Stadien des Zapfensterbens festgestellt werden, die auf eine Beteiligung des Bystander-Effekts hindeuten würden.

4.2 Diskussion

4.2.1 Mechanismen der primären Stäbchendegeneration in der Rhodopsin-knockout-Maus

Das Absterben der PR bei RP ist bis heute nicht therapierbar. Die Vielfalt der auslösenden genetischen Defekte und die unterschiedlichen phänotypischen Erscheinungsbilder der retinalen Erkrankung erschweren die Entwicklung therapeutischer Ansätze. Trotz der Vielfalt scheint es gemeinsame Schlüsselmechanismen zu geben (Chang *et al.*, 1993; Doonan *et al.*, 2003; Wong, 1994), die mutationsunabhängig am Absterben der PR beteiligt sind und dadurch als putative therapeutische Ziele in Betracht kommen (Trifunovic *et al.*, 2012). Um diese Mechanismen zu verstehen, ist es notwendig, die molekularen Signalbahnen des Zelltods und die beteiligten Enzyme in verschiedenen RP-Formen zu analysieren.

In dem vorliegenden Projekt wurden die aktiven Zelltodmechanismen des Stäbchensterbens in der Rho^{-/-}-Maus untersucht. Die Ergebnisse zeigten kaum Einflüsse von konventionellen apoptotischen Prozessen (Bax-Expression, MOMP, Aktivierung von Caspasen) beim Stäbchensterben, sondern eine verstärkte Aktivierung der Enzyme Calpain, HDAC und PARP. Diese Ergebnisse deuten vor allem auf eine Beteiligung nicht-apoptotischer, alternativer Zelltodmechanismen hin (Baines, 2010; Paquet-Durand *et al.*, 2007a).

4.2.1.1 Methodische Überlegungen

Zur Untersuchung der Zelltodmechanismen wurden ausschließlich die aktiven Formen der verschiedenen Enzyme mit AK oder Aktivitätsassays nachgewiesen, da die untersuchten Moleküle an sich ubiquitär in allen Zellen vorliegen. Da die untersuchten Enzyme auch unter physiologischen Bedingungen eine Grundaktivität aufweisen, wurden in früheren Studien die Aktivitätsassays so optimiert, dass hauptsächlich eine Überaktivierung der Enzyme in den Zellen nachgewiesen wird (Paquet-Durand *et al.*, 2006, Paquet-Durand *et al.*, 2007b; Sancho-Pelluz *et al.*, 2010). Dies zeigten in den Versuchen auch die Vergleiche zu den jeweiligen Wt-Kontrolltieren.

Für eine direkte Zuordnung der überaktivierten Enzyme mit dem Absterben der Zellen wäre eine Kombination aus TUNEL-Markierung und Aktivitätsnachweis erforderlich. Diese Doppelmarkierungen sind methodisch allerdings sehr schwierig. Eine Korrelation zwischen TUNEL-positiven Zellen mit HDAC-, Calpain- und PARP- Aktivitäten wurde dennoch in vorangegangenen Studien in der Rd1-Maus bestätigt (Paquet-Durand *et al.*, 2006, Paquet-Durand *et al.*, 2007b; Sancho-Pelluz *et al.*, 2010). Es bleibt zu beachten, dass die enzymatische Überaktivierung und die, mit TUNEL-markierten DNA-Strangbrüche, in unterschiedlichen zeitlichen Phasen des Stäbchensterbens auftreten können. Dies erklärt auch, weshalb die Marker nicht in 100% der TUNEL-positiven Zellen detektiert wurden, sondern einen zumeist geringeren prozentualen Anteil ausmachten. In früheren oder späteren Altersstufen wären demnach andere Verhältnisse zwischen den untersuchten Markern und den TUNEL-positiven Zellen ermittelt worden. Dies ist für die vorliegende Studie allerdings nicht relevant, da es in erster Linie um die Identifizierung der am Stäbchensterben beteiligten Enzyme und den Vergleich mit anderen RP-Modellen geht. Weil die verschiedenen RP-auslösenden Mutationen in den Mausmodellen zu unterschiedlichen zeitlichen Verläufen der Degeneration führen, ist für den Vergleich zwischen den Modellen eine definierte Phase während des Stäbchensterbens erforderlich. Daher wurde der Untersuchungszeitpunkt als das Alter definiert, in dem jeweils die maximale Anzahl an absterbenden Stäbchen vorhanden ist. Die Untersuchungen an diesem definierten Zeitpunkt durchzuführen, hat den weiteren Vorteil, dass in diesem Stadium die beteiligten Prozesse in den meisten Zellen aktiv sind und die Hauptphase des Zapfensterbens noch nicht begonnen hat, sodass hohe Anzahlen an positiven Zellen mit dem Stäbchensterben assoziiert werden können (Kaur *et al.*, 2011; Paquet-Durand *et al.*, 2006; Paquet-Durand *et al.*, 2007b; Sancho-Pelluz *et al.*, 2010; Arango-Gonzales, 2013 in Arbeit).

4.2.1.2 Bestimmung des optimalen Alters zur Untersuchung aktiver Prozesse beim Stäbchen-Zelltod

Der nachgewiesene Verlauf der Photorezeptordegeneration in der Rho^{-/-}-Maus (Abb. 4-1) ergänzt die Beschreibungen früherer Studien (Humphries *et al.*, 1997; Punzo *et*

al., 2009): Der Beginn der Stäbchendegeneration setzt nach pw4 ein. Der fortgeschrittene Stäbchenverlust wurde durch die reduzierte Anzahl an Kernreihen in der ONL bereits an pw6 detektiert. Der offensichtliche Beginn der Zapfendegeneration setzt in Tieren zwischen 6 und 9 Wochen ein. Die Hauptphase des Stäbchensterbens ist an pw17 vorbei. Die meisten in diesem Alter noch vorhandenen Zellen sind Zapfen, deren Verlust in den folgenden Wochen stattfindet. Mittels Quantifizierungen der absterbenden Zellen wurde für die nachfolgenden Untersuchungen das Alter mit der maximalen Anzahl an absterbenden Stäbchen in 6 Wochen alten Tieren ermittelt (Abb. 4-2).

4.2.1.3 Beteiligung apoptotischer Signalwege am primären Stäbchensterben

Das Absterben der Stäbchen wurde häufig mit apoptotischen Prozessen in Verbindung gebracht (Chang *et al.*, 1993; Cottet und Schorderet, 2009; Doonan *et al.*, 2003; Reichel *et al.*, 2001). Diese Klassifizierung erfolgte unter anderem auf der Tatsache, dass das Vorhandensein von fragmentierter DNA, wie sie beim TUNEL-Assay nachgewiesen wird, als apoptotisches Ereignis eingestuft wurde (Chang *et al.*, 1993). Allerdings ist heute bekannt, dass TUNEL-Markierungen nicht zwangsläufig mit dem apoptotischen Absterben von Zellen in Verbindung gebracht werden können, da auch die nicht-apoptotische DNA-Fragmentierung mit dieser Methode detektiert wird (Kelly *et al.*, 2003). Deshalb wurden in dieser Studie andere Marker verwendet, um den Einfluss apoptotischer Prozesse beim primären Stäbchensterben in der Rho^{-/-}-Maus zu untersuchen.

Die apoptotischen Signalkaskaden sind komplex und laufen über unterschiedliche Wege ab, in die meistens Caspasen involviert sind (Samali *et al.*, 1999). Seltener erfolgt der apoptotische Zelltod über Caspase-unabhängige Prozesse: Im Zentrum dieser **Caspase-unabhängigen Apoptose** steht der AIF, der in gesunden Zellen in der Membran der Mitochondrien lokalisiert ist und reaktive Sauerstoffradikale (ROS) abbaut, die während des mitochondrialen Metabolismus entstehen (Apostolova *et al.*, 2006). Durch Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran wird der AIF freigesetzt und vermittelt den apoptotischen Zelltod ohne weitere Aktivierungen von Caspasen (Sevrioukova, 2011; Zeiss, 2003). Die Permeabilisierung der äußeren

mitochondrialen Membran (MOMP-mitochondrial outer membrane permeabilization [engl.]) wird bei dieser apoptotischen Signalbahn vor allem durch das proapoptotische Enzym **Bax** eingeleitet (Zeiss, 2003). Da in der Rho^{-/-}-Retina keine erhöhte Expression von Bax festgestellt wurde (Abb. 4-3), ist es unwahrscheinlich, dass der Caspase-unabhängige apoptotische Mechanismus in das primäre Stäbchensterben involviert ist (Abb. 4-18, 1).

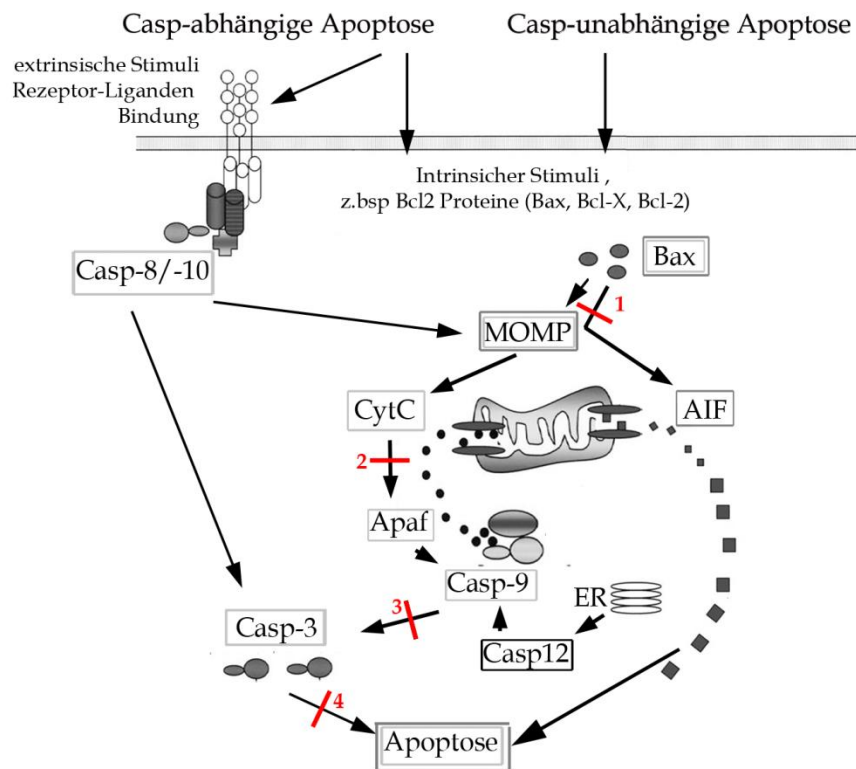


Abbildung 4-18. Darstellung Caspase-abhängiger und Caspase-unabhängiger apoptotischer Signalwege, deren Beteiligung am Stäbchensterben ausgeschlossen werden kann. Die roten Balken kennzeichnen die Signalwege, dessen Beteiligungen am Stäbchensterben in der Rho^{-/-}-Maus, aufgrund der Ergebnisse in dieser Arbeit, ausgeschlossen werden können: In der Rho^{-/-}-Maus konnte keine verstärkte Expression von Bax nachgewiesen werden, wodurch der Hauptweg nicht-apoptischer Prozesse über den Apoptose-induzierenden Faktor (AIF) ausgeschlossen werden kann (1). Auch die Aktivierung der Initiatorcaspase-9 (Casp-9) über cytosolisches Cytochrom c (CytC, 2) und Apaf (*apoptotic protease activating factor* [engl.]) oder durch Stress im endoplasmatischem Retikulum (ER) freigesetzte Caspase-12 (Casp-12, 3) kann ausgeschlossen werden. Des Weiteren konnte keine Aktivierung der Effektorcaspase-3 (Casp-3), als Schlüsselenzym der apoptotischen Prozesse, festgestellt werden (4). Verändert nach Zeiss 2003.

Neben dem proapoptotischen Enzym Bax kann bei der **Caspase-abhängigen Apoptose** die Freisetzung der mitochondrialen Bestandteile auch durch eine Rezeptor-vermittelte Aktivierung der Casp-8 und -10 erfolgen (Abb. 4-18). Vor allem

die Freisetzung von **CytC** spielt bei diesen Signalbahnen eine wichtige Rolle. Cytosolisches CytC aktiviert unter Ausbildung eines Apoptosom-Komplexes mit Apaf (*apoptotic protease activating factor* [engl.]) und der Initiatorcasp-9 nachgeschaltete Effektorcaspasen, die den apoptotischen Zellabbau durchführen (Würstle *et al.*, 2012). Allerdings wird **Casp-9** nicht nur bei MOMP induzierter CytC-Freisetzung aktiviert, sondern auch bei Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER), der z.B. durch Ansammlungen fehlgefalteter Proteine entstehen kann (Rao *et al.*, 2002). ER-Stress wird durch die Aktivierung von Casp-12 vermittelt, die die Procasp-9 ebenfalls in ihre aktive Form überführt (Abb. 4-18). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die Aktivitäten beider Signalbahnen (vermittelt durch CytC-Freisetzung (Abb. 4-3) und Casp-9-Aktivierung (Abb. 4-4)) untersucht.

Die Quantifizierungen der Zellen, die anormale cytosolische CytC-Anreicherungen und die Aktivität der Casp-9 aufwiesen, zeigten in den Rho^{-/-}-Tieren keine Unterschiede zu den Wt-Tieren. Daher kann ausgeschlossen werden, dass diese durch CytC-induzierten (Abb. 4-18, 2) und durch Casp-9-vermittelten (Abb. 4-18, 3) Ereignisse in die Mechanismen des primären Stäbchensterbens involviert sind.

Als letztes Markerprotein der untersuchten apoptotischen Prozesse wurde die Rho^{-/-}-Retina auf die aktive Form von **Casp-3** untersucht, die als Schlüsselenzym der apoptotischen Prozesse bezeichnet werden kann. Die meisten apoptotischen Signalbahnen konvergieren und führen letztendlich zur Aktivierung der Casp-3, die als Effektorcaspase agiert und den proteolytischen Abbau wichtiger metabolischer und cytoskeletaler Strukturen durchführt (D'Amelio *et al.*, 2010; Hengartner, 2000; Saraste und Pulkki, 2000). Die aktive Casp-3-Form wurde in der Rho^{-/-}-Retina zwar sehr selten detektiert, in 0,04% der Gesamtzellen in der ONL, dennoch ist die Anzahl der positiven Zellen gegenüber der Wt-Retina leicht erhöht (Abb. 4-7). Mit einem in Relation zu den TUNEL-positiven Zellen sehr geringen Prozentsatz (2,27% der TUNEL-positiven Zellen; Abb. 4-7) scheint allerdings auch die Aktivierung von Casp-3 nicht in die Mechanismen des Stäbchensterbens involviert zu sein. In Abschnitt 4.2.3 soll daher die leicht erhöhte Anzahl der Zellen mit aktiver Casp-3 separat diskutiert werden.

Aktivierungen der Initiatorcasp-8 und -10, sowie der Effektorcaspasen-6 und -7 (siehe Abb. 1-9) wurde innerhalb dieses Projekts nicht weiter untersucht und können daher nicht ausgeschlossen werden. Da sich die apoptotischen Signalbahnen jedoch häufig kreuzen und untereinander interagieren, kann aus den Ergebnissen vermutet werden, dass auch diese apoptotischen Signalbahnen nicht während des Stäbchensterbens aktiv sind. Nachfolgende Untersuchungen auf die Aktivierung dieser Caspasen wären dennoch sinnvoll, um diese Vermutung abzusichern (siehe Abschnitt 4.2.4).

4.2.1.4 Beteiligung alternativer Zelltodprozesse am primären Stäbchensterben

Die 6 Wochen alte Rho^{-/-}-Retina wurde auf die Aktivität der Enzyme Calpain, HDAC und PARP untersucht, die als Marker für alternative Zelltodmechanismen diskutiert werden (Sancho-Pelluz et al., 2008; Baines, 2010; Paquet-Durand et al., 2007a). Es wurden jeweils erhöhte Anzahl an Zellen festgestellt, die eine starke Aktivierung von Calpain (75,69 % in Relation zu den TUNEL-positiven Zellen; Abb. 4-7), HDAC (21,53 % in Relation zu den TUNEL-positiven Zellen; Abb. 4-7) und PARP (42,36 % in Relation zu den TUNEL-positiven Zellen; Abb. 4-7) zeigen. Die Detektion des PARP-Endproduktes PAR bestätigte zusätzlich die verstärkte PARP-Aktivität in einer Vielzahl von Zellen (Abb. 4-5). Die Befunde deuten auf eine Beteiligung dieser Enzyme beim primären Stäbchensterben hin. Eine Aktivierung während des Stäbchensterbens wurde für diese Enzyme auch in anderen Modellen für RP beschrieben (Kaur et al., 2011; Paquet-Durand et al., 2006; Paquet-Durand et al., 2007a; Paquet-Durand et al., 2007b; Sahaboglu et al., 2010; Sancho-Pelluz und Paquet-Durand, 2012). Die übereinstimmende Detektion dieser Ereignisse in den verschiedenen RP-Modellen deutet auf eine gemeinsame, mutationsunabhängige Zelltodsequenz hin, an der die Enzyme Calpain, PARP und HDAC universell beteiligt sind. Im Kapitel 4.2.2 soll eine mögliche Interaktion dieser Enzyme beim Zelltodmechanismus in den Stäbchen näher beschrieben werden.

4.2.2 Stäbchensterben in zwei unterschiedlichen Mausmodellen für Retinitis Pigmentosa

4.2.2.1 In Rhodopsin-knockout- und in Rd1-Tieren wird das Stäbchensterben durch unterschiedliche Faktoren induziert

Die am Stäbchensterben beteiligten Mechanismen sind in der Rd1-Maus am besten charakterisiert und beschrieben (Sancho-Pelluz *et al.*, 2008). Daher werden im Folgenden die, während des Stäbchensterbens, in der Rho^{-/-}-Maus detektierten Ereignisse mit denen in der Rd1-Maus verglichen.

In der Rd1-Maus wird das Absterben der Stäbchen durch einen Defekt der Stäbchenspezifischen Pde6, einem Protein, das an der Phototransduktion beteiligt ist, hervorgerufen (Bowes *et al.*, 1990). Die Pde6 ist essentiell an der Abschaltung des Dunkelstroms beteiligt (siehe Abschnitt 1.2.1). Durch den Funktionsverlust der Pde6 setzt die cGMP-Hydrolyse in den Rd1-Stäbchen aus. Folglich kommt es zu einer starken cytosolischen cGMP-Akkumulation, die dazu führt, dass die CNG-Kanäle nicht mehr schließen und Ca²⁺ permanent in den PR gelangt. Durch diese gravierenden Veränderungen der cytosolischen Zusammensetzung (erhöhte Konzentrationen des sekundären Botenstoffs cGMP und von Ca²⁺) kann auch der sehr frühe Einsatz der Stäbchendegeneration in diesem Modell erklärt werden (Farber und Lolley, 1974).

Die Zelltod-auslösenden Faktoren in der Rho^{-/-}-Maus sind bisher nicht bekannt. Obwohl der Gendefekt in diesem Modell ebenfalls in einem essentiellen Protein der Phototransduktionskaskade vorhanden ist, werden andere Mechanismen das Stäbchensterben induzieren. Dafür spricht auch der in beiden Modellen sehr unterschiedliche zeitliche Verlauf der Photorezeptordegeneration. Beim Gendefekt in der Rho^{-/-}-Maus handelt es sich nicht um eine „*loss-of-function*“-Mutation, wie bei der Rd1-Maus (Bowes *et al.*, 1990), sondern um eine Deletion des *Rhodopsin*-Gens, wodurch die Expression von Rhodopsin verhindert wird (Humphries *et al.*, 1997). Als Folge der Rhodopsin-Defizienz bilden die Stäbchen keine AS aus (Humphries *et al.*, 1997), sodass vermutlich die gesamten Komponenten der Phototransduktion in den Stäbchen der Rho^{-/-}-Maus nicht existieren. Folglich kann es nicht, wie in der Rd1-Mutante, zu einer Akkumulation von cGMP, der anhaltenden Öffnung der

CNG-Kanäle und den pathologischen Veränderungen des intrazellulären Milieus kommen.

Diese Überlegung wird durch den ermittelten niedrigen cGMP-Level unterstützt (Abb. 4-6). Ähnlich, wie bei der geringen Anzahl Casp-3-positiver Zellen, ist auch das Verhältnis von Zellen mit cGMP-Akkumulation in Relation zu den TUNEL-positiven Zellen mit ~2% sehr gering, wodurch eine Assoziation mit dem Stäbchensterben ausgeschlossen werden kann. Zum Vergleich: In der Rd1-Maus wurde in Relation zu den TUNEL-positiven Zellen eine Anreicherung von cGMP in über 200% der ONL-Zellen nachgewiesen (Arango-Gonzalez *et al.*, 2013; in Arbeit). Allerdings ist die Anzahl cGMP-positiver Zellen in der Rho^{-/-}-Maus im Vergleich zur Wt-Maus erhöht. Diese Beobachtung soll in Abschnitt 4.2.3 näher erläutert werden. Über die genauen Mechanismen, die das Absterben der Stäbchen in der Rho^{-/-}-Maus einleiten, können im Rahmen dieser Arbeit keine weiteren Aussagen getroffen werden.

4.2.2.2 Gemeinsame Stäbchenzelltodmechanismen in der Rhodopsin-knockout- und der Rd1-Maus

Trotz der **unterschiedlichen Prozesse**, die das Stäbchensterben auslösen, zeigen beide Mausmodelle **gleiche Merkmale** (erhöhte Calpain-, PARP- und HDAC-Aktivitäten), die während des Stäbchensterbens aktiv sind (siehe Abschnitt 4.2.1.4). In Abb. 4-19 sind diese Merkmale in einem Schema zusammengefasst. Die Darstellung zeigt eine mögliche Sequenz der stattfindenden Ereignisse:

Als gemeinsamer Ausgangspunkt wird eine **erhöhte Ca²⁺-Konzentration** in den Stäbchen vorausgesetzt. Diese ist in der Rd1-Maus beschrieben (Farber und Lolley, 1974), und wurde in der Rho^{-/-}-Maus indirekt durch die Aktivierung der Ca²⁺-abhängigen Protease Calpain nachgewiesen. Calpain ist ubiquitär in Zellen vorhanden. Durch Assoziation mit dem Inhibitor Calpastatin wird Calpain im inaktiven Zustand gehalten. Es ist bekannt, dass ansteigende Ca²⁺-Konzentrationen zu Konformationsänderungen des Moleküls führen, wodurch Calpain von Calpastatin abdissoziiert und in die aktive Form übergeht (Paquet-Durand *et al.*, 2006). Eine genaue Funktion für **Calpain** beim Zellsterben ist nicht beschrieben. Es

wäre denkbar, dass Calpain die beiden, in der Retina vorkommenden Substrate, AIF und OGG1, proteolytisch spaltet und inaktiviert (Sancho-Pelluz *et al.*, 2008):

- eine **Inaktivierung** von **AIF** würde deren physiologische Funktion als Oxidoreduktase beenden und zu einer Anhäufung der beim mitochondrialen Metabolismus entstehenden ROS führen. Die Anreicherung der ROS könnte unter anderem oxidative DNA-Schäden hervorrufen (Apostolova *et al.*, 2006).
- eine **Inaktivierung** des DNA-Reparaturenzyms **OGG1** könnte die Reparaturmechanismen von, z.B. durch ROS-induzierten, DNA-Schäden reduzieren und zu einer Anhäufung der DNA-Defekte führen (Sancho-Pelluz *et al.*, 2008).

Als Konsequenz der durch die Calpain-Aktivierung **zunehmenden DNA-Schäden** könnte es zur **Hyperaktivierung von PARP** kommen (Paquet-Durand *et al.*, 2007b). PARP ist, ähnlich wie OGG1, ein spezifisches DNA-Reparaturenzym, das unter physiologischen Bedingungen auftretende DNA-Defekte reduziert (Schreiber *et al.*, 2006). Die Aktivität von PARP ist ein Energie-verbrauchender Prozess, bei dem PAR-Polymere aus NAD⁺-Substraten gebildet werden. Als Folge der übermäßigen DNA-Schäden könnte es in den Stäbchen zu einer verstärkten Aktivierung von PARP kommen und bedingt durch die PARP-Hyperaktivität zu einer **Energieverarmung** der Zelle (Sancho-Pelluz *et al.*, 2008). Die PARP-Überaktivierung könnte allerdings auch über die verstärkte Generierung der **PAR-Polymere** am Zelltod beteiligt sein. In diesem, vor einigen Jahren, neu definierten Zelltod $pathway$ (Parthanatos), ist beschrieben, dass auch die Anreicherung von PAR die mitochondriale Freisetzung des **AIF** ins Cytosol und die dadurch vermittelten Zelltodmechanismen bewirken kann (David *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2009).

HDAC sind durch die Deacetylierung von Histonen an genregulatorischen Prozessen beteiligt (Saha und Pahan, 2006). Die Einordnung der **HDAC-Überaktivierung** in die dargestellte Ereignissequenz ist allerdings schwierig, da die Gründe für die Überaktivierung unklar und die Funktionen, die HDAC beim Absterben der Stäbchen einnehmen, noch nicht verstanden sind. Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass diese Enzyme entscheidend am Absterben der Stäbchen beteiligt sind (Sancho-Pelluz *et al.*, 2010; Sancho-Pelluz und Paquet-Durand, 2012).

An Studien der Rd1-Retina konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung von HDAC protektiv auf die Überlebensfähigkeit der PR wirkt (Sancho-Pelluz und Paquet-Durand, 2012). Außerdem wurde bei inhibierter HDAC-Aktivität eine Reduzierung der PARP-positiven Zellen festgestellt. Demnach scheinen sich die HDAC in der Ereignissequenz oberhalb von PARP zu befinden (Sancho-Pelluz und Paquet-Durand, 2012).

Die Darstellung in 4-19 zeigt eine kleine Abfolge von Prozessen, die **gleichermaßen** in der Rho^{-/-}-Maus und in der Rd1-Maus beim Absterben der Stäbchen aktiv sind. Die Beschreibung schließt nicht aus, dass zusätzlich eine Vielzahl paralleler Signalbahnen (z.B. PKA-, PKG-vermittelte *Pathways*) und gegenseitige Interaktionen der Wege ablaufen, deren Beteiligungen am Stäbchensterben ebenfalls beschrieben sind (Fletcher, 2010; Paquet-Durand *et al.*, 2009; Rohrer *et al.*, 2004; Sancho-Pelluz *et al.*, 2008).

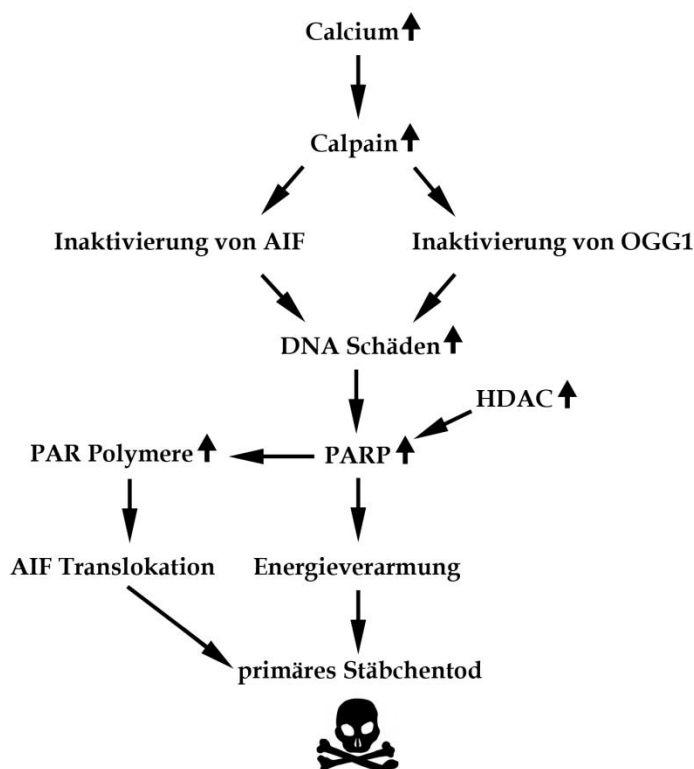


Abbildung 4-19. Putativer Zelltodmechanismus, der gleichermaßen am Absterben der Stäbchen in Rhodopsin-knockout- und in Rd1-Mäusen beteiligt ist. Durch eine erhöhte Calciumkonzentration wird die Protease Calpain aktiviert, die zur Inaktivierung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) in der mitochondrialen Membran und/oder zur Inaktivierung des DNA-Reparaturenzyms OGG1 führt. Beide Ereignisse können zu einem verstärkten Ausmaß an DNA-Schäden führen und folglich zu einer Überaktivierung von PARP, wodurch es zur Energieverarmung der Zelle und einer Ansammlung von PAR-Polymeren kommen könnte. Beide Ereignisse können das Absterben der Zellen durch Aktivierungen nachfolgender Prozesse, in denen unter anderem auch die mitochondriale Freisetzung von AIF induziert werden kann, hervorrufen. Überaktivierungen der genregulatorisch-wirksamen HDAC stehen im Zusammenhang mit der verstärkten Aktivierung von PARP. Verändert nach Sancho-Pelluz *et al.*, 2008.

4.2.3 Aktivität von Caspase-3 und detektierte Veränderungen im cGMP-

Metabolismus

Zellen, in denen die aktive Form von Casp-3 und eine starke cytosolische Akkumulation von cGMP detektiert wurde, kamen in Relation zu den TUNEL-positiven Zellen in einer sehr geringen Anzahl vor (Casp-3: 2,78% in Relation zu den TUNEL-positiven Zellen; cGMP: 2,08% in Relation zu den TUNEL-positiven Zellen), sodass eine Assoziation mit dem zu diesem Zeitpunkt massiven Absterben der Stäbchen kaum vorliegen kann. Dennoch muss die signifikante Erhöhung der Casp-3- und cGMP-positiven Zellen in der Rho^{-/-}-Maus im Zusammenhang mit den ablaufenden Veränderungen stehen, da die Anzahl der Zellen gegenüber dem Wt signifikant erhöht ist. Es wäre denkbar, dass es sich bei den markierten Zellen nicht um Stäbchen handelt, sondern um Zapfen, in denen die ersten metabolischen Veränderungen der einsetzenden Degeneration ablaufen, die ab pw6 auch anhand von Veränderungen der retinalen Struktur und in funktionellen Messungen detektiert werden können (Humphries *et al.*, 1997; Jaissle *et al.*, 2001). Da die Prozesse, die am sekundären Zapfensterben beteiligt sind, bisher nicht untersucht wurden und nicht zwangsläufig dem Zelltodmechanismen der Stäbchen entsprechen, könnten die Markierungen der aktiven Form von Casp-3 und die erhöhte Konzentration von cGMP, die Umstellung des Zapfenmetabolismus in dieser Anfangsphase der Degeneration andeuten.

4.2.4 Fazit zu den Mechanismen der primären Stäbchendegeneration

Zusammengefasst konnte in diesem Projekt gezeigt werden, dass es trotz unterschiedlicher Gendefekte und unterschiedlicher phänotypischer Ausprägungen der Photorezeptordegeneration in der Rho^{-/-}- und der Rd1-Maus, gemeinsame Ereignisse während der Stäbchendegeneration gibt. Die verstärkten Aktivitäten der Enzyme Calpain, PARP und HDAC wurden als Gemeinsamkeiten identifiziert. Weitere Vergleiche mit anderen Modellen für RP sind notwendig, um die Universalität dieser Enzyme beim Stäbchensterben zu verifizieren, wodurch sie putativ als therapeutische Ziele in Frage kommen würden. Die untersuchten mit

Apoptose-assoziierten Enzyme sind, wie auch in der Rd1-Mutante, nicht in das Absterben der Stäbchen in der Rho^{-/-}-Maus involviert.

Nachfolgende Untersuchungen wären interessant, um die Mechanismen des Stäbchensterbens weiter zu untersuchen:

- In weiteren immunohistologischen Versuchen könnte eine putative Rolle von AIF näher untersucht werden: Das mitochondriale AIF könnte durch Calpain inaktiviert werden und auf diesen Weg oxidative Schäden hervorrufen (in diesem Fall wäre es dennoch weiterhin in den Mitochondrien lokalisiert) oder durch die von PAR-induzierte Freisetzung aus den Mitochondrien in den Zellkern translokalisieren und zur DNA-Fragmentierung führen (Sevrioukova, 2011). Im letzten Fall wäre die AIF-IR im Zellkern lokalisiert.
- Neben Casp-3, gibt es 2 weitere relevante Effektorcaspasen (Casp-6 und Casp-7, Abb. 1-9), deren Beteiligung mittels der, in diesem Projekt durchgeführten Versuche, nicht ausgeschlossen werden kann. Daher wären immunohistologische Untersuchungen der aktiven Formen dieser Caspasen, sowie der Initiatorcasp-8 und -10 zum Ausschluss weiterer apoptotische Signalbahnen notwendig.

4.2.5 Einfluss der Stäbchen-Zapfen-Kopplung auf die sekundäre Zapfen-degeneration in Mausmodellen für Retinitis Pigmentosa

In diesem Projekt wurde die Bystander-Hypothese in zwei Mausmodellen für RP (Rho^{-/-}-Maus, Rd1-Maus) untersucht. Durch die unterschiedlichen, mutationsbedingten phänotypischen Ausprägungen in den verwendeten Modellen, konnte der Bystander-Effekt in verschiedenen metabolischen Stadien der sekundären Zapfendegeneration (Anfangs- und Endphase) untersucht werden. Die Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen wurde in beiden Modellen durch gezielte Deletion des Cx36-kodierenden Gens unterbrochen. Um die Auswirkung der Cx36-Defizienz auf das sekundäre Zapfensterben zu analysieren, wurden histologische und quantitative Vergleiche durchgeführt.

4.2.5.1 Gründe für die Beteiligung von *Gap Junctions* am sekundären Zapfensterben

Im Allgemeinen ist ein durch GJ-vermittelter Bystander-Effekt als Mechanismus zur Zelltodausbreitung *in vitro* (Cotrina *et al.*, 1998; Rami *et al.*, 2001) und *in vivo* (Freeman *et al.*, 1995; Mesnil *et al.*, 1996) anerkannt. Im Jahr 2002 wurde der Bystander-Effekt von Harris Ripps mit RP in Verbindung gebracht (Ripps, 2002). Zur Erklärung des sekundären Absterbens der genetisch normalen Zapfen favorisierte er den durch GJ-vermittelten Bystander-Effekt, einen Prozess, in dem toxische Intermediate, die während des Stäbchensterbens entstehen, direkt auf die Zapfen übertragen werden und das sekundäre Absterben dieser Zellen induzieren. Zwei Phänomene, die für die von Ripps aufgestellte Bystander-Hypothese sprechen, sind in den beiden untersuchten Mausmodellen vorhanden und deuten auf einen möglichen Bystander-Effekt hin:

1. Zeitliche Überlappung der einsetzenden Zapfendegeneration mit der Hauptphase des Stäbchensterbens:

Wenn beim Absterben der Stäbchen cytotoxische Metabolite entstehen, die den Zelltod der Zapfen induzieren, sollte der Beginn der sekundären Zapfendegeneration mit der Hauptphase des Stäbchensterbens teilweise überlappen (Ripps, 2002). Diese Überschneidung ist für die humane RP-Form beschrieben (Ripps, 2002) und ebenfalls in den verwendeten Mausmodellen präsent (siehe Abschnitt 1.5.4).

2. Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen:

Die Existenz der GJ-Kanäle zwischen Stäbchen und Zapfen ist mehrfach in der Wt-Mausretina gezeigt worden (Abd-El-Barr *et al.*, 2009; Cangiano *et al.*, 2012; Ribelayga *et al.*, 2008; Trümpner *et al.*, 2008; Tsukamoto *et al.*, 2001). Die Kanäle werden in den Zapfen von Cx36 gebildet (Dang *et al.*, 2004; Feigenspan *et al.*, 2004). Dementsprechend konnte durch den Nachweis einer normalen Cx36-Expression in der OPL der RP-Modelle (Abb. 4-9) gezeigt werden, dass zu Beginn der Zapfendegeneration (Rho^{-/-}, pw5) und in fortgeschrittenen Stadien (Rd1, p21) Cx36-beinhalten GJ zwischen den Stäbchen und den Zapfen existieren.

4.2.5.2 Gibt es einen Einfluss des Bystander-Effekts auf die sekundäre Zapfendegeneration?

Die in diesem Projekt durchgeführten Untersuchungen zeigten keine Unterschiede in dem Verlauf und dem Ausmaß der sekundären Zapfendegeneration zwischen den RP-Mäusen mit intakter Stäbchen-Zapfen-Kopplung und denen mit defizienter Kopplung. Im folgenden Abschnitt sollen die methodischen Hintergründe der Ergebnisse diskutiert werden.

1. Unterbrechung der Stäbchen-Zapfen-Kopplung

In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass eine Deletion von Cx36 ausreichend ist, um die Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen zu unterbrechen (Abd-El-Barr *et al.*, 2009; Deans *et al.*, 2002; Trümpler *et al.*, 2008). Durch Einkreuzen eines Cx36-Knockouts wurde daher die Expression von Cx36 in der Rho^{-/-}- und der Rd1-Maus inhibiert. Die Cx36-Defizienz wurde in beiden Mausmodellen immunohistologisch nachgewiesen (Abb. 4-9), sodass die Auswirkung der unterbrochenen Stäbchen-Zapfen-Kopplung auf die Zapfendegeneration in den generierten Versuchstieren untersucht werden konnte.

2. Einfluss der genetischen Varianz der Versuchstiere

Zur Deletion von Cx36 in den beiden RP-Modellen wurde die Cx36^{-/-}-Mauslinie verwendet (Güldenagel *et al.*, 2001). Cx36-defiziente Retinen entwickeln sich normal, sodass durch die Kreuzung mit diesen Tieren keine morphologischen Veränderungen in der Retina zu erwarten sind. Die Cx36^{-/-}-Mauslinie basiert, ebenso wie die Rho^{-/-}-Mauslinie, auf dem C57Bl6/N-Wt-Hintergrund. Somit ist der genetische Hintergrund der generierten Rho^{-/-}-Cx36-Mauslinie als C57Bl6/N definiert. Durch Kreuzungen zwischen Rd1-Tieren, die auf einen C3H-Wt-Stamm zurückgehen, und den Cx36^{-/-}-Tieren, wurden allerdings Mutanten mit gemischten C3H- und C57Bl6/N-Genen erzeugt. Um die genetische Varianz im Hintergrund der Versuchstiere, und auch die, durch die Elterntiere bedingten, natürlichen genetischen Unterschiede möglichst gering zu halten, wurden in dieser Studie ausschließlich Daten von Cx36-exprimierenden und Cx36-defizienten Rho^{-/-}- bzw. Rd1-Geschwistertieren verwendet und ausgewertet. Dementsprechend wurde ein möglicher genetischer Einfluss auf die Ergebnisse so gering wie möglich gehalten.

3. Alter der Versuchstiere - Detektion verschiedener metabolischer Stadien der Zapfendegeneration

In der Rho^{-/-}Cx36-Mauslinie wurde, wie erwartet, ein langsamer Verlauf der Photorezeptordegeneration beobachtet, wie er in Abschnitt 4.1.1 und in früheren Studien für die „einfache“ Rho^{-/-}-Mutante bereits beschrieben wurde (Humphries *et al.*, 1997; Punzo *et al.*, 2009): Die Stäbchen sterben innerhalb einer Periode von 17 Wochen langsam ab. Die Zapfen entwickeln sich zunächst normal und beginnen in 6 Wochen alten Tieren mit der Degeneration. Das frühe Stadium der Zapfendegeneration ist morphologisch durch den Verlust der AS geprägt, der in 9 Wochen alten Tieren bereits offensichtlich (Abb. 4-10 C, H) und in 17 Wochen alten Tieren abgeschlossen ist (Abb. 4-10 E, J). Der Verlust der AS der Zapfen eignete sich daher gut, um den Beginn der Zapfendegeneration zu untersuchen.

Die Degeneration in der Rd1-Mauslinie verläuft sehr viel schneller: Die Stäbchen degenerieren bereits an p10-11 und sind an p20 fast komplett verschwunden (Abb. 4-10 M; Lin *et al.*, 2009; Pennesi *et al.*, 2012). Die Degeneration der Zapfen beginnt kurz nach dem Einsatz der Stäbchendegeneration (Sancho-Pelluz *et al.*, 2008). Die gesamte Phase des Zapfensterbens dauert bis zu 6 Monate (Punzo *et al.*, 2009; Sancho-Pelluz *et al.*, 2008), allerdings sterben die meisten Zapfen innerhalb von 20 bis 30 Tagen ab. Dies konnte durch die Detektion des deutlichen Zapfenverlustes zwischen p15 und p30 (Abb. 4-16 B) nachgewiesen werden und zeigt, dass dieses Alter gut geeignet ist, um mit dem Zapfentod und Zapfensterben zwei Ereignisse der Endphase der Zapfendegeneration zu untersuchen.

Basierend auf den genannten Tatsachen ist davon auszugehen, dass die untersuchten Zeitpunkte geeignet waren, um frühe (Rho^{-/-}, pw5-17) und spätere Stadien der Zapfendegeneration zu untersuchen (Rd1, p15 bis p30).

4. Untersuchung der Zapfendegeneration

Der Einfluss der Stäbchen-Zapfen-Kopplung auf den Verlauf der sekundären Zapfendegeneration wurde anhand verschiedener Ereignisse ausgewertet, die in unterschiedlichen Phasen der Zapfendegeneration auftraten:

a) Reorganisation der Sekundärneurone:

Die Degeneration von PR ist mit morphologischen Veränderungen der nachfolgenden Stäbchen- und Zapfen-kontaktierenden Zellen verbunden (Cuenca *et al.*, 2004; Gargini *et al.*, 2007; Strettoi *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005). Die Reorganisation der Sekundärneurone wird durch den gestörten glutamatergen Eingang der absterbenden PR hervorgerufen (Cuenca *et al.*, 2004; Gargini *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005). Deshalb eignet sich die morphologische Untersuchung dieser Ereignisse sehr gut, um indirekt putative Unregelmäßigkeiten der Photorezeptordegeneration durch histologische Vergleichsstudien zu detektieren. Die parallel zur Photorezeptordegeneration ablaufende Remodelierung der Horizontalzellen (Abb. 4-11) sowie der Stäbchen- und Zapfen-Bipolarzellen (Abb. 4-12 und 4-13) wurden daher in der Rho^{-/-}-und Rd1-Maus untersucht und mit den induzierten Veränderungen in entsprechenden Cx36-defizienten Geschwistertieren verglichen: In den immunhistologischen Untersuchungen der Rho^{-/-}- und Rd1-Mutanten wurden strukturellen Veränderungen der Stäbchen- und Zapfen-kontaktierenden Sekundärneurone festgestellt, die durch einen Verlust der PR induziert werden. Die detektierten Veränderungen stimmten mit den Beschreibungen früherer Studien überein (Claes *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2009; Strettoi und Pignatelli, 2000; Strettoi *et al.*, 2002). Es konnten allerdings keine, durch die Unterbrechung der Stäbchen-Zapfen-Kopplung hervorgerufenen, Unterschiede in der retinalen Reorganisation festgestellt werden.

b) Verlust der Zapfen-Außensegmente als frühes Ereignis der Zapfendegeneration:

Der Verlust der ZAS ist eines der ersten Merkmale der einsetzenden Zapfendegeneration. Mittels quantitativer Analysen des ZAS-Verlustes wurde der Einfluss der Cx36-Defizienz auf den Beginn und den anfänglichen Verlauf der Zapfendegeneration untersucht: Die Zapfendegeneration in der Rho^{-/-}-Maus zeigt einen Gradienten vom retinalen Zentrum zur Peripherie (Punzo *et al.*, 2009). Die detektierte, signifikante Reduzierung in der Anzahl der AS im zentralen Retinabereich zeigte den Einsatz der Zapfendegeneration in 5 Wochen alten Rho^{-/-}-Cx36^{+/-}- und Rho^{-/-}-Cx36^{-/-}-Tieren an. Eine Verringerung der AS-Dichte wurde über mehrere

Wochen detektiert ($> p_{w12}$; Abb. 4-14). Dennoch lief der Verlust der AS in Cx36-exprimierenden und Cx36-defizienten Geschwistertieren gleich ab.

c) Verlust und Absterben der Zapfen als Kennzeichen späterer Ereignisse der Zapfendegeneration

Die finale Zapfendegeneration ist durch das Absterben und den Verlust der Zapfen gekennzeichnet. Beide Ereignisse wurden am schnellen Degenerationsmodell mit der *Pde6b*-Mutation untersucht: Die Quantifizierung der Zapfenzahl pro 100 μm (Abb. 4-16) zeigte, dass die Rd1-Maus zwischen p15 und p30 nahezu 60% ihrer Zapfen verliert. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis wurde eine hohe Anzahl an TUNEL-positiven Zellen in p21 und p30 Tieren festgestellt (Abb. 4-17). Da die Hauptphase des Stäbchensterbens zu diesem Zeitpunkt bereits vorbei ist (endet an p20; Punzo *et al.*, 2009) und der Verlust der Zapfen in diesem Stadium nachweisbar fortschreitet, repräsentiert die Mehrheit der TUNEL-positiven Zellen die absterbenden Zapfen.

Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei einer geringen Anzahl der markierten Zellen um Stäbchen handelt, wodurch die Anzahl der absterbenden Zapfen, unabhängig von der Cx36-Deletion, in beiden Rd1-Genotypen etwas überhöht sein könnte. Wenn allerdings die Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen an der Ausbreitung des Zelltods beteiligt wäre, dann wäre die Anzahl der TUNEL-positiven Zellen und der Verlust der Zapfen in der Cx36-defizienten Rd1-Maus reduziert. Dies ist nicht der Fall.

4.2.5.3 Der durch *Gap Junctions*-vermittelte Bystander-Effekt ist nicht in die sekundäre Zapfendegeneration involviert

Die Untersuchungen in diesem Projekt zeigten keinen Einfluss der unterbrochenen Stäbchen-Zapfen-Kopplung auf die sekundäre Zapfendegeneration. Daraus lässt sich schließen, dass die Verbreitung von Zelltod-induzierenden Signalen von den Stäbchen auf die Zapfen ausgeschlossen werden kann und die Bystander-Hypothese nicht auf die sekundäre Zapfendegeneration bei RP übertragbar ist.

Allerdings wurde in anderen Studien die Beteiligung von GJ an der Ausbreitung des Zelltods in retinalen Neuronen nachgewiesen (Cusato *et al.*, 2003; Paschon *et al.*, 2012). Cusato *et al.* (2003) zeigten, dass während der retinalen Entwicklung in

absterbenden Zellen ein cytotoxisches Intermediat des apoptotischen Zelltods durch GJ zu den benachbarten Zellen gelangt und den Zelltod induziert (Cusato *et al.*, 2003). Ein weiteres Beispiel für einen durch GJ-vermittelten Zelltod in der Retina veröffentlichten Paschon *et al.*, (2012). Sie verwendeten ein retinales Traumamodell der Hühnerretina und zeigten, dass GJ-Blocker – von denen einer spezifisch Cx36-Kanäle blockiert – die Ausbreitung des apoptotischen Zelltods nach einer induzierten Verletzung reduziert (Paschon *et al.*, 2012). Die Diskrepanz zwischen diesen beiden Studien und den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen, kann durch die nachfolgenden zwei Überlegungen erklärt werden.

1. Beim Absterben der Stäbchen wird kein toxischer Faktor generiert, der den Zelltod auf die Zapfen übertragen könnte:

Das Absterben der Stäbchen wird nicht durch programmierte Prozesse (wie bei der Entwicklung) oder akut induzierte retinale Beschädigungen (wie beim Traumamodell) hervorgerufen, sondern durch vererbte Mutationen, die zu einer fehlerhaften Proteinexpression und zum Funktionsverlust der Stäbchen führen (siehe Abschnitt 4.2.2.1). Es ist wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Zelltod-auslösenden Faktoren auch verschiedenen molekularen Mechanismen unterliegen: Im Gegensatz zu dem apoptotischen Zelltod, der die programmierte Reduzierung der Zellzahl während der Entwicklung steuert oder am direkten Absterben nach mechanischer Penetration beteiligt ist, wird das Stäbchensterben in der Rd1-Maus und in der Rho^{-/-}-Maus nicht mit apoptotischen, sondern mit alternativen Zelltodmechanismen assoziiert (siehe Abschnitt 4.2.2.2). Es ist daher vorstellbar, dass bei den metabolischen Veränderungen während des Stäbchensterbens keine GJ-permeablen cytotoxischen Metaboliten generiert werden (z.B. IP₃), die in der Lage sind, den Zelltod in den Nachbarzellen zu induzieren.

2. Die Gap Junction-Kanäle schließen zu Beginn des Stäbchensterbens:

Die Öffnungswahrscheinlichkeit von interzellulären Kanälen wird sehr stark und in Abhängigkeit ihrer Connexin-Untereinheiten reguliert (siehe Abschnitt 1.3.1). Demnach ist es denkbar, dass die GJ-Kanäle zwischen den Stäbchen und Zapfen schließen, sobald die pathologischen Veränderungen im Stäbchenmetabolismus einsetzen: Die Leitfähigkeit der meisten Connexine reduziert sich beim Anstieg der

intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und bei der Verringerung des pH-Wertes (Bloomfield und Völgyi, 2009) – zwei Ereignisse, die häufig während des Zellsterbens auftreten (Lagadic-Gossmann *et al.*, 2004; Rohrer *et al.*, 2004; Sancho-Pelluz *et al.*, 2008). Diese Regulationsmechanismen könnten auch auf das Stäbchen-Connexin zutreffen, das bisher noch nicht identifiziert wurde und über dessen Eigenschaften daher lediglich spekuliert werden kann.

Die Schließung von Cx36-Kanälen, die die Kopplung auf der Zapfenseite vermitteln, wird, untypisch für Connexin-Kanäle, nicht durch cytosolische Azidifizierungen vermittelt (Gonzalez-Nieto *et al.*, 2008). Dies könnte erklären, weshalb GJ, die ausschließlich aus Cx36 bestehen, während des ischämischen Zelltods geöffnet sind und dabei den Bystander-Tod vermitteln (Cotrina *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2012). Allerdings wäre es auch möglich, dass intrazelluläre Signalkaskaden, die während des Stäbchensterbens aktiviert werden, die Leitfähigkeit der Cx36-Kanäle in den Zapfen verringern. Es ist bekannt, dass die Schließung von Cx36-Kanälen, z.B. durch die Aktivierung des PKG-Signalwegs (Patel *et al.*, 2006) erfolgt, einem *Pathway*, der ebenfalls eine Rolle bei retinaler Degeneration spielt (Paquet-Durand *et al.*, 2009). Ein ähnlicher Mechanismus könnte zusätzlich auch auf das unbekannte Stäbchen-Connexin zutreffen.

4.2.6 Vermittelt die Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen einen positiven Bystander-Effekt?

Die Beteiligung von GJ wird nicht nur bei der Übertragung von Zelltod-induzierenden Faktoren auf die Nachbarzelle diskutiert. Es gibt ebenfalls Studien, die einen positiven Bystander-Effekt zeigen, indem durch Ausbreitung trophischer Substanzen die Überlebensfähigkeit und Vitalität beschädigter Nachbarzellen unterstützt bzw. wiederhergestellt wird (Nakase *et al.*, 2004; Naus *et al.*, 2001; Oguro *et al.*, 2001). In der Mausretina wurde ein solcher Effekt von Striedinger *et al.* (2005) gezeigt. Als Antwort auf retinale Läsionen wird die Expression von Cx36 raufreguliert. Eine Blockierung der GJ mit Carbenoxolon und eine gezielte Deletion von Cx36 führten in diesem Trauma-Mausmodell zu einer verstärkten Ausbreitung des sekundären Zellsterbens. Demnach können Cx36-beinhaltende GJ auch protektiv

auf benachbarte Zellen wirken und diese, durch metabolische Unterstützung, vor dem Zelltod durch traumatische Ereignisse beschützen (Striedinger *et al.*, 2005).

Die Anzahl der geschädigten Zellen ist nach der induzierten Läsion im Traumamodell, die lediglich einen kleinen Bereich der Retina betrifft, sehr viel geringer als bei RP. Die primär absterbenden Stäbchen (> 97% der PR; Jeon *et al.*, 1998) sind massiv in der Überzahl. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass die Kopplung zu der verhältnismäßig sehr geringen Anzahl gesunder Zapfen ausreichend ist, um das Stäbchensterben und das nachfolgende Zapfensterben aufzuhalten. Diese Überlegung spiegelt sich auch in den Ergebnissen wider: Sollte die Kopplung zwischen Stäbchen und Zapfen einen positiven Bystander-Effekt, zumindest in der Anfangsphase des Zellsterbens, auf die Überlebensfähigkeit der PR in den RP-Mausmodellen vermitteln, dann würde die Unterbrechung der Stäbchen-Zapfen-Kopplung in diesem Fall zu einer Beschleunigung des Stäbchensterbens und entsprechend einem verfrühten Einsatz der sekundären Zapfendegeneration führen. Die Ergebnisse zeigen aber, dass sich der zeitliche Verlauf und das Ausmaß der Zapfendegeneration in den untersuchten Tiermodellen nicht unterscheiden. Somit kann nicht nur ein negativer, sondern auch ein positiver Bystander-Effekt dieser GJ ausgeschlossen werden.

4.2.7 Wodurch wird das sekundäre Zapfensterben induziert?

Die Ergebnisse dieses Projekts geben die ersten überzeugenden Hinweise, dass ein durch GJ-vermittelter Bystander-Effekt, wie er von Ripps (Ripps, 2002) vermutet wurde, nicht in das Absterben der Zapfen in RP-Mausmodellen involviert ist, da die Unterbrechung der Stäbchen-Zapfen-Kopplung keinen Effekt auf das sekundäre Absterben der genetisch gesunden Zapfen zeigt. Auch die Möglichkeit eines positiven Bystander-Effekts wird mittels der Ergebnisse ausgeschlossen (siehe Abschnitt 4.2.6).

Allerdings ist der durch GJ-vermittelte Transfer von Todessignalen nicht der einzige mögliche Mechanismus, um den Bystander-Tod zu induzieren. Neben der interzellulären Kommunikation beinhaltet der Bystander-Effekt auch die Möglichkeit, dass beim Absterben generierte Zelltodfaktoren in den

Extrazellulärraum freigesetzt und von benachbarten Zellen endozytiert werden (Freeman *et al.*, 1995). Die Beteiligung einer extrazellulären Ausbreitung toxischer Intermediate am sekundären Stäbchensterben kann mit diesen Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden.

Die Freisetzung toxischer Substanzen wird auch zusammen mit der Aktivierung von retinalen Mikrogliazellen diskutiert (Gupta *et al.*, 2003; Roque *et al.*, 1999). Durch das mutationsbedingte primäre Absterben der Stäbchen werden retinale Mikrogliazellen aktiviert und wandern in die äußere Retina, um dort übrig gebliebene Stäbchenzelldebris zu phagozytieren. Es wird vermutet, dass sie dabei toxische Substanzen freisetzen, die den Zapfenzelltod hervorrufen. Die Freisetzung Zelltod-induzierender Substanzen aus aktivierten Mikrogliazellen wurde bereits im Zusammenhang mit dem sekundären neuronalen Zellsterben nach Schlaganfällen gezeigt (Wood, 1995) und scheint eine alternative Erklärung für den sekundären Zelltod der Zapfen zu liefern. Daneben gibt es allerdings noch weitere in Abschnitt 1.5.2 aufgeführte Mechanismen, die ebenfalls zum Absterben der Stäbchen beitragen könnten. Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass ein Zusammenwirken der verschiedenen beschriebenen Faktoren und Ereignisse für das Absterben der Zapfen verantwortlich ist.

4.2.8 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Da die grundlegenden Funktionen und die Strukturen der Retina durch die gesamte Vertebratenspezies konserviert sind, bietet sich die Mausretina aus verschiedenen Gründen als optimales Untersuchungsmodell speziell für Erkrankungen - wie RP - an: Die Mausretina ist umfassend analysiert, sodass krankhafte Veränderungen gut untersucht und mit den genetischen Defekten der verschiedenen Krankheitsmodelle in Verbindung gebracht werden können. Mittlerweile sind viele natürlich entstandene und transgene Mausmodelle beschrieben, die Phänotypen ausprägen, die identisch zu den humanen RP-Formen sind (Kohler *et al.*, 1997). Daher können Untersuchungen an Mausmodellen dazu beitragen, die Krankheitsgrundlagen zu verstehen, und helfen, therapeutische Ansätze für RP, die aufgrund der Heterogenität dieser Erkrankung sehr schwierig sind, zu entwickeln (Kohler *et al.*,

1997). Die Erforschung von Grundlagen an Mausmodellen hat den Vorteil, dass der Krankheitsverlauf meist wesentlich beschleunigt ist und die Tiere genügend „Ausgangsgewebe liefern“, um die Untersuchungen der histologischen und biochemischen Veränderung zu definierten Zeitpunkten und die Auswirkungen verschiedener therapeutischer Wirkstoffe während des Krankheitsverlaufs zu ermöglichen (Kohler *et al.*, 1997). Dennoch unterscheidet sich die Retina zwischen Mensch und Maus, sodass die in der Mausretina erworbenen Kenntnisse nicht direkt auf den Menschen übertragen werden können. Es werden jedoch wichtige Ansätze für weiterführende Untersuchungen an höheren Vertebraten geschaffen (Chader *et al.*, 2002). Dies trifft auch auf die Ergebnisse dieser Arbeit zu:

Die beiden in dieser Studie verwendeten Mausmodelle, die Rho^{-/-} und die Rd1-Maus, besitzen Gendefekte, die als die häufigsten Ursachen bei humanen RP-Erkrankungen auftreten: Verschiedene Defekte im *Rhodopsin*-Gen sind die häufigste Ursache von RP (Berson *et al.*, 2001; Colley *et al.*, 1995; Sohocki *et al.*, 2001). Mutationen im *Pde6b*-Gen sind die zweithäufigste Ursache, die zu humanen RP-Erkrankungen führen (McLaughlin *et al.*, 1993). Dies ist, neben dem pathologischen Verlauf der Retinadegeneration, eine weitere gemeinsame Grundlage zwischen den untersuchten Modellen und der humanen Erkrankung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit, die aus den Untersuchungen der beiden Modelle hervorgegangen sind, zeigen, zusammen mit vorangegangenen Arbeiten, die gemeinsame, mutationsunabhängige Beteiligung verschiedener Enzyme (Calpaine, HDAC und PARP) am primären Absterben der Stäbchen. Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für weiterführende Untersuchungen, um therapeutische Strategien zum Aufhalten der Stäbchendegeneration zu entwickeln. Des Weiteren hat sich herausgestellt, dass eine Blockierung der Stäbchen-Zapfen-Kopplung nicht das sekundäre Zapfensterben aufhalten kann und dieser Ansatzpunkt daher nicht als therapeutisches Ziel weiter verfolgt werden sollte. Um das sekundäre Zapfensterben aufzuhalten, wäre es daher aussichtsreicher, therapeutische Ansatzpunkte in den anderen Hypothesen, die für das sekundäre Zapfensterben aufgestellt wurden (siehe Abschnitt 1.5.2 und 4.2.7), zu ermitteln.

5. Zusammenfassung

Intrazelluläre Signalwege und interzelluläre Kommunikation über Einzelmembran- und *Gap Junction*-Kanäle spielen bei den physiologischen Prozessen in der äußeren Retina eine wichtige Rolle, können unter pathologischen Bedingungen aber auch am Absterben der retinalen Zellen beteiligt sein. In der vorliegenden Arbeit wurden diese drei Aspekte der zellulären Kommunikation unter physiologischen und pathologischen Bedingungen untersucht.

Das Einzelmembrankanal-bildende Protein Pannexin1 (Panx1) gehört zu einer kürzlich entdeckten Proteinfamilie (Panchin *et al.*, 2000). Frühere Studien zeigten, dass Panx1 in der Mausretina exprimiert wird (Baranova *et al.*, 2004; Dvorianchikova *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2005). Über die genaue Lokalisation innerhalb der Retinazellen und über die Funktion der Panx1-Kanäle in der Retina ist bisher jedoch nicht viel bekannt. Ein Ziel dieser Arbeit war daher, die subzelluläre Lokalisation von Panx1 innerhalb der retinalen Neurone aufzuklären und die Funktion von Panx1-Kanälen in retinalen Schaltkreisen zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde erstmals eine Panx1^{-/-}-Mauslinie verwendet, um die retinale Spezifität der, zur Lokalisation von Panx1 benutzten, AK zu bestätigen und um die Auswirkungen der Panx1-Defizienz auf die retinale Aktivität zu analysieren. Immunfluoreszenzanalysen an retinalem Gewebe und an dissoziierten Retinazellen sowie elektronenmikroskopische Untersuchungen tangentialer Retinaschnitte zeigten die Lokalisation von Panx1 in der Membran von Typ 3a Bipolarzellen und auf den axonalen und dendritischen Endigungen von Horizontalzellen. Zwei verschiedene elektroretinographische Untersuchungsmethoden (*in vivo*- und *in vitro*-ERG) zeigten, dass Panx1-Einzelmembrankanäle unter skotopischen Bedingungen einen reduzierenden Einfluss auf die Aktivität der Stäbchen und der ON-Bipolarzellen haben, während unter photopischen Bedingungen keine Auswirkungen auf die retinalen Antworten festgestellt wurden. Aufgrund der Expression von Panx1-Einzelmembrankanälen in den Endigungen der Horizontalzellfortsätze, die die lateralen Elemente der synaptischen Triade innerhalb der Photorezeptorsynapse bilden, können zwei Funktionen der Panx1-Kanäle vermutet werden: 1. Panx1-Kanäle könnten in den ephaptischen Mechanismus involviert sein, durch den ein negatives Feedback von den Horizontalzellen auf die

Photorezeptoren vermittelt wird (Kranz *et al.*, 2012). 2. Panx1-Kanäle könnten als ATP-freisetzende Kanäle fungieren und durch Interaktionen mit retinalen, ionotropen P2X₇-Rezeptoren (Puthussery und Fletcher, 2004), die Freisetzung von Glutamat aus den Photorezeptoren bewirken.

Intrazelluläre Signalwege und die interzelluläre Kommunikation durch *Gap Junction*-Kanäle wurden in dieser Arbeit in Zusammenhang mit der degenerativen Retinaerkrankung Retinitis Pigmentosa (RP) untersucht: RP ist eine heterogene Erbkrankheit, die durch Mutationen in Stäbchen-spezifischen Genen hervorgerufen wird. Durch die Mutation wird ein primäres Absterben der Stäbchen hervorgerufen, dem eine sekundäre Degeneration der genetisch gesunden Zapfen folgt, dessen Ursache bisher unklar ist. Die intrinsischen, zum Absterben der Stäbchen führenden, Signalbahnen sind Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten. Zur Identifizierung putativer therapeutischer Interventionsziele ist vor allem die Identifizierung der Enzyme interessant, die mutationsunabhängig in den verschiedenen RP-Formen in das Stäbchensterben involviert sind. Daher war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die am Stäbchensterben beteiligten Zelltodmechanismen in der Rhodopsin-knockout-Maus zu analysieren. Ereignisse, die auf eine Beteiligung apoptotischer Signalbahnen hindeuten (Expression von BAX, mitochondriale CytochromeC-Freisetzung, Aktivierung von Caspase-9 und Caspase-3), konnten im Zusammenhang mit dem Stäbchensterben nicht detektiert werden. Mittels immunohistologischer Markierungen und enzymatischer Aktivitätsassays konnten Überaktivierungen von bestimmten Enzymen (Calpaine, Poly-ADP-Ribose Phosphorylase, Histon-Deacetylase) festgestellt werden, die auf einen nicht-apoptotischen, alternativen Zelltodmechanismus hindeuten. Die Hyperaktivität dieser Enzyme scheint ein universelles Merkmal des Stäbchensterbens zu sein, da diese in vorangegangenen Arbeiten ebenfalls in anderen Retinitis Pigmentosa-Modellen nachgewiesen wurden (Arango-Gonzales *et al.*, in Arbeit). Demnach könnte eine pharmakologische Inhibierung der Enzyme als Ziel zur Behandlung von RP in Betracht kommen.

Als putative Erklärung für das Absterben genetisch gesunder Zapfen bei RP, wurde eine Rolle für die Kommunikation über *Gap Junctions* vorgeschlagen. Diese sogenannte Bystander-Hypothese besagt, dass während des primären

Stäbchensterbens cytotoxische Intermediate generiert und über die *Gap Junction*-Kanäle zwischen Stäbchen und Zapfen auf die Zapfen übertragen werden (Ripps, 2002). Sollte diese Hypothese zutreffen, dann könnte eine pharmakologische Blockierung der *Gap Junctions* das sekundäre Zapfensterben aufhalten. Das dritte Ziel dieser Arbeit war es daher, die Bystander Hypothese zu überprüfen. Hierzu wurde der Einfluss der unterbrochenen Stäbchen-Zapfen-Kopplung auf das sekundäre Zapfensterben in der Rhodopsin-knockout-Maus und einem weiteren, etablierten Mausmodell für RP, der Rd1-Maus, untersucht. Durch Verwendung der beiden Mausmodelle, mit unterschiedlichen zeitlichen Verläufen der Photorezeptor-degeneration, konnte das Absterben der Zapfen in verschiedenen metabolischen Phasen untersucht werden: Das langsame Modell mit der Rhodopsin-Defizienz wurde verwendet, um den Einfluss der unterbrochenen Stäbchen-Zapfen-Kopplung auf den Beginn der Zapfendegeneration zu untersuchen. Die Rd1-Maus mit einem schnellen Degenerationsverlauf wurde verwendet, um die Auswirkungen auf späte Stadien der Zapfendegeneration zu analysieren. Die Unterbrechung der Stäbchen-Zapfen-Kopplung wurde in beiden Mausmodellen durch das Einkreuzen eines Connexin36-Knockouts erzeugt, da frühere Studien zeigten, dass die Defizienz von Connexin36 (Cx36) in der Mausretina ausreichend ist, um zum Verlust der Stäbchen-Zapfen-Kommunikation zu führen (Abd-El-Barr *et al.*, 2009; Deans *et al.*, 2002; Trümpler *et al.*, 2008). Immunohistologische Vergleiche der strukturellen Veränderungen in der äußeren Retina zeigten keine Unterschiede zwischen Cx36-exprimierenden und Cx36-defizienten Rhodopsin-knockout- bzw. Rd1-Tieren. Auch in quantitativen Analysen von frühen Merkmalen (Verlust der Zapfen-Außensegmente) und späten Ereignissen (Verlust der Zapfen, Absterben der Zapfen) konnten keine Auswirkungen der unterbrochenen Stäbchen-Zapfen-Kopplung auf die Zapfendegeneration festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit (Kranz *et al.*, 2013, akzeptiert) zeigen, dass es keinen durch Gap-Junction-vermittelten Bystander-Effekt gibt, der den Zelltod von den absterbenden Stäbchen auf die gesunden Zapfen überträgt.

6. Summary

Single-membrane and gap junction channels are essentially involved in physiological processing and cellular communication of the outer retina. Under pathological conditions they can also be involved in the death of retinal cells as well. This thesis aims to investigate three aspects of cellular communication under both, physiological and pathological conditions.

The single-membrane channel forming protein pannexin1 (Panx1) is part of the recently discovered family of proteins (pannexins; Panchin *et al.*, 2000). Previous studies have shown that Panx1 is expressed in the retina (Dvorianchikova *et al.*, 2006; Ray *et al.*, 2005), but little is known about the localization within retinal neurons and about the function of Panx1 channels in the retina so far. Hence one aim of this thesis was to examine the subcellular distribution of Panx1 in the retina and to investigate the functional role of Panx1 channels in the retinal circuitry. In this work a transgenic Panx1-knockout-mouse (Panx1^{-/-}) was used to ensure retinal specificity of the used Panx1 antibodies and to analyze the influence of the Panx1-deficiency on retinal activity. Immunohistochemistry on transgenic versus normal retinal tissue and dissociated retinal cells, as well as immunoelectron microscopical investigations on tangential retina sections revealed a prominent expression of Panx1 in the membrane of type 3b bipolar cells and on axonal and dendritic processes of horizontal cells. The electroretinographical (*in vivo*- and *in vitro*-ERG) data indicated that Panx1 single-membrane channels influences retinal activity under scotopic conditions by reducing the activity of rods and ON bipolar cells. However Panx1-deficiency does not influence photopic ERG responses (Kranz *et al.*, 2012). Based on the localization of Panx1 single-membrane channels on invaginating processes of horizontal cells within the photoreceptor synapse, two putative functions of Panx1 channels can be suggested:

1. Panx1 might be involved in the ephaptic mechanism and thereby mediating the negative feedback from horizontal cells to cones.
2. Panx1 channels might act as an ATP releasing channels and thereby interact with P2X₇ receptors which are located in the presynaptic membrane of the photoreceptor terminal and on the processes of horizontal cells as well (Puthussery und Fletcher,

2004). The propagation of ATP from Panx1 channels might act on the P2X₇ receptors in the photoreceptor terminal and thereby cause glutamate release.

Furthermore, the thesis included the investigation of intracellular pathways and intercellular signaling via gap junctions channels related to the degenerative disorder Retinis Pigmentosa (RP). RP is an inherited heterogeneous disease that is evoked by different mutations in rod-specific genes. The rod-specific mutations lead to primary cell death of rods, which is followed by a secondary cell death of genetically normal cones. To date the cellular mechanisms of rod death and the reason of secondary cone degeneration are not clear. The intrinsic pathways leading to primary rod death are subjects of ongoing research. To identify putative therapeutical targets to end primary cell death, it is necessary to identify enzymes involved in rod death, independently of the mutation. The second aim of this thesis was to analyze cell death mechanisms leading to rod degeneration in the rhodopsin knock-out mouse. Events that are normally related to apoptotic pathways (bax expression, cytochrome-*c* leakage, activities of caspase-9 and -3), were not detected in relation to primary rod death. However, enzymes associated with alternative, non-apoptotic cell death mechanisms (increased activation of calpain, HDAC and PARP, accumulation of PAR) were identified by using immunohistochemistry and enzymatic activity assays. The increased activity of these enzymes seems to be a general feature of rod degeneration, because similar events were described for other RP models during rod cell death (Arango-Gonzales *et al.*, in preparation). Thus a specific inhibition of these enzymes might represent putative targets for therapeutical treatment of RP.

Gap junction communication is a possible explanation of secondary degeneration of healthy cone photoreceptors in RP. This so-called bystander hypothesis indicates the propagation of cell death inducing factors from dying rods to healthy cones through gap junction channels between both photoreceptor subtypes (Ripps *et al.*, 2002). The toxic substances were generated during rod death and might represent gap junction permeable metabolic intermediates. If this hypothesis is true, a blocking the gap junctions between rods and cones might prevent secondary cone death. The third aim of this thesis was to test the bystander hypothesis. Consequently the influence of disrupted rod-cone coupling on secondary cone degeneration was investigated in the

rhodopsin knock-out mouse and in the retinal degeneration1 (rd1) mouse, representing an established model for RP. Both investigated mouse strains exhibit different timescales of photoreceptor degeneration that facilitates to analyze different metabolic stages during cone degeneration: the rhodopsin knock-out mouse as a slow model was used to analyze the influence of disrupted rod-cone coupling on early stages of cone degeneration, whereas the fast degeneration in the rd1 mouse was suited to investigate the effects on later stages of cone degeneration. Disruption of rod-cone coupling was generated by crossbreeding rhodopsin knock-out and rd1 mice with Connexin36 (Cx36) knock-out mice as it was previously shown that deletion of Cx36 is sufficient to disrupt rod-cone communication (Abd-El-Barr *et al.*, 2009; Deans *et al.*, 2002; Trümpner *et al.*, 2008). Immunohistological comparisons of morphological changes in the outer retina during photoreceptor degeneration showed no differences between Cx36-expressing and Cx36-deficient rhodopsin knock-out or rd1 mice. Furthermore quantitative analysis of early features (loss of cone outer segments) and late events (loss and death of cones) revealed no effects of disrupted rod-cone coupling. The results of this work (Kranz *et al.*, 2013, accepted) showed that the bystander hypothesis is not involved in secondary cone degeneration. Therefore disruption of rod-cone coupling cannot prevent secondary cone death.

7. Literaturverzeichnis

- Abd-El-Barr MM, Pennesi ME, Saszik SM, Barrow AJ, Lem J, Bramblett DE, Paul DL, Frishman LJ, Wu SM. 2009. Genetic dissection of rod and cone pathways in the dark-adapted mouse retina. *J Neurophysiol* (3):1945-1955.
- Anselmi F, Hernandez VH, Crispino G, Seydel A, Ortolano S, Roper SD, Kessarar N, Richardson W, Rickheit G, Filippov MA, Monyer H, Mammano F. 2008. ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(48):18770-18775.
- Apostolova N, Cervera AM, Victor VM, Cadenas S, Sanjuan-Pla A, Alvarez-Barrientos A, Esplugues JV, McCreath KJ. 2006. Loss of apoptosis-inducing factor leads to an increase in reactive oxygen species, and an impairment of respiration that can be reversed by antioxidants. *Cell Death Differ* (2):354-357.
- Applebury ML, Antoch MP, Baxter LC, Chun LL, Falk JD, Farhangfar F, Kage K, Krzystolik MG, Lyass LA, Robbins JT. 2000. The murine cone photoreceptor: a single cone type expresses both S and M opsins with retinal spatial patterning. *Neuron*. United States. (3):513-523.
- Arango-Gonzalez B, Trifunović D, Sahaboglu A, Kranz K, Michalakis S, Farinelli P, Cottet S, Ekström P, Ueffing M, Paquet-Durand F. 2013. Comparative analysis of neurodegenerative markers in ten different animal models for retinal degeneration reveals prevalence of non-apoptotic cell death mechanisms (in Arbeit)
- Assuncao Guimaraes C, Linden R. 2004. Programmed cell death-Apoptosis and alternative deathstyles *Eur J Biochem* 271: 1638-1650
- Babai N, Thoreson WB. 2009. Horizontal cell feedback regulates calcium currents and intracellular calcium. *J Physiol* 587(Pt 10):2353-2364.
- Baines CP. 2010. Role of the mitochondrion in programmed necrosis. *Front Physiol* 1:156.
- Banat M, Luke M, Siapich SA, Hescheler J, Weiergraber M, Schneider T. 2008. The dihydropyridine isradipine inhibits the murine but not the bovine A-wave response of the electroretinogram. *Acta Ophthalmol. England*. (6):676-682.
- Bao L, Locovei S, Dahl G. 2004. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* 572(1-3):65-68.
- Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, Shagin D, Nazarenko S, Geraymovych E, Litvin O, Tiunova A, Born TL, Usman N, Staroverov D, Lukyanov S, Panchin Y. 2004. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*. 83(4):706-716.
- Barbe MT, Monyer H, Bruzzone R. 2006. Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology (Bethesda)* 21:103-114.
- Bargiotas P, Krenz A, Hormuzdi SG, Ridder DA, Herb A, Barakat, W, Penuela S, von Engelhardt J, Monyer H, Schwaninger M. 2011. Pannexins in ischemia-induced neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:20772-20777.
- Baylor DA, Lamb TD, Yau KW. 1979. Responses of retinal rods to single photons. *J Physiol* 288:613-634.
- Berson EL, Grimsby JL, Adams SM, McGee TL, Sweklo E, Pierce EA, Sandberg MA, Dryja TP. 2001. Clinical features and mutations in patients with dominant retinitis pigmentosa-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(10):2217-2224.
- Bessant DA, Ali RR, Bhattacharya SS. 2001. Molecular genetics and prospects for therapy of the inherited retinal. *Curr Opin Genet Dev* 11(3):307-316.
- Bloomfield SA, Völgyi B. 2009. The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. *Nat Rev Neurosci*. 10(7):495-506.

- Bloomfield SA, Xin D, Osborne T. 1997. Light-induced modulation of coupling between AII amacrine cells in the rabbit retina. *Vis Neurosci* 14(3):565-576.
- Bloomfield SA, Xin D, Persky SE. 1995. A comparison of receptive field and tracer coupling size of horizontal cells in the rabbit retina. *Vis Neurosci* 12(5):985-999.
- Boassa D, Qiu F, Dahl G, Sosinsky G. 2008. Trafficking dynamics of glycosylated pannexin 1 proteins. *Cell Commun Adhes* 15(1):119-132.
- Bosco D, Haefliger JA, Meda P. 2011. Connexins: key mediators of endocrine function. *Physiol Rev* 91(4):1393-1445.
- Bowes C, Li T, Danciger M, Baxter LC, Applebury ML, Farber DB. 1990. Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* 347(6294):677-680.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. 2006. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*.25(4): 397-424.
- Bruzzone R, Barbe MT, Jakob NJ, Monyer H. 2005. Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels. *J Neurochem* 92(5):1033-1043.
- Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H. 2003. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(23):13644-13649.
- Burkhardt DA. 1993. Synaptic feedback, depolarization, and color opponency in cone photoreceptors. *Vis Neurosci* 10(6):981-989.
- Burkhardt DA, Bartoletti TM, Thoreson WB. 2011. Center/surround organization of retinal bipolar cells: High correlation of. *Vis Neurosci* 28(3):183-192.
- Buskamp V, Roska B. 2011. Optogenetic approaches to restoring visual function in retinitis pigmentosa. *Curr Opin Neurobiol*. England: 2011 Elsevier Ltd.(6)942-946.
- Cangiano L, Asteriti S, Cervetto L, Gargini C. 2012. The photovoltage of rods and cones in the dark-adapted mouse retina. *J Physiol*. England.590(Pt 16):3841-3855.
- Carter-Dawson LD, LaVail MM, Sidman RL. 1978. Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17(6):489-498.
- Carter-Dawson LD, LaVail MM, 1979. Rods and cones in the mouse retina. Structural analysis using light and electron microscopy. *J Comp Neurol* 188:245-262.
- Chader GJ. 2002. Animal models in research on retinal degenerations: past progress and future hope. *Vision Research*, 42(4): 393-399.
- Chandrasekhar A, Bera AK. 2012. Hemichannels: permeants and their effect on development, physiology and death. *Cell Biochem Funct* 30(2):89-100.
- Chang GQ, Hao Y, Wong F. 1993. Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin. *Neuron* 11(4):595-605.
- Claes E, Seeliger M, Michalakis S, Biel M, Humphries P, Haverkamp S. 2004. Morphological characterization of the retina of the CNGA3(-/-)Rho(-/-) mutant mouse lacking functional cones and rods. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(6):2039-2048.
- Colley NJ, Cassill JA, Baker EK, Zuker CS. 1995. Defective intracellular transport is the molecular basis of rhodopsin-dependent. *Proc Natl Acad Sci* 92(7):3070-3074.
- Cook JE, Becker DL. 1995. Gap junctions in the vertebrate retina. *Microsc Res Tech* 31(5):408-419.
- Cotrina ML, Kang J, Lin JH, Bueno E, Hansen TW, He L, Liu Y, Nedergaard M. 1998. Astrocytic gap junctions remain open during ischemic conditions. *J Neurosci* 18(7):2520-2537.
- Cottet S, Schorderet DF. 2009. Mechanisms of apoptosis in retinitis pigmentosa. *Curr Mol Med* 9(3):375-383.
- Cuenca N, Pinilla I, Sauve Y, Lu B, Wang S, Lund RD. 2004. Regressive and reactive changes in the connectivity patterns of rod and cone pathways of P23H transgenic rat retina. *Neuroscience* 127(2):301-17.

- Cusato K, Bosco A, Rozental R, Guimaraes CA, Reese BE, Linden R, Spray DC. 2003. Gap junctions mediate bystander cell death in developing retina. *J Neurosci* 23(16):6413-6422.
- D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. 2010. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ* 17(7):1104-1114.
- Dacheux RF, Raviola E. 1982. Horizontal cells in the retina of the rabbit. *J Neurosci* 2(10):1486-1493.
- Dahl G, Nonner W, Werner R. 1994. Attempts to define functional domains of gap junction proteins with synthetic. *Biophys J* 67(5):1816-1822.
- Dang L, Pulukuri S, Mears AJ, Swaroop A, Reese BE, Sitaramayya A. 2004. Connexin 36 in photoreceptor cells: studies on transgenic rod-less and cone-less mouse retinas. *Mol Vis* 10:323-327.
- David KK, Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL. 2009. Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci* 14:1116-1128.
- de Melo Reis RA, Ventura AL, Schitine CS, de Mello MC, de Mello FG. 2008. Muller glia as an active compartment modulating nervous activity in the vertebrate retina: neurotransmitters and trophic factors. *Neurochem Res* 33(8):1466-1474.
- Deans MR, Völgyi B, Goodenough DA, Bloomfield SA, Paul DL. 2002. Connexin36 is essential for transmission of rod-mediated visual signals in the mammalian retina. *Neuron* 36(4):703-712.
- DeVries SH. 2001. Exocytosed protons feedback to suppress the Ca²⁺ current in mammalian cone. *Neuron* 32(6):1107-1117.
- DeVries SH, Schwartz EA. 1992. Hemi-gap-junction channels in solitary horizontal cells of the catfish retina. *J Physiol* 445:201-230.
- Dolmatova E, Spagnol G, Boassa D, Baum JR, Keith K, Ambrosi C, Kontaridis MI, Sorgen PL, Sosinsky GE, Duffy HS. 2012. Cardiomyocyte ATP release through pannexin 1 aids in early fibroblast activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303(10):H1208-1218.
- Donovan M, Cotter TG. 2002. Caspase-independent photoreceptor apoptosis in vivo and differential expression. *Cell Death Differ* 9(11):1220-1231.
- Doonan F, Donovan M, Cotter TG. 2003. Caspase-independent photoreceptor apoptosis in mouse models of retinal. *J Neurosci* 23(13):5723-5731.
- Dowling JE, Boycott BB. 1966. Organization of the primate retina: electron microscopy. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 166(2):80-111.
- Dvorientchikova G, Ivanov D, Barakat D, Grinberg A, Wen R, Slepak VZ, Shestopalov VI. 2012. Genetic ablation of Pannexin1 protects retinal neurons from ischemic injury. *PLoS One* 7(2):e31991.
- Dvorientchikova G, Ivanov D, Panchin Y, Shestopalov VI. 2006. Expression of pannexin family of proteins in the retina. *FEBS Lett* 580(9):2178-2182.
- Edinger AL, Thompson CB. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 16(6):663-669.
- Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L. 2006. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling. *Biochem J* 397(1):1-14.
- Fahrenfort I, Klooster J, Sjoerdsma T, Kamermans M. 2005. The involvement of glutamate-gated channels in negative feedback from horizontal cells to cones. *Prog Brain Res* 147: 219-229.
- Fahrenfort I, Steijaert M, Sjoerdsma T, Vickers E, Ripps H, van Asselt J, Endeman D, Klooster J, Numan R, ten Eikelder H, von Gersdorff H, Kamermans M. 2009. Hemichannel-mediated and pH-based feedback from horizontal cells to cones in the vertebrate retina. *PLoS One* 4(6):e6090.
- Farber DB, Lolley RN. 1974. Cyclic guanosine monophosphate: elevation in degenerating photoreceptor cells of the C3H mouse retina. *Science* 186(4162):449-451.

- Feigenspan A, Janssen-Bienhold U, Hormuzdi S, Monyer H, Degen J, Söhl G, Willecke K, Ammermuller J, Weiler R. 2004. Expression of connexin36 in cone pedicles and OFF-cone bipolar cells of the mouse retina. *J Neurosci* 24(13): 3325-3334.
- Feigenspan A, Weiler R. 2004. Electrophysiological properties of mouse horizontal cell GABAA receptors. *J Neurophysiol* 92:2789-2801.
- Fletcher EL. 2010. Mechanisms of photoreceptor death during retinal degeneration. *Optom Vis Sci* 87(4):269-275.
- Frank M, Eiberger B, Janssen-Bienhold U, de Sevilla Müller LP, Tjarks A, Kim JS, Maschke S, Dobrowolski R, Sasse P, Weiler R, Fleischmann BK, Willecke K. 2010. Neuronal connexin-36 can functionally replace connexin-45 in mouse retina but not in the developing heart. *J Cell Sci* 123:3605-3615.
- Frantseva MV, Kokarovtseva L, Naus CG, Carlen PL, MacFabe D, Perez Velazquez JL. 2002. Specific gap junctions enhance the neuronal vulnerability to brain traumatic injury. *J Neurosci* 22(3): 644-653.
- Freeman SM, Ramesh R, Shastri M, Munshi A, Jensen AK, Marrogi AJ. 1995. The role of cytokines in mediating the bystander effect using HSV-TK xenogeneic cells. *Cancer Lett* 92(2):167-174.
- Fox MA, Sanes JR. 2007. Synaptotagmin I and II are present in distinct subsets of central synapses. *J Comp Neurol* 503(2):280-296.
- Fu Y, Yau KW. 2007. Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Arch* 454(5):805-819.
- Gargini C, Terzibasi E, Mazzoni F, Strettoi E. 2007. Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study. *J Comp Neurol* 500(2):222-238.
- Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, Feigenspan A, Wässle H. 2004. Types of bipolar cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 469(1):70-82.
- Ghosh KK, Haverkamp S, Wässle H. 2001. Glutamate receptors in the rod pathway of the mammalian retina. *J Neurosci* 21(21):8636-8647.
- Gimenez E, Montoliu L. 2001. A simple polymerase chain reaction assay for genotyping the retinal degeneration mutation (Pdeb(rd1)) in FVB/N-derived transgenic mice. *Lab Anim* 35: 153-156.
- Gomez-Vicente V, Donovan M, Cotter TG. 2005. Multiple death pathways in retina-derived 661W cells following growth factor. *Cell Death Differ* 12(7):796-804.
- Gonzalez-Nieto D, Gomez-Hernandez JM, Larrosa B, Gutierrez C, Munoz MD, Fasciani I, O'Brien J, Zappala A, Cicirata F, Barrio LC. 2008. Regulation of neuronal connexin-36 channels by pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(44):17169-17174.
- Goodenough DA, Paul DL. 2003. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(4):285-294.
- Green DG, Kapousta-Bruneau NV. 1999a. A dissection of the electroretinogram from the isolated rat retina with. *Vis Neurosci* 16(4):727-741.
- Green DG, Kapousta-Bruneau NV. 1999b. Electrophysiological properties of a new isolated rat retina preparation. *Vision Res* 39(13):2165-2177.
- Güldenagel M, Ammermuller J, Feigenspan A, Teubner B, Degen J, Söhl G, Willecke K, Weiler R. 2001. Visual transmission deficits in mice with targeted disruption of the gap junction gene connexin36. *J Neurosci* 21(16):6036-6044.
- Güldenagel M, Söhl G, Plum A, Traub O, Teubner B, Weiler R, Willecke K. 2000. Expression patterns of connexin genes in mouse retina. *J Comp Neurol* 425:193-201.
- Gupta N, Brown KE, Milam AH. 2003. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*. England. p 463-471.
- Hack I, Frech M, Dick O, Peichl L, Brandstätter JH. 2001. Heterogeneous distribution of AMPA glutamate receptor subunits at the. *Eur J Neurosci* 13(1):15-24.
- Hack I, Peichl L, Brandstätter JH. 1999. An alternative pathway for rod signals in the rodent retina: rod photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24):14130-14135.

- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. 2009. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet.* (1):32-42. doi: 10.1038/nrg2485.
- Hagins WA, Penn RD, Yoshikami S. 1970. Dark current and photocurrent in retinal rods. *Biophys J* 10(5):380-412.
- Hansen KA, Torborg CL, Elstrott J, Feller MB. 2005. Expression and function of the neuronal gap junction protein connexin 36 in developing mammalian retina. *J Comp Neurol* 493(2):309-320.
- Haverkamp S, Ghosh KK, Hirano AA, Wässle H. 2003. Immunocytochemical description of five bipolar cell types of the mouse retina. *J Comp Neurol* 455(4):463-476.
- Haverkamp S, Grunert U, Wässle H. 2000. The cone pedicle, a complex synapse in the retina. *Neuron* 27(1):85-95.
- Haverkamp S, Specht D, Majumdar S, Zaidi NF, Brandstätter JH, Wasco W, Wässle H, Tom Dieck S. 2008. Type 4 OFF cone bipolar cells of the mouse retina express calnenilin and contact cones as well as rods. *J Comp Neurol* 507(1):1087-1101.
- Haverkamp S, Wässle H. 2000. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 424(1):1-23.
- Haverkamp S, Wässle H, Duebel J, Kuner T, Augustine GJ, Feng G, Euler T. 2005. The primordial, blue-cone color system of the mouse retina. *J Neurosci* 25(22):5438-5445.
- He S, Weiler R, Vaney DI. 2000. Endogenous dopaminergic regulation of horizontal cell coupling in the mammalian. *J Comp Neurol* 418(1):33-40.
- Heikkinen H, Vinberg F, Nymark S, Koskelainen A. 2011. Mesopic background lights enhance dark-adapted cone ERG flash responses in the intact mouse retina: a possible role for gap junctional decoupling. *J Neurophysiol* 105(5):2309-2318.
- Hengartner MO. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407(6805):770-776.
- Hilgen G, Huebner AK, Tanimoto N, Sothilingam V, Seide C, Garrido MG, Schmidt KF, Seeliger MW, Löwel S, Weiler R, Hübner CA, Dedek K. 2012. Lack of the sodium-driven chloride bicarbonate exchanger NCBE impairs visual function in the mouse retina. *PLoS Biol.* United States. p e46155.
- Hilgen G, von Maltzahn J, Willecke K, Weiler R, Dedek K. 2011. Subcellular distribution of connexin45 in OFF bipolar cells of the mouse retina. *J Comp Neurol* 519:433-450.
- Hirasawa H, Kaneko A. 2003. pH changes in the invaginating synaptic cleft mediate feedback from horizontal. *J Gen Physiol* 122(6):657-671.
- Hombach S, Janssen-Bienhold U, Söhl G, Schubert T, Bussow H, Ott T, Weiler R, Willecke K. 2004. Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. *Eur J Neurosci* 19(10):2633-2640.
- Hornstein EP, Verweij J, Li PH, Schnapf JL. 2005. Gap-junctional coupling and absolute sensitivity of photoreceptors in macaque. *J Neurosci* 25(48):11201-11209.
- Humphries MM, Rancourt D, Farrar GJ, Kenna P, Hazel M, Bush RA, Sieving PA, Sheils DM, McNally N, Creighton P, Erven A, Boros A, Gulya K, Capecchi MR, Humphries P. 1997. Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. *Nat Genet* 15(2):216-219.
- Humphries P. 1993. Hereditary retinopathies: insights into a complex genetic aetiology. *Br J Ophthalmol* 77(8):469-470.
- Iglesias R, Locovei S, Roque A, Alberto AP, Dahl G, Spray DC, Scemes E. 2008. P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *Am J Physiol Cell Physiol* 295(3):C752-760.
- Jacobs GH, Neitz J, Deegan JF, 2nd. 1991. Retinal receptors in rodents maximally sensitive to ultraviolet light. *Nature* 353(6345):655-656.
- Jaisle GB, May CA, Reinhard J, Kohler K, Fauser S, Lutjen-Drecoll E, Zrenner E, Seeliger MW. 2001. Evaluation of the rhodopsin knockout mouse as a model of pure cone function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(2):506-513.

- Janssen-Bienhold U, Trümpner J, Hilgen G, Schultz K, Müller LP, Sonntag S, Dedek K, Dirks P, Willecke K, Weiler R. 2009. Connexin57 is expressed in dendro-dendritic and axo-axonal gap junctions of mouse horizontal cells and its distribution is modulated by light. *J Comp Neurol* 513(4):363-374.
- Jeon CJ, Strettoi E, Masland RH. 1998. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci* 18(21):8936-8946.
- Jürgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9):4997-5002.
- Kamermans M, Fahrenfort I, Schultz K, Janssen-Bienhold U, Sjoerdsma T, Weiler R. 2001. Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. *Science* 292(5519): 1178-1180.
- Kamermans M, Spekrijse H. 1999. The feedback pathway from horizontal cells to cones. A mini review with a look. *Vision Res* 39(15):2449-2468.
- Kaneko A, Tachibana M. 1986. Effects of gamma-aminobutyric acid on isolated cone photoreceptors of the turtle. *J Physiol* 373:443-461.
- Kar R, Batra N, Riquelme MA, Jiang JX. 2012. Biological role of connexin intercellular channels and hemichannels. *Arch Biochem Biophys* 524(1):2-15.
- Kaur J, Mencl S, Sahaboglu A, Farinelli P, van Veen T, Zrenner E, Ekstrom P, Paquet-Durand F, Arango-Gonzalez B. 2011. Calpain and PARP activation during photoreceptor cell death in P23H and S334ter rhodopsin mutant rats. *PLoS One*. United States. p e22181.
- Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW, Molitoris BA, Dagher PC. 2003. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am J Physiol. Cell Physiol.* 284(5):C1309-18.
- Klaassen LJ, Sun Z, Steijaert MN, Bolte P, Fahrenfort I, Sjoerdsma T, Klooster J, Claassen Y, Shields CR, Ten Eikelder HM, Janssen-Bienhold U, Zoidl G, McMahon DG, Kamermans M. 2011. Synaptic transmission from horizontal cells to cones is impaired by loss of connexin hemichannels. *PLoS Biol*. United States. p e1001107.
- Kohler, K., Guenther, E., Zrenner, E., 1997. Animal models for retinitis pigmentosa research. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 211(2):84-93.
- Kolb H. 1974. The connections between horizontal cells and photoreceptors in the retina of the. *J Comp Neurol* 155(1):1-14.
- Kolb H. 1995a. Outer Plexiform Layer. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
- Kolb H. 1995b. Simple Anatomy of the Retina. In: *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
- Kranz K, Dorgau B, Pottke M, Herrling R, Schultz K, Bolte P, Monyer H, Penuela S, Laird DW, Dedek K, Weiler R, Janssen-Bienhold U. 2012. Expression of Pannexin1 in the outer plexiform layer of the mouse retina and physiological impact of its knock-out. *J Comp Neurol* 521(5):1119-35.
- Kranz K, Paquet-Durand F, Weiler R, Janssen-Bienhold U, Dedek K. 2013. Testing for a gap junction-mediated bystander effect in retinitis pigmentosa: secondary cone death is not altered by deletion of connexin36 from cones. *PLoS Biol*. United States.(Akzeptiert).
- Krebs MP, Holden DC, Joshi P, Clark CL 3rd, Lee AH, Kaushal S. 2010. Molecular mechanisms of rhodopsin retinitis pigmentosa and the efficacy of pharmacological rescue. *Cell Mol Life Sci* 395(5):1063-78
- Kulikov AV, Shilov ES, Mufazalov IA, Gogvadze V, Nedospasov SA, Zhivotovsky B. 2012. Cytochrome c: the Achilles' heel in apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 69(11):1787-1797.
- Kumar NM, Gilula NB. 1996. The gap junction communication channel. *Cell* 84(3):381-388.
- Lagadic-Gossman D, Huc L, Lecœur V. 2004. Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death Differ* 11(9):953-961.

- Lai CP, Bechberger JF, Thompson RJ, MacVicar BA, Bruzzone R, Naus CC. 2007. Tumor-suppressive effects of pannexin 1 in C6 glioma cells. *Cancer Res* 67(4):1545-1554.
- Leveillard T, Mohand-Said S, Fintz AC, Lambrou G, Sahel JA. 2004. The search for rod-dependent cone viability factors, secreted factors promoting cone viability. *Novartis Found Symp* 255:117-127; discussion 127-130, 177-118.
- Li S, Tomic M, Stojilkovic SS. 2011. Characterization of novel Pannexin 1 isoforms from rat pituitary cells and their association with ATP-gated P2X channels. *Gen Comp Endocrinol*. United States: Published by Elsevier Inc. 174(2):202-210.
- Lin B, Masland RH, Strettoi E. 2009. Remodeling of cone photoreceptor cells after rod degeneration in rd mice. *Exp Eye Res* 88(3):589-599.
- Locovei S, Scemes E, Qiu F, Spray DC, Dahl G. 2007. Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS Lett* 581(3):483-488.
- Locovei S, Wang J, Dahl G. 2006. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic. *FEBS Lett* 580(1):239-244.
- Lohr HR, Kuntchithapautham K, Sharma AK, Rohrer B. 2006. Multiple, parallel cellular suicide mechanisms participate in photoreceptor cell. *Exp Eye Res* 83(2):380-389.
- Ma W, Hui H, Pelegrin P, Surprenant A. 2009. Pharmacological characterization of pannexin-1 currents expressed in mammalian. *J Pharmacol Exp Ther* 328(2):409-418.
- MacNeil MA, Masland RH. 1998. Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron* 20(5):971-982.
- MacVicar BA, Thompson RJ. 2010. Non-junction functions of pannexin-1 channels. *Trends Neurosci* 33(2):93-102.
- Masland RH. 2001. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 4(9):877-886.
- Masland RH. 2012a. The neuronal organization of the retina. *Neuron* 76(2):266-280.
- Masland RH. 2012b. The tasks of amacrine cells. *Vis Neurosci* 29(1):3-9.
- Mataruga A, Kremmer E, Muller F. 2007. Type 3a and type 3b OFF cone bipolar cells provide for the alternative rod pathway in the mouse retina. *J Comp Neurol* 502(6):1123-1137.
- McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP. 1993. Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 4(2):130-134.
- Mendes HF, van der Spuy J, Chapple JP, Cheetham ME. 2005. Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa: implications for. *Trends Mol Med* 11(4):177-185.
- Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, Willecke K, Yamasaki H. 1996. Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(5):1831-1835.
- Molday RS, Zhang K. 2010. Defective lipid transport and biosynthesis in recessive and dominant Stargardt. *Prog Lipid Res* 49(4):476-492.
- Nakase T, Söhl G, Theis M, Willecke K, Naus CC. 2004. Increased apoptosis and inflammation after focal brain ischemia in mice lacking connexin43 in astrocytes. *Am J Pathol* 164(6):2067-2075.
- Naus CC, Ozog MA, Bechberger JF, Nakase T. 2001. A neuroprotective role for gap junctions. *Cell Commun Adhes* 8(4-6):325-328.
- Nasonkin IO, Lazo K, Hambricht D, Brooks M, Fariss R, Swaroop A. 2011. Distinct nuclear localization patterns of DNA methyltransferases in developing and mature mammalian retina. *J Comp Neurol* 519(10):1914-30.
- Nicotera P. 2002. Apoptosis and age-related disorders: role of caspase-dependent and. *Toxicol Lett* 127(1-3):189-195.
- O'Brien JJ, Chen X, Macleish PR, O'Brien J, Massey SC. 2012. Photoreceptor coupling mediated by connexin36 in the primate retina. *J Neurosci* 32(13):4675-4687.

- Oguro K, Jover T, Tanaka H, Lin Y, Kojima T, Oguro N, Grooms SY, Bennett MV, Zukin RS. 2001. Global ischemia-induced increases in the gap junctional proteins connexin 32 (Cx32) and Cx36 in hippocampus and enhanced vulnerability of Cx32 knock-out mice. *J Neurosci* 21(19):7534-7542.
- Okuno S, Shimizu S, Ito T, Nomura M, Hamada E, Tsujimoto Y, Matsuda H. 1998. Bcl-2 prevents caspase-independent cell death. *J Biol Chem* 273(51):34272-34277.
- Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. 2000. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol. Englnd.* p R473-474.
- Pang JJ, Gao F, Wu SM. 2004. Light-evoked current responses in rod bipolar cells, cone depolarizing bipolar cells and AII amacrine cells in dark-adapted mouse retina. *J Physiol* 558(Pt 3):897-912.
- Pang JJ, Wu SM. 2011. Morphology and immunoreactivity of retrogradely double-labeled ganglion cells in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(7):4886-4896.
- Patel LS, Mitchell CK, Dubinsky WP, O'Brien J. 2006. Regulation of gap junction coupling through the neuronal connexin Cx35 by nitric oxide and cGMP. *Cell Commun Adhes* 13(1-2):41-54.
- Paquet-Durand F, Azadi S, Hauck SM, Ueffing M, van Veen T, Ekstrom P. 2006. Calpain is activated in degenerating photoreceptors in the rd1 mouse. *J Neurochem* 96(3):802-814.
- Paquet-Durand F, Beck S, Michalakis S, Goldmann T, Huber G, Mühlfriedel R, Trifunović D, Fischer MD, Fahl E, Duetsch G, Becirovic E, Wolfrum U, van Veen T, Biel M, Tanimoto N, Seeliger MW. 2011. A key role for cyclic nucleotide gated (CNG) channels in cGMP-related retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 20(5):941-7.
- Paquet-Durand F, Hauck SM, van Veen T, Ueffing M, Ekstrom P. 2009. PKG activity causes photoreceptor cell death in two retinitis pigmentosa models. *J Neurochem* 108(3):796-810.
- Paquet-Durand F, Johnson L, Ekstrom P. 2007a. Calpain activity in retinal degeneration. *J Neurosci Res* 85(4):693-702.
- Paquet-Durand F, Silva J, Talukdar T, Johnson LE, Azadi S, van Veen T, Ueffing M, Hauck SM, Ekstrom PA. 2007b. Excessive activation of poly(ADP-ribose) polymerase contributes to inherited photoreceptor degeneration in the retinal degeneration 1 mouse. *J Neurosci* 27(38):10311-10319.
- Paschon V, Higa GS, Resende RR, Britto LR, Kihara AH. 2012. Blocking of Connexin-Mediated Communication Promotes Neuroprotection during Acute Degeneration Induced by Mechanical Trauma. *PLoS One.* p e45449.
- Peachey NS, Ball SL. 2003. Electrophysiological analysis of visual function in mutant mice. *Doc Ophthalmol* 107:13-36.
- Peichl L, Gonzalez-Soriano J. 1993. Unexpected presence of neurofilaments in axon-bearing horizontal cells of the. *J Neurosci* 13(9):4091-4100.
- Peixoto PM, Ryu SY, Pruzansky DP, Kuriakose M, Gilmore A, Kinnally KW. 2009. Mitochondrial apoptosis is amplified through gap junctions. *Biochem Biophys Res Commun* 390(1):38-43.
- Pelegrin P, Surprenant A. 2006. Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the. *Embo j* 25(21):5071-5082.
- Pelegrin P, Surprenant A. 2009. The P2X(7) receptor-pannexin connection to dye uptake and IL-1beta release. *Purinergic Signal* 5(2):129-137.
- Pennesi ME, Michaels KV, Magee SS, Maricle A, Davin SP, Garg AK, Gale MJ, Tu DC, Wen Y, Erker LR, Francis PJ. 2012. Long-term characterization of retinal degeneration in rd1 and rd10 mice using spectral domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53(8):4644-4656.
- Penuela S, Bhalla R, Gong XQ, Cowan KN, Celetti SJ, Cowan BJ, Bai D, Shao Q, Laird DW. 2007. Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct. *J Cell Sci* 120(Pt 21):3772-3783.

- Penuela S, Gehi R, Laird DW. 2012. The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim Biophys Acta* 1828(1):15-22. doi: 10.1016
- Pfeiffer-Guglielmi B, Fleckenstein B, Jung G, Hamprecht B. 2003. Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase isozymes in rat nervous tissues by using isozyme-specific antibodies. *J Neurochem* 85(1):73-81.
- Phelan JK, Bok D. 2000. A brief review of retinitis pigmentosa and the identified retinitis pigmentosa genes. *Mol Vis* 6:116-124.
- Pignatelli V, Strettoi E. 2004. Bipolar cells of the mouse retina: a gene gun, morphological study. *J Comp Neurol* 476(3):254-266.
- Pinto LH, Invergo B, Shimomura K, Takahashi JS, Troy JB. 2007. Interpretation of the mouse electroretinogram. *Doc Ophthalmol* 115(3):127-136.
- Pottke M, Hoppenstedt W, Janssen-Bienhold U, Schultz K, Perlman I, Weiler R. 2003. Contribution of connexin26 to electrical feedback inhibition in the turtle retina. *J Comp Neurol* 466(4):468-477.
- Pottke M, Schultz K, Weiler R. 1997. Effects of nitric oxide on the horizontal cell network and dopamine release in. *Vision Res* 37(9):1091-1102.
- Prochnow N, Hoffmann S, Vroman R, Klooster J, Bunse S, Kamermans M, Dermietzel R, Zoidl G. 2009. Pannexin1 in the outer retina of the zebrafish, *Danio rerio*. *Neuroscience* 162(4):1039-1054.
- Punzo C, Kornacker K, Cepko CL. 2009. Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nat Neurosci* 12(1):44-52.
- Puthussery T, Fletcher EL. 2004. Synaptic localization of P2X7 receptors in the rat retina. *J Comp Neurol* 472(1):13-23.
- Puthussery T, Yee P, Vingrys AJ, Fletcher EL. 2006. Evidence for the involvement of purinergic P2X receptors in outer retinal processing. *Eur J Neurosci* 24(1):7-19.
- Ralevic V, Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50(3):413-492.
- Rami A, Volkmann T, Winckler J. 2001. Effective reduction of neuronal death by inhibiting gap junctional intercellular communication in a rodent model of global transient cerebral ischemia. *Exp Neurol* 170(2):297-304.
- Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredesen DE, Ellerby HM. 2002. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* 277(24):21836-21842.
- Raviola E, Gilula NB. 1973. Gap junctions between photoreceptor cells in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(6):1677-1681.
- Raviola E, Gilula NB. 1975. Intramembrane organization of specialized contacts in the outer plexiform layer. *J Cell Biol* 65(1):192-222.
- Ray A, Zoidl G, Weickert S, Wahle P, Dermietzel R. 2005. Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous. *Eur J Neurosci* 21(12):3277-3290.
- Regus-Leidig H, Brandstätter JH. 2012. Structure and function of a complex sensory synapse. *Acta Physiol (Oxf)* 204(4):479-486.
- Reichel MB, Schlichtenbrede F, Paul D, Wiedemann P. 2001. [Retinal degeneration. Apoptosis as pathomechanism and therapy strategy]. *Ophthalmologie* 98(3):242-247.
- Ribelayga C, Cao Y, Mangel SC. 2008. The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling. *Neuron* 59(5):790-801.
- Ripps H. 2002. Cell death in retinitis pigmentosa: gap junctions and the 'bystander' effect. *Exp Eye Res* 74(3):327-336.
- Rivolta C, Sharon D, DeAngelis MM, Dryja TP. 2002. Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance pattern. *Hum Mol Genet* 11(10):1219-1227.
- Robertson SJ. 1998. Tissue distribution and functional contribution of P2X receptors in the CNS. *Drug Development Res* 45:336-341.

- Rohrenbeck J, Wässle H, Heizmann CW. 1987. Immunocytochemical labelling of horizontal cells in mammalian retina using. *Neurosci Lett* 77(3):255-260.
- Rohrer B, Pinto FR, Hulse KE, Lohr HR, Zhang L, Almeida JS. 2004. Multidestructive pathways triggered in photoreceptor cell death of the rd mouse as determined through gene expression profiling. *J Biol Chem* 279(40):41903-41910.
- Roque RS, Rosales AA, Jingjing L, Agarwal N, Al-Ubaidi MR. 1999. Retina-derived microglial cells induce photoreceptor cell death in vitro. *Brain Res* 836(1-2):110-9.
- Rosenfeld PJ, Cowley GS, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP. 1992. A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and. *Nat Genet* 1(3):209-213.
- Saha RN, Pahan K. 2006. HATs and HDACs in neurodegeneration: a tale of disconcerted acetylation homeostasis. *Cell Death Differ. England.* 3(4):539-550.
- Sahaboglu A, Tanimoto N, Kaur J, Sancho-Pelluz J, Huber G, Fahl E, Arango-Gonzalez B, Zrenner E, Ekstrom P, Lowenheim H, Seeliger M, Paquet-Durand F. 2010. PARP1 gene knock-out increases resistance to retinal degeneration without affecting retinal function. *PLoS One* 5(11):e15495.
- Samali A, Zhivotovsky B, Jones D, Nagata S, Orrenius S. 1999. Apoptosis: cell death defined by caspase activation. *Cell Death Differ* 6(6):495-6.
- Sancho-Pelluz J, Alavi MV, Sahaboglu A, Kustermann S, Farinelli P, Azadi S, van Veen T, Romero FJ, Paquet-Durand F, Ekstrom P. 2010. Excessive HDAC activation is critical for neurodegeneration in the rd1 mouse. *Cell Death Dis* 1: e24 doi: 10.1038/cddis.2010.4
- Sancho-Pelluz J, Arango-Gonzalez B, Kustermann S, Romero FJ, van Veen T, Zrenner E, Ekstrom P, Paquet-Durand F. 2008. Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Mol Neurobiol* 38(3):253-269.
- Sancho-Pelluz J, Paquet-Durand F. 2012. HDAC inhibition prevents Rd1 mouse photoreceptor degeneration. *Adv Exp Med Biol* 723:107-113.
- Saraste A, Pulkki K. 2000. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45: 528-537. PMID: 10728374.
- Scemes E, Suadicani SO, Dahl G, Spray DC. 2007. Connexin and pannexin mediated cell-cell communication. *Neuron Glia Biol* 3(3):199-208.
- Schneeweis DM, Schnapf JL. 1995. Photovoltage of rods and cones in the macaque retina. *Science* 268(5213):1053-1056.
- Schreiber V. 2006. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:517-528
- Schwartz EA. 1987. Depolarization without calcium can release gamma-aminobutyric acid from a retinal. *Science* 238(4825):350-355.
- Segretain D, Falk MM. 2004. Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and. *Biochim Biophys Acta* 1662(1-2):3-21.
- Sevrioukova IF. 2011. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxid Redox Signal* 14(12):2545-2579.
- Shelley J, Dedek K, Schubert T, Feigenspan A, Schultz K, Hombach S, Willecke K, Weiler R. 2006. Horizontal cell receptive fields are reduced in connexin57-deficient mice. *Eur J Neurosci* 23(12):3176-3186.
- Shestopalov VI, Panchin Y. 2008. Pannexins and gap junction protein diversity. *Cell Mol Life Sci* 65(3):376-394.
- Simo R, Villarreal M, Corraliza L, Hernandez C, Garcia-Ramirez M. 2010. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the. *J Biomed Biotechnol* 2010:190724.
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ. 2001. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during. *J Biol Chem* 276(10):7320-7326.

- Smith RG, Freed MA, Sterling P. 1986. Microcircuitry of the dark-adapted cat retina: functional architecture of the. *J Neurosci* 6(12):3505-3517.
- Söhl G, Maxeiner S, Willecke K. 2005. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci* 6(3):191-200.
- Söhl G, Willecke K. 2003. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes* 10(4-6):173-180.
- Sohocki MM, Daiger SP, Bowne SJ, Rodriguez JA, Northrup H, Heckenlively JR, Birch DG, Mintz-Hittner H, Ruiz RS, Lewis RA, Saperstein DA, Sullivan LS. 2001. Prevalence of mutations causing retinitis pigmentosa and other inherited. *Hum Mutat* 17(1):42-51.
- Sonntag S, Dedek K, Dorgau B, Schultz K, Schmidt KF, Cimiotti K, Weiler R, Lowel S, Willecke K, Janssen-Bienhold U. 2012. Ablation of retinal horizontal cells from adult mice leads to rod degeneration and remodeling in the outer retina. *J Neurosci* 32(31):10713-10724.
- Sosinsky GE, Boassa D, Dermietzel R, Duffy HS, Laird DW, MacVicar B, Naus CC, Penuela S, Scemes E, Spray DC, Thompson RJ, Zhao HB, Dahl G. 2011. Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels (Austin)* 5(3):193-197.
- Soucy E, Wang Y, Nirenberg S, Nathans J, Meister M. 1998. A novel signaling pathway from rod photoreceptors to ganglion cells in mammalian. *Neuron* 21(3):481-493.
- Spray DC. 1994. Gap junction channels: yes, there are substates, but what does that mean? *Biophys J* 67(2):491-492.
- Spray DC, Ye ZC, Ransom BR. 2006. Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. *Glia* 54(7):758-773.
- Stephen R, Filipek S, Palczewski K, Sousa MC. 2008. Ca²⁺-dependent regulation of phototransduction. *Photochem Photobiol* 84(4):903-910.
- Sterling P, Matthews G. 2005. Structure and function of ribbon synapses. *Trends Neurosci* 28(1):20-29.
- Stockton RA, Slaughter MM. 1989. B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *J Gen Physiol* 93(1):101-122.
- Stöhr H, Molday LL, Molday RS, Weber BH, Biedermann B, Reichenbach A, Kramer F. 2005. Membrane-associated guanylate kinase proteins MPP4 and MPP5 associate with Veli3 at distinct intercellular junctions of the neurosensory retina. *J Comp Neurol* 481(1):31-41.
- Strettoi E, Pignatelli V. 2000. Modifications of retinal neurons in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20):11020-11025.
- Strettoi E, Pignatelli V, Rossi C, Porciatti V, Falsini B. 2003. Remodeling of second-order neurons in the retina of rd/rd mutant mice. *Vision Res* 43(8):867-877.
- Strettoi E, Porciatti V, Falsini B, Pignatelli V, Rossi C. 2002. Morphological and functional abnormalities in the inner retina of the rd/rd mouse. *J Neurosci* 22(13):5492-5504.
- Striedinger K, Petrasch-Parwez E, Zoidl G, Napirei M, Meier C, Eysel UT, Dermietzel R. 2005. Loss of connexin36 increases retinal cell vulnerability to secondary cell loss. *Eur J Neurosci* 22(3):605-616.
- Thompson RJ, Macvicar BA. 2008. Connexin and pannexin hemichannels of neurons and astrocytes. *Channels (Austin)* 2(2):81-86.
- Thoreson WB, Babai N, Bartoletti TM. 2008. Feedback from horizontal cells to rod photoreceptors in vertebrate retina. *J Neurosci* 28(22):5691-5695.
- Thoreson WB, Mangel SC. 2012. Lateral interactions in the outer retina. *Prog Retin Eye Res* 31(5): 407-441.
- Trifunović D, Dengler K, Michalakis S, Zrenner E, Wissinger B, Paquet-Durand F. 2010. cGMP-dependent cone photoreceptor degeneration in the cpfl1 mouse retina. *J Comp Neurol* 518(17):3604-17.

- Trifunovic D, Sahaboglu A, Kaur J, Mencl S, Zrenner E, Ueffing M, Arango-Gonzalez B, Paquet-Durand F. 2012. Neuroprotective strategies for the treatment of inherited photoreceptor degeneration. *Curr Mol Med* 12(5):598-612.
- Trümppler J, Dedek K, Schubert T, de Sevilla Muller LP, Seeliger M, Humphries P, Biel M, Weiler R. 2008. Rod and cone contributions to horizontal cell light responses in the mouse retina. *J Neurosci* 28(27):6818-6825.
- Tsukamoto Y, Morigiwa K, Ishii M, Takao M, Iwatsuki K, Nakanishi S, Fukuda Y. 2007. A novel connection between rods and ON cone bipolar cells revealed by ectopic. *J Neurosci* 27(23):6261-6267.
- Tsukamoto Y, Morigiwa K, Ueda M, Sterling P. 2001. Microcircuits for night vision in mouse retina. *J Neurosci* 21(21):8616-8623.
- Vanden Abeele F, Bidaux G, Gordienko D, Beck B, Panchin YV, Baranova AV, Ivanov DV, Skryma R, Prevarskaya N. 2006. Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *J Cell Biol* 174(4):535-546.
- Vardi N, Dhingra A, Zhang L, Lyubarsky A, Wang TL, Morigiwa K. 2002. Neurochemical organization of the first visual synapse. *Keio J Med* 51(3):154-164.
- Vardi N, Duvoisin R, Wu G, Sterling P. 2000. Localization of mGluR6 to dendrites of ON bipolar cells in primate retina. *J Comp Neurol* 423(3):402-412.
- Verweij J, Kamermans M, Spekreijse H. 1996. Horizontal cells feed back to cones by shifting the cone calcium-current. *Vision Res* 36(24):3943-3953.
- Vessey JP, Stratis AK, Daniels BA, Da Silva N, Jonz MG, Lalonde MR, Baldrige WH, Barnes S. 2005. Proton-mediated feedback inhibition of presynaptic calcium channels at the cone. *J Neurosci* 25(16):4108-4117.
- Völgyi B, Deans MR, Paul DL, Bloomfield SA. 2004. Convergence and segregation of the multiple rod pathways in mammalian retina. *J Neurosci* 24(49):11182-11192.
- Wagner C. 2008. Function of connexins in the renal circulation. *Kidney Int* 73(5):547-555.
- Wang J, Ma M, Locovei S, Keane RW, Dahl G. 2007. Modulation of membrane channel currents by gap junction protein mimetic peptides. *Am J Physiol Cell Physiol* 293(3):C1112-1119.
- Wang LB, Zhang LY, Shan CH. 2010. [A new form of cell death: Parthanatos]. *Yi Chuan* 22(9):881-885.
- Wang S, Lu B, Lund RD. 2005. Morphological changes in the Royal College of Surgeons rat retina during photoreceptor degeneration and after cell-based therapy. *J Comp Neurol* 491(4):400-417.
- Wang Y, Dawson VL, Dawson TM. 2009. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos. *Exp Neurol* 218(2):193-202.
- Wang Y, Song JH, Denisova JV, Park WM, Fontes JD, Belousov AB. 2012. Neuronal gap junction coupling is regulated by glutamate and plays critical role in cell death during neuronal injury. *J Neurosci* 32(2):713-725.
- Wässle H. 2004. Parallel processing in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* 5(10):747-757.
- Wässle H, Puller C, Müller F, Haverkamp S. 2009. Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. *J Neurosci* 29(1):106-117.
- Weiler R, Pottel M, He S, Vaney DI. 2000. Modulation of coupling between retinal horizontal cells by retinoic acid and. *Brain Res Brain Res Rev* 32(1):121-129.
- Weiler R, Schultz K, Janssen-Bienhold U. 1996. Ca²⁺-dependency of spinule plasticity at dendrites of retinal horizontal cells and its possible implication for the functional role of spinules. *Vision Res* 36(24):3891-3900.
- Wong P. 1994. Apoptosis, retinitis pigmentosa, and degeneration. *Biochem Cell Biol* 72(11-12):489-498.
- Wood PL. 1995. Microglia as a unique cellular target in the treatment of stroke: potential neurotoxic mediators produced by activated microglia. *Neurol Res* 17(4):242-8
- Wright AF. 1992. New insights into genetic eye disease. *Trends Genet* 8(3):85-91.

- Wu SM. 1992. Feedback connections and operation of the outer plexiform layer of the retina. *Curr Opin Neurobiol* 2(4):462-468.
- Würstle ML, Laussmann MA, Rehm M. 2012. The central role of initiator caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Exp Cell Res* 318(11):1213-20; doi: 10.1016/j.yexcr.2012.02.013.
- Xin D, Bloomfield SA. 1999. Dark- and light-induced changes in coupling between horizontal cells in mammalian retina. *J Comp Neurol* 405(1):75-87.
- Yang Y, Mohand-Said S, Danan A, Simonutti M, Fontaine V, Clerin E, Picaud S, Leveillard T, Sahel JA. 2009. Functional cone rescue by RdCVF protein in a dominant model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 17(5):787-795.
- Yau KW, Hardie RC. 2009. Phototransduction motifs and variations. *Cell* 139(2):246-64. doi: 10.1016/j.cell.
- Yen MR, Saier MH, Jr. 2007. Gap junctional proteins of animals: the innexin/pannexin superfamily. *Prog Biophys Mol Biol* 94(1-2):5-14.
- Yip V, Carter JG, Pusateri ME, McDougal DB, Jr., Lowry OH. 1991. Distribution in brain and retina of four enzymes of acetyl CoA synthesis in. *Neurochem Res* 16(6):629-635.
- Yoshizawa K, Kiuchi K, Nambu H, Yang J, Senzaki H, Kiyozuka Y, Shikata N, Tsubura A. 2002. Caspase-3 inhibitor transiently delays inherited retinal degeneration in C3H mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 240(3):214-219.
- Zeiss CJ. 2003. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* 40(5):481-495.
- Zeiss CJ, Neal J, Johnson EA. 2004. Caspase-3 in postnatal retinal development and degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(3):964-970.
- Zhang M, Wang W. 2003. Organization of signaling complexes by PDZ-domain scaffold proteins. *Acc Chem Res* 36(7):530-538.
- Zobor D, Zrenner E. 2012. [Retinitis pigmentosa - a review. Pathogenesis, guidelines for diagnostics and. *Ophthalmologie* 109(5):501-514;quiz 515.

8. Anhang

8.1 Pannexin1-Proteinsequenz

```

1 maiahlatey vfsdfllkep tepkfkglrl elavdkmvtc iavglp1111 slafaqeisi
61 gtqiscfyps sfswrqaafv dsyscwaavqq ksslqsesgn lplwlhkffp yilllfaill
121 ylpalfwrfs aaphlcSDLK fimeeldkvy nraikaaksa rdldlrDgpg ppgvtenvgq
181 slweisheshf kypiveqylk tkknsshlim kyiscrlvtf vvilladiyl syyfslssls
241 deflcsiksg vlkndstipd rfqckliavg ifqllslinl ivyallipvv vytffipfrq
301 ktdilkvyei lptfdvlhfk segyndlsly nlfleenise lksykclkv1 eniksngggi
361 dpml11t1ng mikmdiidgk iptslqtke dqgsqrvefk dldisseaaa ngeknrsqr
421 ll1npsc

```

Abbildung 8-1. Panx1-Proteinsequenz. Die Proteinsequenz besteht aus 426 Aminosäuren. Die Transmembrandomänen sind gelb unterlegt. Die im cytosolischen Bereich gelegene Sequenz, gegen die der Panx1-AK gerichtet ist, wird von Exon4 und Exon5 kodiert.

8.2 Geräte, Hilfsmittel, Chemikalien, Reagenzien

Tabelle 8-1. Geräte und Hilfsmittel, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Bezeichnung	Hersteller
6-Well-Platte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Ableitkammer, <i>in vitro</i> ERG	Luigs & Neumann, Ratingen
Agarosegel Mini und Midi Gelkammern	Biometra, Göttingen, Deutschland
AplhaImager EP Software mit DE450	Biozym scientific, Hess. Oldendorf
Axio Imager Z1 ApoTome Mikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Axiophot 2 Lichtmikroskop mit Axia Cam MRc	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Blottingkammer mit Zubehör	Universitätswerkstatt, Oldenburg
BNC-2090 Digitalisierer, <i>in vitro</i> ERG	National Instruments, Austin, TeXAS
Brosilikatglasrohr	Hilgenberg, Malsfeld, Deutschland
Brutschrank/Inkubator	Heraeus Instruments, Osterode/Harz
Elektronenmikroskop 902	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
EPC-9 Verstärker	HEKA, Lambrecht, Deutschland
Filterpapier	Millipore, Billerica, MA, USA
Gefriermikrotom Kryocut 5030 <i>Bright microtome</i>	Smuths Thebewn, Cambridgeshire, England
Gelkammer	Biometra, Göttingen
Glaspipettenzieher P-97	Sutter Instruments, Novato, CA, USA
Hybridisierungsöfen	Appligene, Illkirch, Frankreich
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop TCS-SL	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Kühlzentrifuge Typ J2-21	Beckman Coulter, Staufen
Leica DM LFS; Lichtmikroskop am <i>in vitro</i> -ERG Setup	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Lichtmikroskop	Olympus GmbH, Hamburg
Loading dye 5 x „GelPilot“	Qiagen Hamburg
Magnetrührer	Ikamag RH IKA, Staufen
Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
ML132 Bioamplifier	AD Instruments, Hastings, England
Mikromanipulator	Luigs & Neumann, New Orleans, USA
Mikroskop für Farbstoffinjektionen : Leica DM	Leica Mircosystems AG, Wetzlar

LFS	
Mikrotom Reichert Jung <i>Ultracut</i>	Leica Microsystems AG, Wetzlar
Nitrozellulosemembran (Optitran BA-S 85)	Schleicher & Schuell, Dassel,
Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig
pH-Meter	WTW, Weilheim
Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
QDS Stimulation Software	Thomas Euler, Universität Tübingen, Tübingen
Reaktionsgefäße, 500 µl, 1000 µl, 1500 µl	Eppendorf, Hamburg
Schüttler	Edmund Bühler, Hechingen
SEC-05LX Verstärker, <i>in vitro</i> -ERG	npi elektronik, Tamm
Spannungsgerät Standard Power Pack	Biometra, Göttingen
Spektrophotometer	Hitachi, Tokyo, Japan
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
Tischkühlzentrifuge 5147R	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator	Biometra, Göttingen
Vortex Reax 2000	Heidolph Instruments, Nürnberg
WinWCP	John Dempster, University of Scotland, UK

Tabelle 8-2. Chemikalien und Reagenzien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Bezeichnung	Hersteller
7-amino-4-chloromethylcoumarin, t-BOC-L-leucyl-L-methionine amide	Merck, Darmstadt
Aceton	Merck, Darmstadt
Alexa Fluor 594 Natriumhydrazid	Invitrogen, Karlsruhe
Ammuniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Aquatex®	Merck, Darmstadt
Atropinsulfat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Avidin, Alexa Fluor® 488 conjugate	Merck, Darmstadt
Avidin-Biotin-Blocking Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim
Avidin-Biotin-Komplex (ABC)-Kit	Vector, Burlingame, USA
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Bicarbonat 7,5%	Biochrom AG, Berlin
biotinyliertes NAD ⁺	Trevigen, Gaithersburg, USA
Bovine Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bradford-Reagenz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
ChemiBLOCKER	Millipore, Billerica, MA, USA
<i>Concanavalin A (ConA)</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
Coomassie-Blue	Merck, Darmstadt
Cystein (10mM)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Di-Aminobenzidin (DAB)	Vector, Burlingame, USA
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	BioChemika, Düsseldorf
DNA-Gößenstandard <i>peqGold DNA-Leiter Mix</i>	PeqLab, Erlangen
DNase I, RNasefrei (10U/µl)	Roche, Mannheim
DnaseI, <i>Amplification Grade</i> (1U/µl)	Invitrogen, Karlsruhe
DULBECCO's MEM (DMEM)	Biochrom AG, Berlin
dNTP Mix (10 mM)	Qiagen, Hilden
ECL-Western-Blot Detection Kit	Amersham Bioscience, Freiburg

Epoxy Resin	Agar 100; Plano, Wetzlar
Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylenglycol tetraacetic acid (EGTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
<i>Fetal Bovine Serum (FBS)</i>	Biochrom AG, Berlin
<i>Fetales calf serum (FCS)</i>	Gibco, Karlsruhe
<i>Fisch-Gelatin</i>	Aurion, Wageningen, Niederlande
Fluor-de-Ly-Substrat	Biomol, Hamburg
Glucose	Merck, Darmstadt
Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin
Glutaraldehyd	Merk, Darmstadt
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Glycin</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)</i>	Biochrom AG, Berlin
HDAC-Developer	Biomol, Hamburg
Hepes 1M	Biochrom AG, Berlin
<i>HMW-Marker</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>HotStar High Fidelity Polymerase (2,5 U/μl)</i>	Qiagen, Hilden
Hydrogenchlorid (HCl)	Merk, Darmstadt
Hydrogenperoxid (H ₂ O ₂)	Merk, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Ketamin	Bela-Pharm GmbH&Co.KG, Vechta
Kryomatrix Tissue-Tek	Sakura Finetek GmbH, Staufen
LMW-Marker	Sigma-Aldrich, Steinheim
Loading Dye 5 x "GelPilot"	Qiagen, Hilden
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nikotinamid-Adenine-Dinuklotid (NAD ⁺)	Biomol, Hamburg
Nonidet P40	Biomol, Hamburg
Normal donkey serum (NDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Normal goat serum (NGS)	Dianova GmbH, Hamburg
Nukleasefreies Wasser	Promega, Madison, WI, USA
<i>NucleoSpin Kit RNA II</i>	Macherey-Nagel GmbH, Düren
<i>NucleoSpin RNA XS Kit</i>	Macherey-Nagel GmbH, Düren
Oligo(dT)-Primer (50μg/μl)	Promega, Madison, WI, USA
Papain (20U/μl)	Worthington biochemical, Freehold, NJ)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Ponceau-S	Sigma-Aldrich, Steinheim
ProteinaseK (Schwanzspitzenverdau)	Applichem GmbH, Darmstadt
ProteinaseK (TUNEL-Assay)	Roche, Mannheim
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>RNAse AWAY</i>	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Rnasin Plus® Rnase Inhibitor (40 U/μl)</i>	Promega, Madison, WI, USA
Roti® Gelstain	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS)</i>	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Superscript™ III Reverse Transkriptase (200U/μl)</i>	Invitrogen, Karlsruhe
Standard-DNA Leiter	Peqlab, Erlangen
Tris-(2-carboxyethyl)174hosphine (TCEP)	Merck, Darmstadt

Tetramethylethylendimine (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Top Taq DNA Polymerase</i>	Qiagen, Hilden
TO-PRO3	Invitrogen, Karlsruhe
Tris (Tris(Hydroxymethyl)aminomethan)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>TissueTek ® Compound 4583</i>	Sakura Fintechical
Trypsin/EDTA-Lösung	Biochrom AG, Berlin
TUNEL® Cell death detection Kit	Roche, Mannheim
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Vectashield® mit und ohne DAPI	Vektor Laboratories, Burlingham, USA
Vectastain Elite ABC-Kit	Sigma-Aldrich, Steinheim
X-Gal	PeqLab, Erlangen
Xylazine	aniMedica GmbH, Senden-Bösensell
Zellkulturwasser	Promocell G,bH, Heidelberg

8.3 Kollaborationen

Expression von Pannexin1 in der äußeren Mausretina

Die immunhistologischen und biochemischen Spezifitätsanalysen wurden in Zusammenarbeit mit apl. Prof. Dr. Ulrike Janssen-Bienhold und Birthe Dorgau durchgeführt. Technisch wurde die biochemische Spezifitätsanalyse hauptsächlich von Josef Meyer durchgeführt.

Die *Panx1*^{-/-}-Maus wurde im Labor von Hannah Monyer generiert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Der *Panx1*-AK wurde von D.W. Laird und S. Penuala (University of Western Ontario, Canada) für die Arbeit zur Verfügung gestellt. Der verwendete HCN4-AK stammt von Frank Müller (Forschungszentrum Jülich), die Lichtstimulations-Software von Thomas Euler (Universität Tübingen).

Die Betreuung der *Panx1*^{-/-}-Mauslinie, die Zellinjektionen in Kombination mit AK-Markierungen, sowie die *in vivo*-ERG-Ableitungen wurden von Birthe Dorgau durchgeführt und ausgewertet. Birthe Dorgau war ebenfalls an der Reproduktion der Ergebnisse der *Panx1*-Lokalisationsstudie auf Kryoschnitten beteiligt.

Die *in vitro*-ERG-Daten wurden von Dr. Mark Pottek erhoben und ausgewertet.

Die ultrastrukturelle Lokalisation von *Panx1* wurde von Dr. Konrad Schultz durchgeführt. Die Einzelzell-PCR-Analysen zur Lokalisation von *Panx1* in Bipolar- und Horizontalzellen wurden von Dr. Petra Bolte und Regina Herrling durchgeführt.

Mechanismen genetisch bedingter Photorezeptordegeneration

Die Versuche zu Identifizierung der Stäbchenzelltodmechanismus (Abschnitt 4.1.2) und die TUNEL-Quantifizierungen, wurden von mir während meines Laboraufenthalts in der Arbeitsgruppe von Dr. Francois Paquet-Durand („*Cell Death Mechanisms Group*“, Universität Tübingen) durchgeführt.

Die Quantifizierungen der Bax-Expression, CytC-Freisetzung und der aktiven Form von Casp-9 wurde von Mitarbeitern der „*Cell Death Mechanisms Group*“ von Dr. Francois Paquet-Durand (Universität Tübingen) durchgeführt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Der verwendete Glypho-AK stammt von B. Pfeiffer-Guglielmi (Universität Tübingen) und konnte für die Untersuchungen in dieser Arbeit verwendet werden.

8.4 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt worden ist. Es wurden keine anderen, als die von mir selbst angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht wurde.

Kirchlinteln, den

Katharina Kranz

8.5 Danksagung

Ich bedanke mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Reto Weiler für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können, sowie für die Bereitstellung der interessanten Projekte, die richtungsweisenden Gespräche und die wissenschaftliche Freiheit, die ich während meiner Promotionszeit genießen konnte.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Koch für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Insbesondere danke ich Prof. Dr. Ulrike Janssen-Bienhold und PD Dr. Karin Dedek, für die vielseitige und umfassende Betreuung meiner Projekte, die Unterstützung bei den Publikationen und für die Gespräche, Diskussionen und Ideen, die diese Arbeit vorangebracht haben. PD Dr Karin Dedek danke ich außerdem für das kritische Lesen dieser Arbeit.

Für die vielen Hilfestellungen, Arbeitserleichterungen und die Unterstützung während der Laborarbeiten bedanke ich mich ganz herzlich bei Bettina Kewitz, Konrad Schultz, Susanne Wallenstein und Hoto Meyer.

Ich danke außerdem ganz besonders der gesamten AG Neurobiologie und ihren ehemaligen Mitgliedern für die Hilfsbereitschaft, die vielen Diskussionen und die persönlichen Gespräche, die jederzeit für eine angenehme Atmosphäre während der Laborarbeiten und darüber hinaus gesorgt haben. Vorallem bedanke ich mich auch bei Birthe Dorgau und Beate Grünberg für die Unterstützung und den Ansporn in den letzten Monaten.

Dr. Francois Paquet-Durand danke ich für die gute Zusammenarbeit und die Gelegenheit die verschiedenen Arbeiten in seinem Labor durchführen zu können, sowie für die vielen Hilfestellungen und den wissenschaftlichen Austausch während des Laboraufenthalts in Tübingen. Der Dank gilt insbesondere auch Sandra Bernhard-Kurz und den anderen Mitgliedern der „*Cell death Mechanisms Group*“, die mir während der Zeit in Tübingen für technische Fragen und darüber hinaus jederzeit hilfsbereit zur Verfügung standen.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern und meinem Mann für die unendliche Geduld, für das Verständnis und die Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

8.6 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Katharina Kranz, geb. Schmidt
Geburtstag	12.04.1980
Geburtsort	Verden (Aller) / Niedersachsen
Nationalität	deutsch
Geschlecht	weiblich
Familienstand	verheiratet
Wohnort	Krähenkamp21, 27308 Kirchlinteln
Telefon	0152-22448830
E-Mail	katharina-kranz@t-online.de

Ausbildung

2000	Domgymnasium Verden, Abitur
2000 - 2003	Ausbildung zur Reiseverkehrskauffrau, DER Reisebüro GmbH Verden
2003 - 2007	Studium, Diplom-Biologie, C.v.O. Universität Oldenburg Hauptfächer: Physiologie, Zellbiologie, Biochemie
2007 - 2009	Diplomarbeit, AG Neurobiologie, C.v.O. Universität Oldenburg
2009 - heute	Doktorandin; AG Neurobiologie, C.v.O. Universität Oldenburg

Forschungsaufenthalt:

08/2011 - 10/2011	„Cell Death Mechanisms Group“, Experimentelle Ophthalmologie, Universität Tübingen, unter der Leitung von Dr. François Paquet-Durand
-------------------	--

Teilnahme an Konferenzen:

2009	<ul style="list-style-type: none"> • German Society for Neuroscience (NWG), Göttingen (Poster) • “Two eyes – two ears-one system?” -Summer School-neurosensory Science and Systems, Bad Bederkesa (Poster)
2010	<ul style="list-style-type: none"> • Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, FL, USA(Poster) • Tübingen Outer Retina Conference (TORC), Tübingen (Poster) • Retinal Connexin Meeting, Amsterdam, Netherlands(Vortrag)
2011	

- German Society for Neuroscience (NWG), Göttingen (Poster)
 - European Retina Meeting, Amsterdam, Netherlands (Poster)
- 2012
- Hanse Feedback in Neuroscience Hanse-Wissenschaftskolleg, Delmenhorst (Vortrag)
 - International Society for Eye Research, (ISER) Berlin (Vortrag)

Publikationsliste:

Kranz K, Dorgau B, Potttek M, Herrling R, Schultz K, Bolte P, Monyer H, Penuela S, Laird DW, Dedek K, Weiler R, Janssen-Bienhold U. 2012. Expression of Pannexin1 in the outer plexiform layer of the mouse retina and physiological impact of its knockout. *J Comp Neurol.* 2012 Sep 10. doi: 10.1002/cne.23223.

Kranz K, Dedek K, Paquet-Durand F, Janssen-Bienhold, Weiler R. 2013. (accepted). Testing for a gap junction-mediated bystander effect in retinitis pigmentosa: secondary cone death is not altered by deletion of connexin36 from cones.

Arango-Gonzalez B, Sahaboglu A, Kranz K, Michalakis S, Koch S, Koch F, Farinelli P, Mencl S, Kaur J, Trifunović D, Cottet S, Janssen-Bienhold U, Dedek K, Biel M, Zrenner E, Euler T, Ekström P, Ueffing M, Paquet-Durand F (in preparation). Comparative analysis of neurodegenerative markers in ten different animal models for retinal degeneration reveals prevalence of non-apoptotic cell death mechanisms.

8.7 Publikationen

Im nachfolgenden sind die beiden Publikationen Kranz *et al.*, 2012 und Kranz *et al.*, 2013 (akzeptiert) angehängt.

Expression of Pannexin1 in the Outer Plexiform Layer of the Mouse Retina and Physiological Impact of its Knockout

Katharina Kranz,¹ Birthe Dorgau,¹ Mark Pottek,¹ Regina Herrling,¹ Konrad Schultz,¹ Petra Bolte,¹ Hannah Monyer,² Silvia Penuela,³ Dale W. Laird,³ Karin Dedek,¹ Reto Weiler,¹ and Ulrike Janssen-Bienhold^{1*}

¹Department of Neurobiology, University of Oldenburg, D-26111 Oldenburg, Germany

²Clinical Neurobiology, Universitätsklinikum Heidelberg, D-69120 Heidelberg, Germany

³Department of Anatomy & Cell Biology, University of Western Ontario, London, Ontario, N6A5C1 Canada

ABSTRACT

Pannexin1 (Panx1) belongs to a class of vertebrate proteins that exhibits sequence homology to innexins, the invertebrate gap junction proteins, and which also shares topological similarities with vertebrate gap junction proteins, the connexins. Unlike gap junctional channels, Panx1 forms single-membrane channels, whose functional role in neuronal circuits is still unsettled. We therefore investigated the subcellular distribution of Panx1 in the mouse retina of wildtype and Panx1-null mice by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), immunohistochemistry, and electron microscopy. Use of Panx1-deficient mice served as a model to assess the physiological role of Panx1 by electroretinographic recordings and also to ensure the specificity of the anti-Panx1 antibody label-

ing. Expression of Panx1 was found in type 3a OFF bipolar cells and in dendrites and axonal processes of horizontal cells. Panx1 was also found in horizontal cell dendrites representing the lateral elements of the triad synapse at cone and rod terminals. In vivo electroretinography of Panx1 knockout mice indicated an increased a- and b-wave compared to Panx1 wildtype mice under scotopic conditions. The effect on the b-wave was confirmed by in vitro electroretinograms from the inner retina. These results suggest that Panx1 channels serve as sinks for extracellular current flow making them possible candidates for the mediation of feedback from horizontal cells to photoreceptors. *J. Comp. Neurol.* 521:1119–1135, 2013.

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

INDEXING TERMS: retina; pannexin; bipolar cells; horizontal cells; electroretinography; hemichannel

The vertebrate retina is a neuronal network arranged in a layered architecture. All tasks from light perception to afferent transmission of extracted visual information are performed by synaptic interactions between more than 50 different types of neurons (Masland, 2001). Synaptic interactions include the electrical coupling of adjoining cells by gap junctions, i.e., intercellular channels composed of connexins. Connexins belong to a large family of transmembrane proteins with a tetra-spanning topology; in the retina, different connexin isoforms are allocated to specific cell types (Bloomfield and Völgyi, 2009). A functional gap junction channel requires the clustering of connexins into a hexameric channel termed a connexon and its coupling with a counterpart provided by a neighboring cell. In some cases connexons remain unapposed, thus providing a route for cytoplasmic communication with the extracellular environment. These hemichannels are

suggested to play a role in water flux, pathology, and release of signaling molecules in the nervous system (Evans et al., 2006; Spray et al., 2006), and have also been implicated in feedback of horizontal cells to photoreceptors in the retina (Kamermans et al., 2001).

A similar scope of functions is now attributed to pannexins (MacVicar and Thompson, 2010), the vertebrate homologs of invertebrate gap junction proteins (innexins), that share structural properties with connexins. First

The first two authors contributed equally to this work.

Grant sponsor: European Commission FP7; Grant number: RETICIRC HEALTH-F2-2009-223156 and MWK (to R.W.).

*CORRESPONDENCE TO: Dr. Ulrike Janssen-Bienhold, University of Oldenburg, Department of Neurobiology, P.O. Box 2503, D-26111 Oldenburg, Germany. E-mail: ulrike.janssen.bienhold@uni-oldenburg.de

Received March 8, 2012; Revised July 9, 2012; Accepted September 5, 2012

DOI 10.1002/cne.23223

Published online September 10, 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

© 2012 Wiley Periodicals, Inc.

described by Panchin et al. (2000) as channel-forming proteins in vertebrates, the pannexin family now consists of three members termed Panx1, Panx2, and Panx3 (Baranova et al., 2004). Panx1 is the most ubiquitously expressed pannexin, present in neuronal tissue and several internal organs (Barbe et al., 2006). The similar topology of pannexins and connexins (D'hondt et al., 2009) led to the assumption that Panx1 also forms gap junctions, which was supported by evidence in cells engineered to overexpress pannexins (Bruzzone et al., 2003; Shestopalov and Panchin, 2008; Ambrosi et al., 2010). However, there is now considerable agreement that Panx1 primarily forms single-membrane channels which, like connexin hemichannels, connect the cytoplasm of a cell with the extracellular space (Sosinsky et al., 2011). These channels conduct molecules smaller than 1 kDa, like ions (Ca^{2+}), amino acids, and adenosine triphosphate (ATP), and can interact with purine receptors (D'hondt et al., 2009). Recently, Panx1 has been implicated in several cellular processes connected to ischemia, cell death, and immunological or neuronal inflammatory processes (MacVicar and Thompson, 2010).

In the mouse retina, prominent expression of Panx1 mRNA was shown in all retinal layers excluding photoreceptors (Ray et al., 2005). Dvorianchikova et al. (2006) reported Panx1 in somata and processes of horizontal cells, in amacrine cells and ganglion cells. Furthermore, Panx1 is present in horizontal cells of the fish retina (Prochnow et al., 2009), but up to now little is known about its retinal function.

The aim of the present study was to investigate the subcellular distribution of Panx1 in the mouse retina and to examine a putative Panx1 influence on retinal signal transmission by *in vivo* and *in vitro* electroretinography. For this purpose, a transgenic Panx1 knockout (KO) mouse (Anselmi et al., 2008) was employed, which also served as a control to ensure specific Panx1 immunoreactivity. Panx1 localization was investigated in whole tissue, single cells, and subcellular compartments by a set of different complementary methods including single-cell reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), immunohistochemistry, and electron microscopy.

MATERIAL AND METHODS

Animals and tissue preparation

Experiments were performed on C57BL/6N wildtype (WT) mice (Charles River, Wilmington, MA), transgenic Panx1 KO mice (*B6-Panx1^{tm1Mony}*, in the following referred to as: Panx1^{-/-}) and Panx1-expressing littermates (Panx1^{+/+}) of both sexes at an age of 2–6 months. In Panx1^{-/-} mice the expression of Panx1 is disrupted by inserting the *lacZ* gene and a phosphoglycerate kinase-

neomycin cassette flanked by *loxP* sites into exon 1 of the *Panx1* gene via homologous recombination (Anselmi et al., 2008; for illustration of construct see fig. S3A of Bargiotas et al., 2011). Since the inserted fragment was derived from a 129/SVJ mouse strain, mice were backcrossed to C57BL/6 mice after the removal of the neomycin cassette.

Mice were euthanized by CO₂ overdose and subsequent cervical dislocation. Eyes were enucleated and cornea, lens, and vitreous were removed from the eyecup either in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4) for cryosections or in Ringer's solution (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM D-glucose and 5 mM HEPES; pH 7.4) for vibratome sections.

For immunohistochemistry, eyecups were fixed in 2% paraformaldehyde (PFA; Riedel de Haen, Seelze, Germany) at room temperature (RT). After washing in PB eyecups were cryoprotected in PB containing 30% sucrose (4°C, overnight) and embedded in Cryoblock (Mediate, Burgdorf, Germany). Vertical sections (18–20 μm) were prepared using a cryomicrotome (Bright Instrument, Huntingdon, UK).

For dye injections, retinas were dissected from the eyecup, bisected, and embedded in 2% agar. Vertical sections (200 μm) were cut using a vibratome (VT1200; Leica Biosystems, Nussloch, Germany). Slices were fixed by 4% PFA in PB (7 minutes, RT) and rinsed in Ringer's solution prior to use.

Animals were handled and euthanized in accordance with the institutional guidelines for animal welfare at the University of Oldenburg and the laws on animal experimentation issued by the German government.

Immunohistochemistry

Eyecup sections were rinsed either in Tris-buffered saline pH 7.4 (TBS) containing 0.3% Triton X-100 (TTBS) for cryosections or in PB for vibratome sections. Nonspecific binding sites were blocked with 5% ChemiBLOCKER (Millipore, Billerica, MA), 0.5% Triton X-100, and 0.05% NaN₃ in TTBS or PB (30 minutes, RT). Primary antibodies (Table 1) were diluted in blocking reagent and applied overnight at 4°C. After rinsing in TTBS or PB, slices were incubated with secondary antibodies (1:500; 2 hours, RT) conjugated to Alexa Fluor 488, 586, and 647 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Finally, sections were washed and mounted using Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Dissociation of retinal cells was performed as described by Feigenspan and Weiler (2004), and the labeling procedure was accomplished as described for vertical sections, with the exception of using TBS for rinsing and 10% normal goat serum (NGS) in TBS for blocking. Primary and secondary antibodies were diluted in TTBS.

TABLE 1.

Primary Antibodies and Their Dilutions Used on Retinal Cryosections (c), Retinal Vibratome Slices (v), and Dissociated Mouse Retinal Cells (d)

Antibody	Antigen	Host, monoclonal or polyclonal, dilution	Manufacturer, catalog or log number
Calbindin D-28K	Chicken calbindin D-28K, full length amino acid (aa) sequence	Mouse, monoclonal, 1:5,000 (c); 1:2,500 (d)	Swant, Bellinzona, Switzerland/300
Calretinin	Rat calretinin, full-length aa sequence	Goat, polyclonal, 1:1,000 (v)	Millipore, Billerica, MA/AB1550
Calsenilin	Human recombinant calsenilin	Mouse, monoclonal, 1:2,000 (c)	W. Wasco, Harvard Medical School, Charleston, MA Millipore, Billerica, MA/AB1550
ChAT	Human placental choline acetyltransferase	Goat, polyclonal, 1:500 (v)	Chemicon International Inc., AB 144P
G0 α	Bovine brain G0 α	Mouse, monoclonal, 1:500 (c); 1:250 (d)	Chemicon International Inc., MAB 3073
HCN4 γ	Murine HCN4 ion channel, aa 1,116–1,201	Guinea pig, monoclonal, 1:25 (c); 1:10 (d)	F. Müller, Forschungszentrum Jülich, Germany
Panx1	Murine Panx1, aa 395–409 (QRVEFKDLDSSEAA)	Rabbit, polyclonal, 1:2,000 (c), 1:1,000 (v); 1:500 (d)	D.W. Laird, University of Western Ontario, London, Canada
PKARII β	Human recombinant protein kinase A regulatory subunit II β , aa 1–418	Mouse, monoclonal, 1:2,000 (c)	BD Bioscience, San José, CA / 610625
ZNP-1	Synaptotagmin II from 1–5 day old zebrafish embryo	Mouse, monoclonal, 1:500 (c)	Zebrafish International Resource Center/081002–25

Antibody specificity

The rabbit polyclonal anti-Panx1 antibody was generated by Penuela et al. (2007). The peptide used for immunization comprised 15 amino acid residues (QRVEFKDLDSSEAA) corresponding to the C-terminal residues 395–409 of mouse Panx1. The specificity of the antibodies was previously described for transfected normal rat kidney (NRK) cells as well as in human skin and mouse spleen sections (Penuela et al., 2007). Concerning the mouse retina, we provide a specificity test within this study (see below).

The guinea pig monoclonal antibody against the ion channel HCN4 was generated by immunization with a glutathione S-transferase fusion protein containing amino acid residues 1,116–1,201 of the mouse HCN4 C-terminus. In Western blot analysis, the antibody recognizes a 132-kDa protein in membrane fractions isolated from either mouse retina or transfected HEK-293 cells. The immunoreaction was very close to the molecular weight of 129 kDa predicted for HCN4 (Mataruga et al., 2007).

The monoclonal mouse anti-calbindin antibody was generated by hybridization of mouse myeloma cells with spleen cells immunized with calbindin D-28K purified from chicken. The antibody recognizes a 28-kDa band in Western blot analysis of mouse brain extracts. Immunoreactivity of this antibody is absent from cerebellar sections of calbindin D-28K KO mice (manufacturer's sheet for calbindin D-28K; Swant Bellinzona, Switzerland).

The mouse monoclonal antibody against the synaptic vesicle-associated protein synaptotagmin 2 (ZNP-1) recognizes a 60-kDa band in Western blot analysis of zebrafish embryos, mouse cerebellum, and mouse

synaptosomes. For the murine retina, the specificity of the antibody was described by Fox and Sanes (2007).

The mouse monoclonal antibody against the protein kinase A subunit RII β (PKARII β) was the same as used by Mataruga et al. (2007). The antibody detects a 53-kDa band in Western blot analysis of mouse retinal proteins as well as in human endothelial cells (positive control). This coincides with the predicted molecular weight of mouse PKARII β .

The mouse anti-calsenilin antibody recognizes a specific band in Western blot analysis of mouse retina extracts. After blocking with GST-calsenilin immunoreactivity is absent (Haverkamp et al., 2008).

The monoclonal antibody against the G-protein α subunit (G0 α) was the same antibody used by Haverkamp and Wässle (2000). The specificity is confirmed by Western blot analysis (manufacturer's sheet, Chemicon International, Temecula, CA, MAB3073). This antibody detects rod and cone ON bipolar cells in mouse retina (Haverkamp and Wässle, 2000).

The polyclonal goat anti-calretinin antibody recognizes an expected 31-kDa band in Western blots of rat brain extracts (Miyata et al., 2000) and labels several subtypes of amacrine cells in the mouse retina (Haverkamp and Wässle, 2000).

The goat polyclonal anti-choline acetyltransferase (ChAT) antibody recognizes a 68-kDa band in Western blot analysis (manufacturer's sheet; Chemicon International, AB144P). In the retina, the antibody labels sublamina 2 and 4 of the inner plexiform layer (Yip et al., 1991).

β -Galactosidase staining

As creation of the *Panx1* knockout included the insertion of the *lacZ* gene, the *Panx1* immunolabeling in retinal sections could be verified by screening for β -galactosidase. β -Galactosidase activity was monitored as described by Güldenagel et al. (2000). In brief, after PFA fixation vertical cryosections (18–20 μ m) were rinsed in washing solution (0.1 M PB, pH 7.4; 2 mM $MgCl_2$; 2 mM EGTA; 0.01% sodium deoxycholate; 0.02% Nonidet P40) and incubated for 48 hours at 37°C in staining solution (washing solution containing 5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$, 5 mM $K_4[Fe(CN)_6]$, 1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal); peqlab, Erlangen, Germany). Sections were then again washed in washing solution, rinsed in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), mounted in glycerol/PBS, and analyzed with a Zeiss Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

SDS-PAGE and Western blot analysis

Specificity of the rabbit polyclonal anti-*Panx1* antibody for the mouse retina was accessed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analysis of crude subcellular fractions (Janssen-Bienhold et al., 2009). Total protein lysates of four retinas per genotype were fractionated by differential centrifugation steps giving total homogenate (TH), a membrane fraction, and a cytosolic fraction. Proteins (30 μ g per subcellular fraction) were separated according to their molecular weight by SDS-PAGE on 8–10% gradient gels and transferred overnight (40 V at 4°C) to a nitrocellulose membrane (Optitran BA-S 85; Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). After blocking nonspecific binding sites for 1 hour with 5% powdered milk in TBS-Tween at 37°C, anti-*Panx1* antibodies were incubated (1:5,000 in TBS-Tween with powdered milk) overnight at 4°C. Unaffiliated primary antibodies were removed by several washes (TBS-Tween) before the blot was incubated with secondary goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase (1:3,000 in TBS-Tween; BioRad Laboratories, Munich, Germany) for 2 hours at RT. After washing, immunoreactive proteins were visualized using a chemiluminescence detection system (Pierce ECL; Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) following the instructions of the manufacturer.

RT-PCR

RNA was extracted from isolated mouse retinas by means of an RNA preparation kit (NucleoSpin RNAII; Macherey-Nagel, Düren, Germany) used according to the manufacturer's manual. Horizontal cell and bipolar cell mRNA samples were obtained from single dissociated cells, which were aspirated by a patch pipette. Isolated

TABLE 2.
Primers Used for cDNA Amplification

Primer	Primer sequence 5' → 3'	Amplicon cDNA/genomic DNA (basepairs)
<i>Panx1</i> exon5F	gcaacaatggggagaagaa	–
<i>Panx1</i> exon5R	gctctctagaagccccaggt	349
<i>Panx1</i> exon5Rn	tcctctagcacctgccagtc	330
β -actinF	tgttaccaactgggacgaca	–
β -actinR	aaggaaggctggaaaagagc	573/1,027
connexin57F	catctcggcatcaggaaaat	–
connexin57R	cagatgatggacggtgtga	451
connexin57Fnested	cagcagtggaacactgaga	–
connexin57Rnested	aagccgtcattgtaccgaac	386

OFF bipolar cells were identified by short axon terminals, and 3–4 complete cells were gathered for each sample. For horizontal cell mRNA a single horizontal cell was collected per sample. The pipette was filled with 2.5 μ g/ μ l Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) in RA1 lysis buffer (Macherey-Nagel). Following collection the pipette tip was broken inside a PCR tube containing 20 U of RNase inhibitor (RNasin; Promega, Madison, WI).

DNaseI (Amplification Grade; Invitrogen) incubation was performed according to manufacturer's guidelines to exclude contamination with genomic DNA. cDNA synthesis from 1 μ g mouse retinal mRNA or from different retinal cell samples was performed in final volumes of 25 μ l with 8 U/ μ l superscript III polymerase (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. PCR analysis of obtained cDNA was performed using HotStar Taq Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's manual. For cDNA amplification, specific primer pairs for *Panx1* (GenBank Accession number NM_019482) and *Cx57* (GenBank Accession number NM_010289) were used as well as intron-spanning β -actin primers (GenBank Accession number NM_007393) as internal control to exclude contamination with genomic DNA (Table 2). The amplification was performed using a thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany), and 20 μ l of each amplified transcript was analyzed by 2% agarose gel electrophoresis and visualized on a transilluminator (Biozym Scientific, Hessisch-Oldendorf, Germany) after ethidium bromide staining. PCR products were amplified and sequenced by a commercial sequencing service (AGOWA genomics, Berlin, Germany).

Immunoelectron microscopy

Immunoelectron microscopy was performed as described by Janssen-Bienhold et al. (2009). Isolated mouse retinas were fixed (2% PFA / 3% sucrose in PB, 30 minutes) and cryoprotected (30% sucrose in PB, overnight). Tangential and vertical sections of 60 μ m thickness were cut using a cryomicrotome (Bright Instrument)

and treated with NGS (10% in PB, 3 hours) to saturate nonspecific binding sites. Incubation with the anti-Panx1 antibody (1:200 in PB) was carried out for 5 days at 4°C. After rinsing with PB, the secondary antibody (biotinylated goat anti-rabbit IgG, 1:250; Vector Laboratories) was applied overnight at 4°C. Unbound secondary antibodies were removed by rinsing, and Panx1 immunoreactivity was visualized using VectaStain Elite ABC Kit (Vector Laboratories) according to the manufacturer's protocol followed by a 7-minute treatment with 3,3'-diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, MO; 10% in PB, activated by H₂O₂). After rinsing, slices were postfixed (2.6% glutaraldehyde, 1% PFA, 87.6 mM sucrose; 1 hour, RT), subjected to silver intensification, and incubated in OsO₄ (1% in PB) for additional fixation and contrast enhancement. Finally, slices were dehydrated in increasing acetone concentrations (50–100%) and embedded in epoxy resin (Agar 100; Plano, Wetzlar, Germany). Ultrathin sections were made and evaluated with a Zeiss 902 transmission electron microscope (Carl Zeiss).

Intracellular dye injections

Intracellular dye injections were performed as described previously (Hilgen et al., 2011). Prefixed slices were transferred to an injection chamber mounted on the stage of an upright microscope (Leica DM LFS; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Bipolar cells were impaled under visual control with sharp microelectrodes (120–220 MΩ) made of borosilicate glass tubing (Hilgenberg, Malsfeld, Germany). Electrodes contained 7.5 mM Alexa Fluor 594 sodium hydrazide (Invitrogen) diluted in 0.2 M KCl (pH 7.4). The dye was iontophoretically injected with a current of –1 nA for 3–6 minutes by using the current-clamp circuit of an EPC-9 amplifier (HEKA, Lambrecht, Germany). After injection, slices were fixed again with 4% PFA in PB for 3–5 minutes and rinsed in Ringer's solution before antibody incubation.

Fluorescent image acquisition

Images were taken with a Leica TCS SL confocal microscope. Scanning was performed with either a 40 × /1.25 plan apochromat or a 63 × /1.32 plan apochromat objective at a resolution of 1,024 × 1,024 pixels. Leica TCS SL image acquisition software was used to adjust offset and gain of the channels. Scans of red, green, and blue fluorescence channels were imaged separately and are presented either as single scan section or as projections of 5–15 sections (z-axis increment 0.5 μm for intracellular dye injections or 0.2 μm for immunohistochemistry and dissociated isolated cells). Intensity and contrast of images were adjusted using Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems, San Jose, CA) and the public domain image processing software ImageJ (NIH, Bethesda, MD).

In vivo electroretinography

For whole-animal electroretinograms (ERGs) 3-month-old mice were dark-adapted overnight. Anesthesia by intraperitoneal injection of xylazine (50 mg/kg) and ketamine (20 mg/kg), dilation of pupils by atropine sulfate (1%) and other preparatory procedures (Frank et al., 2010) were performed under dim red light (>620 nm). Electrical potentials were recorded in response to white-light flashes (5 ms) and bandpass-filtered (1–1,000 Hz) using a ML132 Bioamplifier (ADInstruments, Hastings, UK). Responses to 20 flashes given at 0.4 Hz were averaged for low flash intensities, and the number of repetitions and the stimulus frequency decreased to 5 flashes at 0.066 Hz for the brightest stimulus. Photopic ERGs were recorded against a uniform white background light (25 cds/m²).

Averaging and storage of the recordings as well as data analysis were performed using a PowerLab system (ADInstruments). Statistical analysis was done using Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA). All results were validated using two-way analysis of variance (ANOVA), and pairwise comparisons were conducted using a post-hoc Bonferroni test and Student's *t*-test for independent samples.

In vitro electroretinography

Animals were dark-adapted for at least 3 hours and euthanized as described above. Retinal dissection took place under dim red light (>690 nm) and in extracellular solution consisting of 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1.6 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 10 mM D-glucose, equilibrated to pH 7.4 with carbogen gassing. The isolated retina was spread ganglion cell side-down over a ring-shaped Ag–AgCl reference electrode situated at the glass bottom of a recording chamber (Luigs & Neumann, Ratingen, Germany) mounted on the stage of an upright microscope (Leica DM LFS; Leica Microsystems). It was continuously perfused with extracellular solution (5 ml/min flow rate) heated to 35°C and was left in darkness for 30 minutes prior to recording.

ERGs were recorded using microelectrodes made from borosilicate glass tubing (outer diameter 1.5 mm, wall thickness 0.225 mm; Hilgenberg), which were filled with extracellular solution giving an electrode resistance of about 4–10 MΩ. The electrode tip was positioned at the level of the rod outer segments visually guided by infrared light microscopy. Deeper retinal layers were accessed by advancing the electrode into the retina by a motor-driven micromanipulator (Luigs & Neumann). Full-field white-light flashes (5 ms) were generated by stimulation software (QDS; Thomas Euler, University of Tübingen, Tübingen, Germany), presented on a CRT monitor, and

projected to the retina through the condenser of the microscope. Electrical potentials were amplified by a high-gain amplifier (SEC-05LX; npi electronic, Tamm, Germany), lowpass-filtered (20 Hz), digitized (BNC-2090; National Instruments, Austin, TX), and sampled (10 kHz) using the data acquisition system WinWCP (John Dempster, University of Scotland, Glasgow, UK), which also

allows for offline data analysis. Responses to 20 light flashes delivered at 0.1 Hz were averaged per stimulus condition. Statistical analysis was done as described above.

RESULTS

Specificity of anti-Panx1 antibodies in the mouse retina

We used a recently generated rabbit polyclonal antibody raised against murine Panx1 (Penuela et al., 2007), which has not yet been employed in a retinal study. Therefore, a Western blot analysis on crude subcellular fractions of retinal protein extracts obtained from Panx1^{-/-} mice and Panx1-expressing littermates (Panx1^{+/+}) as well as an immunohistochemical investigation on retinal sections were carried out to exclude possible crossreactions of the antibody with other retinal proteins (Fig. 1).

Western blots of homogenates from Panx1^{+/+} mice revealed a prominent immunoreactive band with a molecular weight of about 47 kDa (Fig. 1A; asterisk). This value fits in the range of 41–48 kDa predicted for Panx1 and its glycosylated stages (Penuela et al., 2007). The band was detected in TH and membrane fraction (M) and absent from the soluble fraction (S). Additional bands were recognized at about 58 kDa in TH of Panx1^{+/+} retinas and above 205 kDa non-specifically in TH and M of both genotypes. The molecular mass (in kDa) is indicated on the left. B–D: Panx1 immunoreactivity in vertical retina sections. In the INL of Panx1^{+/+} retinas (C) punctate Panx1 immunosignal was found in the membrane of distinct cell somata and dendrites which proceed into the OPL (arrows). Moderate Panx1 immunoreactivity was present in the distal part of the OPL (horizontal arrow in C, inset; single scan image). These patterns were absent from Panx1-deficient mice (D). Both genotypes depicted an intense and most likely nonspecific immunolabel in the IPL and GCL (C,D) as well as on some amacrine cell somata (arrowhead in C,D). Images show maximum projections of confocal stacks (3 μm thickness). Retinal layers are indicated in the Nomarski micrograph (B). E,F: Verification of Panx1 immunolabeling by β-galactosidase staining. In Panx1^{-/-} mice (F) β-galactosidase reactivity was detected in putative horizontal cells (long arrows) and bipolar cells (short arrows) and in the GCL, whereas Panx1^{+/+} mice displayed no staining (E). ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale bars = 10 μm for B–D; 5 μm for inset in C; 20 μm for E,F.

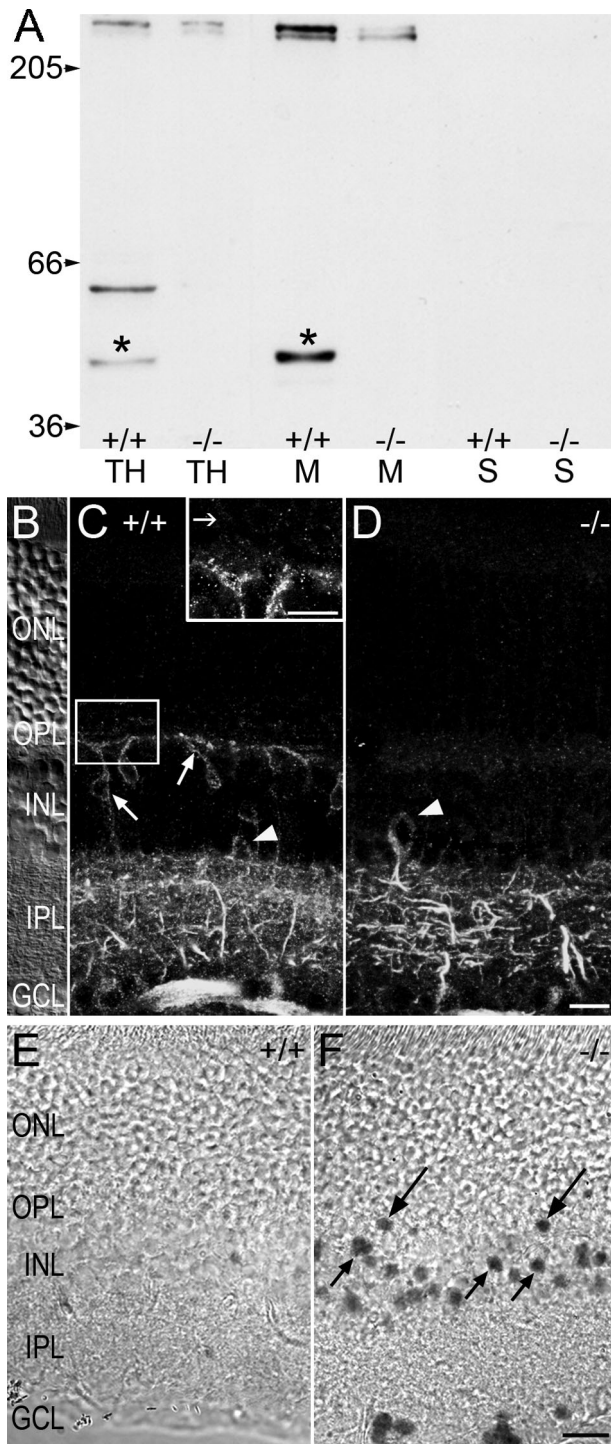


Figure 1

increased immunoreactivity compared to the TH band, as expected for a membrane-bound protein.

An additional band at 58 kDa was exclusively present in TH of *Panx1*^{+/+} mice, which might represent a post-translationally modified form of Panx1 as previously described by Dvorianchikova et al. (2006). Also, an immunoreactive protein doublet with a molecular mass exceeding 205 kDa was observed in TH and even more intensely in the membrane fraction (Fig. 1A). Since it was found in both, *Panx1*^{+/+} and *Panx1*^{-/-} mice, it most likely indicates nonspecific crossreactivity of the antibody with retinal membrane proteins other than Panx1.

These findings permit the conclusion that the applied antibody does in fact recognize Panx1 in the mouse retina, allowing a further characterization in immunohistochemistry. Vertical retina slices of *Panx1*^{+/+} and *Panx1*^{-/-} mice did not differ in general morphology and layer thickness. In *Panx1*^{+/+} mice, Panx1 immunolabeling resulted in a punctate pattern in membranes of somata located in the inner nuclear layer (INL) and also in dendritic-like structures ascending to the outer plexiform layer (OPL; Fig. 1C; arrows). The location and shape of these labeled somata is reminiscent of bipolar cells. Less prominent punctate immunolabel was also found at a distinct level in the distal OPL (horizontal arrow in Fig 1C, inset), which suggests a location of Panx1 in horizontal cells. These immunosignals were absent from *Panx1*^{-/-} mice (Fig. 1D), indicating a specific detection of Panx1 in these retinal layers, which is also corroborated by the detection of β -galactosidase reactivity in cells of *Panx1*^{-/-} mice resembling bipolar and horizontal cells (Fig. 1E,F).

Additionally, an intense labeling of the inner retina of both *Panx1*^{+/+} and *Panx1*^{-/-} mice was detected. This reactivity pattern comprised a punctate signal following the outline of large somata in the proximal INL, as well as a broad label pervading the inner plexiform layer (IPL) and ganglion cell layer (GCL; Fig. 1C,D; arrowheads). Because this pattern was also present in the KO condition, it may result from nonspecific binding of the antibody and could possibly correspond to the high molecular band detected in retinal membrane samples of both genotypes on the Western blot (compare Fig. 1A). However, we cannot exclude the existence of specific Panx1 immunoreactivity in these retinal layers, since it may be masked by the extensive nonspecific signal, and because β -galactosidase reactivity was also present in cells of the GCL (Fig. 1E,F). In the following, we will focus on the characterization of specific Panx1 immunolabeling found in the OPL and INL.

Panx1 is expressed in type 3a OFF bipolar cells

The Panx1 immunosignal in cells reminiscent of bipolar cells was studied in more detail. In the mammalian retina,

five OFF and six ON bipolar cell subtypes can be discriminated by light response properties, morphology, and the expression of marker proteins (Ghosh et al., 2004; Wässle et al., 2009). We therefore combined Panx1 immunohistochemistry in vertical retina sections with the use of antibodies directed against markers and with intracellular dye injections.

Type 1 (CB1) and type 2 (CB2) cone bipolar cells both stratify in sublamina S1 of the IPL. Three putative dye-injected CB1 cells were recognized by the rather short and stout primary dendrite and the comparatively sparse axonal branching (Fig. 2F,G), and none of them showed any Panx1 immunoreactivity (Fig. 2F). Also, no Panx1 immunosignal was found in CB2 cells (Fig. 2A) identified by ZNP-1 labeling (Fox and Sanes, 2007; Wässle et al., 2009) and in CB4 cells (Fig. 2E) recognized by calsenilin immunoreactivity (Haverkamp et al., 2008). CB3 cells comprise two subpopulations that stratify in S2 and display only slight morphological differences (Wässle et al., 2009) but can easily be distinguished by the specific expression of HCN4 in CB3a cells and PKARI β in CB3b cells (Mataruga et al., 2007). Whereas the latter were Panx1-negative (Fig. 2D), Panx1 was colocalized with HCN4 on somata and dendrites of CB3a cells (Fig. 2B; arrows). In single confocal scans (thickness 0.2 μ m) Panx1 labeling consisted of distinct puncta, which were predominantly found in the plasma membrane and displayed overlap with or proximity to HCN4 immunoreactivity (Fig. 2C; arrows). Also, 23 dye-injected cells were recognized as CB3 by their axonal stratification (Fig. 2H–M). Only 10 of them were found to be Panx1-positive (Fig. 2H), depicting punctate immunolabeling in membranes of somata and dendrites (Fig. 2I,J; arrow). These cells matched the morphological description of CB3a cells (Fig. 2K) with curly dendrites, a stout axon, and varicose axon terminals (Mataruga et al., 2007; Wässle et al., 2009), whereas Panx1-negative cells bore resemblance to CB3b morphology (Fig. 2L,M). This suggests Panx1 as an additional marker for discriminating between both CB3 subpopulations.

ON bipolar cells were identified by immunoreactivity for the G-protein subunit G $_{\alpha}$ (Ghosh et al., 2004). The labeling was prominent in cell bodies and dendrites (Fig. 3B), but did not coincide with the specific pattern of Panx1 immunoreactivity (Fig. 3A,C). In addition, individual subtypes were accessed by dye filling, identified by the stratification level within the IPL, and checked for Panx1 immunoreactivity. In total, 13 CB5 cells (Fig. 3D,E), eight CB6 cells, 17 CB7 cells (Fig. 3F,G), four CB8 cells (Fig. 3H,I), and 11 rod bipolar cells (Fig. 3J,K) were injected, and in no case could a colocalization with the specific Panx1 immunolabeling be discerned. The rather infrequent CB9 cells were not encountered, but Panx1

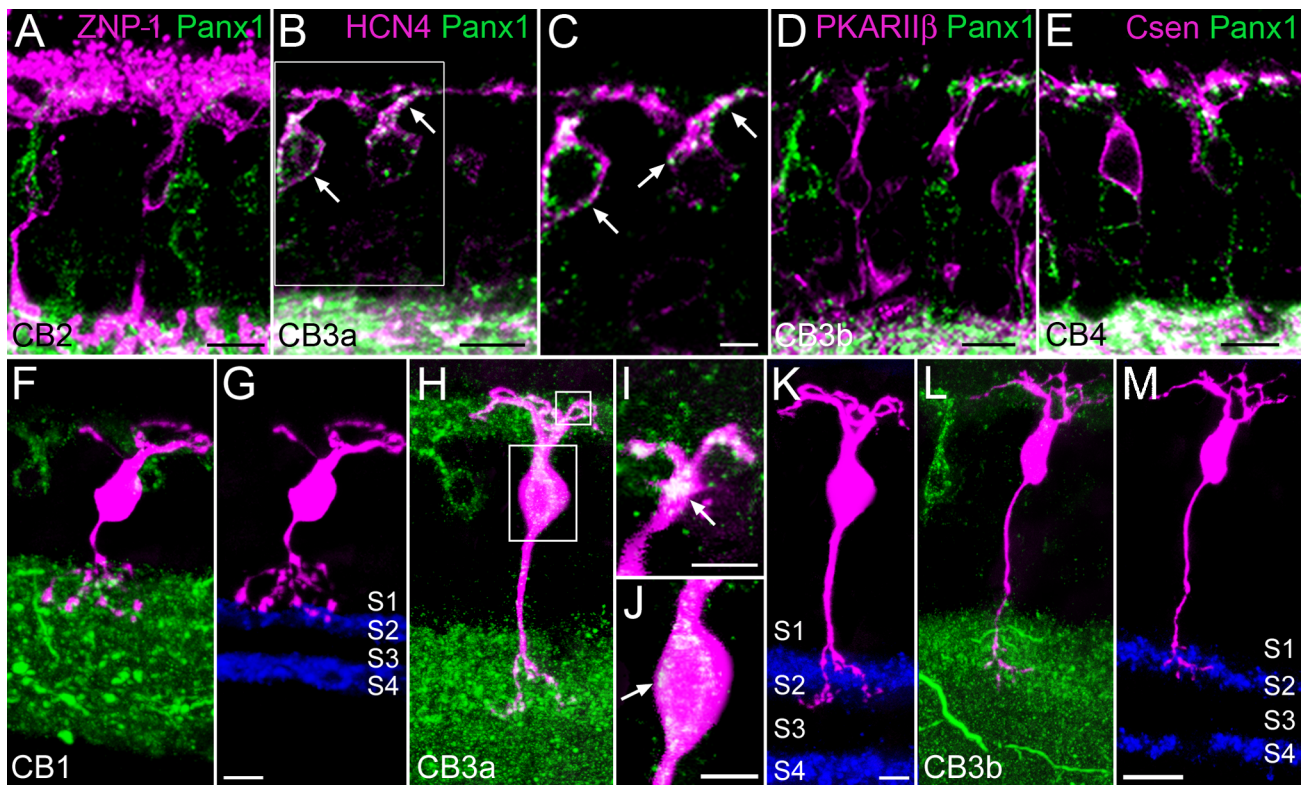


Figure 2. Panx1 expression in type 3a OFF bipolar cells. A–E: Immunoreactivity of antibodies against Panx1 (green) and various bipolar cell markers (magenta) in vertical sections. Panx1 immunosignal was present in HCN4-positive CB3a cells (B,C) and not found in other OFF bipolar cell types like CB2 (A), CB3b (D), and CB4 (E). Single scan representation of the area indicated in B revealed immunoreactive puncta in the plasma membrane of somata and in dendrites (arrows in B,C). F–M: OFF bipolar cells revealed by dye injection (magenta). Panx1 (green) colocalized with putative CB3a cells (white dots in H–J), but not with CB1 (F) and CB3b cells (L). Single confocal scans of the areas outlined in H showed Panx1 in dendrites (arrow in I) and the soma (arrow in J) of putative CB3a cells. Blue bands indicate the stratification of the IPL as revealed by calretinin (G) or ChAT immunoreactivity (K,M). Scale bars = 20 μm for A,B,D,E; 10 μm for C,F–I,K–M; 5 μm for J.

expression could be excluded because the Panx1 immunosignal was absent from all cells that were immunoreactive to $G_{0\alpha}$.

Analysis of isolated bipolar cells on RNA and protein level supported the immunohistological findings. RT-PCR analysis (Fig. 4A) was accomplished with samples of 2–3 isolated OFF bipolar cells that were identified by their characteristic morphology exhibiting a short axon (Fig. 4B,C). Panx1 mRNA transcripts were detected in three out of eight samples (Fig. 4A, right) adding more evidence to the notion that Panx1 is restricted to one or a few OFF bipolar cell subtypes and is not a widely expressed protein among OFF bipolar cells. Isolated bipolar cells were also studied by immunocytochemistry, revealing, consistent with the data from retinal sections, Panx1 immunoreactivity only in cells being also HCN4-positive (Fig. 4D–F), while none was found in ON bipolar cells recognized by $G_{0\alpha}$ immunolabeling (Fig. 4G). The Panx1 immunosignal in CB3a cells consisted of intense dots located in the cell membrane of the soma and along the dendritic branches (Fig. 4F; upper arrow). Also, sparse label was present

along the axon, and intensive fluorescence puncta showed up in the axon terminal (Fig. 4F; lower arrow).

The dendritic localization of Panx1 was further assessed by ultrastructural examination using vertical sections of the distal OPL (Fig. 4H–K). Electron micrographs of Panx1^{+/+} mice revealed Panx1-positive cellular processes (Fig. 4H; arrow) forming noninvaginating contacts with the base of rod spherules. These structures resemble the flat contacts rods make with cone bipolar cells like CB3a cells (Mataruga et al., 2007), which were identified in this study as being Panx1-positive. Putative flat contacts at the bases of cone pedicles, as known from cone OFF bipolar cells, also showed Panx1 immunolabel (Fig. 4J, arrows), whereas cellular processes with a similar position in Panx1-deficient mice were devoid of the immunolabel (Fig. 4I,K; arrows).

Expression of Panx1 in horizontal cells

The less prominent, punctate Panx1 immunoreactivity located distally of the bipolar cell dendrites (inset in

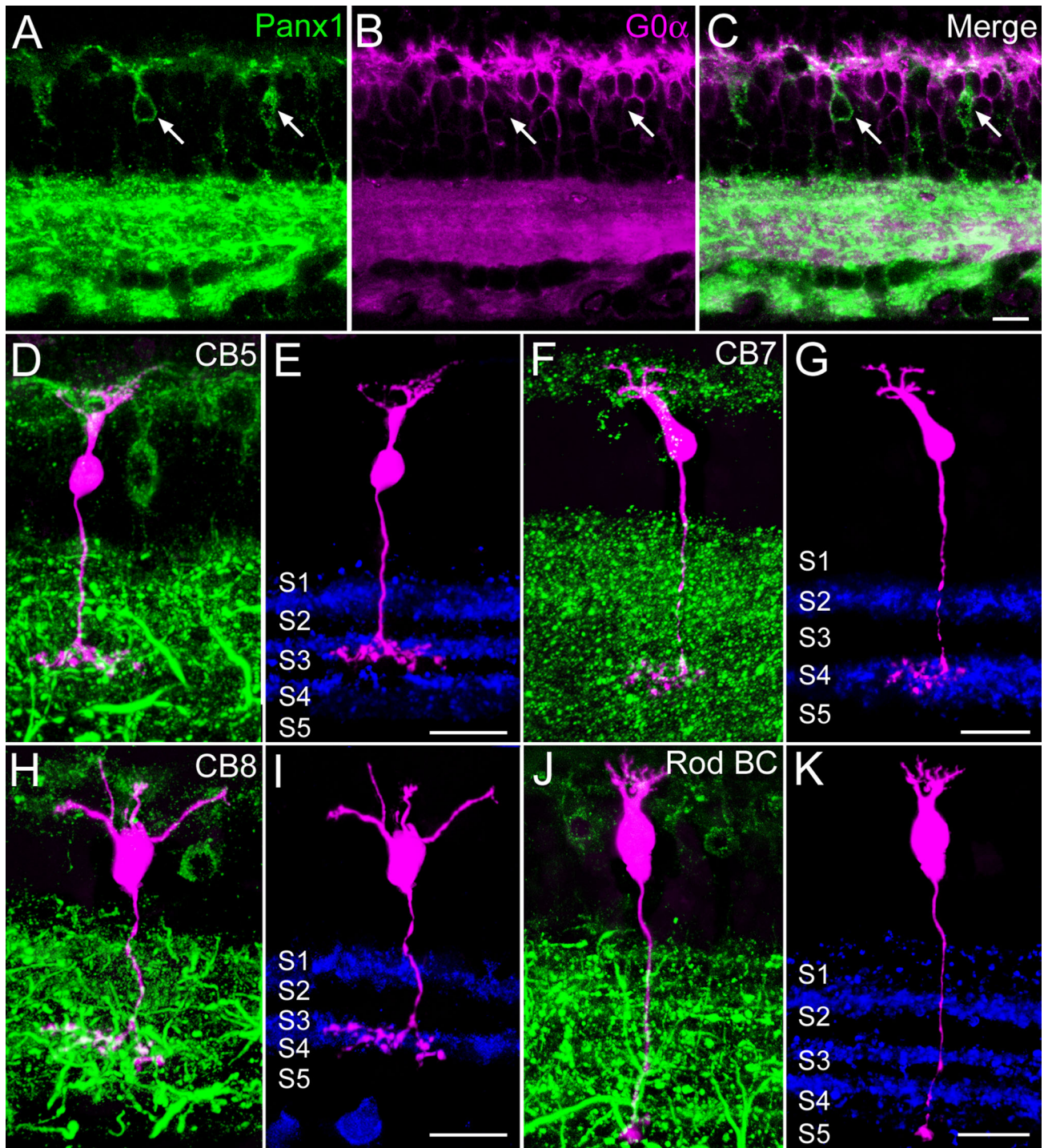


Figure 3. Panx1 is absent from ON bipolar cells. A–C: Immunoreactivity of Panx1 (A; green) and the ON bipolar cell marker G0 α (B; magenta) did not colocalize (C). Arrows point to the position of Panx1-positive cells. D–K: Dye injection of several ON bipolar cell types (magenta) revealed no colocalization with the Panx1 immunosignal for putative CB5 (D), CB7 (F), CB8 (H), and rod bipolar cells (J). Blue bands indicate the stratification of the IPL as revealed by calretinin (E,K) or ChAT immunoreactivity (G,I). Scale bars = 20 μ m for A–C; 10 μ m for D–K.

Fig. 1C) in vertical retina sections suggest horizontal cells as being Panx1-positive cells too. In a double-labeling approach using the calcium-binding protein calbindin as a marker for mouse horizontal cells (Röhrenbeck et al., 1987) some Panx1-immunoreactive puncta were located

more distally of the bipolar cell signal (Fig. 5A; short arrow) and correlated with calbindin-positive processes (Fig. 5A; long arrows). Single confocal scans revealed small Panx1 clusters directly adjacent to the calbindin immunosignal in the distal part of the OPL (Fig. 5B;

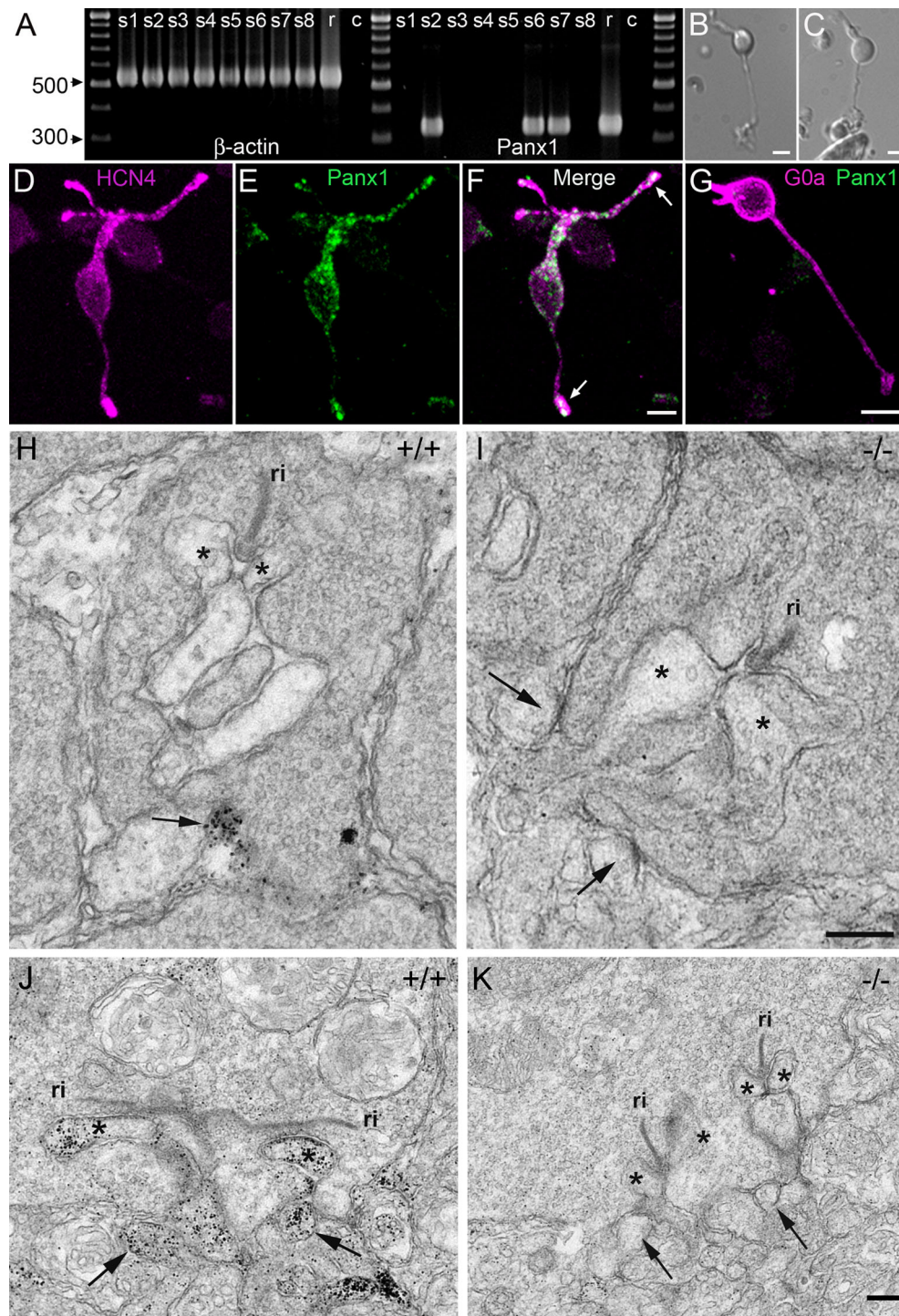


Figure 4. Expression of Panx1 in OFF bipolar cells. **A:** RT-PCR analysis of OFF bipolar cell samples (s1–s8). Intron-spanning β -actin primers confirmed amplification of cDNA (573 bp) and excluded contamination with genomic DNA (1,027 bp). Panx1 was detected in three out of eight samples. Retinal cDNA (r) was used as internal control. Negative control (c) without template. **B,C:** Examples of collected OFF bipolar cells. **D–G:** Confocal micrographs of isolated bipolar cells. Panx1 immunosignal was present in HCN4-immunoreactive CB3a cells (D–F) with a punctate reactivity pattern in the membrane of the soma, on dendrites (upper arrow) and the axon terminal (lower arrow). No Panx1 immunolabel was found in ON bipolar cells identified by G0 α immunoreactivity (G). **H–K:** Electron micrographs of vertical sections showing the terminals of rods (H,I) and cones (J,K). Panx1 immunoreactivity was present in putative bipolar cell dendrites (arrows) forming flat contacts to the bases of rod spherules (H) and cone pedicles (J) in Panx1^{+/+} retina while similar structures in the Panx1 KO condition were devoid of immunoreactivity (I,K; arrows). Asterisks indicate horizontal cell processes ascending towards the synaptic ribbon (ri). Scale bars = 10 μ m for B–G; 250 nm for H–J.

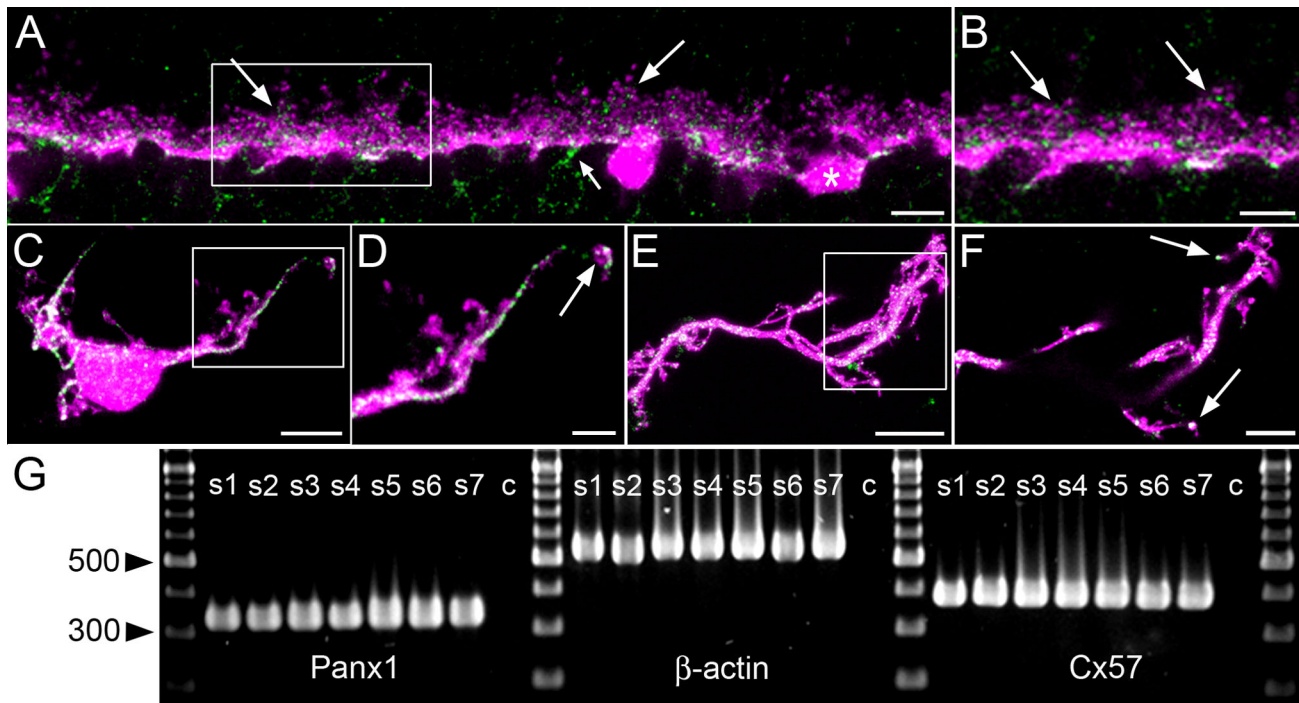


Figure 5. Panx1 expression in horizontal cells. **A,B:** Panx1 immunoreactivity (green) in the OPL of vertical retina sections. Horizontal cells were identified by calbindin immunoreactivity (magenta). Panx1 immunosignal was marginally present in horizontal cell somata (asterisk in A). A single confocal scan of the area pointed out in A revealed colocalization of Panx1-immunoreactive puncta with horizontal cell processes (long arrows in B). The short arrow indicates a Panx1-positive bipolar cell dendrite. **C–F:** Isolated horizontal cells highlighted by calbindin immunosignal (magenta) depicted Panx1-immunoreactive puncta (white dots) in dendrites (C,D) and axonal processes (E,F). Single confocal scans of the indicated areas in C and E revealed the localization of Panx1 clusters at the tips of dendrites (arrow in D) and axon terminal processes (arrows in F). **G:** RT-PCR analysis of isolated horizontal cell samples revealed detection of Panx1 mRNA in horizontal cell samples (s1–s7). Intron-spanning β -actin primers confirmed cDNA amplification and excluded contamination with genomic DNA. Amplification of the horizontal cell specific connexin57 (Cx57) guaranteed that cDNA was based on horizontal cell mRNA. Negative control (c) without template. Scale bars = 10 μ m for A,C,E; 5 μ m for B,D,F.

arrows), and Panx1 was, to a weaker extent, present in horizontal cell somata (Fig. 5A; asterisk). For distinction between dendritic and axon terminal structures we examined the distribution of Panx1 in dissociated horizontal cells (Fig. 5C,D) and axon terminals (Fig. 5E,F) labeled with calbindin. Panx1 immunolabel was found in all horizontal cells with a pronounced expression along the dendrites and a lower abundance in the cell body (Fig. 5C). In single confocal scans Panx1 immunoreactivity appeared as distinct clusters arranged in line along the processes and at the tips of the dendrites (Fig. 5D; arrow). In the same way, axon terminals were Panx1-positive (Fig. 5E) and even displayed Panx1-immunoreactive clusters at the terminal processes (Fig. 5F; arrows).

RT-PCR analysis on single-cell samples confirmed the expression of Panx1 in horizontal cells. Obtained cDNA was checked for horizontal cell origin by searching for Cx57 transcripts (Fig. 5G; right), because Cx57 is specific to horizontal cells in mouse retina (Hombach et al., 2004). In addition, β -actin served as internal cDNA control to exclude contamination with genomic DNA (Fig. 5G;

center). Panx1 transcripts were detected in all cDNA samples (Fig. 5G; left).

A more detailed resolution of the Panx1 distribution in the distal part of the OPL was obtained by electron microscopy of tangential retinal slices. Horizontal cell processes invaginate photoreceptor terminals and represent lateral processes at the synaptic ribbon (Fig. 6; asterisks) with dendrites contacting cone pedicles and axonal processes invaginating rod spherules. Ultrastructural analysis on the level of the photoreceptor synapses revealed Panx1 immunolabel at the tips of horizontal cell invaginations located in rod spherules (Fig. 6A; arrow) and occasionally in cone pedicles (Fig. 6C; arrow), which was not discerned in Panx1^{-/-} mice (Fig. 6B,D).

Electroretinograms are altered in Pannexin 1 knockout mice

The functional role of Panx1 in the retina was assessed by electroretinography, which is a common noninvasive technique allowing the characterization of mouse

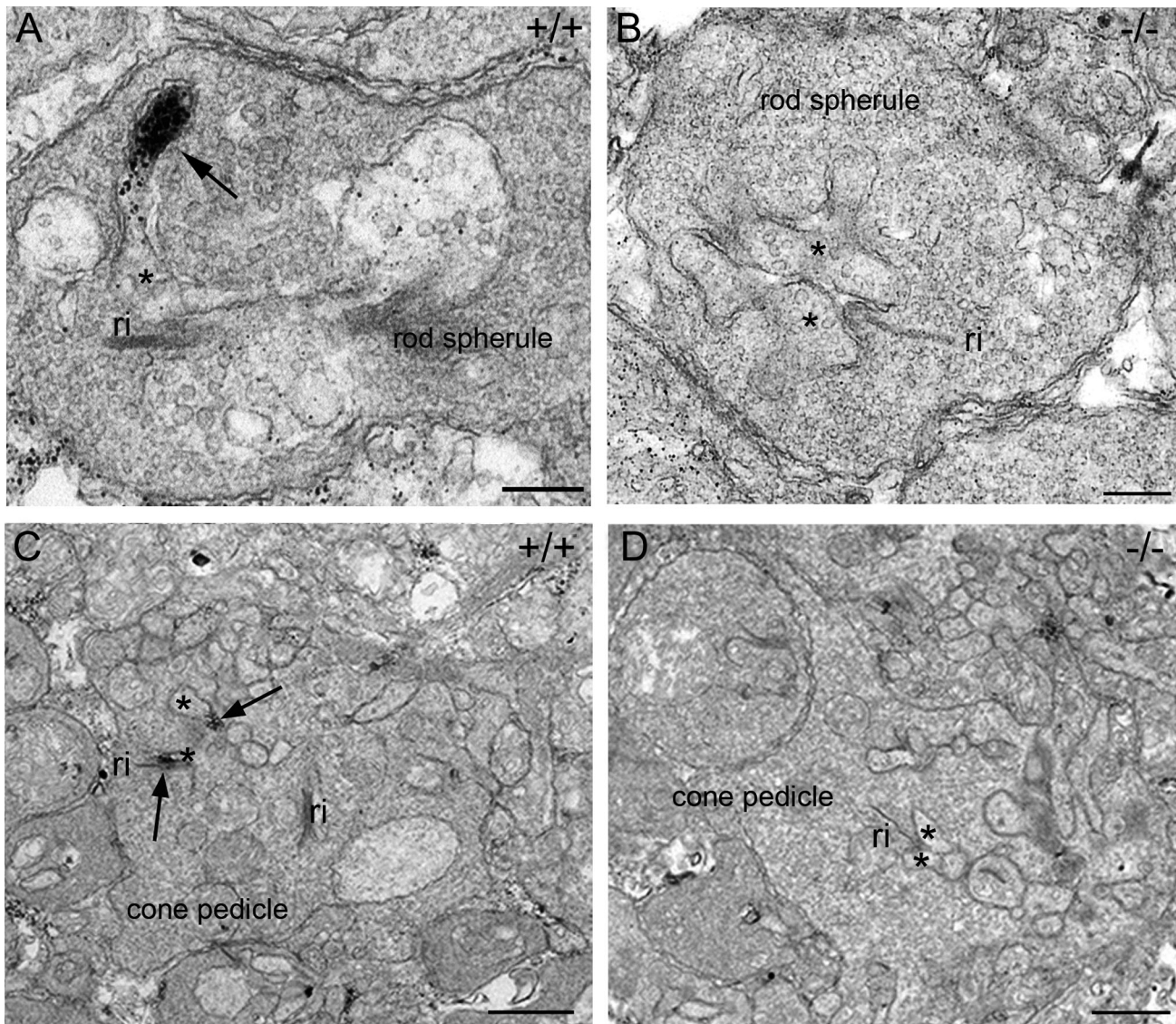


Figure 6. Ultrastructural localization of Panx1 in terminal structures of horizontal cells. In tangential sections of the OPL Panx1 immunolabel was found at the tips of horizontal cell processes invaginating rod spherules (arrow in A) and cone pedicles (arrows in C). Asterisks indicate the position of horizontal cell processes at the ribbon synapse (ri). In Panx1-deficient mice horizontal cell processes were devoid of the Panx1 immunosignal (B,D). Scale bars = 0.2 μm for A,B; 0.1 μm for C,D.

mutants with visual deficiencies (Pinto et al., 2007). The recordings displayed the typical appearance of an ERG with the initial negative a-wave followed by a positive b-wave that is superimposed by oscillatory potentials (Fig. 7A). Deficiency of Panx1 affected the light properties of the scotopic, but not the photopic ERG. Under scotopic conditions, a- and b-wave amplitudes of Panx1^{-/-} mice were increased compared to Panx1^{+/+} mice, especially at higher light intensities (Fig. 7A,B). This effect was validated by two-way ANOVA, revealing a difference between Panx1^{-/-} and Panx1^{+/+} animals (a-wave $F_{(1,180)} = 4.04$, $P < 0.05$; b-wave $F_{(1,180)} = 18.54$, $P < 0.001$) and an effect of light intensity (a-wave $F_{(9,180)} = 71.01$, $P < 0.001$; b-wave $F_{(9,180)} = 49.69$, $P < 0.001$). In contrast,

no effect of interaction was observed (a-wave $F_{(9,180)} = 0.87$, $P = 0.55$; b-wave $F_{(9,180)} = 0.42$, $P = 0.92$). Implicit time (IT) of the a- and b-wave decreased with rising stimulus intensity for both genotypes (a-wave $F_{(9,180)} = 6.11$, $P < 0.001$; b-wave $F_{(9,180)} = 50.70$, $P < 0.001$), but did not display a difference between the genotypes (a-wave $F_{(1,180)} = 0.29$, $P = 0.59$; b-wave $F_{(1,180)} = 3.41$, $P = 0.067$; Fig. 7C). These data suggest that Panx1 deficiency interferes with retinal activity in the dark-adapted condition without affecting the temporal properties of the signal transmission.

Under photopic conditions the a-wave was lacking (Fig. 7D), because rods were saturated by background light (Peachey and Ball, 2003). The b-wave was smaller

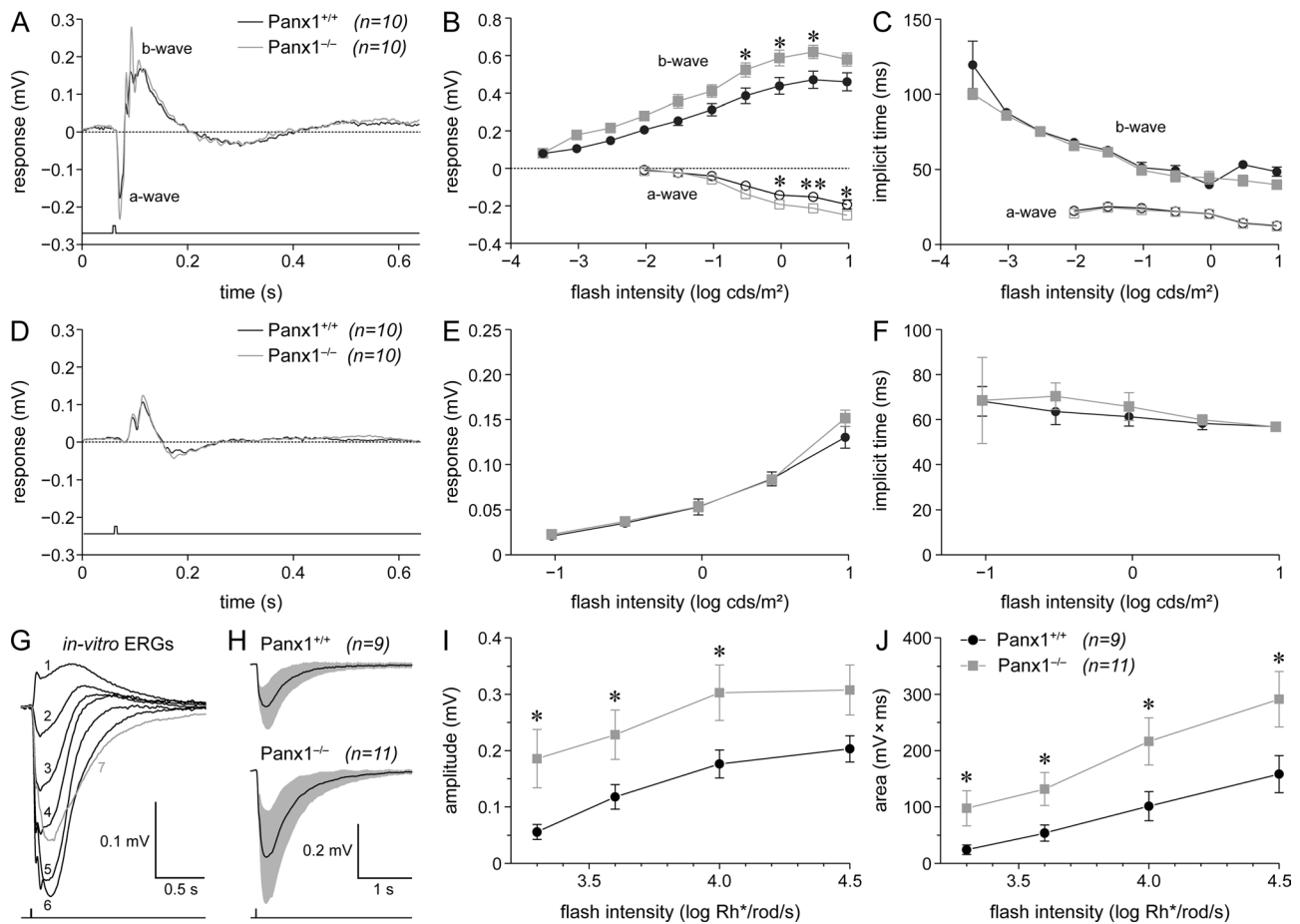


Figure 7. Influence of Panx1 deficiency on retinal light response properties. **A–C:** Impact on the scotopic ERG. Average scotopic ERGs of Panx1^{+/+} (black) and Panx1^{-/-} mice (gray) evoked by a light flash (bottom trace) of 9.5 cds/m² (A). Scotopic intensity–response relationships revealed larger response amplitudes of the a- and b-wave in Panx1^{-/-} mice (B). No difference between genotypes was found for the implicit times (IT) of the ERG components (C). **D–F:** The photopic ERG was not influenced by lack of Panx1 with respect to general waveform (D), intensity–response curve (E), and IT (F) of the b-wave. Average ERGs in D were evoked by a light flash of 9.5 cds/m² given against a background illumination of 25 cds/m². **G:** Recording of in vitro ERGs from the isolated retina. Responses to a light flash (bottom trace; 9.7×10^3 rhodopsin photoisomerizations per rod per second) depend on the penetration depth of the recording electrode. ERG waveform is shown for transretinal recording (trace 1) and for advancement of the electrode in 25–30 μ m increments (traces 2–7) towards the ganglion cell side. The gray trace was obtained from a depth of about 165 μ m and represents the recording condition for the remaining charts. **H–J:** Effect of Panx1 deficiency on in vitro ERGs recorded from the inner retina. Average ERGs (solid line; shaded area: standard deviation) differed between Panx1^{+/+} and Panx1^{-/-} mice (H). Panx1^{-/-} mice displayed responses with larger amplitudes (I) and which enclosed a more extended area (J) than ERGs obtained from Panx1^{+/+} mice. Error bars represent SEM. Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

compared to the scotopic condition, but displayed no difference between Panx1-deficient mice and Panx1-expressing controls with respect to amplitude ($F_{(1,90)} = 1.19$, $P = 0.28$; Fig. 7E) and IT ($F_{(1,90)} = 1.55$, $P = 0.22$; Fig. 7F). Whereas the b-wave amplitude increased with stimulus intensity ($F_{(4,90)} = 80.98$, $P < 0.001$), the IT remained unaltered ($F_{(4,90)} = 2.08$, $P = 0.09$). Also, no effect of interaction was detected (amplitude $F_{(4,90)} = 0.46$, $P = 0.77$; IT $F_{(4,90)} = 1.31$, $P = 0.27$).

Interestingly, in a current study using a different Panx1 KO mouse line scotopic and photopic ERGs from KO animals were indistinguishable from WT littermates

(Dvorianchikova et al., 2012). In that study slightly lower stimulus intensities were used compared to those leading to a substantial difference in our study (Fig. 7B). Therefore, electroretinographic experiments on isolated retinas (in vitro ERGs) were performed to verify the outcome of the in vivo recordings and to obtain information from different retinal layers (Green and Kapousta-Bruneau, 1999). Transretinally recorded ERGs consisted of a positive transient followed by a slower wave of the same polarity and similar amplitude (Fig. 7G; trace 1). The response amplitude increased with stimulus intensity, and IT of the initial component was shortened. Advancing

the recording electrode deeper into the retina changed the ERG into a large wave of negative polarity, the onset of which was characterized by a transient or small inflexion with the same IT as the transretinally recorded initial positive component (Fig. 7G; trace 2–7). Since this response component persisted during inhibition of glutamatergic transmission (50 μ M APB, 10 μ M CNQX), it can be attributed to photoreceptor activity, leaving the larger part of the response to activity postsynaptic to photoreceptors. Amplitudes of these inverted ERG waveforms increased with electrode penetration until a depth of 110–135 μ m, and from there decreased while the response decay slowed down. This recording profile was similar for both genotypes, and special regard was given to ERG recording at a penetration depth of 165–190 μ m to emphasize the contribution of activity arising from the inner retina. Panx1^{-/-} mice ($n = 11$) displayed larger amplitudes of the second response component (Fig. 7H,I) compared to Panx1^{+/+} animals ($n = 9$), and the difference was confirmed by two-way ANOVA ($F_{(1,69)} = 18.66$, $P < 0.0001$). There was an effect of light intensity ($F_{(3,69)} = 5.01$, $P < 0.005$), but none of interaction ($F_{(3,69)} = 0.05$, $P = 0.99$). Also, the area enclosed by the response trace differed between the genotypes ($F_{(1,69)} = 17.35$, $P < 0.0001$) and stimulus intensities ($F_{(3,69)} = 9.12$, $P < 0.0001$) without any effect of interaction ($F_{(3,69)} = 0.37$, $P = 0.78$). The response area of Panx1^{+/+} mice was out-sized by that of Panx1-deficient mice (Fig. 7J), reflecting the increased amplitude and slightly decelerated response decay in the KO condition. The in vitro ERGs thus confirmed the alteration of response properties caused by Panx1-deficiency.

DISCUSSION

The current study employed for the first time Panx1 KO mice to verify the distribution and investigate the function of Panx1 in the retina by using immunohistochemical methods and ERG recordings. Panx1 expression was prominent in horizontal cells as well as in CB3a-type OFF bipolar cells, and scotopic ERGs had enlarged a- and b-waves in Panx1-deficient mice.

Specificity of the Panx1 antibody in the mouse retina

The membrane-associated 47-kDa protein detected by the Panx1 antibody exclusively in WT homogenates corresponds well to the molecular weight of Panx1 (Penuela et al., 2007; Dvorianchikova et al., 2012), and we therefore consider it as retinal Panx1. A second protein of about 58 kDa may represent a posttranslationally modified isoform, as Panx1 exhibits a glycosylation site at the second extracellular loop and exists in different glycosyla-

tion stages that play a role in its transportation to the cell membrane (Boassa et al., 2007; Penuela et al., 2007). Furthermore, the protein sequence of Panx1 manifests several putative phosphorylation sites (Penuela et al., 2007; Prochnow et al., 2009), and it is likely that phosphorylation modulates the functional properties of Panx1 as shown for Cx36 in the mouse retina (Urschel et al., 2006), but is also probable of being lost during subcellular fractionation leading to the absence of the band in the membrane fraction.

Specificity of the Panx1 antibody was confirmed for labeling in the outer retina, but not in the IPL and GCL. The antibody may therefore recognize different splice variants (isoforms) of Panx1 or may crossreact with completely different proteins. However, a BLAST search using the UniProt rodent database confirmed the high specificity of the epitope and revealed only one unrelated protein, termed Casp8ap2, which shares about half the amino acids with the Panx1 immunization peptide and is typically located in the cytoplasm or nucleus, but not at the membrane (Milovic-Holm et al., 2007). Against this background we consider the anti-Panx1 antibody specific for retinal cells making synaptic contacts in the OPL and used it as a tool for a detailed investigation of the Panx1 distribution in the outer retina.

Distribution of Panx1 in the mouse retina

Panx1 expression in the OPL and INL is in line with the work of Ray et al. (2005). In CB3a cells, Panx1 localization displayed no preference for a specific compartment. However, Panx1 expression in axon terminals could not be claimed with certainty, as Panx1 immunolabeling did not show a specific signal in the IPL. CB3a cells provide for an alternative pathway in rod signaling (Mataruga et al., 2007), and the expression of Panx1 adds to the distinctness of these cells from CB3b cells, underlining that both represent in fact diverse subclasses of OFF cone bipolar cells.

Panx1 expression in horizontal cells was restricted to dendritic and axonal processes and was nearly absent from somata, consistent with previous studies (Ray et al., 2005; Dvorianchikova et al., 2006; Prochnow et al., 2009). The murine retina has a single type of horizontal cell that receives cone input at the dendrites and rod input at the axon terminals (Peichl and Gonzalez-Soriano, 1993). Both compartments maintain separate networks based on gap junctions consisting of Cx57 (Hombach et al., 2004; Janssen-Bienhold et al., 2009). In contrast to Cx57, Panx1 forms single-membrane channels (Sosinsky et al., 2011), a feature that points to a function differing from gap junctional coupling. The presence of Panx1 at the tips of horizontal cell processes that invaginate photoreceptor terminals parallels recent findings from the

zebrafish retina (Prochnow et al., 2009) and is also reminiscent of the localization of connexin hemichannels in fish and turtle (Kamermans et al., 2001; Pottek et al., 2003). Also, this localization is close to the position of purinergic P2X₇ receptors at the photoreceptor synapse (Puthusseray et al., 2006), which is notable, as pannexins are suggested to provide a release channel for the messenger ATP (MacVicar and Thompson, 2010).

Physiological implications of Panx1

Absence of Panx1 resulted in altered light responses. Signals arising from rod and rod bipolar cell activity were enhanced in Panx1^{-/-} mice in the dark-adapted condition, while no difference compared to Panx1^{+/+} mice was found when the cone pathway was studied during saturation of the rod pathway. How does this relate to the localization of Panx1 in type CB3a OFF bipolar cells and horizontal cells?

The b-wave of the ERG reflects light-evoked activity of ON bipolar cells, which gives rise to extracellular current flowing towards the sink in the OPL (Stockton and Slaughter, 1989). Panx1 channels situated along dendrites and somata of CB3a cells may provide a competing current sink reducing the radial current flow. Removal of this sink by loss of Panx1 channels as in the KO condition may therefore result in an enlarged b-wave. However, lack of Panx1 did not modify the ERG in the photopic condition, suggesting that the prolonged light adaptation prior to recording results in closure of Panx1 channels. A similar modulation is also known from retinal gap junctions (Bloomfield et al., 1997; Xin and Bloomfield, 1999).

The a-wave represents the reduction of the dark current due to the light-evoked events in photoreceptors and originates from the extracellular radial current that is directed from the photoreceptor inner segments towards the outer segments (Penn and Hagins, 1969). Also, currents arising at the photoreceptor synapse may contribute to the a-wave as shown by calculations on a model rod (Hagins et al., 1970) and by dihydropyridine block of L-type Ca²⁺ channels located at the photoreceptor terminals, which resulted in a reduced a-wave in mouse ERG (Banat et al., 2008). Consequently, Panx1 channels localized in bipolar cell dendrites and horizontal cell processes in close contact to photoreceptor terminals may provide an additional sink for extracellular current depending on darkness-related conductivity of the photoreceptor terminal membrane. When open during light stimulation, they would account for a somewhat smaller a-wave, making larger amplitudes in Panx1-deficient animals probable.

Currents in the photoreceptor terminal are regulated by negative horizontal cell feedback, which shapes bipolar cell receptive fields and enhances local contrasts. At present three different mechanisms are debated to

account for this pathway. Besides GABA as retrograde signal (Kaneko and Tachibana, 1986; Schwartz, 1987) and pH changes in the synaptic cleft (DeVries, 2001; Hirasawa and Kaneko, 2003; Vessey et al., 2005) a third idea promotes an ephaptic interaction between horizontal cells and photoreceptors (Kamermans et al., 2001). Connexin hemichannels present at horizontal cell dendritic tips invaginating the cone pedicles are thought to serve as current sinks for the return flow of the ionic charge movements arising from synaptic activity. The extracellular current directed into the photoreceptor cavity generates a voltage drop in the extracellular potential that shifts the activation curve of Ca²⁺ channels in the photoreceptor membrane towards more negative potentials, resulting in Ca²⁺ influx and subsequent increase of transmitter release. While this mechanism has been studied in fish (Kamermans et al., 2001; Fahrenfort et al., 2004; Klaassen et al., 2011) and turtle retina (Pottek et al., 2003), its presence is not confirmed thus far for mammals.

The localization of Panx1 immunoreactivity at the tips of horizontal cell processes found in the present study is reminiscent of the connexin hemichannel localization that is central to the ephaptic feedback pathway. Similarly, Panx1 is reported from horizontal cell dendrites invaginating cone pedicles of the zebrafish retina (Prochnow et al., 2009). Panx1 forms hexameric membrane channels that resemble connexin hemichannels, but in contrast do not depend on a strong depolarization for opening because they are not blocked by extracellular Ca²⁺ (Bruzzone et al., 2005). In fact, gating is achieved by an increase of intracellular Ca²⁺ at normal resting potential and regular external Ca²⁺ levels. This makes Panx1 a candidate for mediating horizontal cell to photoreceptor feedback by an ephaptic mechanism similar to that described for connexin hemichannels, especially in the mammalian retina where the requisite connexin localization at invaginating horizontal cell processes has not yet been found (Jansen-Bienhold et al., 2009). Moreover, feedback is only partly abolished in zebrafish mutants lacking Cx55.5 hemichannels in horizontal cells, leaving about 40% of the total hemichannel conductance for the contribution of other connexins or Panx1 (Klaassen et al., 2011). Feedback to rods was recently confirmed for the rod-dominated murine retina (Babai and Thoreson, 2009), and we also found Panx1 in axon terminal structures contacting rod spherules. Also, inhibition of feedback in cold-blooded animals is demonstrated by applying the nonselective gap junction and hemichannel blocker carbenoxolone (Kamermans et al., 2001; Pottek et al., 2003) that is inhibitory to pannexin channels as well (Bruzzone et al., 2005) making a contribution of Panx1 to feedback even more likely.

CONCLUSION

Two distinct cell populations in the retina were identified to express Panx1. The presence of Panx1 in horizontal cell processes invaginating the photoreceptor cavity suggests a role in outer retinal feedback similar to that discussed for connexin hemichannels, which is all the more appealing for the murine retina as in this species other hemichannels have not been found at this particular synapse. However, questions about the conditions which induce gating of Panx1 channels in an intact physiological environment are still unsettled. While this applies even more to the retina, our study adds to the notion of Panx1 contributing to neuronal activity in intact tissue.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Bettina Kewitz, Susanne Wallenstein, and Josef Meyer for expert technical assistance. We also thank Thomas Euler (University of Tübingen, Germany) for the light stimulation software QDS as well as Frank Müller (Forschungszentrum Jülich, Germany) for the anti-HCN4 antibody.

ROLE OF AUTHORS

All authors had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Study concept and design: UJB, KD, RW, SP, DWL; Acquisition of data: KK, BD, MP, RH, KS, PB, UJB; Analysis and interpretation of data: KK, BD, MP, RH, KS, PB, KD, UJB; Drafting of the article: KK, BD, MP, KD, UJB; Critical revision of the article for important intellectual content: RW, SP, DWL, HM; Obtained funding: RW; Administrative, technical, and material support: RW, HM, SP, DWL; Study supervision: UJB, KD.

LITERATURE CITED

- Ambrosi C, Gassmann O, Pranskevich JN, Boassa D, Smock A, Wang J, Dahl G, Steinem C, Sosinsky GE. 2010. Pannexin1 and Pannexin2 channels show quaternary similarities to connexons and different oligomerization numbers from each other. *J Biol Chem* 285:24420–24431.
- Anselmi F, Hernandez VH, Crispino G, Seydel A, Ortolano S, Roper SD, Kessar N, Richardson W, Rickheit G, Filippov MA, Monyer H, Mammano F. 2008. ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca^{2+} signals across the inner ear. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:18770–18775.
- Babai N, Thoreson WB. 2009. Horizontal cell feedback regulates calcium currents and intracellular calcium levels in rod photoreceptors of salamander and mouse retina. *J Physiol* 587:2353–2364.
- Banat M, Lüke M, Siapich SA, Hescheler J, Weiergräber M, Schneider T. 2008. The dihydropyridine isradipine inhibits the murine but not the bovine a-wave response of the electroretinogram. *Acta Ophthalmol* 86:676–682.
- Baranova A, Ivanov D, Petrash N, Pestova A, Skoblov M, Kelmanson I, Shagin D, Nazarenko S, Geraymovych E, Litvin O, Tiunova A, Born TL, Usman N, Staroverov D, Lukyanov S, Panchin Y. 2004. The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics* 83:706–716.
- Barbe MT, Monyer H, Bruzzone R. 2006. Cell-cell communication beyond connexins: the pannexin channels. *Physiology (Bethesda)* 21:103–114.
- Bargiotas P, Krenz A, Hormuzdi SG, Ridder DA, Herb A, Barakat W, Penuela S, von Engelhardt J, Monyer H, Schwaninger M. 2011. Pannexins in ischemia-induced neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:20772–20777.
- Bloomfield SA, Völgyi B. 2009. The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. *Nat Rev Neurosci* 10:495–506.
- Bloomfield SA, Xin D., Osborne T. 1997. Light-induced modulation of coupling between All amacrine cells in the rabbit retina. *Vis Neurosci* 14:565–576.
- Boassa D, Ambrosi C, Qiu F, Dahl G, Gaietta G, Sosinsky G. 2007. Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. *J Biol Chem* 282:31733–31743.
- Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, Herb A, Monyer H. 2003. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13644–13649.
- Bruzzone R, Barbe MT, Jakob NJ, Monyer H. 2005. Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurochem* 92:1033–1043.
- DeVries SH. 2001. Exocytosed protons feedback to suppress the Ca^{2+} current in mammalian cone photoreceptors. *Neuron* 32:1107–1117.
- D'hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Bultynck G, Himpens B. 2009. Pannexins, distant relatives of the connexin family with specific cellular functions? *Bioessays* 31:953–974.
- Dvorianchikova G, Ivanov D, Panchin Y, Shestopalov VI. 2006. Expression of pannexin family of proteins in the retina. *FEBS Lett* 580:2178–2182.
- Dvorianchikova G, Ivanov D, Barakat D, Grinberg A, Wen R, Slepak VZ, Shestopalov VI. 2012. Genetic ablation of Pannexin1 protects retinal neurons from ischemic injury. *PLoS ONE* 7:e31991.
- Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L. 2006. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signaling limelight. *Biochem J* 397:1–14.
- Fahrenfort I, Sjoerdsma T, Ripps H, Kamermans M. 2004. Cobalt ions inhibit negative feedback in the outer retina by blocking hemichannels on horizontal cells. *Vis Neurosci* 21:501–511.
- Feigenspan A, Weiler R. 2004. Electrophysiological properties of mouse horizontal cell GABA_A receptors. *J Neurophysiol* 92:2789–2801.
- Fox MA, Sanes JR. 2007. Synaptotagmin I and II are present in distinct subsets of central synapses. *J Comp Neurol* 503:280–296.
- Frank M, Eiberger B, Janssen-Bienhold U, de Sevilla Müller LP, Tjarks A, Kim JS, Maschke S, Dobrowolski R, Sasse P, Weiler R, Fleischmann BK, Willecke K. 2010. Neuronal connexin-36 can functionally replace connexin-45 in mouse retina but not in the developing heart. *J Cell Sci* 123:3605–3615.
- Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, Feigenspan A, Wässle H. 2004. Types of bipolar cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 469:70–82.
- Green DG, Kapousta-Bruneau NV. 1999. A dissection of the electroretinogram from the isolated rat retina with microelectrodes and drugs. *Vis Neurosci* 16:727–741.

- Güldenagel M, Söhl G, Plum A, Traub O, Teubner B, Weiler R, Willecke K. 2000. Expression patterns of connexin genes in mouse retina. *J Comp Neurol* 425:193–201.
- Hagins WA, Penn RD, Yoshikami S. 1970. Dark current and photocurrent in retinal rods. *Biophys J* 10:380–412.
- Haverkamp S, Wässle H. 2000. Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 424:1–23.
- Haverkamp S, Specht D, Majumdar S, Zaidi NF, Brandstätter JH, Wasco W, Wässle H, Tom Dieck S. 2008. Type 4 OFF cone bipolar cells of the mouse retina express calsinin and contact cones as well as rods. *J Comp Neurol* 507:1087–1101.
- Hilgen G, von Maltzahn J, Willecke K, Weiler R, Dedek K. 2011. Subcellular distribution of connexin45 in OFF bipolar cells of the mouse retina. *J Comp Neurol* 519:433–450.
- Hirasawa H, Kaneko A. 2003. pH changes in the invaginating synaptic cleft mediate feedback from horizontal cells to cone photoreceptors by modulating Ca²⁺ channels. *J Gen Physiol* 122:657–671.
- Hombach S, Janssen-Bienhold U, Söhl G, Schubert T, Büsow H, Ott T, Weiler R, Willecke K. 2004. Functional expression of connexin57 in horizontal cells of the mouse retina. *Eur J Neurosci* 19:2633–2640.
- Janssen-Bienhold U, Trümpner J, Hilgen G, Schultz K, Müller LP, Sonntag S, Dedek K, Dirks P, Willecke K, Weiler R. 2009. Connexin57 is expressed in dendro-dendritic and axo-axonal gap junctions of mouse horizontal cells and its distribution is modulated by light. *J Comp Neurol* 513:363–374.
- Kamermans M, Fahrenfort I, Schultz K, Janssen-Bienhold U, Sjoerdsma T, Weiler R. 2001. Hemichannel-mediated inhibition in the outer retina. *Science* 292:1178–1180.
- Kaneko A, Tachibana M. 1986. Effects of gamma-aminobutyric acid on isolated cone photoreceptors of the turtle retina. *J Physiol* 373:443–461.
- Klaassen LJ, Sun Z, Steijaert MN, Bolte P, Fahrenfort I, Sjoerdsma T, Klooster J, Claassen Y, Shields CR, Ten Eikelder HM, Janssen-Bienhold U, Zoidl G, McMahon DG, Kamermans M. 2011. Synaptic transmission from horizontal cells to cones is impaired by loss of connexin hemichannels. *PLoS Biol* 9:e1001107.
- MacVicar BA, Thompson RJ. 2010. Non-junction functions of pannexin-1 channels. *Trends Neurosci* 33:93–102.
- Masland RH. 2001. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 4:877–886.
- Mataruga A, Kremmer E, Müller F. 2007. Type 3a and type 3b OFF cone bipolar cells provide for the alternative rod pathway in the mouse retina. *J Comp Neurol* 502:1123–1137.
- Milovic-Holm K, Kriehoff E, Jensen K, Will H, Hofmann TG. 2007. FLASH links the CD95 signaling pathway to the cell nucleus and nuclear bodies. *EMBO J* 26:91–401.
- Miyata S, Nakai S, Kiyohara T, Hatton GI. 2000. Calbindin-D28k and calretinin in the rat posterior pituitary; light and electron microscopic localization and upregulation with dehydration. *J Neurocytol* 29:5–17.
- Panchin Y, Kelmanson I, Matz M, Lukyanov K, Usman N, Lukyanov S. 2000. A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Curr Biol* 10:R473–474.
- Peachey NS, Ball SL. 2003. Electrophysiological analysis of visual function in mutant mice. *Doc Ophthalmol* 107:13–36.
- Peichl L, Gonzalez-Soriano J. 1993. Unexpected presence of neurofilaments in axon-bearing horizontal cells of the mammalian retina. *J Neurosci* 13:4091–4100.
- Penn RD, Hagins WA. 1969. Signal transmission along retinal rods and the origin of the electroretinographic a-wave. *Nature* 223:201–204.
- Penuela S, Bhalla R, Gong XQ, Cowan KN, Celetti SJ, Cowan BJ, Bai D, Shao Q, Laird DW. 2007. Pannexin 1 and pannexin 3 are glycoproteins that exhibit many distinct characteristics from the connexin family of gap junction proteins. *J Cell Sci* 120:3772–3783.
- Penuela S, Bhalla R, Nag K, Laird DW. 2009. Glycosylation regulates pannexin intermixing and cellular localization. *Mol Biol Cell* 20:4313–4323.
- Pinto LH, Invergo B, Shimomura K, Takahashi JS, Troy JB. 2007. Interpretation of the mouse electroretinogram. *Doc Ophthalmol* 115:127–136.
- Pottek M, Hoppenstedt W, Janssen-Bienhold U, Schultz K, Perlman I, Weiler R. 2003. Contribution of connexin26 to electrical feedback inhibition in the turtle retina. *J Comp Neurol* 466:468–477.
- Prochnow N, Hoffmann S, Vroman R, Klooster J, Bunse S, Kamermans M, Dermietzel R, Zoidl G. 2009. Pannexin1 in the outer retina of the zebrafish, *Danio rerio*. *Neuroscience* 162:1039–1054.
- Puthussery T, Yee P, Vingrys AJ, Fletcher EL. 2006. Evidence for the involvement of purinergic P2X receptors in outer retinal processing. *Eur J Neurosci* 24:7–19.
- Ray A, Zoidl G, Weickert S, Wahle P, Dermietzel R. 2005. Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous system. *Eur J Neurosci* 21:3277–3290.
- Röhrenbeck J, Wässle H, Heizmann CW. 1987. Immunocytochemical labelling of horizontal cells in mammalian retina using antibodies against calcium-binding proteins. *Neurosci Lett* 77:255–260.
- Schwartz EA. 1987. Depolarization without calcium can release gamma-aminobutyric acid from a retinal neuron. *Science* 238:350–355.
- Shestopalov VI, Panchin Y. 2008. Pannexins and gap junction protein diversity. *Cell Mol Life Sci* 65:376–394.
- Sosinsky GE, Boassa D, Dermietzel R, Duffy HS, Laird DW, MacVicar B, Naus CC, Penuela S, Scemes E, Spray DC, Thompson RJ, Zhao HB, Dahl G. 2011. Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels (Austin)* 5:193–197.
- Spray DC, Ye ZC, Ransom BR. 2006. Functional connexin “hemichannels”: a critical appraisal. *Glia* 54:758–773.
- Stockton RA, Slaughter MM. 1989. B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *J Gen Physiol* 93:101–122.
- Urschel S, Höher T, Schubert T, Alev C, Söhl G, Wörsdorfer P, Asahara T, Dermietzel R, Weiler R, Willecke K. 2006. Protein kinase A-mediated phosphorylation of connexin36 in mouse retina results in decreased gap junctional communication between All amacrine cells. *J Biol Chem* 281:33163–33171.
- Vessey JP, Stratis AK, Daniels BA, Da Silva N, Jonz MG, Lalonde MR, Baldrige WH, Barnes S. 2005. Proton-mediated feedback inhibition of presynaptic calcium channels at the cone photoreceptor synapse. *J Neurosci* 25:4108–4117.
- Wässle H, Puller C, Müller F, Haverkamp S. 2009. Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. *J Neurosci* 29:106–117.
- Xin D, Bloomfield SA. 1999. Dark- and light-induced changes in coupling between horizontal cells in mammalian retina. *J Comp Neurol* 405:75–87.
- Yip V, Carter JG, Pusateri ME, McDougal DB Jr, Lowry OH. 1991. Distribution in brain and retina of four enzymes of acetyl CoA synthesis in relation to choline acetyl transferase and acetylcholine esterase. *Neurochem Res* 16:629–635.

**Testing for a gap junction-mediated bystander effect in retinitis pigmentosa:
secondary cone death is not altered by deletion of connexin36 from cones**

Katharina Kranz¹, François Paquet-Durand², Reto Weiler¹, Ulrike Janssen-Bienhold^{1*}, Karin Dedek^{1*}

¹Department of Neurobiology, University of Oldenburg, Oldenburg, Germany

²Institute for Ophthalmic Research, Centre for Ophthalmology, University of Tübingen, Tübingen, Germany

* both authors contributed equally

Corresponding author:

PD Dr. Karin Dedek, University of Oldenburg, Department of Neurobiology,
P. O. Box 2503, D-26111 Oldenburg, Germany

karin.dedek@uni-oldenburg.de

ABSTRACT

Retinitis pigmentosa (RP) relates to a group of hereditary neurodegenerative diseases of the retina. On the cellular level, RP results in the primary death of rod photoreceptors, caused by rod-specific mutations, followed by a secondary degeneration of genetically normal cones. Different mechanisms may influence the spread of cell death from one photoreceptor type to the other. As one of these mechanisms a gap junction-mediated bystander effect was proposed, i.e., toxic molecules generated in dying rods and propagating through gap junctions induce the death of healthy cone photoreceptors. We investigated whether disruption of rod-cone coupling can prevent secondary cone death and reduce the spread of degeneration. We tested this hypothesis in two different mouse models for retinal degeneration (rhodopsin knockout and *rd1*) by crossbreeding them with connexin36-deficient mice as connexin36 represents the gap junction protein on the cone side and lack thereof most likely disrupts rod-cone coupling. Using immunohistochemistry, we compared the progress of cone degeneration between connexin36-deficient mouse mutants and their connexin36-expressing littermates at different ages and assessed the accompanied morphological changes during the onset (rhodopsin knockout) and later stages of secondary cone death (*rd1* mutants). Connexin36-deficient mouse mutants showed the same time course of cone degeneration and the same morphological changes in second order neurons as their connexin36-expressing littermates. Thus, our results indicate that disruption of connexin36-mediated rod-cone coupling does not stop, delay or spatially restrict secondary cone degeneration and suggest that the gap junction-mediated bystander effect does not contribute to the progression of RP.

INTRODUCTION

Retinitis pigmentosa (RP) is a group of inherited retinal degenerative diseases characterized by a progressive loss of photoreceptor cells. RP is caused by mutations in a variety of genes (>40), predominantly expressed by rod photoreceptors [1]. Rod-specific mutations lead to primary cell death of rods, resulting in night blindness and tunnel vision in human patients. When the disease progresses, genetically normal cones also die, leading to loss of central vision and ultimately to blindness [1]. To date it is not understood how cell death propagates from dying rods to healthy cones in those forms of RP in which mutations occur only in rods [1]. However, studies from different RP mouse models showed that various mechanisms may contribute to secondary cone degeneration. Punzo et al. [2] suggested that cones may starve to death because progressive rod loss disrupts the physical interaction between photoreceptors and the supporting retinal pigment epithelium, thereby depriving cones from nutrients [2,3]. Also, deprivation from a rod-derived cone viability factor, which may be constantly released by healthy rod photoreceptors, could result in secondary cone death

[4,5]. Other studies suggested that cell death-inducing molecules, potentially released into the extracellular space by activated microglia cells [6,7], were involved. The *gap junction-mediated bystander effect* provides another explanation that is often considered [8,9]. In this scenario, the cell death-inducing signal is not released into the extracellular space but permeates from dying rods through gap junctions directly to healthy cones, thereby carrying cell death-promoting signals from one photoreceptor type to the other [8]. This hypothesis is supported by studies demonstrating that gap junction channels, which allow passage of small molecules (below ~1 kDa), are involved in controlling the death of retinal cells during development and after traumatic injury. Dying neuroblasts, for instance, generate gap junction-permeant apoptotic signals that mediate bystander killing during retinal development [9]. Studies on a trauma model in chicken retina demonstrated the spread of apoptotic cell death through gap junctions after mechanical damage [10].

To the best of our knowledge, to date the potential contribution of a gap junction-mediated bystander effect (mediated by rod-cone coupling) to secondary cone degeneration in RP has never been investigated. Therefore, we crossbred two different mouse models for RP with mice deficient for the gap junction protein connexin36 (Cx36). As Cx36 is expressed on the cone side of the gap junction [11-13], deletion of this connexin leads to a disruption of Cx36-dependent rod-cone coupling [14-16]. To investigate the influence of photoreceptor coupling on different stages of cone degeneration, we chose two mouse models for RP with different time courses of photoreceptor degeneration: the rhodopsin knockout (*Rho*^{-/-}) mouse is a slow model of photoreceptor degeneration [17]. The long time period between the onset of cone degeneration and the actual death of cones makes this RP mouse model suitable to investigate the influence of photoreceptor coupling on early events in cone degeneration. Later stages of cone degeneration, when the majority of cones have died, were analyzed in the *rd1* mouse, which represents a well-established model of fast photoreceptor degeneration [18].

RESULTS

Cx36 expression is not altered in *Rho*^{-/-} and *rd1* mice.

Physiological and structural analysis in wild-type (wt) retinas previously demonstrated that cone photoreceptors are functionally coupled to rods [14,15,19-22]. This coupling is mediated by the gap junction protein connexin36 (Cx36) expressed on the cone side [11,12,14] and another, yet unknown connexin on the rod side. To examine if secondary cone degeneration in *Rho*^{-/-} and *rd1* mice may potentially be influenced by the deletion of the cone connexin, we first investigated if both degeneration models exhibit a normal distribution of Cx36 in the outer plexiform layer (OPL; Fig. 1). Figure 1B shows the characteristic punctate distribution of Cx36 in vertical wt sections. Consistent with previous studies [12],

Cx36 immunoreactivity is stronger in the inner plexiform layer (IPL) than in the OPL where it is attributed to the dendrites of OFF bipolar cells and to cone photoreceptor endings [12]. A similar Cx36 distribution was obtained in retina sections from *Rho*^{-/-} [postnatal week (pw) 5, Fig. 1C] and *rd1* mice [postnatal day (p) 21, Fig. 1E]. Higher magnification revealed that the overall density of Cx36-positive puncta in the OPL of *Rho*^{-/-} (Fig. 1I) and *rd1* mice (Fig. 1K) was comparable to wild type (Fig. 1H), suggesting that Cx36 expression and most likely also rod-cone coupling are not altered in *Rho*^{-/-} and *rd1* mice.

To disrupt rod-cone coupling, both models were crossbred with Cx36 knockout mice (Cx36^{-/-}) [23]. As expected, Cx36 immunosignals were absent in retinas from *Rho*^{-/-}Cx36^{-/-} (Fig. 1D, J) and *rd1*Cx36^{-/-} (Fig. 1F, L) mice, allowing to directly test the effect of Cx36-dependent photoreceptor coupling on secondary cone degeneration in RP.

Time course of photoreceptor degeneration

To investigate if deletion of the cone connexin alters the progression of secondary cone degeneration, we compared the outer retinal morphology of Cx36-expressing (Fig. 2A-E; K-N) and Cx36-deficient (Fig. 2F-J; O-R) *Rho*^{-/-} (Fig. 2A-J) and *rd1* mice (Fig. 2K-R). Vertical cryosections were counterstained with antibodies against glycogen phosphorylase (glypho), to label the entire cone photoreceptor [24], and antibodies against velis-3, to stain the outer limiting membrane (OLM) and photoreceptor terminals [25]. Retinal layering was visualized with the nucleic acid stain TO-PRO-3. Figure 2 shows the difference in time course of rod photoreceptor degeneration between both models: the slow degeneration over a time period of four months in *Rho*^{-/-}Cx36^{+/+} and *Rho*^{-/-}Cx36^{-/-} mice (Fig. 2A-J) and the fast degeneration within one month in *rd1*Cx36^{+/+} and *rd1*Cx36^{-/-} mice (Fig. 2L-R).

In *Rho*^{-/-} mice, previous studies showed that photoreceptor degeneration starts with the loss of rods around pw3 to pw4 [17]. Consistently, at pw5 the ONL of *Rho*^{-/-} mice became thinner as the number of nuclei was reduced (Fig. 2B; 10-12 rows of nuclei) compared to wt mice (12-14 rows of nuclei; not shown). At this age, cones, however, were not affected by the primary degeneration and displayed their normal shape (Fig. 2B). Secondary cone degeneration starts around pw6 [26] when cones begin to change their morphology. With progressive rod loss, indicated by a further thinning of the ONL, cones became shorter (Fig. 2C) and gradually lost their outer (Fig. 2C) and inner segments (Fig. 2D, E). However, the major phase of cone death did not begin before pw17 [2]. At this time-point, most rods had died and the ONL was reduced to a single row of nuclei (Fig. 2E); velis-3-labeled photoreceptor terminals were hardly discernible (Fig. 2E). However, similar changes in the outer retinal morphology were also observed in *Rho*^{-/-}Cx36^{-/-} littermates (Fig. 2F-J).

In contrast to rhodopsin-deficient mice, photoreceptor degeneration in the *rd1* mouse model occurred within days and not weeks (Fig. 1K-R). Primary rod degeneration started

during retinal development around p11 [2] and reduced the ONL at p15 to half of its width (Fig. 2L). Cone morphology was already impaired in p15 *rd1Cx36^{+/+}* mice (Fig. 2L) as cones became smaller in size and the inner and outer segments regressed (Fig. 2L-N). In line with previous studies [2], our results showed that rod degeneration in *rd1Cx36^{+/+}* mice progressed rapidly and left only one row of nuclei in the ONL after the major phase of rod death at p21 (Fig. 2M). Around this time point, secondary cone death is initiated [27]. Consistently, the number of cells in the ONL further decreased (Fig. 2N) and cones lost nearly all processes and their characteristic shape (Fig. 2M, N). From p21 on, glypho-positive immunoreactivity around remaining nuclei in the ONL indicated that the majority of remaining cells represented cones. When we analyzed the time course of cone degeneration in *rd1* mice lacking Cx36 (*rd1Cx36^{-/-}*), we did not find any differences from *rd1* mice (Fig. 2P-R).

Remodeling of second order neurons

In mouse models for RP, photoreceptor degeneration is accompanied by morphological changes of downstream neurons, which respond to the loss of glutamatergic input from photoreceptors with structural reorganization. In the *Rho^{-/-}* and *rd1* mouse models, horizontal cells (HC) as well as some ON and OFF bipolar cell types strongly reorganize [28-31]. To determine whether Cx36 deficiency changes retinal remodeling, we compared the morphologies of HC and distinct bipolar cell types between Cx36-expressing and Cx36-deficient *Rho^{-/-}* and *rd1* mice.

HC were immunolabeled with antibodies against the calcium-binding protein calbindin [32] (Fig. 3). Consistent with previous studies [28], HC staining in *Rho^{-/-}Cx36^{+/+}* retinas revealed an initial outgrowth of processes into the ONL up to pw9 (Fig. 3B, C; short arrowhead). In older animals (pw12, pw17) HC sprouts retracted from the ONL and progressively ramified into the inner nuclear layer (INL) (Fig. 3D, E; long arrowhead). At pw17, HC somata occasionally switched their position from the distal INL into the ONL (Fig. 3E; asterisk). No differences in the rearrangement of HC processes and somata were observed between Cx36-expressing and Cx36-deficient siblings (Fig. 3F-J).

HC reorganization showed similar hallmarks in *rd1* mice and *rd1* mice lacking Cx36, but it occurred faster than in *Rho^{-/-}* mutants. Already at p15, HC processes, mostly originating from axonal complexes [30], protruded into the INL (Fig. 3L, long arrowhead). At this time point, some smaller sprouts were still present in the ONL (Fig. 3P, short arrowhead). While HC extensions in the ONL retracted after p21, the long processes in the INL persisted over the investigated period of time (Fig. 3M, N). At p30, HC somata were occasionally displaced to the ONL (Fig. 3R, asterisk). Thus, deletion of Cx36 from the rod-cone gap junction did not change the reorganization of HC in *rd1* mice, which followed a similar time course as reported in other studies [29-31].

To investigate the remodeling of bipolar cells, we immunolabeled the ON bipolar cell (BC) population with antibodies against the G-protein subunit G_{α} [33]. To distinguish rod from cone ON BC, rod BC were additionally stained with antibodies directed against PKC α [32] (Fig. 4). During photoreceptor degeneration, BC reorganized with distinct morphological characteristics which were similar in both, $Rho^{-}/Cx36^{+/+}$ and $Rho^{-}/Cx36^{-/}$ mice. At pw5, the dendritic organization appeared normal, except for some PKC α -positive rod BC dendrites sprouting into the ONL (Fig. 4B, C, G, H; long arrow). The dendrites of PKC α -negative cone ON BC, in contrast, did not extend into the ONL. While photoreceptor degeneration progressed, almost all ON BC dendrites were retracted and were almost completely absent at pw12 (Fig. 4D). From pw12 onward, rod BC often switched their position into the ONL (Fig. 4D, E, I, J; asterisk).

Similar changes were observed in $rd1Cx36^{+/+}$ and $rd1Cx36^{-/}$ mutants, in agreement with previous findings in $rd1$ mice [29-31]: ON BC dendrites were only rudimentarily developed at the early age of p15. Occasionally, at p15 and p21, small rod BC dendrites sprouted into the ONL, presumably due to the impaired synaptic transmission from dying rods (Fig. 4L, P, long arrow). The dendrites of G_{α} -labeled rod and cone ON BC progressively retracted and were completely absent after 21 days of age (Fig. 4M, N). Similar to the older $Rho^{-/}$ mutants, an increasing number of rod BC somata was displaced to the ONL (Fig. 4 N, R; asterisk).

For OFF bipolar cells, we used the rod- and cone-contacting type 3b BC as an example because type 3b cells were found to reorganize when transmission from photoreceptors is impaired [34,35]. Type 3b cells were specifically labeled with antibodies against PKARII β [36]. In both RP models, this cell type responded similarly to photoreceptor degeneration. Type 3b cells developed very fine processes, which extended through the entire ONL up to the OLM, presumably reaching out for photoreceptor input [35]. These changes were already detected at pw5 in $Rho^{-}/Cx36^{+/+}$ and p15 in $rd1 Cx36^{+/+}$ (Fig. 5B, L; long arrows), respectively. Sprouted dendrites, however, were almost completely retracted with progressive thinning of the ONL while other dendrites remained in the OPL even at later degeneration stages (Fig. 5C-E, M, N, short arrows). Remodeling was similar in the respective Cx36-deficient $Rho^{-/}$ and $rd1$ littermates (Fig. 5F-J, O-R).

Thus, our immunostainings clearly demonstrated that photoreceptor degeneration resulted in massive morphological changes of second order neurons. However, reorganization during photoreceptor degeneration in $Rho^{-/}$ and in $rd1$ mice was unaffected by the lack of Cx36; deletion of the cone connexin did not change the extent or the time course of retinal reorganization in RP mouse models.

Loss of cone outer segments at the onset of secondary cone degeneration

To extend our investigations with more sensitive and direct measurements, we examined the effect of Cx36 deficiency on the onset (in *Rho*^{-/-} mice) and during later stages (in *rd1* mice) of secondary cone degeneration.

During the process of photoreceptor degeneration, cells pass through different metabolic changes. One very early event indicating the onset of cone degeneration is the retraction and subsequent loss of cone outer segments (COS) [2]. In *Rho*^{-/-} mutants, it takes more than 10 weeks from the retraction of COS until cones get lost (Fig. 2A-J). Therefore, this RP model is well suited to investigate the influence of Cx36-dependent rod-cone coupling on the onset of cone degeneration. We directly analyzed this by comparing the progressive loss of COS between 5-, 9- and 12-week-old *Rho*^{-/-}Cx36^{+/+}, *Rho*^{-/-}/Cx36^{-/-}, and wt animals (Fig. 6). COS were stained in retinal whole-mounts with antibodies against both cone opsins (S-opsin, M-opsin) [37]. The number of stained COS was quantified in four different regions of interest (ROI; 100 x 200 μm²), 50% and 75% along the dorsal-ventral axis (with 100% corresponding to the distance between the optic nerve head and the retina edge) to control for eccentricity-related differences (Fig. 6A). Representative ROI examples demonstrate the progressive loss of COS from 5- to 12-week-old *Rho*^{-/-}Cx36^{+/+} and *Rho*^{-/-}Cx36^{-/-} animals (Fig. 6B). However, as these examples show no obvious differences in the density of COS between same-aged Cx36-expressing and Cx36-deficient *Rho*^{-/-} mutants (Fig. 6B), we quantified the number of COS in retinas from at least three different animals for each genotype (Fig. 6C-E). At pw5, there were no significant differences in the number of COS between *Rho*^{-/-}Cx36^{+/+}, *Rho*^{-/-}Cx36^{-/-} and wt controls (Fig. 6C; $p > 0.0803$ for all comparisons, $n = 3$), except for the central part of the dorsal retina. In this region, COS were significantly reduced in both transgenic animals, when compared to wt mice ($p = 0.0178$, *Rho*^{-/-}Cx36^{+/+}, wt; $p = 0.0093$, *Rho*^{-/-}Cx36^{-/-}, wt, $n = 3$). As cone degeneration starts in the central retina in *Rho*^{-/-} mice [2], we assume that this decrease might represent the onset of cone degeneration. While the number of COS remained almost constant in wt controls, a substantial fraction of COS was lost in 9- and 12-week-old *Rho*^{-/-}Cx36^{+/+} and *Rho*^{-/-}Cx36^{-/-} mice, indicating that early cone degeneration now covered a large retinal area (Fig. 6D, E). However, because the density of COS showed no significant differences between these mutants ($p > 0.1089$ for all comparisons; $n = 5$, pw9, $n = 3$, pw12), we conclude that the loss of COS is not delayed or prevented by the deletion of the cone connexin from the rod-cone gap junction (Fig. 6C-E).

Secondary cell death and loss of cone photoreceptors at a late disease stage

The fast progression of photoreceptor degeneration in *rd1*Cx36^{+/+} and *rd1*Cx36^{-/-} caused an early and rapid retraction of COS [38] as indicated in Figure 2K-R. Thus, the *rd1* mouse model is not suitable for analyzing the loss of COS over time. Instead, we used the *rd1*

model to directly examine the influence of Cx36 deletion on cone loss (Fig. 7) and cell death (Fig. 8). We measured cone loss by quantifying remaining cones in vertical retina sections labeled with antibodies against cone arrestin (Fig. 7A). As the retinal degeneration in *rd1* mice followed a center-to-periphery gradient [18], cones were quantified only in the central part of the retina, up to a distance of 1,000 μm from the optic nerve (Fig. 7A). Cone arrestin labeling revealed the ongoing deformation and loss of cones from p15 to p30 (Fig. 7B-G). There were no obvious differences in shape or number of cones between same-aged Cx36-expressing (Fig. 7B-D) and Cx36-deficient *rd1* mice (Fig. 7E-G). These observations were confirmed by quantitative data (Fig. 7H). The number of cones was the same in *rd1* mutants and wt controls at p15, indicating that the loss of cones was not yet initiated at this age. In contrast, the number of cones decreased by one third in *rd1Cx36^{+/+}* and *rd1Cx36^{-/-}* mice from p15 to p21 ($p = 7.1 \times 10^{-7}$, $n = 3$) and by almost another third from p21 to p30 ($p = 0.5 \times 10^{-5}$, $n = 3$), confirming the progressive loss of cones during this period [2,27]. However, there was no statistical difference in the number of cone photoreceptors between age-matched Cx36-expressing and Cx36-deficient *rd1* mutants (p15: $p = 0.2993$; p21: $p = 0.9271$; p30: $p = 0.1386$).

We used a second approach to analyze the influence of Cx36 deletion on the late stage of cone degeneration. We compared the number of dying cells between Cx36-expressing and Cx36-deficient *rd1* siblings (Fig. 8). DNA fragmentation represents a late event in cell death. The emerging DNA nick ends were detected *in situ* with TUNEL staining. TUNEL-positive cells were quantified in the central retina of *rd1 Cx36^{+/+}*, *rd1 Cx36^{-/-}* and wt mice at the ages of p21 and p30, i.e., at times when secondary cone loss progressed [2,27], as shown in Figure 7. Because most rods have died at p21 [18] and the majority of remaining cells in the ONL represent cone photoreceptors (Fig. 2M, N, Q, R), TUNEL-positive nuclei in the ONL most likely represent dying cones (Fig. 8B, C, E, F). As expected, comparing the number of dying cells between same-aged *rd1* mutants and wt mice revealed a significantly increased number of TUNEL-positive cells in both *rd1* mutants when compared to wt mice ($p < 0.0004$ for all comparisons), with a higher number of TUNEL-positive cells at p21 than at p30 (Fig. 8G; *rd1Cx36^{+/+}*: $p = 0.0020$; *rd1Cx36^{-/-}*: $p = 0.0032$). However, deletion of Cx36 did not change the time course or the extent of secondary cone death as it did not affect the number of dying cones (Fig. 8G; p21: $p = 0.5231$; p30: $p = 0.9296$; $n = 3$).

DISCUSSION

The bystander effect is an established mechanism to explain the propagation of cell death from dying cells to healthy neighbors and was demonstrated in various *in vitro* [39,40] and *in vivo* systems [41-43]. To explain the secondary death of genetically normal cones in RP, Ripps [8] proposed a gap junction-mediated bystander effect and suggested that gap

junctions provide an avenue by which toxic intermediates generated by dying rods are transmitted to healthy cones [8,9]. We tested this hypothesis in two different mouse models for RP, the *rd1* and the *Rho*^{-/-} mouse, by targeted deletion of the gene coding for Cx36, the gap junction-forming protein on the cone side. We assessed the progress of the degenerative disease at various levels; however, we did not find any differences in secondary cone degeneration between RP mice with and without Cx36.

There are several possibilities why no effect on secondary cone degeneration was found and therefore we will discuss in the following the impact of Cx36, the parameters assessed, and the gap junction-mediated bystander effect in RP.

Cx36 expression in RP mouse models

Electrical coupling between rod and cone photoreceptors is the basic premise of the bystander hypothesis and has been demonstrated in a variety of animal models [44], including the mouse [14,15,19,22,45]. Although for the mouse only the connexin on the cone side is known (Cx36) [12,13], several studies show that disruption of Cx36 is sufficient to disrupt rod-cone coupling [14-16]. If Cx36 plays a role in secondary cone death, mouse models for RP should express Cx36 in the OPL. This was indeed the case; we found that Cx36 expression was similar to wild-type controls at early (*Rho*^{-/-}, pw5) and later RP stages (*rd1*, p21), confirming that Cx36-containing gap junctions may indeed mediate bystander killing. Breeding *Rho*^{-/-} and *rd1* mice with Cx36^{-/-} mice abolished the expression of Cx36 (Fig. 1) and allowed a test of the bystander hypothesis.

Assessing secondary cone degeneration

The impact of Cx36 deletion on secondary cone degeneration was assessed by evaluating the rearrangement of second order neurons, the loss of COS as an indication for the *onset* of secondary cone degeneration, and the numbers of dying and residual cones as an indication for the *progress* of secondary cone death.

The slow time course of retinal degeneration in rhodopsin-deficient mice was similar as in previous studies [2,17]. Rods do not form outer segments and die over a period of 17 weeks. Cones develop normally at first, leading to a supernormal response in electroretinograms around pw5 [26], but start to degenerate from pw6 to pw13 [26], losing inner and outer segments until pw17 (Fig. 2E). In contrast to *Rho*^{-/-} mice, degeneration in *rd1* mice was much faster: rods start to degenerate around p10-11 and are almost completely lost until p20 (Fig. 2N) [38,46]. Cone photoreceptors, although unaffected by the *Pde6β* mutation, start to degenerate shortly after rod degeneration begins [27]. Although most cones die within 20-30 days, cone cell death may take up to six months to be completed [2,27]. Thus, the time points investigated were suitable to analyze the onset (*Rho*^{-/-} mouse, pw5-17)

and later stages of secondary cone degeneration, *i.e.* when most cones have died (*rd1* mice, p15-30).

As previous studies reported changes in rod- and cone-contacting second order neurons in various animal models for RP [30,47-49], we analyzed the morphologies of horizontal cells, rod and cone bipolar cells in *Rho*^{-/-} and *rd1* mice and their Cx36-deficient littermates. Reorganization is evoked by disturbed glutamatergic input from photoreceptors [47-49]. Consistent with earlier reports [28-30,38], we found that horizontal and rod bipolar cell dendrites in both RP models reached out into the ONL, presumably searching for photoreceptor input. At later disease stages, these ectopic dendrites were retracted and horizontal cells sent numerous dendrites into the INL. As ectopic horizontal cell dendrites mostly originate from the rod-contacting axonal arborization [30], it is not surprising that we did not find differences between Cx36-expressing and Cx36-deficient mice. However, also cone-contacting ON bipolar cells showed remodeling and nearly completely lost their dendrites with disease progress (Fig. 4) [29,30]. Rod- and cone-contacting type 3b OFF cone bipolar cells retained elaborate dendritic arbors in the OPL (Fig. 5) after retracting sprouted dendrites with progressive thinning of the ONL. Thus, although we found a reorganization of rod- and cone-contacting second order neurons similar to previous studies, we failed to detect any effect of Cx36 deficiency on retinal remodeling.

We also quantitatively assessed features directly associated with the onset and later stages of secondary cone degeneration. The loss of COS is a first indication of cone degeneration and shows a clear center-to-periphery gradient in *Rho*^{-/-} mice [2]. A significant reduction of the COS density in the central part of the dorsal retina indicated the beginning of cone degeneration in *Rho*^{-/-}Cx36^{+/+} and *Rho*^{-/-}Cx36^{-/-} mice at pw5. Loss of COS persisted over a long period of time (> pw12, Fig. 6). However, the number of COS decreased similarly in Cx36-expressing and Cx36-deficient siblings.

The fast degenerating *rd1* mouse model was used to assess cell death in cones and loss of cone photoreceptors as late events in secondary cone degeneration. From p15 until p30, *rd1* mice lost almost 60% of their cones as shown by quantifying the number of cones per 100 μ m in the OPL (Fig. 7). Consistently, a high number of TUNEL-positive cells were found between p21 and p30. Because the major phase of rod death ends around p20 [2], TUNEL-positive cells at p30 most likely represent dying cones. For both *rd1* mouse mutants, we cannot exclude that a small proportion of TUNEL-positive cells represented rods, suggesting that the number of dying cones might be slightly overestimated in both genotypes. However, if Cx36 had an influence on late stages of cone degeneration, the number of dying and lost cones, respectively, should have been reduced in Cx36-deficient *rd1* mice. This was not the case.

Rod-cone gap junctions do not mediate a bystander effect in RP mouse.

As we found no influence of Cx36 deletion on secondary cone degeneration, we exclude a Cx36-dependent gap junction-mediated spread of a cell death-inducing signal from dying rods to healthy cones.

Other studies, however, demonstrated that gap junctions can propagate cell death-inducing signals in cell lines [39,40] and even retinal neurons [9,10]. Cusato et al. (2003) reported that dying cells are clustered in the developing retina and that this clustered cell death is reduced by the gap junction inhibitor carbenoxolone [9]. The authors hypothesized that a cytotoxic byproduct of apoptotic cell death is passed to neighboring cells via gap junctions [9]. Paschon et al. (2012) used an acute trauma model of the retina to show that gap junction blockers - one of them rather specific for Cx36 - reduced the spread of apoptosis in retinal neurons after injury [10]. In contrast to these models, photoreceptor death in RP mice is not mediated by classical apoptosis but most likely involves a non-apoptotic, alternative cell death mechanism [50] characterized by a deregulation of cGMP metabolism, down-regulation of transcription factors, activity of histone deacetylases and excessive activation of calcium-dependent proteases [27,51,52]. Thus, we may have failed to detect a Cx36-dependent gap junction-mediated bystander effect in RP because non-apoptotic cell death in rods may not produce gap junction-permeable cytotoxic metabolites (*e.g.* IP₃) able to induce cell death in neighboring cells.

Another reason why rod-cone coupling may not play a role in secondary cone degeneration is that gap junctions between rods and cones may close as soon as rods begin to die. Because Cx36 is not expressed in rods [12] in the mouse retina and the connexin on the rod side is not known so far, we can only speculate on the properties of the rod connexin. The conductance of most connexins is decreased by a rise in the intracellular calcium concentration and a drop in pH [44] – two common incidents during cell death [27,53,54]. In contrast, gap junctions exclusively made of Cx36 were reported to decrease their conductance upon intracellular alkalization and not acidification [55]. This may represent the reason why gap junctions made of Cx36 were reported to remain open during ischemia [56], thereby mediating bystander killing. However, as the connexin on the rod side is not Cx36 but another connexin, it is conceivable that the gap junction between rods and cones is closed when rods begin to die. Additionally, intracellular signaling cascades may contribute to the closure of the rod-cone gap junction. Cx36 lowers its conductance, for example, in response to activation of the protein kinase G pathway [57], a pathway which was reported to play a role in retinal degeneration [58]. A similar mechanism may also apply to the unknown rod connexin.

Also, we cannot entirely exclude the possibility that another gap junction protein may compensate for the deletion of Cx36 as we did not directly assess rod-cone coupling in RP

mouse models. However, other studies on mice [14-16] have shown that deletion of Cx36 is sufficient to disrupt rod-cone coupling. Thus, it seems highly unlikely that - despite the deletion of Cx36 - rod-cone coupling is functional in *Rho*^{-/-}Cx36^{-/-} and *rd1*Cx36^{-/-} mice.

Gap junctions were not only discussed to propagate cell death from dying cells to healthy neighbors but were also shown to mediate a *positive* bystander effect [59-61]. For the mouse, Striedinger et al. (2005) reported that Cx36 is upregulated in response to retinal lesioning. Blockade of gap junctions with carbenoxolone resulted in an increased extent of secondary cell loss in this mouse model. Thus, Cx36 may also protect neighboring cells from cell death after traumatic injury of the retina [62]. If Cx36-containing rod-cone gap junctions mediated a positive bystander effect, deletion of Cx36 would have led to an acceleration of secondary cone degeneration in RP mouse models. However, the time course and extent of cone death were unchanged in Cx36-deficient mice, ruling out a negative and positive bystander effect for Cx36-dependent gap junctions.

In summary, our study provides the first conclusive evidence that a Cx36-dependent gap junction-mediated bystander effect, postulated by Ripps [8], is not involved in secondary cone degeneration in mouse models for RP as the deletion of Cx36 on the cone side of the rod-cone gap junction had no effect on the secondary death of genetically healthy cones. However, since the gap junction-mediated transfer of death signals is not the only possible mechanism to mediate bystander killing, we cannot exclude that extracellular propagation of toxic intermediates [39] may contribute to cone degeneration in RP.

MATERIALS AND METHODS

Unless stated otherwise, all chemicals were purchased from Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Germany).

Ethics statement

All experiments were carried out in accordance with the institutional guidelines for animal welfare of the University of Oldenburg, following the standards described by the German animal protection law (*Tierschutzgesetz*). The mere killing of mice for tissue analysis is registered with the local authorities (*Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*) and reported on a regular basis as demanded by law but needs no further approval if no other treatment is applied before killing.

Transgenic animals

Photoreceptor degeneration was studied in *Rho*^{-/-} mice [17] and in *rd1* mice (Charles River, Wilmington, MA) [63]. Both RP models were crossbred with Cx36^{-/-} mice (C57Bl6/N genetic background) [23], resulting in *Rho*^{-/-} and *rd1* mice with a heterozygous deletion of Cx36. The

offspring generation of *Rho*^{-/-}*Cx36*^{+/-} and *rd1Cx36*^{+/-} mice was intercrossed to obtain homozygous *Cx36*-expressing and *Cx36*-deficient littermates for both RP mouse models. Mice were genotyped for alterations in genes encoding for *rhodopsin*, *rod cGMP phosphodiesterase subunit beta (Pde6β)* and *Cx36* by polymerase chain reaction analysis of tail DNAs using sets of primers listed in Table 1. To minimize differences in genetic background, comparative analyses were performed on littermates. For *Rho*^{-/-}*Cx36*^{+/-} and *Rho*^{-/-}*Cx36*^{-/-} mice, the ages of 5, 9, 12 and 17 weeks were analyzed. *Rd1Cx36*^{+/-} and *rd1Cx36*^{-/-} mice were analyzed 15, 21, and 30 days after birth, respectively. Additional control experiments were performed with age-matched wt animals corresponding to the respective genetic backgrounds of the transgenic mouse strains used (*Rho*^{-/-}: C57Bl6/N, Charles River; *rd1*: C3A.BLiA-*Pde6b*+/J, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME).

Retinal tissue preparation and immunohistochemistry

Animals were anesthetized with CO₂ and killed by cervical dislocation. Eyes were enucleated and prepared in Ringer's solution containing (mM) 137 NaCl, 5.4 KCl, 1.8 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 D-glucose, and 5 HEPES, pH 7.4. Cornea, lens and vitreous body were removed from the eyecup. Eyecups for vertical retina sections were fixed either for 20 minutes in 2% paraformaldehyde (PFA; Riedel de Haen, Seelze, Germany) or for 60 minutes in 4 % PFA in phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS), followed by several washing steps in PBS. Eyecups were cryoprotected in sucrose-containing PBS solutions (10%, 20%, 30% sucrose) and embedded in cryoblock (Meditate GmbH, Burgdorf, Germany) at -20°C. Vertical sections (18-20 μm for morphological analysis; 12 μm for quantitative analysis) were cut on a cryostat (Bright, Huntingdon, United Kingdom). Sections from littermates and same-aged wild-type mice were collected on the same slide to ensure equal treatments. Cryosections were rinsed either in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) or in Tris-buffered saline (TBS, pH 7.4) containing 0.3% Triton X-100 (TBST) and blocked either with 10% normal goat serum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) or 10% normal donkey serum (Dianova GmbH, Hamburg, Germany) in TBST. Primary antibodies were applied overnight at 4 °C. After several washing steps, slices were incubated with secondary antibodies for at least two hours. Finally, sections were rinsed again and subsequently mounted in Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Primary (Table 2) and secondary antibodies were diluted in blocking solution. Secondary antibodies were conjugated to Alexa Fluor 488 or 568 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) or Cy3 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Experiments, in which primary antibodies were omitted, were performed to control for non-specific binding of secondary antibodies. In some experiments, nuclei were stained by adding the nucleic acid stain TO-PRO-3 (Invitrogen) to the secondary antibody solution (dilution 1:1,000) or by using Vectashield with DAPI (Vector Laboratories).

Quantification of COS was carried out on flat-mounted retinas. Eyecup preparation was performed as described above; the dorsal orientation of each retina was marked by incision. Isolated retinæ were flat-mounted on slides, fixed for 40 minutes with 2% PFA, transferred onto a filter paper (Millipore, Billerica, MA) with the photoreceptor layer up and kept in 0.1 M PB. Retinas of littermates and age-matched wild-type controls were incubated in the same well of a 6-well plate. Whole-mounts were washed in 0.1 M PB and blocked with 5% ChemiBLOCKER (Millipore) containing 0.5% Triton X-100 and 0.05% NaN₃ for one hour. Primary antibodies were applied for 5 days at 4°C (Table 2). Secondary antibodies were applied overnight at 4°C. After several washing steps whole-mounts were mounted in Vectashield.

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL assay)

To determine the number of dying cells, a TUNEL assay was performed on vertical cryostat sections using an *in situ* cell death detection kit (Fluorescein or TMR; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions.

Fluorescent image acquisition

Images for morphological comparisons between transgenic animals and for the quantification of COS were taken with a Leica TCS SL confocal microscope, as described previously [64]. Scanning for morphological comparisons was performed either with a 40x/1.25 oil plan apochromat or with a 63x/1.32 oil plan apochromat objective (z-axis step size 0.2 µm). Confocal images for quantification of cone outer segments (COS) were taken either with a 20x/0.5 plan fluotar objective or a 40x/0.7 plan fluotar objective (z-axis step size 0.5-0.8 µm). Unless stated otherwise, images are presented as maximum projections of z-stacks of 2-3 µm thickness. To quantify photoreceptors and TUNEL-positive cells, images were taken using an Axio Imager Z1 ApoTome microscope, equipped with a Zeiss AxioCam digital camera and Zeiss Axiovision 4.7 software. Complete vertical sections were scanned using the Mosaix mode of Axiovision 4.7 at 20x or 40x magnification. Images were superimposed and slightly adjusted for brightness and contrast in Photoshop CS4 (Adobe, San Jose, CA).

Quantification and statistical analysis

Retinas of each experimental group were processed under identical conditions with respect to tissue dissection, incubation steps and microscopic evaluation. Quantification of cone photoreceptors and TUNEL-positive cells was performed as previously described [65]. For the quantitative COS analysis, confocal maximum projections (thickness 3-5 µm) of the outer segment region, ranging from the optic nerve up to the dorsal and ventral edge of the retina, were intensity adjusted and assembled to one montage, covering the dorsal-ventral axis of

the whole-mounted retinas, in Photoshop CS4. For each retina, ROI were defined at 50% and 75% dorsal and ventral of the optic nerve, respectively. The density of COS was manually determined in an area of 100 x 200 μm^2 . Cone photoreceptor and TUNEL quantification was carried out only in the central retina, which was defined as the area ranging from the optic nerve up to a distance of 1,000 μm towards the retinal periphery. Slices for quantification were taken in the immediate vicinity of the optic nerve. The summarized results display the manually determined number of cones and TUNEL-positive cells per 100 μm retina length.

For statistical comparisons within one genotype and between genotypes the unpaired, two-tailed Student's t-test was used. Quantitative data represent the means of at least three different littermates and appropriate wild-type control mice per genotype and age. Error bars in the figures indicate standard deviation. Levels of significance are indicated as follows: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Bettina Kewitz, and Sandra Bernhard-Kurz for excellent technical assistance and Konrad Schultz for help with confocal microscopy. We also thank B. Pfeiffer-Guglielmi (University of Tübingen, Tübingen, Germany) for the generous gift of the anti-glycogen phosphorylase antibody.

REFERENCES

1. Buskamp V, Roska B (2011) Optogenetic approaches to restoring visual function in retinitis pigmentosa. *Curr Opin Neurobiol* 21: 942-946.
2. Punzo C, Kornacker K, Cepko CL (2009) Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nat Neurosci* 12: 44-52.
3. Zhao C, Yasumura D, Li X, Matthes M, Lloyd M, et al. (2011) mTOR-mediated dedifferentiation of the retinal pigment epithelium initiates photoreceptor degeneration in mice. *J Clin Invest* 121: 369-383.
4. Yang Y, Mohand-Said S, Danan A, Simonutti M, Fontaine V, et al. (2009) Functional cone rescue by RdCVF protein in a dominant model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 17: 787-795.
5. Leveillard T, Mohand-Said S, Fintz AC, Lambrou G, Sahel JA (2004) The search for rod-dependent cone viability factors, secreted factors promoting cone viability. *Novartis Found Symp* 255: 117-127.
6. Roque RS, Rosales AA, Jingjing L, Agarwal N, Al-Ubaidi MR (1999) Retina-derived microglial cells induce photoreceptor cell death in vitro. *Brain Res* 836: 110-119.
7. Gupta N, Brown KE, Milam AH (2003) Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 76: 463-471.
8. Ripps H (2002) Cell death in retinitis pigmentosa: gap junctions and the 'bystander' effect. *Exp Eye Res* 74: 327-336.
9. Cusato K, Bosco A, Rozental R, Guimaraes CA, Reese BE, et al. (2003) Gap junctions mediate bystander cell death in developing retina. *J Neurosci* 23: 6413-6422.
10. Paschon V, Higa GS, Resende RR, Britto LR, Kihara AH (2012) Blocking of Connexin-Mediated Communication Promotes Neuroprotection during Acute Degeneration Induced by Mechanical Trauma. *PLoS One* 7: e45449.
11. Deans MR, Volgyi B, Goodenough DA, Bloomfield SA, Paul DL (2002) Connexin36 is essential for transmission of rod-mediated visual signals in the mammalian retina. *Neuron* 36: 703-712.

12. Feigenspan A, Janssen-Bienhold U, Hormuzdi S, Monyer H, Degen J, et al. (2004) Expression of connexin36 in cone pedicles and OFF-cone bipolar cells of the mouse retina. *J Neurosci* 24: 3325-3334.
13. Dang L, Pulukuri S, Mears AJ, Swaroop A, Reese BE, et al. (2004) Connexin 36 in photoreceptor cells: studies on transgenic rod-less and cone-less mouse retinas. *Mol Vis* 10: 323-327.
14. Trümpler J, Dedek K, Schubert T, de Sevilla Müller LP, Seeliger M, et al. (2008) Rod and cone contributions to horizontal cell light responses in the mouse retina. *J Neurosci* 28: 6818-6825.
15. Abd-El-Barr MM, Pennesi ME, Saszik SM, Barrow AJ, Lem J, et al. (2009) Genetic dissection of rod and cone pathways in the dark-adapted mouse retina. *J Neurophysiol* 102: 1945-1955.
16. Pang JJ, Gao F, Lem J, Bramblett DE, Paul DL, et al. (2010) Direct rod input to cone BCs and direct cone input to rod BCs challenge the traditional view of mammalian BC circuitry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 395-400.
17. Humphries MM, Rancourt D, Farrar GJ, Kenna P, Hazel M, et al. (1997) Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. *Nat Genet* 15: 216-219.
18. Carter-Dawson LD, LaVail MM, Sidman RL (1978) Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 17: 489-498.
19. Tsukamoto Y, Morigiwa K, Ueda M, Sterling P (2001) Microcircuits for night vision in mouse retina. *J Neurosci* 21: 8616-8623.
20. Pang JJ, Gao F, Wu SM (2004) Light-evoked current responses in rod bipolar cells, cone depolarizing bipolar cells and All amacrine cells in dark-adapted mouse retina. *J Physiol* 558: 897-912.
21. Heikkinen H, Vinberg F, Nymark S, Koskelainen A (2011) Mesopic background lights enhance dark-adapted cone ERG flash responses in the intact mouse retina: a possible role for gap junctional decoupling. *J Neurophysiol* 105: 2309-2318.
22. Cangiano L, Asteriti S, Cervetto L, Gargini C (2012) The photovoltage of rods and cones in the dark-adapted mouse retina. *J Physiol* 590: 3841-3855.
23. Güldenagel M, Ammermuller J, Feigenspan A, Teubner B, Degen J, et al. (2001) Visual transmission deficits in mice with targeted disruption of the gap junction gene connexin36. *J Neurosci* 21: 6036-6044.
24. Pfeiffer-Guglielmi B, Fleckenstein B, Jung G, Hamprecht B (2003) Immunocytochemical localization of glycogen phosphorylase isozymes in rat nervous tissues by using isozyme-specific antibodies. *J Neurochem* 85: 73-81.
25. Stöhr H, Molday LL, Molday RS, Weber BH, Biedermann B, et al. (2005) Membrane-associated guanylate kinase proteins MPP4 and MPP5 associate with Veli3 at distinct intercellular junctions of the neurosensory retina. *J Comp Neurol* 481: 31-41.
26. Jaissle GB, May CA, Reinhard J, Kohler K, Fauser S, et al. (2001) Evaluation of the rhodopsin knockout mouse as a model of pure cone function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 506-513.
27. Sancho-Pelluz J, Arango-Gonzalez B, Kustermann S, Romero FJ, van Veen T, et al. (2008) Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Mol Neurobiol* 38: 253-269.
28. Claes E, Seeliger M, Michalakakis S, Biel M, Humphries P, et al. (2004) Morphological characterization of the retina of the CNGA3(-/-)Rho(-/-) mutant mouse lacking functional cones and rods. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 2039-2048.
29. Strettoi E, Pignatelli V (2000) Modifications of retinal neurons in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 20: 11020-11025.
30. Strettoi E, Porciatti V, Falsini B, Pignatelli V, Rossi C (2002) Morphological and functional abnormalities in the inner retina of the rd/rd mouse. *J Neurosci* 22: 5492-5504.
31. Strettoi E, Pignatelli V, Rossi C, Porciatti V, Falsini B (2003) Remodeling of second-order neurons in the retina of rd/rd mutant mice. *Vision Res* 43: 867-877.
32. Haverkamp S, Wässle H (2000) Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 424: 1-23.
33. Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, Feigenspan A, Wässle H (2004) Types of bipolar cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 469: 70-82.
34. Haverkamp S, Specht D, Majumdar S, Zaidi NF, Brandstätter JH, et al. (2008) Type 4 OFF cone bipolar cells of the mouse retina express calnenin and contact cones as well as rods. *J Comp Neurol* 507: 1087-1101.
35. Sonntag S, Dedek K, Dorgau B, Schultz K, Schmidt KF, et al. (2012) Ablation of retinal horizontal cells from adult mice leads to rod degeneration and remodeling in the outer retina. *J Neurosci* 32: 10713-10724.
36. Mataruga A, Kremmer E, Müller F (2007) Type 3a and type 3b OFF cone bipolar cells provide for the alternative rod pathway in the mouse retina. *J Comp Neurol* 502: 1123-1137.
37. Applebury ML, Antoch MP, Baxter LC, Chun LL, Falk JD, et al. (2000) The murine cone photoreceptor: a single cone type expresses both S and M opsins with retinal spatial patterning. *Neuron* 27: 513-523.
38. Lin B, Masland RH, Strettoi E (2009) Remodeling of cone photoreceptor cells after rod degeneration in rd mice. *Exp Eye Res* 88: 589-599.

39. Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, Willecke K, Yamasaki H (1996) Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1831-1835.
40. Freeman SM, Abboud CN, Whartenby KA, Packman CH, Koeplin DS, et al. (1993) The "bystander effect": tumor regression when a fraction of the tumor mass is genetically modified. *Cancer Res* 53: 5274-5283.
41. Rami A, Volkman T, Winckler J (2001) Effective reduction of neuronal death by inhibiting gap junctional intercellular communication in a rodent model of global transient cerebral ischemia. *Exp Neurol* 170: 297-304.
42. Cotrina ML, Kang J, Lin JH, Bueno E, Hansen TW, et al. (1998) Astrocytic gap junctions remain open during ischemic conditions. *J Neurosci* 18: 2520-2537.
43. Frantseva MV, Kokarovtseva L, Naus CG, Carlen PL, MacFabe D, et al. (2002) Specific gap junctions enhance the neuronal vulnerability to brain traumatic injury. *J Neurosci* 22: 644-653.
44. Bloomfield SA, Völgyi B (2009) The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. *Nat Rev Neurosci* 10: 495-506.
45. Ribelayga C, Cao Y, Mangel SC (2008) The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling. *Neuron* 59: 790-801.
46. Pennesi ME, Michaels KV, Magee SS, Maricle A, Davin SP, et al. (2012) Long-term characterization of retinal degeneration in rd1 and rd10 mice using spectral domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53: 4644-4656.
47. Cuenca N, Pinilla I, Sauve Y, Lu B, Wang S, et al. (2004) Regressive and reactive changes in the connectivity patterns of rod and cone pathways of P23H transgenic rat retina. *Neuroscience* 127: 301-317.
48. Gargini C, Terzibasi E, Mazzoni F, Strettoi E (2007) Retinal organization in the retinal degeneration 10 (rd10) mutant mouse: a morphological and ERG study. *J Comp Neurol* 500: 222-238.
49. Wang S, Lu B, Lund RD (2005) Morphological changes in the Royal College of Surgeons rat retina during photoreceptor degeneration and after cell-based therapy. *J Comp Neurol* 491: 400-417.
50. Trifunovic D, Sahaboglu A, Kaur J, Mencl S, Zrenner E, et al. (2012) Neuroprotective strategies for the treatment of inherited photoreceptor degeneration. *Curr Mol Med* 12: 598-612.
51. Paquet-Durand F, Sanges D, McCall J, Silva J, van Veen T, et al. (2010) Photoreceptor rescue and toxicity induced by different calpain inhibitors. *J Neurochem* 115: 930-940.
52. Sancho-Pelluz J, Alavi MV, Sahaboglu A, Kustermann S, Farinelli P, et al. (2010) Excessive HDAC activation is critical for neurodegeneration in the rd1 mouse. *Cell Death Dis* 1: e24.
53. Rohrer B, Pinto FR, Hulse KE, Lohr HR, Zhang L, et al. (2004) Multidestructive pathways triggered in photoreceptor cell death of the rd mouse as determined through gene expression profiling. *J Biol Chem* 279: 41903-41910.
54. Lagadic-Gossman D, Huc L, Lecureur V (2004) Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. *Cell Death Differ* 11: 953-961.
55. Gonzalez-Nieto D, Gomez-Hernandez JM, Larrosa B, Gutierrez C, Munoz MD, et al. (2008) Regulation of neuronal connexin-36 channels by pH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 17169-17174.
56. Wang Y, Song JH, Denisova JV, Park WM, Fontes JD, et al. (2012) Neuronal gap junction coupling is regulated by glutamate and plays critical role in cell death during neuronal injury. *J Neurosci* 32: 713-725.
57. Patel LS, Mitchell CK, Dubinsky WP, O'Brien J (2006) Regulation of gap junction coupling through the neuronal connexin Cx35 by nitric oxide and cGMP. *Cell Commun Adhes* 13: 41-54.
58. Paquet-Durand F, Hauck SM, van Veen T, Ueffing M, Ekstrom P (2009) PKG activity causes photoreceptor cell death in two retinitis pigmentosa models. *J Neurochem* 108: 796-810.
59. Naus CC, Ozog MA, Bechberger JF, Nakase T (2001) A neuroprotective role for gap junctions. *Cell Commun Adhes* 8: 325-328.
60. Oguro K, Jover T, Tanaka H, Lin Y, Kojima T, et al. (2001) Global ischemia-induced increases in the gap junctional proteins connexin 32 (Cx32) and Cx36 in hippocampus and enhanced vulnerability of Cx32 knock-out mice. *J Neurosci* 21: 7534-7542.
61. Nakase T, Söhl G, Theis M, Willecke K, Naus CC (2004) Increased apoptosis and inflammation after focal brain ischemia in mice lacking connexin43 in astrocytes. *Am J Pathol* 164: 2067-2075.
62. Striedinger K, Petrasch-Parwez E, Zoidl G, Napirei M, Meier C, et al. (2005) Loss of connexin36 increases retinal cell vulnerability to secondary cell loss. *Eur J Neurosci* 22: 605-616.
63. Bowes C, Li T, Frankel WN, Danciger M, Coffin JM, et al. (1993) Localization of a retroviral element within the rd gene coding for the beta subunit of cGMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 2955-2959.

64. Kranz K, Dorgau B, Pottek M, Herrling R, Schultz K, et al. (2012) Expression of Pannexin1 in the outer plexiform layer of the mouse retina and physiological impact of its knock-out. *J Comp Neurol*. doi: 10.1002/cne.23223.
65. Kaur J, Mencl S, Sahaboglu A, Farinelli P, van Veen T, et al. (2011) Calpain and PARP activation during photoreceptor cell death in P23H and S334ter rhodopsin mutant rats. *PLoS One* 6: e22181.
66. Gimenez E, Montoliu L (2001) A simple polymerase chain reaction assay for genotyping the retinal degeneration mutation (Pdeb(rd1)) in FVB/N-derived transgenic mice. *Lab Anim* 35: 153-156.

FIGURE LEGENDS

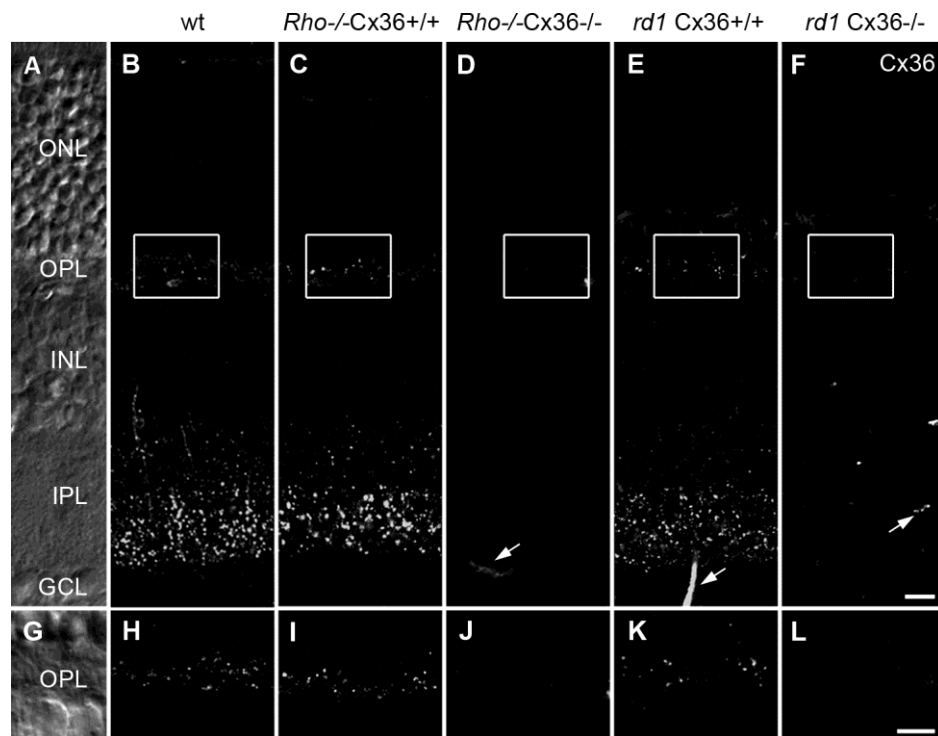


Figure 1. Distribution of Cx36 in retinal degeneration mouse models. Cx36 antibody staining in vertical sections of wild-type (wt) mice (B), *Rho*^{-/-} (pw5) (C) and *rd1* mice (p21) (E) depicted the typical distribution pattern of Cx36 in the OPL and in the IPL. The staining is absent in *Rho*^{-/-} and *rd1* mice with a targeted deletion of Cx36 (D, F). Cx36 immunoreactivity in magnified regions in the OPL of wt (H), *Rho*^{-/-}Cx36^{+/+} (I) and *rd1*Cx36^{+/+} mice (K) produced fine punctuate labeling in the outer plexiform layer (OPL) where rods and cones are electrically coupled by Cx36. This staining was absent in the OPL of Cx36-deficient *Rho*^{-/-} (J) and *rd1* mutants (L). Residual staining (arrows) was caused by unspecific binding of the secondary antibody to blood vessels and was also present in controls (stainings without primary antibody). Retinal layers are indicated in the Nomarski micrographs (A, G). Scale bars = 10 μ m in F (applies to A-F); in L (applies to G-L).

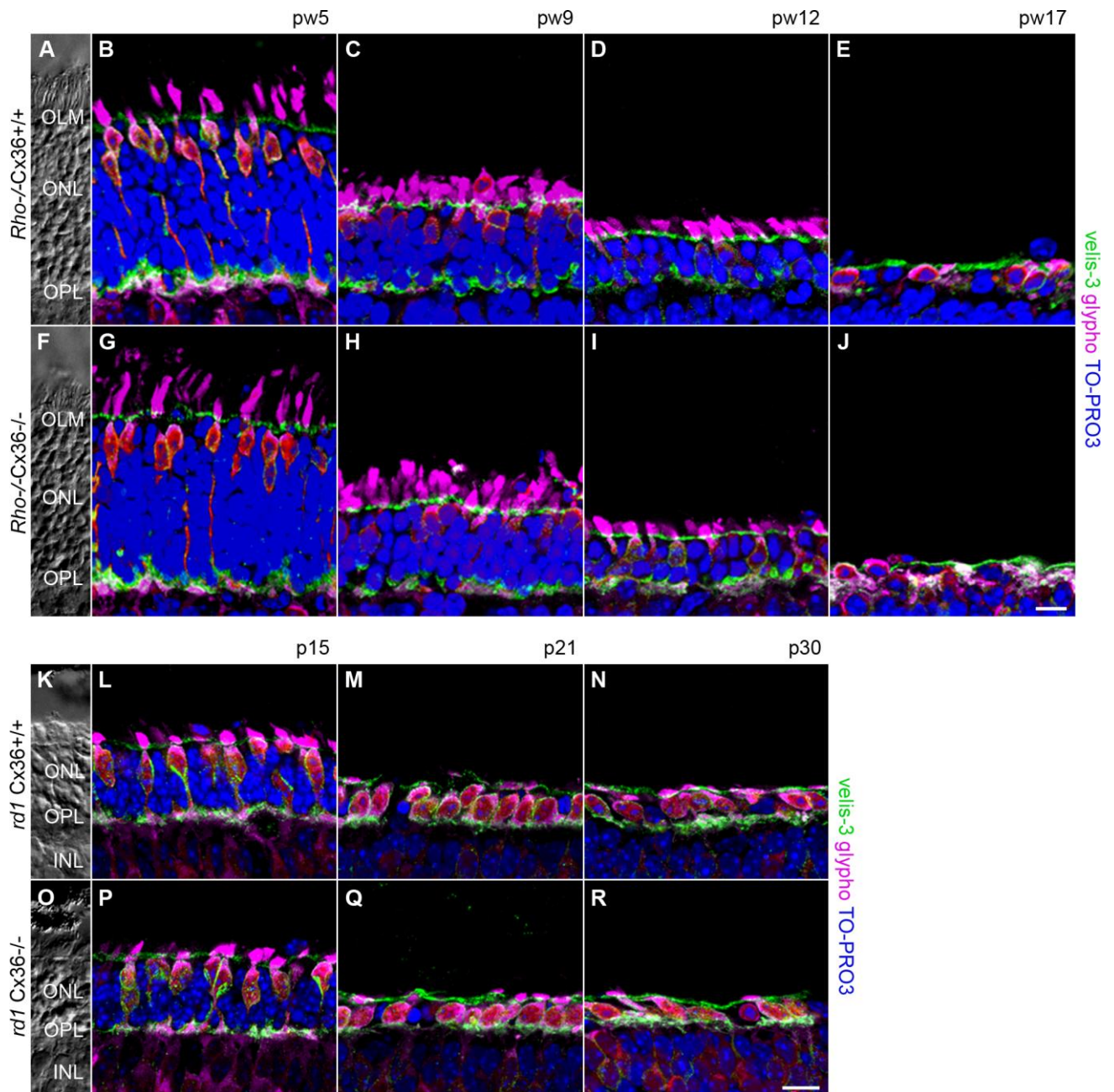


Figure 2. Progression of photoreceptor degeneration in *Rho*^{-/-} and *rd1* mutants. Projections of collapsed confocal scans showed the outer retinal morphology in vertical retina slices of Cx36-expressing (A-E, K-N) and Cx36-deficient (F-J, O-R) *Rho*^{-/-} (A-J) and *rd1* mice (K-R) at different developmental stages. Labeling of cone photoreceptors for glypho (magenta) and staining of photoreceptor terminals and the OLM for velis-3 (green) illustrated the progress of photoreceptor degeneration. Nuclei were stained with TO-PRO-3 (blue). Retinal layers are indicated on transmission photographs in A, F, K, O. Scale bar = 10 μm in J (applies to A-J); in R (applies to K-R).

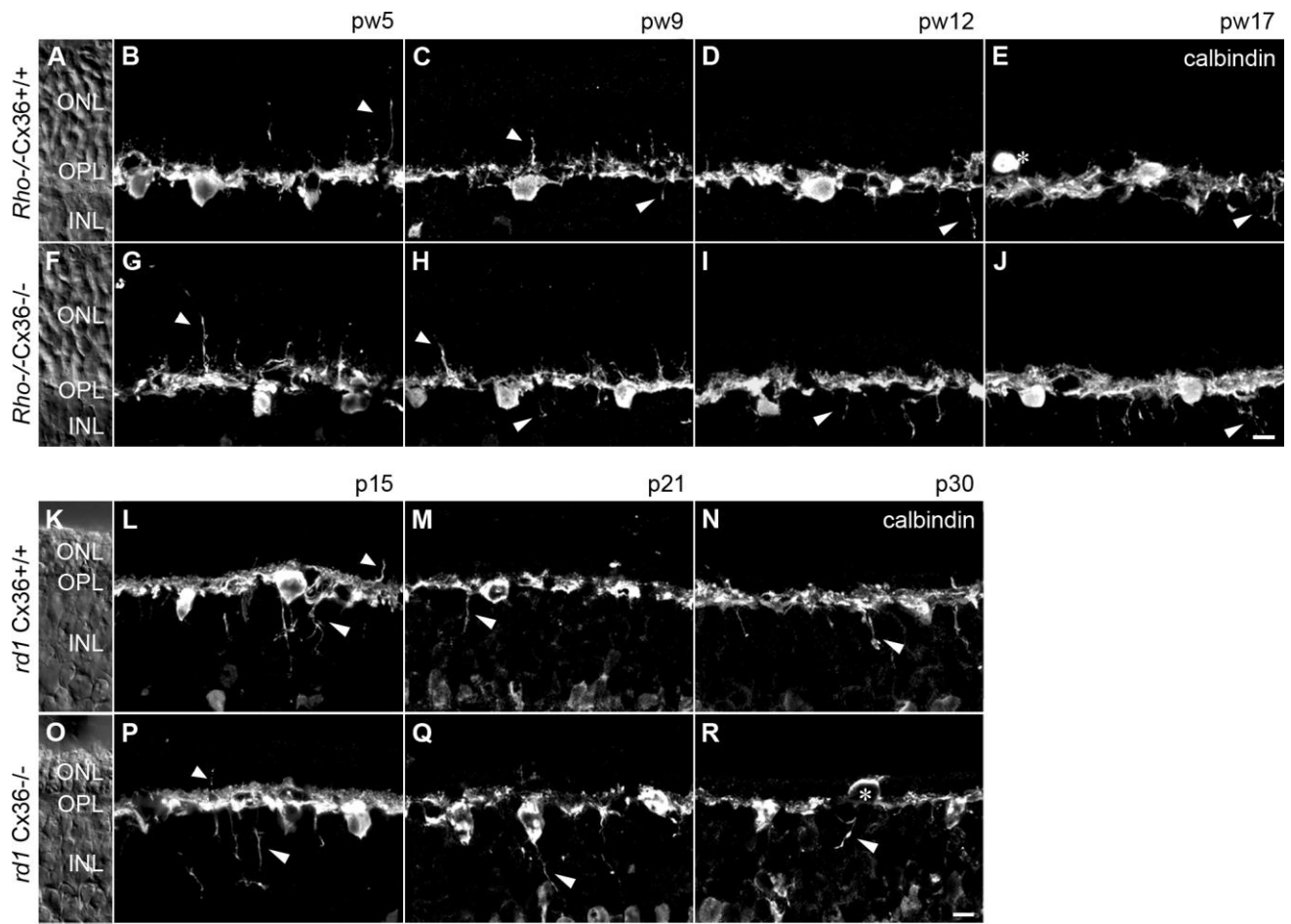


Figure 3. Reorganization of horizontal cells is not changed by Cx36 deficiency. Horizontal cells were labeled with anti-calbindin antibodies at various ages in *Rho*^{-/-}*Cx36*^{+/+} (A-E), *Rho*^{-/-}*Cx36*^{-/-} (F-J) and *rd1Cx36*^{+/+} (K-N), *rd1Cx36*^{-/-} mice (O-R). Independent of Cx36 deletion, the reorganization of HC was initiated by the sprouting of processes into the ONL (B, C, G, H, L, P; short arrowhead). However, at later stages, these processes retracted and horizontal cell dendrites reached progressively into the INL (C-E, H-J, L-N, P-R; long arrowhead). Horizontal cell somata were occasionally found displaced to the ONL (E, R, asterisks). Nomarski micrographs (A, F, K, O) indicate the retinal layering. Scale bar = 10 μ m in J (applies to A-J); in R (applies to K-R).

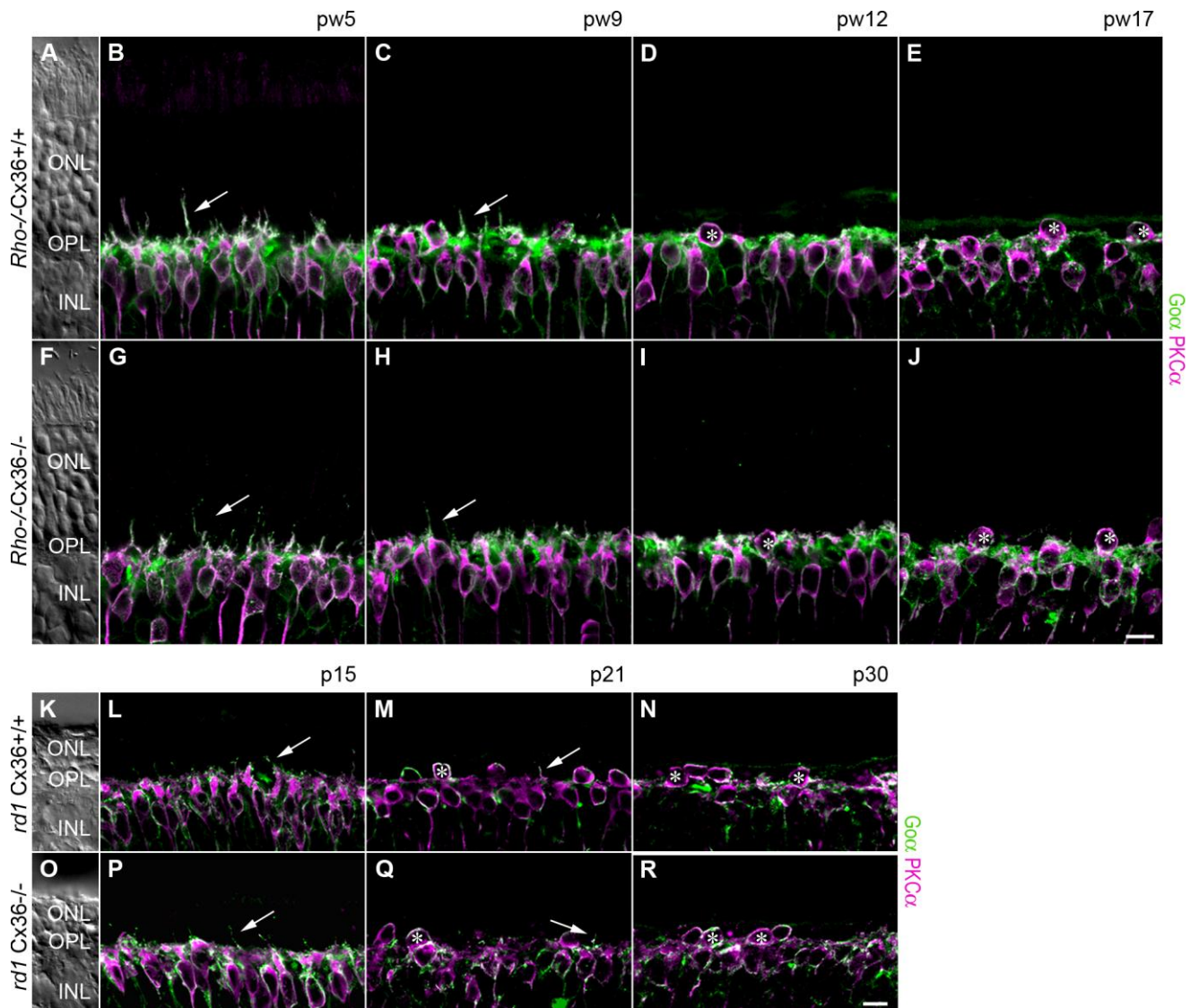


Figure 4. Deletion of Cx36 did not affect remodeling of ON bipolar cells in *Rho*^{-/-} and *rd1* mice. Vertical sections of the retina were double-stained for G0 α (green), a marker for all ON BC, and PKC α (magenta), a marker for rod BC. In Cx36-expressing *Rho*^{-/-} and *rd1* mutants, rod bipolar cell dendrites sprouted into the ONL (B, C, L, M; long arrow) at the onset of degeneration. With progressing photoreceptor degeneration, all ON bipolar cell dendrites were retracted (D, M). In both disease models, PKC α -positive cell somata were frequently found displaced to the ONL (D, E, M, N, asterisks). Remodeling was similar in Cx36-deficient *Rho*^{-/-} (G-J) and *rd1* littermates (P-R). Nomarski micrographs (A, F, K, O) indicate the retinal layering. Scale bars = 10 μ m in J (applies to A-J), in R (applies to K-R).

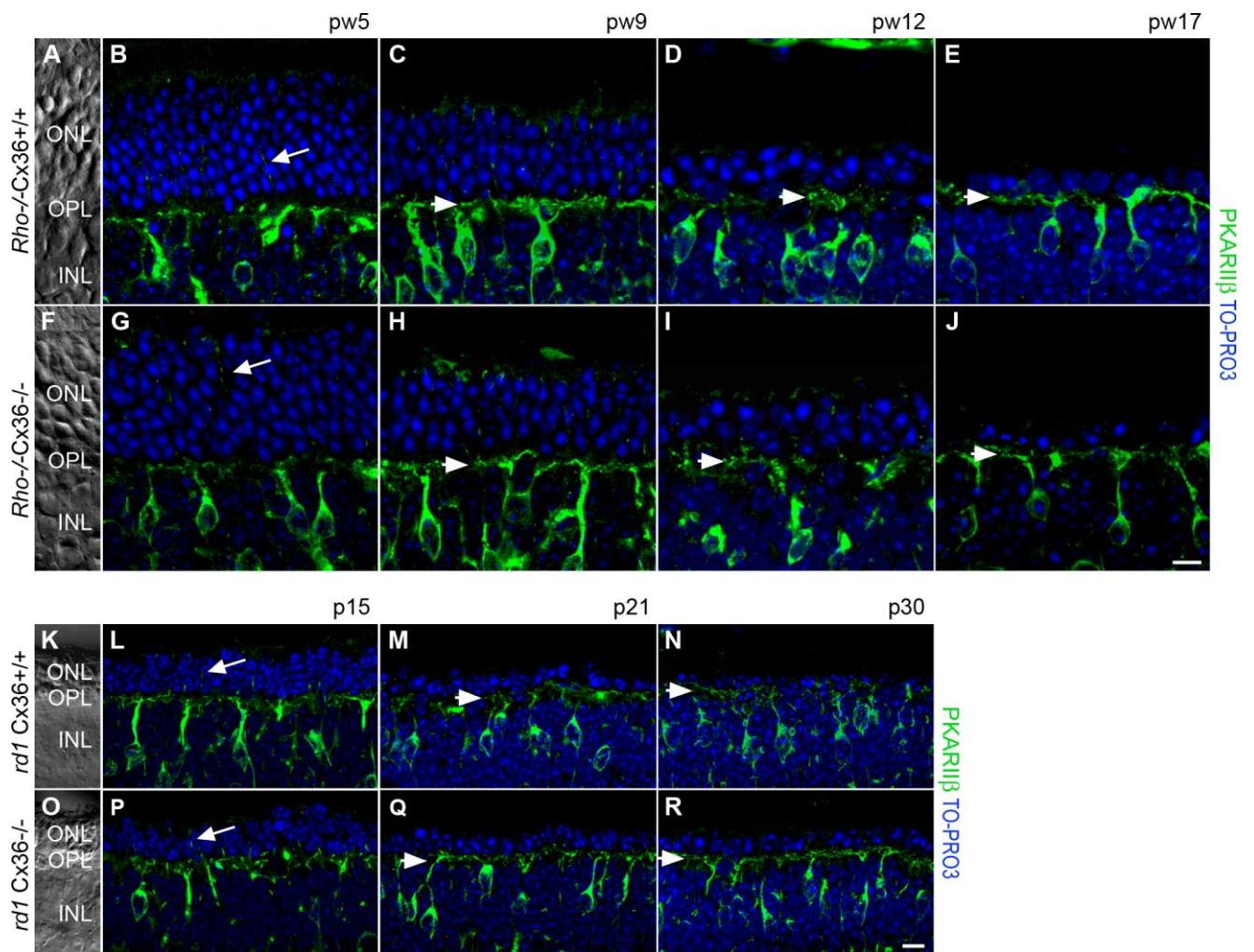


Figure 5. Deletion of Cx36 did not affect remodeling of type 3b OFF bipolar cells. Morphological changes of type 3b OFF cone bipolar cells visualized with anti-PKAR11 β antibodies (green). Nuclei were counterstained with the nucleic acid stain TO-PRO-3 (blue). During photoreceptor degeneration, dendrites of type 3b BC developed very fine processes protruding through the ONL up to the OLM (arrows). When the ONL became thinner with disease progress, these dendrites retracted. Additional dendrites persist in the OPL of all tested ages (short arrow). Morphological changes did not differ between Cx36-expressing and Cx36-deficient *Rho*^{-/-} (A-J) and *rd1* mice (K-R). Scale bars = 10 μ m in J (applies to A-J), in R (applies to K-R).

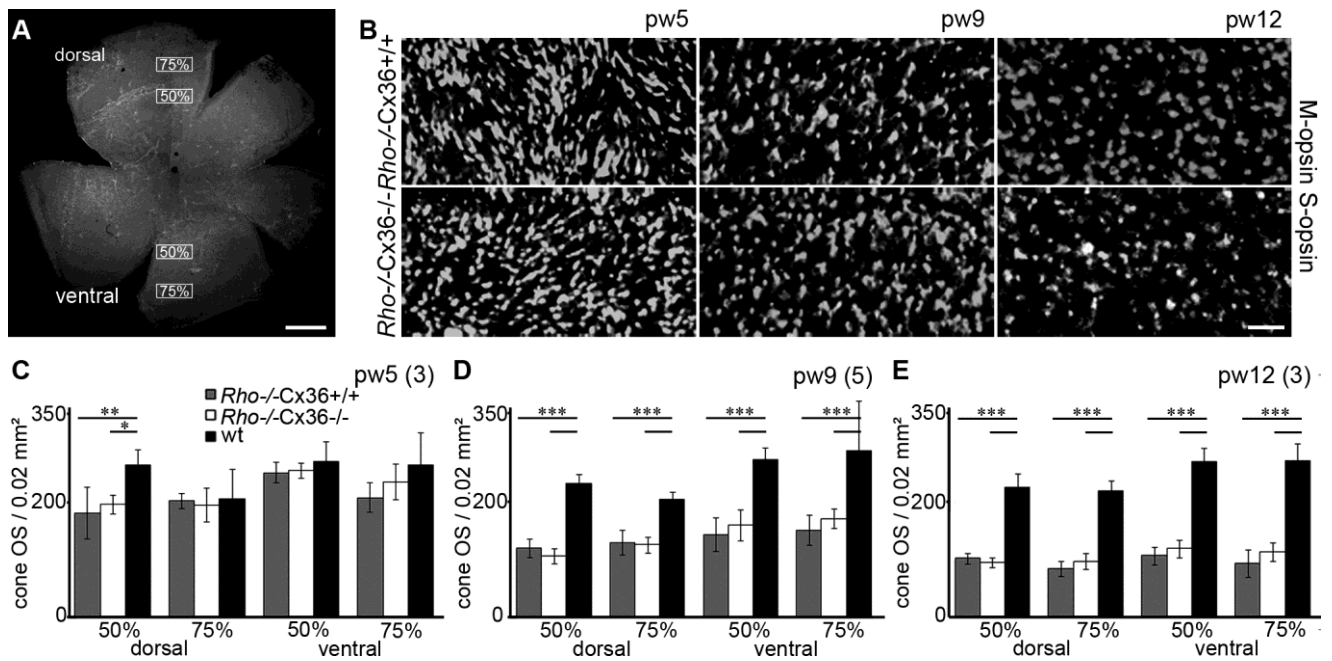


Figure 6. Cx36 deletion did not affect the loss of cone outer segments in *Rho*^{-/-} mice.

Onset of cone degeneration was assessed by the quantification of cone outer segments (COS) in the central and peripheral part in retinal whole-mounts (in a distance of 50% and 75% dorsal and ventral of the optic nerve, as indicated in A). COS were labeled with antibodies against M- and S-opsin. Representative examples of quantified regions in the dorsal part of the retina (75%) in 5-, 9- and 12-week-old *Rho*^{-/-}*Cx36*^{+/+} and *Rho*^{-/-}*Cx36*^{-/-} mice are shown in B. The number of COS per 0.02 mm² was quantified in Cx36-expressing (grey) and Cx36-deficient (white) *Rho*^{-/-} mutants and same-aged wild-type controls (black) at the age of pw5 (C), pw9 (D) and pw12 (E). Values are given as mean ± SD; a t-test was used to compare means: *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001. n specifies the number of animals. Scale bars = 300 μm in A; 25 μm in B.

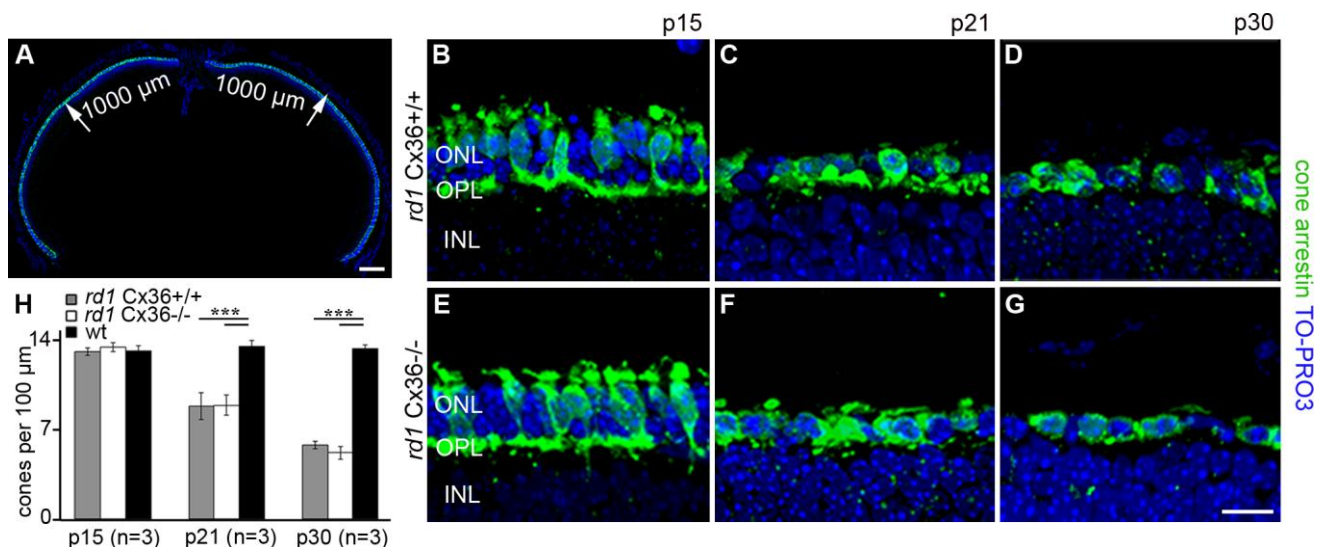


Figure 7. Time course of cone loss in *rd1Cx36^{+/+}* and *rd1Cx36^{-/-}* mice. Quantification of cones in vertical sections of the central retina (defined up to a distance of 1,000 μm from the optic nerve), as indicated in A. B-G show magnifications of the quantified regions in the central ONL of cone arrestin-labeled vertical sections from *rd1Cx36^{+/+}* (B-D) and *rd1Cx36^{-/-}* (E-G) mice at different ages. The bar graph (H) displays the quantification of cone arrestin-positive cells per 100 μm length at different ages in *rd1Cx36^{+/+}* (grey), *rd1Cx36^{-/-}* (white) and wt mice (black). The number of cone photoreceptors in both transgenic mouse lines was reduced at p21 and p30 compared to same-aged wt controls. There are no statistical differences between Cx36-expressing and Cx36-deficient *rd1* mice. Values are given as mean \pm SD; a t-test was used to compare means: ***, $p < 0.001$. n specifies the number of animals. Scale bars = 200 μm in A; 10 μm in G (applies to B-G).

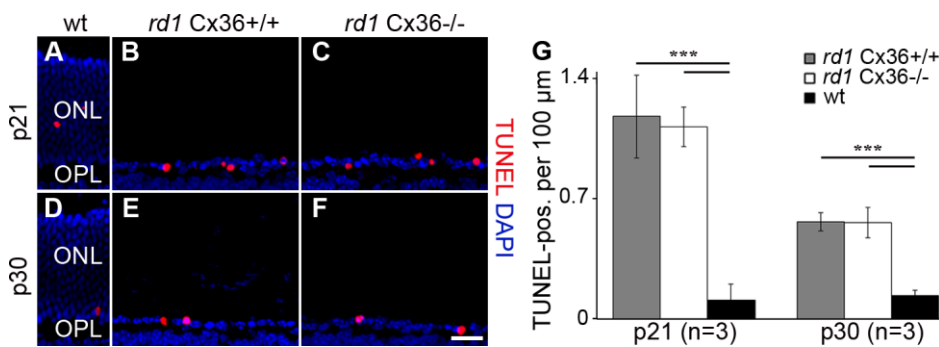


Figure 8. Cell death rate in *rd1Cx36^{+/+}*, *rd1Cx36^{-/-}* and wt mice. Dying cone photoreceptors in vertical sections of wild-type (wt) (A, D), *rd1Cx36^{+/+}* (B, E), *rd1Cx36^{-/-}* mouse retina (C, F) at the ages of p21 (A-C) and p30 (D-F) were labeled by TUNEL staining (red); nuclei were stained with DAPI (blue). Sections from wt controls indicate the normal retinal layering (A, D). The bar graph (G) summarizes the quantification of TUNEL-positive cells in the ONL in *rd1Cx36^{+/+}* (grey), *rd1Cx36^{-/-}* (white) and wt mice (black). The amount of TUNEL-positive cells in both *rd1* genotypes was significantly increased when compared to wt mice. Comparisons between same-aged *rd1* mutants revealed no statistical differences. Values are given as mean \pm SD; a t-test was used to compare means: ***, $p < 0.001$. n specifies the number of animals. Scale bars = 20 μm in F (applies to A-F).

Table 1. Primers used for mouse genotyping.

Primer	Primer sequence 5` to 3`	References*
RhoF	TCT CTC ATG AGC AGC CTA AAG	[17]
RhoR	ATG CCT GGA ACC AAT CCG AG	[17]
Rho KO	TTC AAG CCC AAG CTT TCG CG	[17]
Rd1 2.1F	TGT TGC TCT GCG GTA AGA TG	[66]
Rd1 2.1R	TCC CTC AGT CTG GGA TCA AT	[66]
RD3	TGA CAA TTA CTC CTT TTC CCT CAG TCT G	[66]
RD4	GTA AAC AGC AAG AGG CTT TAT TGG GAA C	[66]
HRT	CAG TAA ATC GTT GTC AAC AGT	[23]
EPS7	TCC	
EX3T	CTG TTC AAG GAC TGG TAA	[23]
Intron	GCG CTG	
EX36	GTC TCC TTA CTG GTG GTC TCT	[23]
DSP4	GTG	

* related to primer sequences and/or PCR conditions used

Table 2. Primary antibodies used in this study.

	Immunogen	Species, type, dilution	Source (Cat. No.)
Calbindin D-28K	Calbindin D-28K, chicken, full-length amino acid sequence	Mouse, monoclonal, 1:5,000	Swant, Marly, Switzerland (300)
Calbindin D-28K	Recombinant rat calbindin, D-28K	Rabbit, polyclonal, 1:1,000	Swant, Marly, Switzerland (CB-38a)
Cone arrestin	Synthetic linear peptide, derived from amino acid 369-389 of cone arrestin	Rabbit, polyclonal, 1:1,000	Millipore, Billerica, MA (AB15282)
Connexin36	C-terminal region of rat and mouse Cx36, derived from amino acid 286-303	Rabbit, polyclonal, 1:500	Invitrogen Carlsbad, CA (51-6300)
Glycogen phosphorylase	Guinea pig-anti glycogen phosphorylase	Guinea pig, polyclonal, 1:1,000	B. Pfeiffer-Guglielmi University of Tübingen, Tübingen, Germany
G _{0α}	Bovine brain G _{0α}	Mouse, monoclonal, 1:500	Millipore, Billerica, MA (AB 144P)
PKARIIβ	Human recombinant protein kinase A, regulatory subunit IIβ derived from amino acids 1-418	Mouse, monoclonal, 1:2,000	BD Bioscience, San José, CA (610625)
PKCα	Raised against a peptide mapping at the C-terminus of PKCα of human origin	Goat, polyclonal, 1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (Sc-208-G)
OPN1SW (N-20)	Raised against an epitope mapping at the N-terminus of the human S-opsin protein encoded by <i>OPN1SW</i>	Goat, polyclonal, 1:500	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA (Sc-14363)
Opsin, red/green	Recombinant human red/green opsin targeting the last 38 amino acids from the C-terminus	Rabbit, polyclonal, 1:500	Millipore, Billerica, MA (AB 5405)
Velis-3	Synthetic peptide derived from the C-terminus of rat velis-3 (MALS-3) protein	Rabbit, polyclonal, 1:1,000	Invitrogen Carlsbad, CA (51-5600)