

Aus dem Institut für Funktionelle und Klinische Anatomie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Tageszeitliche Regulation der Genexpression im retinalen Pigmentepithel der Maus

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Annalisa Leiser
aus Flörsheim am Main

Mainz, 2021

Tag der Promotion: 25.05.2021

Teile der Arbeit publiziert in „Rhythmic Regulation of Photoreceptor and RPE Genes Important for Vision and Genetically Associated With Severe Retinal Diseases“, Investigative Ophthalmology & Visual Science, August 2018

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iii
Tabellenverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	v
1. Einleitung und Zielsetzung.....	1
2. Literaturdiskussion	3
2.1 Funktionelle Anatomie der Netzhaut beim Säuger	3
2.2 Der visuelle Zyklus.....	9
2.3 Das circadiane System der Säuger	11
2.3.1 Grundlagen circadianer Rhythmik.....	11
2.3.2 Komponenten des circadianen Systems.....	12
2.3.3 Die molekulare Organisation der circadianen Uhr	14
2.3.4 Uhren in der neuronalen Retina	16
2.3.5 Uhren im retinalen Pigmentepithel	21
3. Materialien und Methoden	25
3.1 Materialien	25
3.1.1 Chemikalien.....	25
3.1.2 Laborgeräte	26
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	27
3.1.4 Software	28
3.1.5 Primer.....	28
3.2 Methoden.....	31
3.2.1 Entnahme des retinalen Pigmentepithels.....	31
3.2.2 RNA-Extraktion.....	31
3.2.3 cDNA-Synthese (Reverse Transkriptase, RT)	32
3.2.4 Quantitative „real time polymerase chain reaction“ (qRT-PCR).....	33
3.2.5 Herstellung der Standards	34
3.2.6 Statistische Auswertung.....	35

4. Ergebnisse	37
4.1 Uhrengene und putativ Uhren-kontrollierte Gene des retinalen Pigmentepithels.....	37
4.1.1 Die Uhrengene <i>Per1</i> , <i>Per2</i> , <i>Per3</i> zeigen eine tageszeitliche Rhythmik	37
4.1.2 Tageszeitliche Rhythmik der uhrenkontrollierten Gene <i>Dbp</i> und <i>E4bp4</i>	39
4.1.3 <i>Drd4</i> und <i>Gnaz</i> zeigen keine Rhythmik.....	41
4.2 Gene des visuellen Zyklus.....	42
4.2.1 Zentrale Komponenten des visuellen Zyklus stehen unter tageszeitlicher Regulation.....	42
4.2.2 Schlüsselenzyme des Energiestoffwechsels sind arrhythmisch	44
5. Diskussion	46
5.1 Circadiane Uhren im retinalen Pigmentepithel	46
5.1.1 Das retinale Pigmentepithel beherbergt einen molekularen Oszillator	46
5.1.2 Der Neuromodulator Dopamin spielt im retinalen Pigmentepithel eine entscheidende Rolle als „Entrainer“	49
5.2 Funktionelle Relevanz der molekularen Uhr im retinalen Pigmentepithel	52
5.2.1 Der visuelle Zyklus wird tageszeitlich reguliert.....	52
5.2.2 Einfluss des molekularen Oszillators auf den Metabolismus im retinalen Pigmentepithel	54
6. Zusammenfassung.....	57
Literaturverzeichnis	I
Danksagung.....	XXII
Tabellarischer Lebenslauf	XXIII

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Der Aufbau der Retina	5
Abb. 2	Schematischer Aufbau des retinalen Pigmentepithels.....	6
Abb. 3	Funktionen des retinalen Pigmentepithels	8
Abb. 4	Adaptierte schematische Darstellung des visuellen Zyklus	10
Abb. 5	Organisation des circadianen Systems in Säugern	13
Abb. 6	Die molekulare Organisation der circadianen Uhr	15
Abb. 7	Die Rolle von Melatonin und Dopamin in der Retina	20
Abb. 8	24-Stunden-Expressionsprofil der Uhrgene <i>Per1-3</i> , <i>Cry1-2</i> und <i>Bmal1</i>	38
Abb. 9	24-Stunden-Expressionsprofil der uhrenregulierten Gene <i>Dbp</i> und <i>E4bp4</i>	40
Abb. 10	24-Stunden-Expressionsprofil von <i>Drd4</i> und <i>Gnaz</i>	41
Abb. 11	24-Stunden-Expressionsprofile der Gene des visuellen Zyklus.....	43
Abb. 12	24-Stunden-Expressionsprofile der Schlüsselenzyme des Energiestoffwechsels.....	45

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Tabellarische Zusammenfassung der verwendeten Primer	28
Tab. 2	Reaktionsansatz zur Synthese von cDNA	32
Tab. 3	Reaktionsansatz des Mastermixes	33
Tab. 4	PCR-Programm.....	34
Tab. 5	Parameter der Cosinor-Funktion.....	36
Tab. 6	Statistische Analyse der in den Abbildungen 8, 9 und 10 dargestellten Expressionsprofile	39
Tab. 7	Statistische Analyse der in den Abbildungen 11 und 12 dargestellten Transkriptionsprofile	44
Tab. 8	Vergleich der Rhythmik einzelner Gene zwischen RPE, Retina und SCN .	49

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AANAT	Arylalkylamin- <i>N</i> -Acetyltransferase
Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
<i>Acadm</i>	engl. acyl-coenzyme A dehydrogenase
AE2	engl. anionen exchanger 2
AMPA-R.	engl. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazoleprpionic acid receptor
ANOVA	einfaktorielle Varianzanalyse
arRP	autosomal-rezessiv vererbte Retinitis pigmentosa
AS	Außensegmente
bHLH	basis-helix-loop-helix
<i>Bmal1</i>	engl. brain and muscle ARNT-like 1, Synonym: MOP3
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
CamK	engl. calcium/Calmodulin-dependent protein kinase class
CCG	engl. clock controlled gene
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (engl. complementary desoxyribonucleinacid)
<i>Clock</i>	engl. circadian locomotory output cycles kaput
CNGCs	engl. cGMP-gated-cation-channels
CNS	zentrales Nervensystem
<i>Cpt1</i>	engl. carnitine palmitoyltransferase 1
CRALBP	Zellulär-Retinalaldehyd-bindendes Protein
CRE	engl. cAMP-response elements

CREB	engl. cyclic adenosine monophosphate-response-element-binding-protein
<i>Cry1, 2</i>	engl. cryptochrome 1, 2
CT	engl. circadian time
Ct	engl. threshold cycle
D2R	Dopamin-D2-Rezeptor
D4R	Dopamin-D4-Rezeptor
<i>Dbp</i>	engl. albumin gene D-site binding protein
DD	Dunkel/Dunkel
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. desoxyribonucleid acid)
DNase	engl. Desoxyribonuclease
dsDNA	engl. double-stranded DNA
E-box	engl. enhancer element
EDTA	Etyhlendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERG	Elektroretinogramm
et al.	lateinisch et alia; und andere
FAK	engl. focal adhesion kinase
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure, engl. gamma-aminobutyric acid
<i>Gapdh</i>	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunden
H1R	Histamin-1-Rezeptor
H2R	Histamin-2-Rezeptor
INL	engl. inner nuclear layer
IPL	engl. inner plaxiform layer

IPM	Interphotorezeptormatrix
ipRGCs	photosensitive Ganglienzellen
IRBP	Interphotorezeptor-Retinol-bindende Protein
IS	Innensegment
kDa	Kilodalton
l	Liter
LCA	Lebersche kongenitale Amaurose
LD	Licht/Dunkel
LRAT	Lecithin-Retinol-Acyltransferase
lux	Beleuchtungsstärke
M	Mol pro Liter
MAPK	engl. mitogen-aktiviert-protein-kinase
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MV	Mikrovilli
N-ret-PE	<i>N</i> -Retinylidenphosphatidylethanolamin
NA	Noradrenalin
NCBI	engl. National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
NMDA-R.	<i>N</i> -Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NTC	engl. no template control
<i>Opn4</i>	Melanopsin
PACAP	engl. pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PAS	Photorezeptor-Außensegmente
PBS	engl. phosphate buffered saline

PCR	engl. polymerase chain reaction
PE	Phosphatidylethanolamin
PEDF	engl. pigment epithelium-derived factor
<i>Per1, 2, 3</i>	engl. period 1, 2, 3
PKA	Proteinkinase A
PNS	photoendokrines System
q-RT-PCR	engl. Quantitative-Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction
RDH5, 10, 11	Retinol-Dehydrogenase 5, 10, 11
RHT	Retinohypothalamischer Trakt
RLBP1	engl. retinaldehyde-binding protein 1
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleid acid)
RNase	Ribonuclease
RPE	retinales Pigmentepithel
RPE65	retinales Pigmentepithelspezifisches 65-kDa-Protein (Retinoid-Isomerohydrolase)
RT	Reverse Transkriptase (engl. reverse transkriptase)
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
sog.	Sogenannt
β -Hb	β -Hydroxybutyrat
β -ME	β -Mercaptoethanol
Tab.	Tabelle
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VEGF	engl. vascular endothelial growth factor
VIP	vasoatives intestinales Peptid
z.B.	zum Beispiel

ZT	Zeitgeber Zeit
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

1. Einleitung und Zielsetzung

Die zentrale Uhr der Säuger ist der Nucleus suprachiasmaticus (SCN), ein Kerngebiet im ventralen Teil des Hypothalamus (1). Dieses Kerngebiet exprimiert Uhrengene und fungiert als molekularer Oszillator, der die circadiane Rhythmik des Körpers kontrolliert (2, 3). Als „Meisteruhr“ erhält der SCN optische Informationen aus der Retina (4). Diese ermöglicht es ihm, seine endogene Oszillation an veränderte Lichtbedingungen anzupassen. Außerdem kann er Oszillatoren in peripheren Geweben synchronisieren (3). Diese wiederum regulieren in den jeweiligen Geweben lokale physiologische und metabolische Prozesse (3).

Wie der SCN, scheint auch die Säugetier-Retina ein circadianes Uhrensysteem zu besitzen und als autonomer Oszillator zu fungieren (1, 2). Das retinale Uhrensysteem ist dabei maßgeblich an der Regulation der Physiologie der Retina beteiligt (4). Die Oszillatoren der amakrinen Zellen der Retina steuern die Synthese und Ausschüttung des Neuromodulators Dopamin und die Oszillatoren in den Photorezeptoren regulieren die Melatoninsynthese (5, 6). Dopamin wirkt dabei als „Signal für den Tag“ und ermöglicht so die Anpassung der Retina an Licht, wohingegen Melatonin als Gegenspieler des Dopamins als „Signal für die Nacht“ fungiert und die Adaption der Retina an Dunkelheit vermittelt (6).

Noch nicht eindeutig geklärt ist, ob auch das retinale Pigmentepithel (RPE), welches mit der Retina eine funktionelle Einheit bildet, einen oder mehrere Oszillatoren besitzt und wie diese Oszillatoren reguliert werden. Baba et al. konnten in einer 2010 durchgeführten Studie zeigen, dass die *Per2*-mRNA-Menge im RPE eine deutliche circadiane Rhythmik aufweist, was ein Hinweis auf die Existenz circadianer Uhren im RPE ist (7). Pavan et al. (2006) und Yoshikawa et al. (2008) konnten darüber hinaus nachweisen, dass kultivierte RPE-Zellen einen circadianen Rhythmus in der Adenylylcyclase (AC)- sowie *Bmal1*-Luciferase-Aktivität zeigen (8, 9). Ebenso zeigte die Expression von *Cry1* im RPE eine tageszeitliche Rhythmik (10).

Des Weiteren ist bekannt, dass die Phagozytose der Außensegmente (AS) der Photorezeptoren unter circadianer Kontrolle steht (11). Das RPE nimmt in der Regulation des sogenannten (sog.) „disk sheddings“ eine zentrale Rolle ein und es konnte gezeigt werden, dass der circadiane Rhythmus der Phagozytose auch nach Zerstörung des SCNs persistiert. Er wird folglich nicht im SCN, sondern im Auge selbst

generiert (7). So ist möglich, dass der Rhythmus dieses Regenerationsprozesses über Oszillatoren des RPEs induziert wird.

Das RPE ist für die Funktion der Photorezeptoren und somit für die visuelle Wahrnehmung von Säugern essentiell. Beispielsweise (bspw.) sind die im RPE exprimierten Proteine LRAT, RPE65, RDH5, RDH10, RDH11 und RLB1 zentrale Bestandteile des visuellen (retinoiden) Zyklus, über den das für den Sehvorgang notwendige 11-cis-Retinal regeneriert wird (12, 13).

Ein Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der circadianen Uhr des RPE. Hierzu wurden die tageszeitlichen Expressionsprofile der Uhrengene *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2* und *Bmal1* sowie der Uhren-regulierten Gene *Dbp* und *E4bp4* analysiert. Darüber hinaus wurde untersucht, inwieweit die bekanntermaßen in der Retina rhythmisch exprimierten Gene *Cpt1 α* , *Acadm*, *Pgc1a*, *Gnaz* und *Drd4* auch im RPE eine Rhythmik zeigen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war zu prüfen, inwieweit die Regeneration des Photopigments 11-cis-Retinal einer tageszeitlichen Adaptation unterliegt. Hierzu wurde eruiert, inwieweit die zentralen Gene des visuellen retinoiden Zyklus (*Lrat*, *Rpe65*, *Rdh5*, *Rdh10*, *Rdh11* und *Rlbp1*) eine tageszeitliche Regulation ihrer Expression aufwiesen.

2. Literaturdiskussion

2.1 Funktionelle Anatomie der Netzhaut beim Säuger

Die Netzhaut oder Retina ist entwicklungsgeschichtlich gesehen ein Teil des Gehirns. Sie entwickelt sich aus den beiden Blättern des neuroektodermalen Augenbechers, der sich in der 3. - 4. Entwicklungswoche aus dem Zwischenhirn (Diencephalon) ausstülpt (14, 15). Aus dem äußeren Blatt des Augenbechers entwickelt sich das zur Sklera hin orientierte Stratum pigmentosum, welches auch als RPE bezeichnet wird, wohingegen aus dem inneren Blatt das zum Glaskörper gelegene Stratum nervosum entsteht. Die Retina setzt sich somit aus zwei unterschiedlichen Gewebeblättern, dem RPE und der neuronalen Retina, zusammen, wobei beide eine funktionelle Einheit bilden. Die neuronale Retina enthält die ersten drei Neurone der Sehbahn: Photorezeptorzellen (1. Neuron), Bipolarzellen (2. Neuron) und Ganglienzellen (3. Neuron). Die Photorezeptorzellen lassen sich morphologisch und funktionell in zwei verschiedenen Typen unterteilen: Stäbchen und Zapfen. Beide bestehen aus einem lichtempfindlichen Fortsatz, welcher wiederum aus einem Innensegment (IS) und einem AS gebildet wird, einem Perikaryon und einem kurzen axonalen Fortsatz. Die Stäbchen sind für das Dämmerungssehen (skotopisches Sehen) und die Zapfen für das Sehen bei Tageslicht (photopisches Sehen) verantwortlich (15). Die Bipolarzellen verbinden die Photorezeptoren mit den Ganglienzellen, deren Axone den Sehnerv bilden und die Lichtinformationen zum Metathalamus des Gehirns weiterleiten (15). Der vordere Teil der Netzhaut wird von den Epithelien des Ziliarkörpers und der Iris gebildet, die entwicklungsgeschichtlich ebenfalls den Blättern des Augenbechers entstammen (15). Die Grenze zwischen den beiden Teilen der inneren Augenhaut wird von der Ora serrata, einer sägezahnartigen Linie, gebildet (15).

Histologisch werden zehn Schichten der Netzhaut unterschieden (16) (s. Abb. 2): Die äußerste Schicht bildet das RPE (Stratum pigmentosum), welches mit seiner apikalen, Mikrovilli (MV) besetzten Seite die Photorezeptoren umschließt und basal an die Aderhaut (Choroidea) grenzt (17). Der genaue Aufbau und die Funktionen des RPEs werden im Abschnitt 2.1.1 noch eingehender behandelt.

Die zweite Schicht enthält die sensorischen Fortsätze der Photorezeptoren (15). Das Licht muss folglich erst alle weiter innen gelegenen Schichten der Netzhaut durchqueren, um auf die lichtempfindlichen Teile der Photorezeptoren zu treffen. Das IS stellt das metabolische Zentrum der Zelle dar. Über ein dünnes Zilium steht es in Verbindung mit dem AS. Dieses enthält in Stäbchen das Sehpigment Rhodopsin,

welches in aktiver Form mit 11-cis-Retinal gekoppelt ist und einen zentralen Bestandteil der Transduktion von Licht in elektrochemische Signale darstellt (18) (s. Abb. 1): Trifft ein Photon auf die Retina, bewirkt dies eine Konformationsänderung des Opsins. Durch den Lichtreiz wird 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal umgewandelt, sodass aus Rhodopsin aktiviertes Rhodopsin (Meta-Rhodopsin II) wird. Das aktivierte Rhodopsin bindet an das G-Protein Transducin, wodurch dieses ebenfalls aktiviert wird. GDP wird an der alpha-Untereinheit (α -UE) des Transducins durch GTP ersetzt. Die α -UE des Transducins kann nun eine cGMP-abhängige Phosphodiesterase stimulieren, welche cGMP zu GMP hydrolysiert. Die intrazelluläre cGMP-Konzentration nimmt infolgedessen ab, sodass cGMP-abhängige Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle geschlossen werden und es zu einer Abnahme der zytosolischen Ca^{2+} - und Na^+ -Konzentration kommt. Die Zelle hyperpolarisiert und die Glutamatausschüttung der Zelle wird gehemmt. In Zapfen läuft die Phototransduktion ähnlich wie in Stäbchen ab – mit dem Unterschied, dass diese anstelle des Sehpigments Rhodopsin sog. Zapfen-Opsine enthalten, die für jeweils verschiedene Wellenlängen des Lichts sensibel sind.

An die Schicht der sensorischen Fortsätze schließt sich die äußere Grenzschicht (Stratum limitans externum) an, welche Zellkontakte (Zonula adherentes) zwischen den Photorezeptorzellen und den sog. Müller-Zellen enthält. Sie gehören zu den Gliazellen der Retina und übernehmen u.a. (unter anderem) eine Stützfunktion (19).

In der vierten Schicht, dem Stratum nucleare externum, liegen die Perikarya der Photorezeptoren, die das erste Neuron der Sehbahn darstellen (15).

Die fünfte Schicht, das Stratum plexiforme externum, enthält die Synapsen der 1. Neurone (Photorezeptoren) mit den Bipolarzellen (2. Neuron) und Horizontalzellen. Sie dient entsprechend der Informationsweiterleitung und -verarbeitung (15).

An das Stratum plexiforme externum schließt sich das Stratum nucleare internum an. Hier sind die Perikarya der Bipolarzellen sowie der Horizontalzellen, der amakrinen Zellen und Müller-Zellen zu finden.

In der nächsten Schicht, dem Stratum plexiforme internum, findet die Umschaltung der bipolaren Zellen auf die Ganglienzellen (3. Neuron) statt. Die Perikarya der Ganglienzellen liegen in der achten Schicht der Retina, dem Stratum ganglionicum, wohingegen sich die Axone der Ganglienzellen in der neunten Schicht, dem Stratum neurofibrarum, sammeln. Die letzte Schicht der Retina, die Membrana limitans interna, wird von der Plasmamembran bzw. der Basallamina der Müller-Zellen gebildet (15).

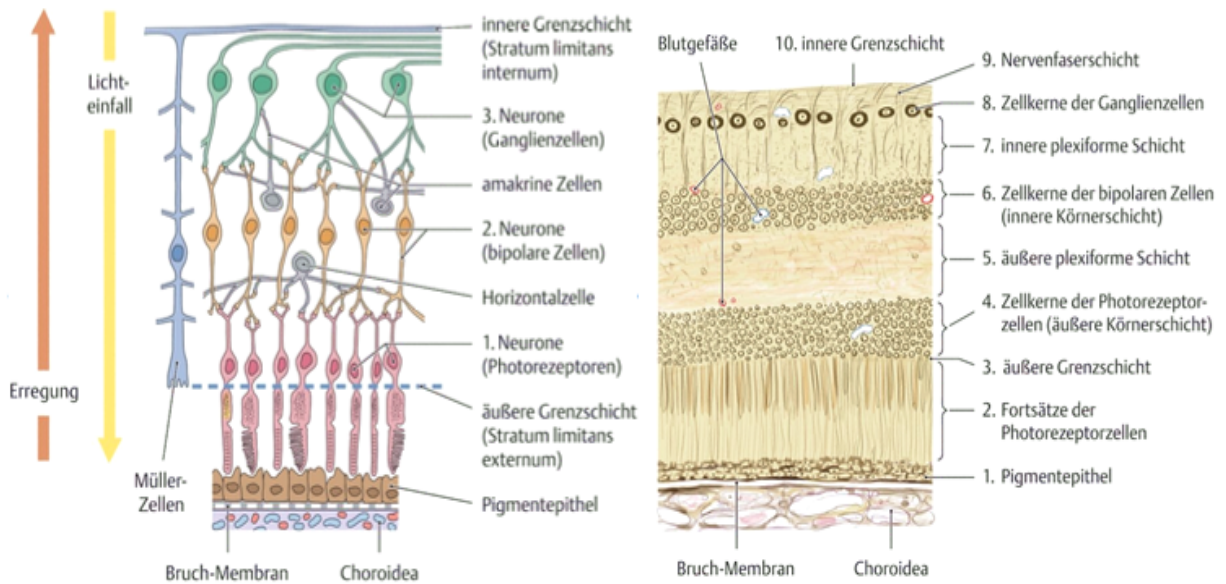


Abb. 1 Der Aufbau der Retina

Die Abbildungen stellen den Aufbau der Retina dar. Im histologischen Bild lassen sich zehn Schichten unterscheiden. Deutlich erkennbar ist die Ausbreitung der Photorezeptoren über mehrere Schichten der Netzhaut sowie ihr direkter Kontakt zum außen liegenden retinalen Pigmentepithel. Die Erregungsleitung läuft dem Lichteinfall entgegen von außen nach innen. Einzelheiten siehe Text. Abbildungen entnommen aus Schünke M., Schulte E., Schuhmacher U. et. al., Prometheus Lernatlas der Anatomie Kopf und Neuroanatomie, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2006; Abb. a, Seite 163

Das RPE liegt zwischen der Aderhaut (Choroidea) und den Photorezeptoren der Retina (20) (s. Abb. 2 und 3). Es besteht aus einer einschichtigen Lage hexagonaler, kubisch-prismatischer Epithelzellen, die sowohl eine strukturelle als auch eine funktionelle Polarität aufweisen (17).

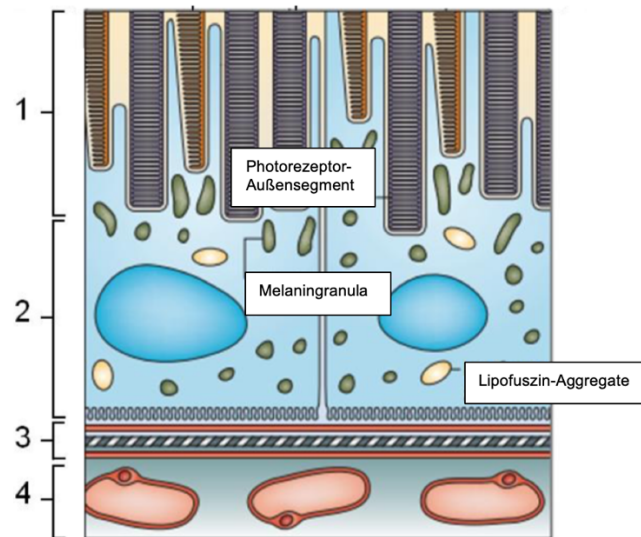


Abb. 2 Schematischer Aufbau des retinalen Pigmentepithels

Die Photorezeptoraußensegmente (1) werden von apikalen Mikrovilli der Zellen des RPEs, die zahlreiche Melaningranula und im Alter Lipofuszinaggregate (2) enthalten, umgeben. Die Bruch'sche Membran (3) grenzt apikal an das RPE und besteht aus der Plasmamembran von RPE-Zellen, einer inneren Kollagenschicht, einer Elastinschicht, einer äußeren Kollagenschicht sowie der Plasmamembran der Zellen der Choroidea (4). Abkürzung: *RPE = retinales Pigmentepithel*

Abbildung entnommen aus „Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait“, A.F. Wright et al., 2010 (21)

Die apikale, an die Photorezeptoren der Retina grenzende Seite des RPEs ist mit MV besetzt, was zu einer Oberflächenvergrößerung der Zellen führt (22). Dies erleichtert den Stoffaustausch zwischen dem RPE und der Retina. Das RPE versorgt die Photorezeptoren mit Metaboliten wie Glucose, Vitamin A oder Fettsäuren und sorgt gleichzeitig für einen Abtransport von Wasser, Ionen und Giftstoffen (22). Die MV umschließen die lichtsensitiven AS der Photorezeptoren, wobei die Enden der MV bis zu deren IS reichen und erst in unmittelbarer Nähe zu Fortsätzen der Müller-Zellen enden (23). Durch diese enge Verzahnung zwischen Photorezeptoren und RPE wird die Phagozytose der abgestoßenen AS der Photorezeptoren erleichtert. Die als Phagosom aufgenommenen AS werden innerhalb der RPE-Zellen über einen Mikrotubuli-assoziierten, energieabhängigen Transport zu basalen Lysosomen befördert, in denen sie durch Enzyme abgebaut werden (23). Mit steigendem Alter führt ein unvollständiger Abbau der AS-Fragmente zu Lipofuszin-Einlagerungen (24). Lipofuszin-Granula sind beim Menschen etwa ab dem 6. Lebensmonat nachweisbar und akkumulieren mit steigendem Lebensalter immer weiter. Durch Einschränkung des „freien“ Zellvolumens behindern die Granula die Funktion des RPEs, sodass bspw.

lysosomale Prozesse gestört werden. Zudem wirkt Lipofuszin phototoxisch und induziert möglicherweise durch seinen autofluoreszierenden Bestandteil „anionen-exchanger“ (AE2) einen apoptotischen Zelltod (14, 22).

Eine weitere wichtige Aufgabe des RPEs liegt im Schutz der Netzhaut mittels Lichtabsorption. Die Epithelzellen besitzen vor allem (v.a.) in ihrem apikalen Bereich Melanin-Granula, die Streulicht aufnehmen und zudem antioxidativ wirken, sodass die Retina vor schädigenden Einwirkungen geschützt wird (22). Des Weiteren enthält das RPE eine große Menge antioxidativer Enzyme wie Superoxid-Dismutase und Katalase sowie nichtenzymatische Antioxidantien wie die Carotinoide Lutein und Zeaxanthin, Ascorbate, alpha-Tocopherol und β -Carotene (22). Unterstützt werden diese durch Glutathion und Melanin, die ebenfalls antioxidativ wirken können (22).

Der apikal liegende subretinale Spalt zwischen der neuronalen Retina und dem RPE enthält die sog. Interphotorezeptormatrix (IPM), die den zwischen den AS verbleibenden Interzellularraum ausfüllt. Die IPM ist essentiell für die Interaktion der Zellpopulationen. Sie ermöglicht Austauschvorgänge und gewährleistet eine Anhaftung zwischen RPE und neuronaler Retina (14).

Insbesondere ist die IPM am visuellen (retinoiden) Zyklus beteiligt: Das beim Sehvorgang (s. Abschn. 2.1, Abb. 1) entstandene all-trans-Retinal wird in die IPM sezerniert und von dort aus in die RPE-Zellen aufgenommen. Hier wird es über mehrere enzymatische Schritte zu 11-cis-Retinal regeneriert und dann wieder in die IPM abgegeben (22).

Auf der basalen Seite des RPEs zeigt sich eine Faltung der Oberfläche, die wie die apikal liegenden MV der Oberflächenvergrößerung und somit dem verbesserten Stoffaustausch dient (17). Hier grenzt das RPE an die Bruch'sche Membran, welche eine pentalaminäre Struktur aufweist: Die erste Schicht wird von der Basallamina der RPE-Zellen gebildet, welche selbst aus Strukturproteinen, Laminin, Fibronectin und Typ-IV-Kollagen besteht. Daran schließen sich eine Kollagenschicht sowie eine elastische Schicht, gefolgt von einer weiteren Kollagenschicht, an. Die letzte Lage der Bruch'schen Membran bildet die Basallamina der Endothelzellen der Choriokapillaris (14). Die basale Seite des RPEs bildet eine epitheliale Barriere zum Gefäßsystem der Choroidea und kontrolliert als Teil der Blut-Retina-Schranke den Stoffaustausch zwischen den beiden Geweben. Hieran sind auch die zwischen den RPE-Zellen gelegenen Tight junctions beteiligt (20).

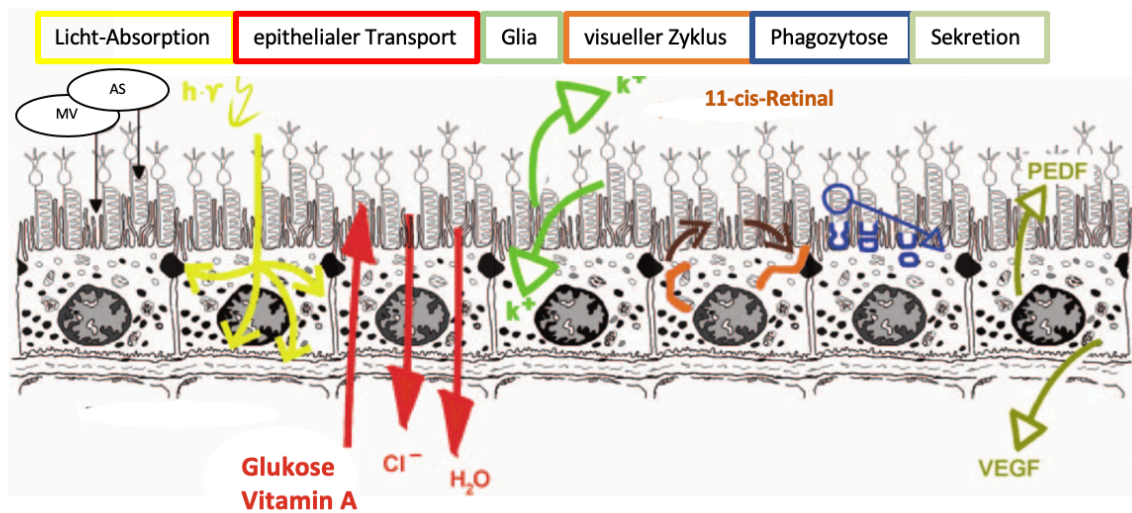


Abb. 3 Funktionen des retinalen Pigmentepithels

Die Abbildung fasst die Funktionen des RPE schematisch zusammen. Erkennbar ist, dass das RPE nicht nur für den epithelialen Transport von Nährstoffen wie Glucose sowie die Sekretion von Wachstumsfaktoren wie PEDF und VEGF verantwortlich ist, sondern dass es auch eine entscheidende Rolle im visuellen Zyklus sowie der Phagozytose von AS der Photorezeptoren spielt. Das RPE ist für die Vitalität der Photorezeptoren und für den Sehvorgang essentiell. Abkürzungen: *RPE* = *retinales Pigmentepithel*, *PEDF* = *pigment epithelium-derived factor*, *VEGF* = *vascular endothelial growth factor*, *AS* = *Außensegmente*, *MV* = *Mikrovilli*

Abbildung entnommen und verändert aus „The retinal pigment epithelium in visual function“, O. Strauss, 2005 (22)

2.2 Der visuelle Zyklus

Das lichtensitive Pigment der Stäbchen ist Rhodopsin. Es besteht aus einem Membranprotein, dem Opsin (7-transmembran-Domäne G-gekoppeltes Rezeptor-Protein), und einem Chromophor, dem 11-cis-Retinal (20, 25). Die Zapfen enthalten als Sehpigmente verschiedene Zapfen-Opsine. Im Folgenden wird der visuelle Zyklus der Stäbchen dargestellt. Im Prinzip verläuft der visuelle Zyklus jedoch für beide Photorezeptor-Typen ähnlich (s. Abb. 4).

Wie bereits beschrieben, isomerisiert 11-cis-Retinal während des Sehvorgangs zu all-trans-Retinal (20) (s. Abschn. 2.1). Entsprechend muss 11-cis-Retinal nun regeneriert werden. Dazu zerfällt Metarhodopsin II (aktiviertes Rhodopsin) am Ende des Transduktionsvorgangs in Opsin und all-trans-Retinal (15).

All-trans-Retinal wird in das Lumen des Stäbchen-AS ausgeschüttet. Dort wird Membran-Phosphatidylethanolamin (PE) angehängt, wobei *N*-Retinylidenphosphatidylethanolamin (*N*-ret-PE) entsteht (26). *N*-ret-PE kann nun durch ein großes 12-Transmembran-Domäne-Protein namens ATP-bindende-KasseteA4 (ABCA4) von der luminalen zur zytoplasmatischen Seite wandern (27). Im Zytoplasma des Stäbchen-AS trennt sich all-trans-Retinal von PE (28) und wird durch die Retinoldehydrogenase (RDH) 8 und möglicherweise die RDH12 zu all-trans-Retinol reduziert (26-28). All-trans-Retinol wird durch das Interphotorezeptor-Retinol-bindende Protein (IRBP) - ein großes Glykoprotein, das in den Photorezeptoren synthetisiert und in die IPM ausgeschüttet wird – gebunden (29, 30), sodass es die Matrix überqueren kann und die Membran der RPE-MV erreicht (31). Mutationen in *Rbp3*, dem Gen das für IRBP codiert, verursachen Retinitis pigmentosa (32).

Im RPE bindet all-trans-Retinol fest an Cellulär-Retinol-bindendes Protein (CRPB) und wird von diesem zum endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert. Im ER katalysiert die Lecithin-Retinol-Acyl-Transferase (LRAT) die Übertragung einer Acyl-Gruppe von in der Membran vorhandenem Phosphatidylcholin auf Retinol (33, 34). Der entstandene all-trans-Retinyl-Ester wird nun durch RPE-spezifisches 65kDa-Protein (RPE65) hydrolysiert und zu 11-cis-Retinol isomerisiert (34, 35). Mutationen in den für LRAT oder RPE65 codierenden Genen verursachen Lebersche kongenitale Amaurosis (34, 36-38).

An 11-cis-Retinol kann sich nun Zellulär-Retinalaldehyd-bindendes Protein (CRALBP) anlagern, wodurch die Oxidation von 11-cis-Retinol zu 11-cis-Retinalaldehyd durch 11-

cis spezifische RDHs erleichtert wird (39-41). Die wichtigste 11-cis-spezifische RDH des RPE stellt RDH5 dar (42).

CRALB transloziert anschließend zur apikalen Seite des RPE und übergibt 11-cis-Retinal an IRBP. Schlussendlich wird 11-cis-Retinal dann über IRBP an apo-Rhodopsin gebunden, sodass die Regeneration des Rhodopsin-Molekül abgeschlossen ist (17).

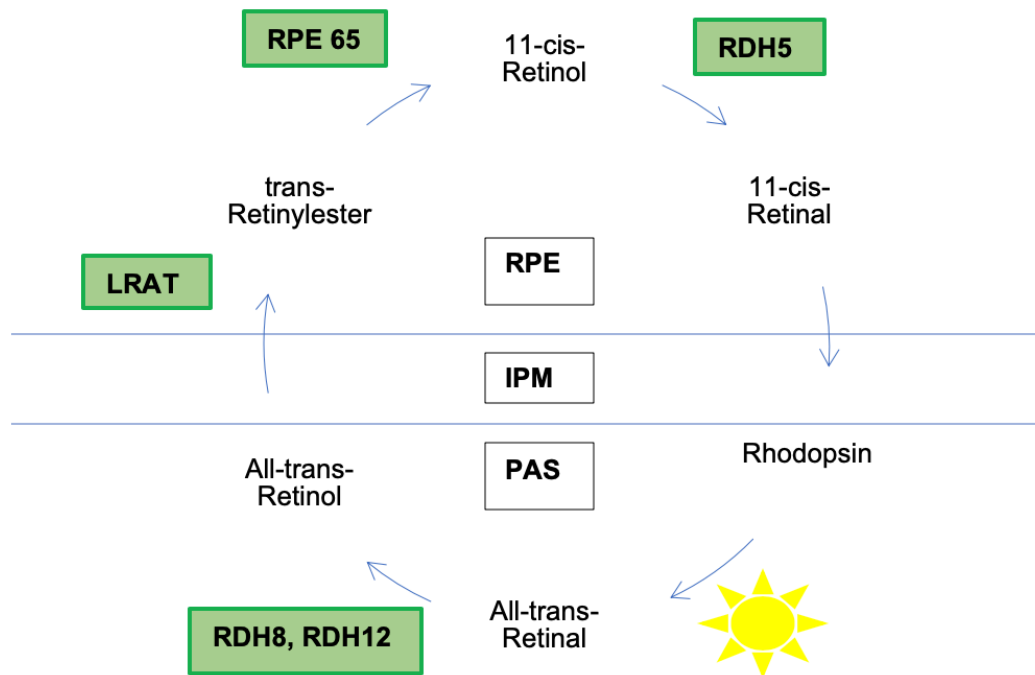


Abb. 4 Adaptierte schematische Darstellung des visuellen Zyklus

Die Abbildung zeigt den in den Photorezeptoren und RPE ablaufenden visuellen Zyklus (Einzelheiten siehe Text). Abkürzungen: *RPE* = *retinales Pigmentepithel*, *IPM* = *Interphotorezeptormatrix*, *LRAT* = *Lecithin-Retinol-Aceyltransferase*, *PAS* = *Photorezeptor-Außensegmente*, *RDH* = *Retinoldehydrogenase*

Abbildung entnommen und verändert aus „Targeted disruption of the murine retinal dehydrogenase gene *Rdh12* does not limit visual cycle function“, Kurth I. et al., 2007 (43)

2.3 Das circadiane System der Säuger

2.3.1 Grundlagen circadianer Rhythmik

Aufgrund der Rotation der Erde um ihre eigene Achse, verändern sich Umweltbedingungen, wie bspw. die Lichtverhältnisse, das Nahrungsangebot und die Temperatur, rhythmisch mit einer Periodenlänge von 24 Stunden (44). Um überleben zu können, müssen sich die Bewohner der Erde an diese veränderten Bedingungen anpassen können (4). Doch wie bewältigen sie dies?

In beinahe allen Körperzellen nahezu aller Lebewesen sind sog. „circadiane Uhren“ (lat.: circa = ungefähr, dies = Tag) vorhanden, die einen endogenen Rhythmus von etwa 24 Stunden generieren (4, 44). Diese endogene Periodik wird auf molekularer Ebene durch Transkriptions-Translationsschleifen erzeugt: Durch ein Wechselspiel von Genaktivierung und -inhibition werden sog. Uhrengene (*Bmal1*, *Clock*, *Per*, *Cry*) zyklisch exprimiert und garantieren somit die fortwährende Oszillation der Uhr (s. Abschn. 2.3.3) (44). Der endogene Rhythmus von circa 24 h bleibt auch in Abwesenheit von externen Signalen bestehen (44). Durch sog. „Zeitgeber“ (ZT), also externe Signale von außen, wird die Rhythmik der Oszillatoren mit den äußeren Umweltbedingungen synchronisiert und die Periodendauer auf exakt 24 Stunden fixiert (44). Der wichtigste exogene ZT ist dabei das über die Retina perzipierte Licht (4, 45). Zur Generierung von circadianen Rhythmen besitzen Säuger ein komplexes System aus zentralen und peripheren Uhren. Der als Hauptschrittmacher bezeichnete SCN koordiniert die Uhren des peripheren Gewebes über humorale und neuronale Signale und ermöglicht somit eine Synchronisation aller Körperzellen (4, 44).

Über das circadiane System reguliert der SCN zahlreiche physiologische Prozesse wie den Schlaf-Wach-Rhythmus, die Regulation der Körpertemperatur, den Leber- und Nierenstoffwechsel sowie die Sekretion von Hormonen wie Melatonin und Glucocorticoiden (46). Beeinträchtigungen der circadianen Uhren des Körpers sind mit Pathologien wie bspw. Schlafstörungen, Depression, kardiovaskulären Erkrankungen und Krebs assoziiert (46).

Eine Anpassung an die rhythmischen Schwankungen der Umweltbedingungen wird folglich durch das exakte Zusammenspiel des SCN, der Retina sowie peripherer Oszillatoren ermöglicht und ist für die Gesundheit des Individuums unabdingbar.

2.3.2 Komponenten des circadianen Systems

Das circadiane System der Säuger ist hierarchisch strukturiert (44) (s. Abb. 6). An seiner Spitze steht der SCN – ein bilaterales Kerngebiet im ventralen Hypothalamus, welches alle zentralen und peripheren Uhren über direkte sowie indirekte Verbindungen kontrolliert (1, 47). Das als Hauptschrittmacher bezeichnete Kerngebiet liegt in der Regio praeoptica über dem Chiasma opticum und umrahmt den dritten Ventrikel. Es besteht aus circa 20.000 Neuronen, die wiederum jeweils etwa 1000 Synapsen bilden (44). Jedes Neuron generiert hinsichtlich seiner elektrischen Aktivität einen eigenen circadianen Rhythmus (48). Die Neurone des SCN kommunizieren über die Neurotransmitter vasoaktives intestinales Peptid (VIP) sowie Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und werden über elektrische Synapsen untereinander synchronisiert, sodass sie synchron oszillieren und einen robusten circadianen Rhythmus ausbilden können (43, 49).

Der SCN erhält über den retinohypothalamischen Trakt (RHT) sensorische Informationen von der Retina (43, 50). Der RHT wird von Axonen spezieller intrinsischer photosensitiver retinaler Ganglienzellen (ipRGCs) der inneren Retina gebildet (43, 44) und moduliert die Neurone des SCNs über die Neurotransmitter Glutamat und PACAP (pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) (44, 51). Glutamat interagiert dort mit NMDA- und AMPA-Rezeptoren, was zu einem Ca^{2+} -Einstrom führt (43, 44). Über mehrere Kinasen (CamK, MAPK, PKA) induziert Ca^{2+} die Phosphorylierung und damit Aktivierung von CREB (cyclic adenosine monophosphate-response-element-binding-protein) (43, 52). CREB bindet an cAMP (cyclic adenosine monophosphate) response elements (CRE) auf den Promoterregionen von *Per1* und *Per2*, wodurch deren Transkription induziert wird (43, 46, 47, 53). Diese CREB-vermittelte Transkription der Uhrengenen scheint für die Adaption der im SCN-generierten circadianen Periodik an den Hell-Dunkel-Wechsel der Umwelt essentiell zu sein (54).

Als Hauptschrittmacher synchronisiert der SCN über verschiedene neuronale Bahnen und humorale Signale andere Oszillatoren im Gehirn und in peripheren Geweben (43, 55). So projiziert er über das sympathische Nervensystem in das Pinealorgan und reguliert hier die rhythmische Synthese und Sekretion von Melatonin (42, 56). Hierbei induziert die nächtliche Ausschüttung von Noradrenalin (NA) die Melatoninsynthese des Pinealorgans über eine Aktivierung des Schüsselenzyms der Melatoninsynthese Arylalkylamin-*N*-Acetyltransferase (AANAT) (46, 51).

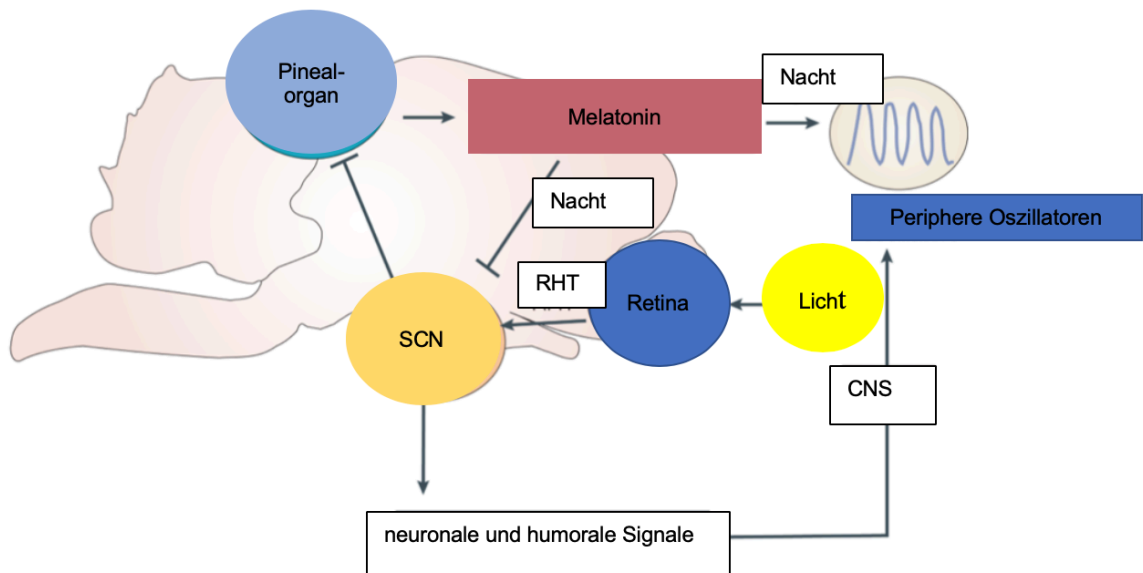


Abb. 5 Organisation des circadianen Systems in Säugern

In Säugern agiert der SCN als zentraler Schrittmacher. Über den RHT erhält er optische Informationen aus der Retina, was es dem SCN ermöglicht, seinen eigenen circadianen Rhythmus an den Hell-Dunkel-Rhythmus der Umwelt anzupassen. Über neuronale und humorale Signale kann der SCN wiederum periphere Oszillatoren synchronisieren. Dieses hierarchisch organisierte System scheint essentiell zu sein, um die vielen peripheren Oszillatoren zeitlich aufeinander abzustimmen und die Integrität der im Körper eines Individuums ablaufenden Prozesse zu gewähren. Abkürzungen: *CNS* = *zentrales Nervensystem*, *RHT* = *retinohypothalamischer Trakt*, *SCN* = *Nucleus suprachiasmaticus*
 Abbildung entnommen und verändert aus „Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms“, Bell-Pedersen D. et al., 2005 (57)

2.3.3 Die molekulare Organisation der circadianen Uhr

Auf molekularer Ebene werden circadiane Rhythmen durch autoregulierte positive und negative Transkriptions-Translations-Feedbackschleifen (TTFL = transcriptional-translation-feedback-loops) generiert (2, 6, 52) (s. Abb. 6). Im Zentrum dieser Feedbackschleifen stehen die Gene *Clock*, *Bmal1*, *Per* und *Cry* (58).

Die Gene *Clock* und *Bmal1* codieren für basic-helix-loop-helix(bHLH)-PER-ARNT-SIM(PAS)-Transkriptionsfaktoren (33, 52, 54, 59). Die Proteinprodukte CLOCK und BMAL1 heterodimerisieren, translokieren in den Nucleus und binden hochsensitiv an E-Box-Sequenzen (33, 53). Durch die Bindung wird die Expression der Gene *Per1*, *Per2* und *Per3* sowie *Cry1* und *Cry2* induziert (33, 53). BMAL1 und CLOCK fungieren folglich als Aktivatorproteine der Expression von *Per*- und *Cry*-Genen und stellen somit die positiven Komponenten der Feedbackschleife dar (60). Die entstehenden *Per*- und *Cry*-Genprodukte bilden im Zytoplasma einen Komplex, welcher im Laufe der späten Hellphase in den Nucleus wandert und als negative Komponente der Feedbackschleife die CLOCK/BMAL1-abhängige Transkription von PER und CRY hemmt (33, 53). Nachts fällt die Menge an PER und CRY somit wieder ab, sodass die Blockade morgens aufgehoben ist und mit der CLOCK/BMAL1-abhängigen Transkription von *Per* und *Cry* ein neuer Zyklus beginnen kann (61). Die so generierte Rhythmik wird durch Phosphorylierungen, die unter anderem die Translokation der Uhrengenenprodukte in den Nucleus beeinflussen, und weitere post-transkriptionalen Modifizierungen moduliert (33, 59, 61).

In einer zweiten Feedbackschleife aktiviert das CLOCK/BMAL1-Heterodimer die Transkription der Gene *Rev-Erb α* und *Ror α* über E-Box-Sequenzen (33, 60). Die entstehenden Genprodukte konkurrieren nun um die Rev-erb/Ror-elements (RREs)-Bindungsstellen des *Bmal1*-Promoters, wobei die Transkription des Gens durch Rev-Erb α gefördert und durch Ror- α gehemmt wird (33, 60).

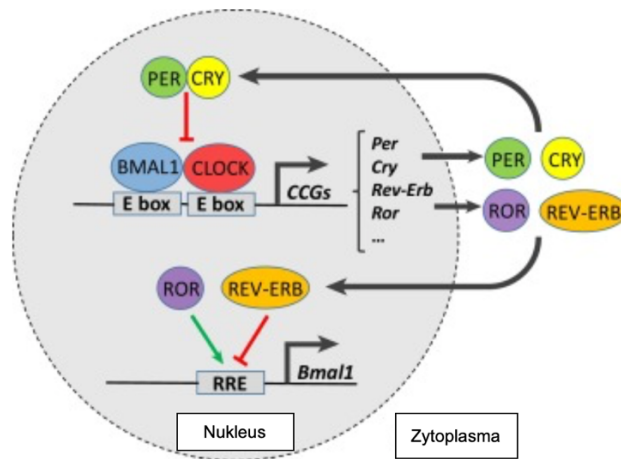


Abb. 6 Die molekulare Organisation der circadianen Uhr

Die positive Schleife der Transkriptions-Translations-Feedback-Schleife wird von den Transkriptionsfaktoren BMAL1 und CLOCK gebildet. Der Komplex aus BMAL1 und CLOCK aktiviert die Transkription von *Per*- und *Cry*-Genen. Im Zytoplasma heterodimerisieren PER und CRY, translozieren in den Nukleus und inhibieren die Transkription von *Bmal1* und *Clock*, wodurch sie ihre eigene Transkription ebenfalls supprimieren (negatives Feedback). BMAL1 und CLOCK induzieren in einer zweiten Feedbackschleife die Transkription von *Rev-Erb α* und *Ror α* (Einzelheiten siehe Text).
Abkürzungen: CCGs = *clock controlled Genes*

Abbildung entnommen und verändert aus „Molecular Cogs: Interplay between Circadian Clock and Cell Cycle“, Gaucher J. et al., 2018 (62)

Wie unter 2.3.2 schon dargestellt, beeinflusst Licht als wichtigster Zeitgeber über CREB-Protein den 24 h-Rhythmus der circadianen Uhr.

Weiterhin wird die molekulare Uhr über sog. D-Box-Regulatoren beeinflusst. Diese binden als Transkriptionsfaktoren an die Promoterregion einiger circadian gesteuerter Gene und aktivieren oder inhibieren somit die Transkription der Gene (63). DBP (albumin gene D-site binding protein) bindet beispielweise an die Promoterregion von *Per1* und *Per2*, wodurch deren Transkription induziert wird (60, 64). E4BP4 bewirkt hingegen als negativer Regulator der D-Box eine Supprimierung der Transkription (64). Diese zusätzliche „Schleife“ über D-Box-Regulatoren scheint der Stabilisierung und dem „Fine-Tuning“ der Oszillation zu dienen (65).

Die Proteinprodukte der Uhrengene regulieren jedoch nicht nur andere Uhrengene sondern auch sog. „clock controlled genes“ (CCGs) (33, 60). CCGs enthalten im Bereich ihrer Promoter Bindestellen für Uhrenprodukte, über die eine 24 h-Rhythmik ihrer Transkription induziert wird (33, 60). Zu den CCGs gehört z.B. das schon oben erwähnte *Dpb*-Gen, dessen Transkription über E-Box-Sequenzen reguliert wird (65).

2.3.4 Uhren in der neuronalen Retina

Die Retina enthält ein komplexes Uhrenwerk, welches lokal ihre Physiologie und Funktion reguliert (11, 59, 61, 66). Die circadiane Rhythmik der endogenen retinalen Uhr bleibt auch in isolierten Retina-Kulturen erhalten, was für die Existenz eines vom SCN unabhängigen circadianen Uhrensystems spricht (2). So bleibt bspw. die rhythmische Expression der *Aanat*-mRNA in Photorezeptorzellen auch nach Läsion des SCNs und unter DD-Bedingungen erhalten (67). Die exakte Lokalisation der retinalen Oszillatoren sowie ihr Zusammenspiel sind bisher jedoch noch nicht abschließend geklärt. Aktuelle Studien postulieren, dass die retinalen circadianen Uhren in den Zapfen sowie in Neuronen der inneren Retina, v.a. in dopaminergen amakrinen Zellen und Müllerzellen, lokalisiert sind (68).

Ruan et al. (2006) konnten nachweisen, dass dopaminerge amakrine Zellen, Bipolarzellen, Horizontalzellen und Ganglienzellen einen kompletten Satz an Uhrengenen exprimieren (11, 68, 69). Es zeigte sich, dass die circadiane Rhythmik der Uhrengenenexpression in dopaminergen amakrinen Zellen auch nach Isolation vom SCN und den Photorezeptoren persistierte (2, 70). Dies deutet daraufhin, dass amakrine Zellen unabhängige endogene Oszillatoren beherbergen (70, 71). Die endogenen Oszillatoren der dopaminergen amakrinen Zellen scheinen dabei insbesondere die Rhythmik der DA-Synthese und -Ausschüttung zu steuern (71, 72). Wie bereits erwähnt, exprimieren auch retinale Ganglienzellen Uhrengene (2, 71). Möglich ist, dass eine Subpopulation der Ganglienzellen, die ipRGCs, eine circadiane Uhr enthält, die Einfluss auf die tageszeitliche Expression des Gens *Opn4* nehmen könnte (73). Studien deuten daraufhin, dass die circadianen Uhren der Retina über *Opn4*, das für das Photopigment Melanopsin codiert (74), bzw. über die ipRGC lichtabhängig synchronisiert werden (73, 74). Eine andere Subpopulation der retinalen Ganglienzellen scheint über das Gen *Opn5*, das für das Photopigment Neuropsin codiert (75), für die Licht-Dunkel-Synchronisation des retinalen Uhrensystems verantwortlich zu sein (76).

Außerdem scheinen die zentralen Uhrenprodukte CLOCK, BMAL1, NPAS2, PER1, PER2 und CRY2 nur in Zapfen, die nur zwei bis drei Prozent der Photorezeptoren ausmachen, nicht aber in den Stäbchen, rhythmisch exprimiert werden (2, 69). Dies deutet daraufhin, dass Zapfen, nicht aber Stäbchen, autonome circadiane Uhren enthalten (11, 56). Die Präsenz einer circadianen Uhr in ausschließlich den Zapfen konsistiert mit dem Befund, dass das photische ERG (Elektroretinogramm) unter

circadianer Kontrolle steht, wohingegen das skotopische, durch Stäbchen vermittelte ERG, keine circadiane Regulation aufweist (77). Weitere Studien deuten daraufhin, dass der zelleigene Oszillator der Photorezeptoren unter anderem die rhythmische Melatonin-Synthese über eine Beeinflussung des Schlüsselenzyms AANAT steuert (67).

Retinale Gliazellen, die sog. Müller-Zellen, exprimieren ebenfalls die kanonischen Uhrengene und zeigen auch nach Isolation vom retinalen Gewebe eine Persistenz der Rhythmik, was dafür spricht, dass sie ebenfalls autonome Uhren enthalten (78).

Das komplexe retinale circadiane System, welches sich scheinbar aus Oszillatoren in den Zapfen und Zellen der inneren Retina zusammensetzt, ermöglicht es der Netzhaut, ihren Metabolismus sowie ihre Funktion an Änderungen der Beleuchtungsintensität im Tagesverlauf antizipativ zu adaptieren (11, 79).

Essentiell für die visuelle Signalverarbeitung ist die Fähigkeit der Retina zur Hell-Dunkel-Adaption. Diese wird u.a. durch die Möglichkeit, am Tag Zapfen und in der Nacht Stäbchen als Photorezeptoren zu nutzen, gewährleistet (80). Stäbchen unterliegen bereits bei geringen Lichtintensitäten einer Sättigung (81), wohingegen Zapfen auch bei sehr hellem Licht photosensitiv bleiben (82). Das Zusammenspiel der Zapfen und Stäbchen gewährleistet es Säugern, auch bei stark wechselnden Lichtbedingungen die visuelle Wahrnehmung zu erhalten. Unabdingbar ist dabei eine circadian regulierte Stäbchen-Zapfen-Kopplung, also eine im Tagesverlauf fluktuierend starke „Kopplung“ des skotopischen und photopischen Sehens (80). So ist in der Nacht die Stäbchen-Zapfen-Verbindung über „gap junctions“ deutlich stärker als am Tag, da das „gap junction“-Protein Connexin 36 nachts stärker exprimiert wird (11, 64, 83, 84). Durch diese verstärkte Stäbchen-Zapfen-Kopplung wird der Informationsaustausch zwischen den beiden Photorezeptor-Typen sichergestellt und das nächtliche Sehen verbessert (11, 80).

Neben der circadianen Regulation der Stäbchen-Zapfen-Kopplung ist auch die tageszeitliche Regulation der Photorezeptorpigmente für die visuelle Signalverarbeitung von Bedeutung (85). Bspw. unterliegt die Expression von Rhodopsin und UV-Opisin einem circadianen Rhythmus (85). Ob die Rhythmik der Photopigmente über einen retinalen Oszillator oder über den SCN reguliert wird, ist bisher jedoch ungeklärt (86).

Entscheidend für die Funktionalität der Retina ist auch die Fähigkeit, den retinalen Stoffwechsel an den nächtlich erhöhten Energiebedarf anzupassen (87). Die Photorezeptoren benötigen zur Aufrechterhaltung ihres Ruhepotentials große Mengen

Energie, die sie hauptsächlich durch aerobe Glykolyse gewinnen (88). Der nächtlich erhöhte Energiebedarf kommt dadurch zustande, dass nachts ein ständiger Ionenstrom in die Zelle hinein herrscht und dass diese Ionen zur Gewährleistung des Konzentrationsgradienten unter Energieaufwand wieder aus der Zelle hinaus gepumpt werden müssen. Die Adaption an den tageszeitlich schwankenden Energiebedarf wird unter anderem durch die circadiane Regulation der Gene *Pgc-1 α* , *Cpt-1 α* und *Acadm* gewährleistet (89, 90). Das Proteinprodukt von *Pgc-1 α* fungiert dabei als übergeordneter Stoffwechselregulator (91, 92), wohingegen *Cpt-1 α* und *Acadm* für Enzyme der β -Oxidation von Fettsäuren codieren (90). Außerdem führen die Schwankungen des Energiebedarfs der Zellen auch zu tageszeitlichen Veränderungen des oxidativen Stresses, dem die Zellen im Rahmen metabolischer Prozesse ausgesetzt sind (93, 94). Dies wiederum scheint zu einer tageszeitlichen Rhythmik der Schutzmechanismen der Zelle gegen oxidativen Stress zu führen. So gibt es bspw. Hinweise darauf, dass die Gluthathion-Peroxidase, ein antioxidatives Enzym, in neuronalem Gewebe wie der Retina nachts verstärkt exprimiert wird (94-96). Möglicherweise könnte Melatonin dabei als Stimulator der Gluthathion-Peroxidase-Synthese fungieren (97).

Des Weiteren steht die Expression von cGMP-gated cation channels (CNGCs) in der Retina unter circadianer Kontrolle (11). CNGCs sind essentiell für die in den AS stattfindende Phototransduktion. Das Öffnen und Schließen der CNGCs ist zwar in erster Linie abhängig von der Stimulation durch Licht, aber die Affinität von CNGCs zu cGMP steht unter circadianer Kontrolle (11). In der subjektiven Nacht ist die Affinität von CNGCs zu cGMP erhöht, sodass nachts ein größerer Dunkelstrom vorherrscht als tagsüber (11). Möglicherweise spielen die CNGCs als „Input“ und „Output“ des retinalen Uhrenwerkes eine entscheidende Rolle für das „Entrainment“ der circadianen Oszillatoren der Photorezeptoren (11).

Außerdem stehen sowohl die Licht- als auch die Kontrastsensitivität sowie die Funktion der ipRGCs unter Kontrolle des retinalen Uhrenwerkes (56).

Vermittelt wird die circadiane Kontrolle u.a. über die Neuromodulatoren DA und Melatonin (56) (s. Abb. 7). DA wird in den dopaminergen amakrinen Zellen der inneren Körnerschicht (engl.: inner nuclear layer, INL) sowie der plexiformen Schicht (engl.: inner plexiform layer, IPL) gebildet und lichtinduziert bzw. am Tag freigesetzt (98). Seine Wirkung wird über D2- und D4-Rezeptoren vermittelt und es dient als „Signal für den Tag“ (98). Durch DA wird die Adaption der Retina an Helligkeit (98, 99) sowie eine verstärkte Kontrastsensitivität ermöglicht (98) und es inhibiert die Melatoninsynthese

(100, 101). Außerdem beeinflusst DA zusammen mit dem Neurotransmitter GABA die molekulare Uhr auch direkt, indem es die Transkription von *Per1* und *Per2* lichtinduziert stimuliert (72).

Melatonin fungiert hingegen als „Signal für die Nacht“ (11, 65, 102) und wird entsprechend v.a. nachts in den Photorezeptoren synthetisiert (103, 104). Die circadiane Synthese von Melatonin wird über das Schrittmacher-Enzym AANAT reguliert (105): Das CLOCK/BMAL1-Heterodimer bindet an die E-Box im *Aanat*-Promoter und vermittelt über die transkriptionelle Hochregulation der AANAT-Synthese einen Anstieg der Melatoninausschüttung in der Nacht (106). Über die Bindung an membranständige G-Protein-gekoppelte Melatonin-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 (MRT1 und MRT2) induziert Melatonin die Dunkeladaptation der Retina (107). Die circadiane Rhythmik der retinalen Melatonin-Synthese bleibt auch nach Entfernung des SCNs und auch in explantierten Retinae in Kultur erhalten (84, 108). Diese Befunde deuten daraufhin, dass die Periodizität der *Aanat*-Transkription von Retina-eigenen Uhren und nicht vom SCN gesteuert wird.

Wie bereits erwähnt, beeinflussen sich die beiden Neuromodulatoren reziprok, indem sie die Synthese und Ausschüttung des jeweils anderen hemmen (80, 109, 110) (siehe Abb. 7). Sakamoto et al. (2006) konnten jedoch zeigen, dass die rhythmische Expression der *Aanat* in Photorezeptoren der Ratte nicht an DA gebunden ist, wohingegen die DA-Freisetzung an den circadianen Melatonin-Rhythmus gebunden zu sein scheint: In Melatonin-defizienten Mäusen wird die DA-Freisetzung unter DD-Bedingungen arrhythmisch, wohingegen die rhythmische Expression der *Aanat*-mRNA auch bei Ratten mit degenerierten dopaminergen Neuronen erhalten bleibt (111). Das tageszeitliche Expressionsmuster der *Aanat* scheint folglich durch endogene Oszillatoren der Photorezeptoren selbst generiert zu werden (111).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass DA und Melatonin essentielle Bestandteile des retinalen Uhrenwerks sind und eine entscheidende Rolle im Zusammenspiel der circadianen Oszillatoren der verschiedenen retinalen Zellen einnehmen (11).

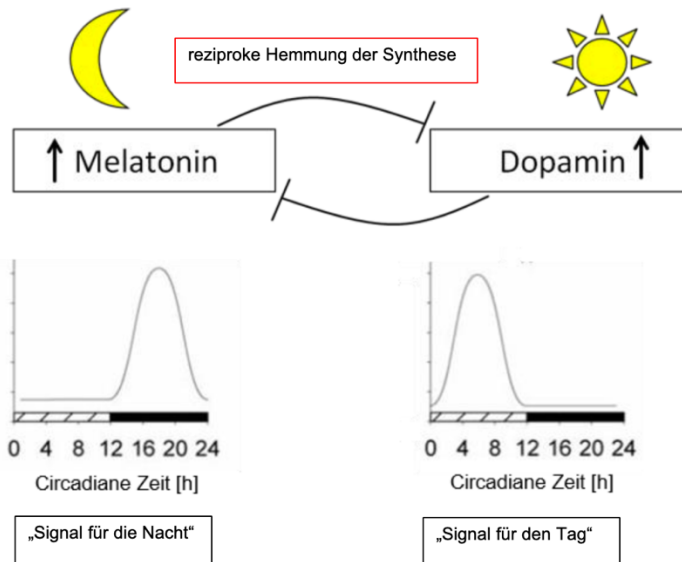


Abb. 7 Die Rolle von Melatonin und Dopamin in der Retina

Melatonin und Dopamin agieren in der Retina als Gegenspieler. Die Synthese und Freisetzung beider Neuromodulatoren wird circadian reguliert und zeigt nachts erhöhte Melatoninspiegel und tagsüber erhöhte Dopaminkonzentrationen. Melatonin fungiert als „Signal für die Nacht“, wohingegen Dopamin als „Signal für den Tag“ wirkt. Die Neurotransmitter beeinflussen sich reziprok, indem sie die Synthese des jeweils anderen hemmen. Abkürzungen: *h = Stunden*

Abbildung entnommen und verändert aus „The circadian clock system in the mammalian retina“, Tosini G., 2008 (6)

Wie bereits erwähnt, kommen circadiane Uhren nicht nur in verschiedenen retinalen Zelltypen, sondern auch in anderen okulären Strukturen wie RPE, Cornea, Iris und Ziliarkörper vor (2, 50, 112). Das Auge fungiert somit als ein Multi-Oszillator-System, das die Adaption verschiedener Augenparameter reguliert (56).

2.3.5 Uhren im retinalen Pigmentepithel

Das RPE scheint wie die neuronale Retina circadiane Oszillatoren zu besitzen und somit als Teil des retinalen Uhrenwerks zu fungieren (11). Bisher noch nicht gänzlich geklärt ist jedoch, ob der circadiane Oszillator im RPE unabhängig vom SCN und der neuronalen Retina agieren kann und welche funktionelle Bedeutung er hat (11).

Wie schon erwähnt, spielt das RPE in der Erneuerung der AS der Photorezeptoren eine entscheidende Rolle und trägt somit zur Vitalität der Retina bei. Bereits frühe Studien konnten nachweisen, dass der Prozess des „Disk sheddings“ und der AS-Phagozytose circadian reguliert ist (7). Doch wo sind die für den Rhythmus der Phagozytose verantwortlichen Oszillatoren lokalisiert? Enthält das RPE eine endogene Uhr und nimmt diese Einfluss auf die circadiane Regulation der Phagozytose?

Baba et al. konnten 2010 zeigen, dass die *Per2*-mRNA-Menge im murinen RPE in vivo einen klaren circadianen Rhythmus zeigt, mit einem Peak zur ZT24 unter LD-Bedingungen und einen weiteren Peak zur ZT12 im DD (7). Weiterhin konnten sie zeigen, dass weder Lichtexposition noch die Entfernung des SCNs die *PER2::LUC*-Biolumineszenz beeinflusste (7). Diese Ergebnisse sprechen für die Existenz einer RPE-Uhr, die unabhängig vom SCN oszilliert (7). Die Ergebnisse von Baba et al. wurden durch die 2019 durchgeführte Studie von Milicevic et al. untermauert und erweitert. Milicevic et al. konnten zeigen, dass in kultivierten humanen RPE-Zellen nicht nur *Per2* sondern auch die Uhrengene *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*, *Per1* und *Rev-Erba* rhythmisch exprimiert werden, was die Hypothese unterstützt, dass die RPE-Zellen einen robusten molekularen Oszillator enthalten (113). *Rev-Erba* zeigte unter den Kulturbedingungen eine besonders ausgeprägte Rhythmik und in *Rev-Erba*-defizienten Zellen blieb die *Per2::LUC*-Oszillation zwar erhalten, aber es zeigte sich eine verlängerte Periode der *Per2*-Biolumineszenz sowie ein früherer Phasenwechsel (113). *Rev-Erba* scheint im RPE folglich eine essentielle Rolle für das exakte Timing der molekularen Uhr zu spielen (113).

In weiteren Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von *Cry1*-mRNA im RPE von Hühnern unter LD-Bedingungen eine tageszeitliche Rhythmik mit einem Peak zur ZT8 aufwies. Unter LL-Bedingungen war der Rhythmus robust, wohingegen er unter DD-Bedingungen nicht stabil war (10).

Peirson et al. (2004) konnten erstmals nachweisen, dass RPE-Zellen Melanopsin exprimieren (*Opn4*) (106, 114). Ob Melanopsin auch im RPE, wie in den iRGCs, als Photopigment an der Synchronisation der Uhr des RPEs beteiligt ist, oder aber als Photoisomerase wirkt und somit an der Regeneration von Photopigmenten teilnimmt, ist derzeit unklar und bedarf weiterer Studien (114). Tosini et al. (2012) vermuten jedoch, dass das RPE trotz des hohen Melanopsingehaltes nicht direkt photosensibel ist, sondern von außen „entrained“ wird (104, 114). So induziert eine Lichtgabe in der subjektiven Nacht im isolierten RPE keinen Phasenwechsel (7).

In einer 2017 durchgeführten Studie konnte beobachtet werden, dass DA über D2R im RPE den PER2::LUC-Biolumineszenz-Rhythmus verändern kann. So kann eine DA-Gabe die RPE-Uhr bis zu 12 Stunden vor- oder zurückstellen – je nachdem, zu welcher Zeit der Neuromodulator appliziert wird. Eine DA-Gabe in den Morgenstunden zur ZT0-4 führt zu einer Phasenverschiebung um etwa 6 Stunden nach hinten, wohingegen eine DA-Gabe zur ZT4-12 eine Phasenverschiebung um etwa 5 Stunden nach vorne bewirkt (115). Eine DA-Gabe in den Nachtstunden zur ZT12-20 beeinflusst die Phase kaum. Auf molekularer Ebene führt DA über den D2R im RPE zur Induktion der Expression von *Per1* und *Per2*, was letztendlich zu einem „Reset“ der circadianen RPE-Uhren führt (115). Vermutlich wird DA aus den amakrinen Zellen der Retina ausgeschüttet, gelangt über noch nicht eindeutig identifizierte Wege ins RPE und wirkt dort, wie in anderen nicht-photosensitiven okulären Strukturen, als „Photo-Entrainer“-Signal, um die RPE-Uhr mit den anderen okulären Uhren zu synchronisieren (115). Im Gegensatz zur RPE-Uhr scheint die putative Uhr der Cornea nicht über DA sondern über Melatonin durch die Aktivierung des MT2R synchronisiert zu werden (115). Melatonin könnte auch in der Vernetzung der circadianen Uhren des RPEs und der Photorezeptoren eine entscheidende Rolle spielen: Denkbar ist, dass es als parakriner, lipophiler Neuromodulator aus den Photorezeptoren diffundiert, an Melatonin-Rezeptoren im RPE bindet und so die circadiane Funktion des RPEs beeinflusst (107). In Übereinstimmung mit dieser Arbeitshypothese, konnten Nash und Osborne (1995) die Expression von Melatonin-Rezeptoren in humanen RPE-Zellen sowie in RPE-Zellen aus Ratten nachweisen (116). Wiechmann et al. (2004) konnten zeigen, dass Melatonin-Rezeptoren im RPE von *Xenopus* (afrikanischer Krallenfrosch) an den apikalen MV, nicht aber an der basalen Membran exprimiert werden (107). Dies unterstützt die Hypothese, dass das für das RPE relevante Melatonin eher retinalen Ursprungs ist (107). Wiechmann et al. (2008) vermuten, dass Melatonin im RPE unter anderem zu der Generierung des circadianen Rhythmus der Phagozytose der AS der

Photorezeptoren beiträgt (107). Laurent et al. (2017) konnten zeigen, dass der Verlust von MT1R oder MT2R eine Verzögerung der circadianen Rhythmik im RPE zur Folge hat: So zeigt die Phagozytose der AS der Photorezeptoren bei der Defizienz von Melatonin-Rezeptoren einen um etwa 3 h verzögerten Peak (117).

Morioka et al. (2018) konnten zeigen, dass die molekularen Uhren im RPE nicht nur über DA und Melatonin sondern auch über Histamin reguliert werden (118). So scheint Histamin im RPE über H1-Rezeptoren (H1R) einen Phasenwechsel der *Bmal1*-Transkription zu induzieren. Ebenso führt die Bindung von Histamin an den Gq-Protein-gekoppelten H1R zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration, einer vermehrten pCREB-Expression im Nucleus und letztendlich zu einem Phasenwechsel des *Bmal1*-Luciferase-Rhythmus (118). Histamin könnte als parakriner Neuromodulator, neben DA und Melatonin, auch an der Regulation des „disk shedding“ (siehe unten) beteiligt sein (118).

Ikarashi et al. (2017) stellten die Hypothese auf, dass auch das cholinerge System an der Regulation der circadianen Rhythmen im RPE beteiligt ist (119). Sie konnten zeigen, dass ein Phasenwechsel der *Bmal1*-Transkription auch über Muskarin-Rezeptoren herbeigeführt werden kann (107, 115, 119).

Eine wichtige Funktion des RPEs ist die Phagozytose der abgestoßenen AS der Photorezeptoren. In Stäbchen zeigt sich v.a. im Morgengrauen 1-2 Stunden nach Sonnenaufgang und bei Lichtstimulation ein Anstieg der Phagozytoserate, wohingegen der Anstieg in Zapfen je nach untersuchter Spezies abweicht, abhängig davon, ob die Spezies Stäbchen- oder Zapfen-dominiert ist (120-122). Der tageszeitliche Rhythmus der Phagozytoserate persistiert auch in konstanter Dunkelheit, was zeigt, dass er über circadiane Uhren kontrolliert wird (123-125). Eine Läsion des SCN führt zu keiner Modulation des Phagozytose-Rhythmus (119, 126). Dies ist ein Hinweis darauf, dass der Rhythmus über endogene retinale Oszillatoren gesteuert wird (119). Aktuell wird vermutet, dass die circadiane Periodik der Phagozytose sowohl von den Uhren der Photorezeptoren als auch von solchen im RPE selbst kontrolliert wird und dass der Zeitpunkt des Peaks aus einer Interaktion zwischen diesen beiden Uhrensystemen resultiert (11, 127). Der genaue molekulare Mechanismus dieser Interaktion zwischen der RPE- und der Photorezeptor-Uhr ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Da DA den circadianen Rhythmus der Phagozytose im RPE über den D2R beeinflussen kann, besteht die Möglichkeit, dass DA die Uhren der Photorezeptoren und des RPEs synchronisiert (11).

Zudem könnten der spannungsgesteuerte Kalzium-Kanal Cav1.3 sowie der spannungs- und Kalzium-gesteuerte Kalium-Kanal KCa1.1 eine wichtige Rolle in der Regulation des circadianen Rhythmus der Phagozytose einnehmen (11, 128). Wie in Photorezeptoren steht die Expression des Calciumkanals Cav1.3 auch im RPE unter circadianer Kontrolle (11, 128). Interessanterweise fehlt in Cav1.3-defizienten Mäusen der Phagozytose-Peak der AS im Morgengrauen, was daraufhin deutet, dass dieser Kanal eine Rolle für die circadiane Kontrolle der Phagozytose spielt (11). Der sog. „große Kaliumkanal“ (BK = big potassium) weist im RPE zwar keine rhythmische Expression auf, aber in BK-defizienten Mäusen kommt es zu einer Phasen-Verschiebung der Phagozytose (11) und zu einer Desynchronisation von Phagozytose und „AS-disk-shedding“ (11). Sowohl Cav.1.3 als auch BK scheinen folglich eine Rolle in der circadianen Kontrolle der AS-Phagozytose und des „disk sheddings“ zu spielen (11).

Melatonin, das nachts von Photorezeptoren sezerniert wird, scheint ebenfalls in den Regulationsprozess der AS-Phagozytose involviert zu sein (107). Wie bereits oben erwähnt, konnte gezeigt werden, dass sich der Phagozytose-Peak in MT1R- und MT2R-Knockout-Mäusen um etwa 3 Stunden verschiebt (117). Da sowohl das Fehlen von MT1R als auch von MT2R den circadianen Rhythmus der Phagozytose in gleicher Weise beeinflusst, ist davon auszugehen, dass der Effekt des Melatonins über MT1R/MT2R-Heteromere vermittelt wird (117). Interessanterweise führt bereits eine Änderung der Phagozytose-Rhythmik um 3 Stunden zu einer gesteigerten Akkumulation von Lipofuszin im RPE. Das exakte „Timing“ der Phagozytose scheint folglich für die Gesundheit der Photorezeptoren essentiell zu sein (117). Die enorme Bedeutung dieses Regenerationsprozesses der AS für die Vitalität der Photorezeptorzellen und des RPEs selbst zeigte sich auch in den Studien von Nandrot et al. (2006). So zeigten Mäuse, in denen die Rhythmik des Regenerationsprozesses durchbrochen wurde ($\alpha v \beta 5$ -Integrin-Rezeptor-Knockout-Mäuse), einen altersabhängigen Funktionsverlust der Photorezeptoren sowie eine erhöhte Lipofuszin-Akkumulation im RPE (129).

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Absolute QPCR SYBR Green Mix	Abgene/ Thermo Fisher Scientific, Deutschland
Agarose, Star Pure-Agarose	Star Lab, Deutschland
Aqua dest.	Roth, Deutschland
DEPC-Wasser	Roth, Deutschland
EDTA, 0,5 mM	Merck, Deutschland
Essigsäure, 99-100%	Merck, Deutschland
Ethanol	Roth, Deutschland
Isopropanol	Merck, Deutschland
NaCl 0,9%	Braun, Deutschland
Oligo-d(T)-Primer	Operon, USA
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Deutschland
Reverse-Transkriptionskit, Verso cDNA-Kit	Thermo-Fisher Scientific, Deutschland
RNA-Extraktions-Kit, RNeasy Micro Kit	Qiagen, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Roth, Deutschland
TrisPuffer (10 mM), pH 7,7	Merck, Deutschland

3.1.2 Laborgeräte

Gefrierschrank, -20 °C	Liebherr Premium, Deutschland
Gefriertruhe, -86 °C	Kendro Laboratory Products, Deutschland
Kühlschrank, 4 °C	Liebherr, Deutschland
PCR-Gerät, CFX96 Real Time System mit C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad, USA
Photometer, NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, USA
Pipetten	BRAND, Deutschland
Thermocycler, peqStar Thermocycler	PEQLAB Biotechnologie, Deutschland
Ultraschall-Homogenisator, SONOPLUS mini20	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Deutschland
Vortexer	Scientific Industrie, USA
Waage, Sartorius LE323S	Santarius, Deutschland
Zentrifugen	Thermo Fisher Scientific, Deutschland

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Microcentrifuge Tubes	Kisker Biotech, Deutschland
PCR-Film, QPCR Adhesive Clear Seals	4titude, United Kingdom
PCR-Platten, Frame Star 96 non-skirted low profile	4titude, United Kingdom
Pipettenspitzen, SafeSeal Tips Professional	Biozym Scientific, Deutschland
Pipettenspitzen, ungestopft	Sarstedt, Deutschland
Reaktionsgefäße, Quali-„Low-Retention“	Qiagen, Deutschland
Säulchen, RNeasy Min Elute Spin Column	Qiagen, Deutschland

3.1.4 Software

Bio-Rad CFX Manager 3.1	Bio-Rad, USA
Microsoft Office, Version 2007	Microsoft, USA
NanoDrop 1000 V3.8.1	Thermo Fisher Scientific, USA
SPSS Statistics, Version 15.0	SPSS Inc., USA

3.1.5 Primer

In der nachfolgenden Tabelle (s. Tab. 1) sind die für die quantitative RT-PCR verwendeten Primer aufgelistet. Die Sequenzen der untersuchten Transkripte stammen aus der öffentlich zugänglichen Gen-Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Die Primer wurden mit der Clone Manager Suite 7 Software kreiert und als Lyophilisate von der Firma Operon (USA) erworben. Das Primer-Lyophilisat wurde nach Hersteller-Anweisung in sterilem TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH = 8) resuspendiert, sodass sich eine Endkonzentration von 100 µM ergab. Vor der weiteren Verwendung bei der qPCR wurden die Primer 1:10 mit TE-Puffer verdünnt.

Tab. 1 Tabellarische Zusammenfassung der verwendeten Primer

Name	GenBank Accession numbers (NCBI)	Sequenzen 5'→3': Forward 3'→5': Reverse	Länge (bp)
18s	NR_003278	5'→3' TCAACACGGGAAACCTCAC 3'→5' TCGCTCCACCAACTAAGAAC	110
Acadm	NM_007382.5	5'→3' TACCCGTTCCCTCTCATC 3'→5' CCCATACGCCAACTCTTC	129
Akr1b1	NM_009658.3	5'→3' GTCTCCAACCTCAACCCTCTTC 3'→5' CCTTTGCTGTGGCAGTATTC	137
Bmal1 (Arntl)	NM_007489.4	5'→3' CCCGCTGAACATCACAAG 3'→5' AGCCTGCCCTGGTAATAG	115
Cpt1a	NM_013495	5'→3' GCCATCTGTGGGAGTATGTC	112

		3'→5' TGTAGCCTGGTGGGTTTG	
Cry1	NM_007771.3	5'→3' CAAGAAGCTGGCTACTGAG 3'→5' GCTGACGAGAGTCTGAAAC	136
Cry2	NM_009963.4	5'→3' TGTGGTGTGCCATTTGTG 3'→5' AGCCCTGGTAAGAAGATACG	103
Dbp	NM_016974.3	5'→3' GGAGGTGCTAATGACCTTTG 3'→5' GGACTTTCCTTGCCTTCTTC	146
E4bp4 (Nfil3)	NM_017373	5'→3' CGTATTCCACCTCCATCTACC 3'→5' AAGACTTGCCCACTACACC	144
Gapdh	BC082592.1	5'→3' GTCATCCCAGAGCTGAAC 3'→5' CTCAGATGCCTGCTTCAC	144
Lrat	NM_023624.4	5'→3' CCATACAGCCTACTGTGGAAC 3'→5' AAGACAGCCGAAGCAAGAC	146
Per1	NM_011066.4	5'→3' CCAGATTGGTGGAGGTTACTGAGT 3'→5' GCGAGAGTCTTCTTGGAGCAGTAG	92
Per2	AF036893	5'→3' AGTGGCAAGATTCAAACCAAAGT 3'→5' TTCTATGGTGGTGACAGCTTTCA	120
Per3	NM_011067.2	5'→3' CCGCCCCTACAGTCAGAAAG 3'→5' GCCCCACGTGCTTAAATCCT	100
Pgc1a	NM_008904	5'→3' GTGTTCCCGATCACCATATTCC 3'→5' GGTGTCTGTAGTGGCTTGATTC	101
Rdh10	NM_133832.3	5'→3' GTGCTCTGTTGTGTTCTC 3'→5' TCAGACTACGCTGATCTC	110
Rdh11	NM_021557.5	5'→3' AAGCCGTCACAGGGAACAG 3'→5' CGCCCGCATTGTTGATGAG	132
Rdh5	NM_134006.4	5'→3' TGGAGCCTGGCTTCTTTC 3'→5' GTAGTGGGCCTGTATAGCTG	104
Rlbp1 (Cralbp)	NM_020599.2	5'→3' GCTACAGAGGGTCTTTGTTC 3'→5' ACTTTGCCGTCGTAATTG	114
Rpe65	NM_029987.2	5'→3' GTGGCAAGAGCCAGATTCTTAC 3'→5' CTTTGGCATTCAGAACCAGGAG	149

3.1.7 Tiere

Für die Experimente dieser Arbeit wurden 10 - 12 Wochen alte männliche und weibliche Melatonin-profiziente Mäuse (Stamm: C3H.C-Pde6b2H) genutzt. Die Tiere wurden freundlicherweise von Dr. Russel G. Foster (Nuffield Laboratory of Ophthalmology and the Sleep and Circadian Neuroscience Institute, University of Oxford) zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden unter standardisierten Laborbedingungen im Tierstall des Instituts für Klinische und Funktionelle Anatomie der Universitätsmedizin Mainz gehalten. Die Temperatur im Tierstall betrug 20 +/- 1 °C und die Luftfeuchte lag bei circa 50%. Futter und Wasser erhielten die Mäuse ad libitum.

Für die Analyse der rhythmischen Genexpression wurden die Tiere über einen Zeitraum von 3 Wochen in einem Licht-Dunkel-Zyklus mit 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit (LD12:12) gehalten. Die Beleuchtungsstärken auf Käfiglevel betrugen 200 lux während der Lichtphase und gedimmtes Rotlicht (<5 lux) während der Dunkelphase. Die Zeitgeber Licht-an und Licht-aus sind definiert als Zeitgeber (ZT) 0 bzw. ZT12. Die Entnahme des RPE erfolgte in 3 h-Intervallen über einen 24 h-Zyklus durch Dekapitation der Mäuse nach Anästhesie mit Kohlendioxid. Während der Dunkelphase erfolgte die Tötung der Tiere unter Rotlicht.

Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien für Tierversuche nach Maßgabe der Europäischen Gemeinschaft (Direktive 86/609/EEC) durchgeführt, und den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland folgend, gehalten und behandelt.

3.2 Methoden

3.2.1 Entnahme des retinalen Pigmentepithels

Zur Isolation des RPEs wurden die Bulbi optici entnommen und gesäubert. Anschließend wurde der N. opticus und anhaftendes Gewebe mit einer Pinzette entfernt. Dann wurden die Bulbi mit einer Schere entlang der im vorderen Teil des Bulbus liegenden Ora serrata, einer sägezahnartigen Linie, die den „sehenden“ (Pars optica retinae) vom „blinden“ (Pars caeca retinae) Teil der Retina trennt, eingeschnitten. Nun konnten die Linse und der Glaskörper von der Retina und dem RPE getrennt werden. Anschließend wurde die Retina vorsichtig mit einer Pinzette vom RPE gelöst und das RPE gesammelt. Die beiden erhaltenen RPEs eines Tieres wurden sofort in ein Reaktionsgefäß gegeben, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus dem RPE erfolgte mit Hilfe des RNeasy Micro Kit (cat. No. 74004) nach Protokoll des Herstellers.

Die Proben wurden in einem Volumen von 350 µl Lysepuffer, bestehend aus RLT-Puffer und β-Mercaptoethanol (β-ME) (1:100), mittels Ultraschalles homogenisiert. Das Lysat wurde im nächsten Schritt für 3 Minuten bei 17.000 g zentrifugiert, sodass der Überstand abgenommen werden konnte. Dieser wurde mit 350 µl 70%igem Ethanol gemischt. Das Ethanol-Probengemisch wurde auf 2 ml Collection tubes pipettiert und bei 8000 g für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen und 350 µl RW1-Puffer auf die Säulen gegeben (1. Waschschrift). Danach erfolgte die erneute Zentrifugation für 15 Sekunden bei 8000 g. Der Durchfluss wurde abermals verworfen. Daraufhin folgte ein DNase-Verdau. Hierfür wurden 10 µl DNase I Lösung (1500 Kunitz-Einheiten) mit 70 µl RDD-Puffer gemischt, auf die Säulchen pipettiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgten zwei weitere Waschschriffe unter Verwerfung des Durchflusses: zunächst mit 500 µl RPE-Puffer für 15 Sekunden bei 8000 g und anschließend mit 500 µl 80%igem Ethanol für 2 Minuten bei 8000 g. Anschließend wurden die Säulchen bei geöffnetem Deckel für 5 Minuten durch Zentrifugation auf höchster Stufe getrocknet. Zur Eluierung der RNA wurden die Säulchen in 1,5 ml RNasefreie Collection tubes gegeben und 14 µl RNasefreies Wasser auf die Mitte der Säulchen pipettiert. Es folgte

eine fünfminütige Inkubation sowie eine erneute Zentrifugation bei 17.000 g. Das beschriebene Procedere wurde mit dem Durchfluss wiederholt.

Zur Bestimmung der RNA-Menge und der -Reinheit wurde das Verhältnis der UV-Absorption der RNA bei 260 nm zu 280 nm mittels NanoDrop bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

3.2.3 cDNA-Synthese (Reverse Transkriptase, RT)

Die im vorherigen Schritt extrahierte RNA wurde für die nachfolgende Real-Time PCR-Messung in codogene DNA transkribiert. Hierfür kam das Verso cDNA Kit der Firma Thermo Fisher Scientific zum Einsatz.

Wie im Herstellerprotokoll angegeben wurden folgende Reagenzien für den Reaktionsansatz eingesetzt:

Tab. 2 Reaktionsansatz zur Synthese von cDNA

Puffer	4 µl
Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP)- Mix (0,5 mM)	1,8 µl
Anchored Oligo-dt-Primer (0,5µg/µl)	0,8 µl
RT-Enhancer	0,8 µl
Verso-Enzyme-Mix	0,8 µl
RNase-freies Wasser	0,8 µl

Zu 9 µl des Mastermixes wurden je 4 µl RNA gegeben und mit 7 µl RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Des Weiteren wurde ein Kontrollansatz ohne mRNA hergestellt (NTC = „no template control“). Die PCR-Reaktion zur Synthese der cDNA erfolgte bei 42 °C für 30 Minuten. Die erhaltene cDNA wurde anschließend mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:4 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

3.2.4 Quantitative „real time polymerase chain reaction“ (qRT-PCR)

Zur Amplifikation und Quantifizierung der cDNA wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Die hierfür verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Quantifizierung erfolgte dabei mittels Fluoreszenz-Messung. Als Nachweisreagenz wurde SYBR Green benutzt, ein fluoreszierender Farbstoff, der sich unspezifisch an doppelsträngige DNA angelagert. Das Fluoreszenz-Signal ist dabei proportional zur Menge an Doppelstrang-DNA und kann zur Quantifizierung der amplifizierten DNA genutzt werden. Die Fluoreszenz-Messung erfolgt in Echtzeit („real-time“).

Zur Durchführung der qPCR wurde ein Mastermix nach folgendem Schema angesetzt (s. Tab. 3):

Tab. 3 Reaktionsansatz des Mastermixes

H ₂ O	4,6 µl
iTaq SYBR	10 µl
3´-Primer (100 nM)	0,2 µl
5´-Primer (100 nM)	0,2 µl
Probe	5 µl

In die Wells der PCR-Platte wurden je 5 µl der cDNA-Probe und 15 µl des Mastermixes gegeben, woraus sich ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Well ergab. Alle Proben wurden dabei in Duplikaten angesetzt.

Nach der Zentrifugation bei 1500 g für 1 Minute erfolgte die PCR-Amplifikation und Quantifizierung mit Hilfe eines i-Cyclers nach folgendem Protokoll: Denaturierung für 30 sek bei 95 °C, gefolgt von 45 Amplifizierungszyklen für 5 sek bei 95 °C und 30 sek bei 60 °C.

Tab. 4 PCR-Programm

Programm	Anzahl Wdh.	Temp. (°C)	Zeit (sek)
Initiale Denaturierung	1	95	30
Amplifikation	45	95	5
		60	30
Schmelzkurve	von 65 °C auf 95 °C in 0,5-°C Schritten erhitzt		

Am Ende der Amplifizierungszyklen wurden Schmelzkurven von den Amplifikaten angefertigt, um die Spezifität der PCR-Produkte zu prüfen. Dazu wurden die Proben in 0,5 °C-Schritten von 65 °C auf 95 °C erhitzt, wobei das Fluoreszenzsignal vom i-Cycler in jedem Schritt registriert wurde. Anhand der Peaks der Schmelzkurve konnten die spezifischen PCR-Produkte von unspezifischen Produkten, wie bspw. Primer-Dimeren, unterschieden werden.

Die Transkriptmenge in den Proben wurde anhand der gemessenen Schwellenwert-Zyklen (Ct-Werte) mit der Bio-Rad CFX Manager 3.1 Software (Bio-Rad) mithilfe einer internen Standardkurve (10fache serielle Verdünnungsreihe von 10⁸-10 cDNA-Kopien/µl) kalkuliert. Die Expressionslevel der Transkripte wurden in Bezug auf die in den Proben vorhandene Menge an *Gapdh* mRNA und *18S* rRNA normalisiert.

3.2.5 Herstellung der Standards

Zur Herstellung der internen Standards wurden PCR-Produkte der verwendeten Primer (s. Tab. 1) elektrophoretisch aufgetrennt. Die PCR-Amplikons der Primer wurden zunächst mit TAE-Puffer (97,6 g Tris-Base, 5,84 g EDTA, 20 ml Essigsäure ad 2000 ml H₂O) im Verhältnis 1:5 gemischt und anschließend auf ein 2%iges-TAE-Agarosegel aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 40 Minuten erfolgte die elektrophoretische Separierung der Proben. Nach erfolgter Auftrennung wurden die nun unter UV-Licht sichtbaren Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA extrahiert. Hierfür diente das QIAquick Gel Extraction Kit. Die Extraktion der DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zu den Gel-Banden wurde die dreifache

Menge an QG-Puffer hinzugefügt. Dann erfolgte die Inkubation der Proben unter konstanter Rotation (300 rpm) für zehn Minuten bei 50° C und anschließend wurde die einfache Menge Isopropanol zu den Proben gegeben. Die Proben wurden auf QIAquick-Säulchen pipettiert, welche für eine Minute bei 17.000 g zentrifugiert wurden. Der Durchfluss wurde verworfen und es folgten zwei Waschritte: zunächst mit 500 µl QG-Puffer, anschließend mit 750 µl PE-Puffer. Die Proben wurden abermals für eine Minute bei 17.000 g zentrifugiert und der Durchfluss wurde wiederum verworfen.

Im nächsten Schritt erfolgte die Elution der DNA mit 30 µl EB-Puffer. Mittels Photometer (NanoDrop) wurde die DNA-Konzentration der Eluate bestimmt. Aus der gemessenen DNA-Konzentration und der bekannten Fragmentlänge der Primer-Produkte (s. Tab. 1) konnte die Anzahl der cDNA-Kopien in den Eluaten bestimmt und auf einen Gehalt von 10⁹ Kopien/µl eingestellt werden (number of copies = (amount * 6,022*10²³) / (length * 1*10⁹*650)). Die Lösung mit der Kopienzahl von 10⁹/µl wurde im Verhältnis 1:10 seriell mit DEPC-H₂O verdünnt und so die Standardreihe mit bekannter Anzahl an cDNA-Kopien eines Gens (10⁸ bis 10¹ Kopien/µl) hergestellt. Unter Verwendung der Agarose-Gelelektrophorese konnte zudem gezeigt werden, dass die erzeugten Amplifikate für alle Gene die vorhergesagten Größen aufweisen.

3.2.6 Statistische Auswertung

Zur Bestimmung der tageszeitlichen bzw. rhythmischen Expression eines Gens wurden für jedes Gen vier unabhängige Versuchsreihen, bestehend aus je acht Proben, durchgeführt. Die erhobenen Daten stellen dabei den Mittelwert +/- den Standardfehler des Mittelwertes dar. Die Transkript-Mengen wurden relativ zur durchschnittlichen Expression der Datensätze über 24 h berechnet, um die temporale Expression darzustellen.

Zur statistischen Bewertung der rhythmischen Genexpression im 24-Stunden-Profil wurde die Cosinor-Analyse angewandt. Bei der Cosinor-Analyse werden durch Anpassung der erhobenen Daten an eine Sinuskurve, mathematische Schätzwerte wie der Zeitpunkt der maximalen Genexpression (Akrophase) und die Amplitude der tageszeitlichen Schwingung bestimmt.

Die Cosinor-Analyse kann durch folgende Formel (s. Tab. 5) beschrieben werden:

$$f(t) = A + B \cos (2\pi (t + C)/T)$$

Tab. 5 Parameter der Cosinor-Funktion

F(t)	relative Expressionslevel der Zielgene
T	Zeit der Probenentnahme (h)
A	Durchschnittswert der Cosinorkurve
B	Amplitude der Kurve
C	Acrophase (Zeitpunkt, an dem die Funktion ihr Maximum erreicht)
T	Periodenzeit (24 h)

Darüber hinaus wurde die One-Way ANOVA (one way analysis of variance) genutzt, um Unterschiede in der Genexpression innerhalb einer Versuchsgruppe unabhängig von der rhythmischen Oszillation zu detektieren. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Uhrengene und putativ Uhren-kontrollierte Gene des retinalen Pigmentepithels

4.1.1 Die Uhrengene *Per1*, *Per2*, *Per3* zeigen eine tageszeitliche Rhythmik

Zunächst wurde untersucht, ob die zentralen Komponenten der molekularen Uhr (s. Abschn. 2.3.3) im RPE eine rhythmische Expression aufweisen. Analysiert wurden die tageszeitlichen Expressionsprofile der Uhrengene *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2* und *Bmal1* (s. Abb. 8).

In der Cosinor-Analyse zeigten alle drei *Per*-Gene eine statistisch signifikante Rhythmik, wobei das Maximum der Expression von *Per 1* bei ZT10,4, von *Per2* bei ZT12,4 und von *Per3* bei ZT9,8 lag (s. Abb. 8, Tab. 6). Alle drei *Per*-Gene weisen folglich die höchste Expression im Bereich des Wechsels von der Hell- zur Dunkelphase auf. Der Tiefpunkt der Genexpression zeigte sich in der Dunkelphase im Bereich zwischen ZT20 und ZT24 (*Per1*: ZT22,4; *Per2*: ZT0,4; *Per3*: ZT21,8) (s. Abb. 8, Tab. 6).

Die einfaktorielle ANOVA-Analyse war nur für *Per2* statistisch auffällig, wohingegen für *Per1* und *Per3* keine statistische Auffälligkeit nachgewiesen werden konnte (s. Tab. 6).

Die Expression der Uhrengene *Cry1*, *Cry2* und *Bmal1* zeigte weder in der Cosinor- noch in der einfaktoriellen ANOVA-Analyse einen statistisch signifikanten Rhythmus (s. Tab. 6).

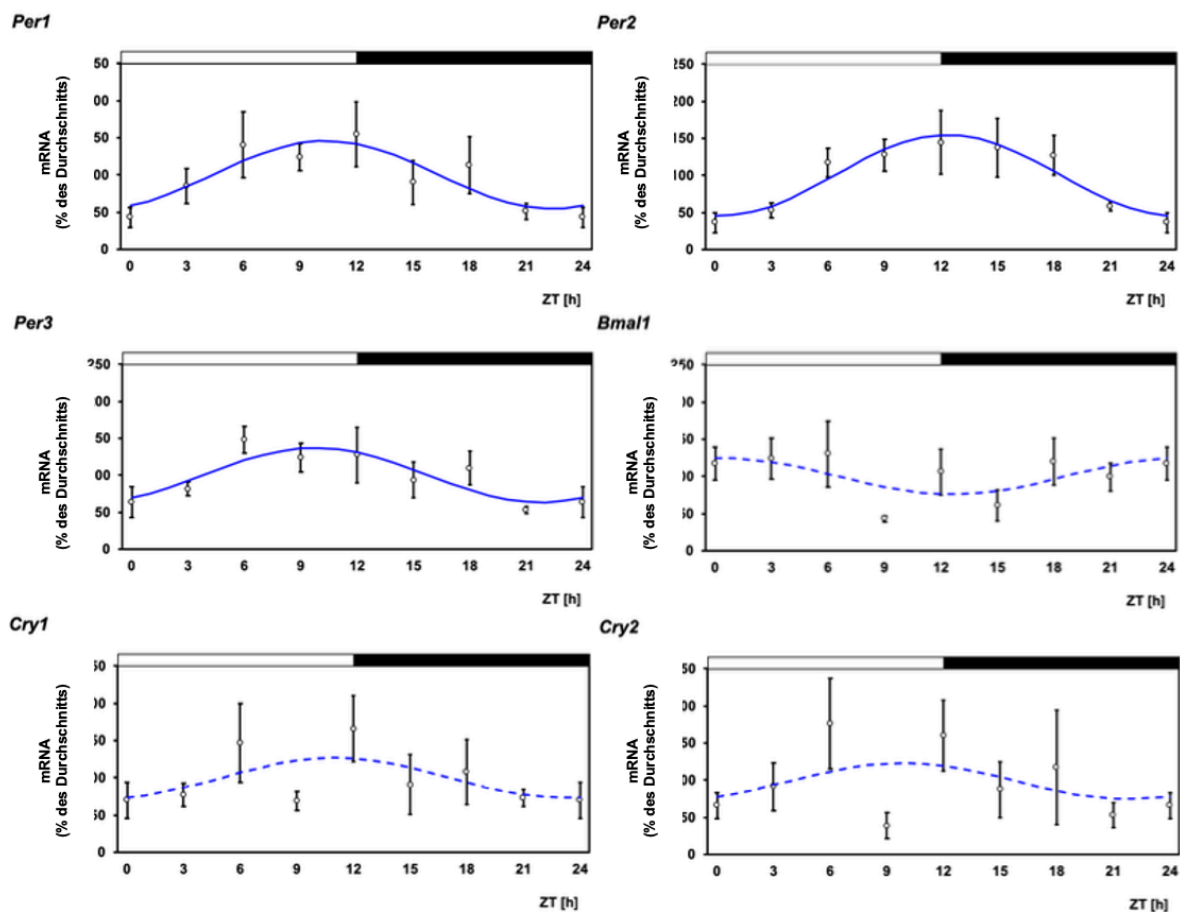


Abb. 8 24-Stunden-Expressionsprofil der Uhrengene *Per1-3*, *Cry1-2* und *Bmal1*

Die mRNA-Mengen der Gene *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2* und *Bmal1* sind als Funktion der ZT unter Licht/Dunkel 12:12 aufgetragen. Die Messung der Transkripte erfolgte in Präparaten des RPEs mittels qPCR. Die Daten entsprechen dem Prozentsatz des durchschnittlichen Wertes der Transkriptmenge über die Periode von 24 Stunden. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert \pm SEM ($n=4$, jedes n repräsentiert ein Tier (zwei Pigmentepithelien)). Der Wert zur ZT0 wurde zweimal (ZT0 und ZT24) aufgetragen. Der schwarze Balken markiert die Dunkelphase. Die Linien entsprechen einer periodischen Sinusfunktion, die mittels Cosinor-Analyse bestimmt wurde (durchgezogene und gestrichelte Linie entsprechen $p < 0,05$ bzw. $p > 0,05$). Die statistische Analyse der Profile ist in Tab. 6 aufgeführt. Abkürzungen: *mRNA* = messenger ribonucleic acid, *ZT* = Zeitgeber-Zeit, *RPE* = retinales Pigmentepithel, *qPCR* = quantitative polymerase chain reaction, *SEM* = Standardfehler des Mittelwertes, *Tab.* = Tabelle

Tab. 6 Statistische Analyse der in den Abbildungen 8, 9 und 10 dargestellten Expressionsprofile

Gen	ANOVA	COSINOR			
	p-Wert	Acrophase (h)	Phase (h)	Amplitude (%)	p-Wert
<i>Per1</i>	0,161	10,39	22,39	45,69	p<0,05
<i>Per2</i>	0,026	12,36	0,36	54,43	p<0,05
<i>Per3</i>	0,059	9,79	21,79	36,73	p<0,05
<i>Cry1</i>	0,343	-	-	-	p>0,05
<i>Cry2</i>	0,257	-	-	-	p>0,05
<i>Bmal1</i>	0,273	-	-	-	p>0,05
<i>Dbp</i>	0,000	7,59	19,59	67,15	p<0,05
<i>E4bp4</i>	0,211	21,46	9,46	35,68	p<0,05
<i>Drd4</i>	0,109	-	-	-	p>0,05
<i>Gnaz</i>	0,366	-	-	-	p>0,05

4.1.2 Tageszeitliche Rhythmik der uhrenkontrollierten Gene *Dbp* und *E4bp4*

In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die CCGs *Dbp* und *E4bp4* im RPE eine tageszeitliche Rhythmik aufweisen.

Sowohl in der Cosinor- als auch in der ANOVA-Analyse zeigte die Expression von *Dpb* einen statistisch signifikanten Rhythmus, wobei die Expression ein Maximum zur ZT7,6 (s. Abb. 9, Tab. 6) und ein Minimum zur ZT19,6 aufwies.

Ebenso zeigte *E4bp4* in der Cosinor-Analyse statistisch signifikante tageszeitliche Schwankungen in seiner Expression, wohingegen die einfaktorielle ANOVA-Analyse keine statistische Auffälligkeit erkennen ließ (s. Abb. 9, Tab. 6). Die maximale und minimale *E4bp4*-mRNA-Menge lag zur ZT21,5 bzw. zur ZT9,5 vor.

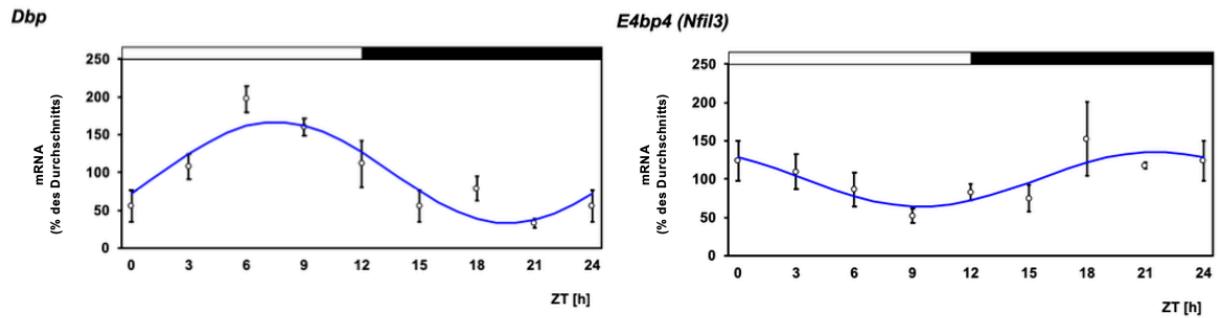


Abb. 9 24-Stunden-Expressionsprofil der uhrenregulierten Gene *Dbp* und *E4bp4*

Die mRNA-Mengen der Gene *Dbp* und *E4bp4* sind als Funktion der ZT unter Licht/Dunkel 12:12 aufgetragen. Die Messung der Transkripte erfolgte in Präparaten RPEs mittels qPCR. Die Daten entsprechen dem Prozentsatz des durchschnittlichen Wertes der Transkriptmenge über die Periode von 24 Stunden. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert \pm SEM ($n=4$, jedes n repräsentiert ein Tier (zwei Pigmentepithelien)). Der Wert zur ZT0 wurde zweimal (ZT0 und ZT24) aufgetragen. Der schwarze Balken markiert die Dunkelphase. Die Linien entsprechen einer periodischen Sinusfunktion, die mittels Cosinor-Analyse bestimmt wurde (durchgezogene Linie entspricht $p < 0,05$). Die statistische Analyse der Profile ist in Tab. 6 aufgeführt. Abkürzungen: *mRNA* = messenger ribonucleic acid, *ZT* = Zeitgeber-Zeit, *RPE* = retinales Pigmentepithel, *qPCR* = quantitative polymerase chain reaction, *SEM* = Standardfehler des Mittelwertes, *Tab.* = Tabelle

Auf der Basis der Cosinor-Analyse lassen die vorliegenden Befunde darauf schließen, dass die Uhrengene *Per1*, *Per2* und *Per3* sowie die CCGs *Dbp* und *E4bp4* im RPE rhythmisch exprimiert werden. Dieser Nachweis unterstützt die These, dass im RPE eine circadiane Uhr vorhanden ist und dass diese die Genexpression des Gewebes beeinflusst.

4.1.3 *Drd4* und *Gnaz* zeigen keine Rhythmik

Aufgrund der Tatsache, dass Dopamin-D4-Rezeptoren in der Retina rhythmisch exprimiert werden und für die dopaminerge Regulation des RPEs von Bedeutung zu sein scheinen, wurde überprüft, inwieweit *Drd4* auch im RPE eine tageszeitliche Oszillation aufweist.

Weder in der Cosinor-Analyse noch in der einfaktoriellen ANOVA-Analyse konnte für *Drd4* eine statistisch signifikante Rhythmik der Genexpression nachgewiesen werden (s. Abb. 10, Tab. 6).

Um zu eruieren, ob das in der Retina rhythmisch exprimierte *Gnaz* auch im RPE Uhren-abhängig reguliert wird, wurde in einem weiteren Schritt die Transkriptmenge dieses Gens als Funktion der ZT analysiert.

Es zeigte sich jedoch weder in der Cosinor- noch in der ANOVA-Analyse eine signifikante Rhythmik der *Gnaz*-Expression (s. Abb. 10, Tab. 6).

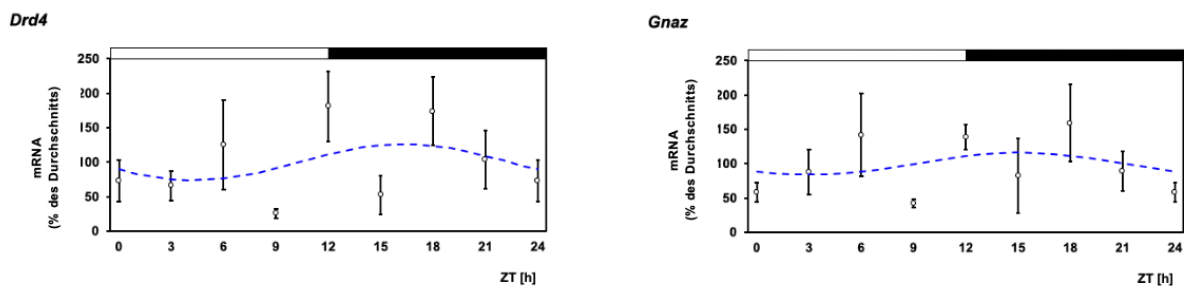


Abb. 10 24-Stunden-Expressionsprofil von *Drd4* und *Gnaz*

Die mRNA-Mengen der Gene *Drd4* und *Gnaz* sind als Funktion der ZT unter Licht/Dunkel 12:12 aufgetragen. Die Messung der Transkripte erfolgte in Präparaten des RPEs mittels qPCR. Die Daten entsprechen dem Prozentsatz des durchschnittlichen Wertes der Transkriptmenge über die Periode von 24 Stunden. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert +/- SEM (n=4, jedes n repräsentiert ein Tier (zwei Pigmentepithelien)). Der Wert zur ZT0 wurde zweimal (ZT0 und ZT24) aufgetragen. Der schwarze Balken markiert die Dunkelphase. Die Linien entsprechen einer periodischen Sinusfunktion, die mittels Cosinor-Analyse bestimmt wurde (gestrichelte Linie entspricht $p > 0,05$). Die statistische Analyse der Profile ist in Tab. 6 aufgeführt. Abkürzungen: mRNA = messenger ribonucleic acid, ZT = Zeitgeber-Zeit, RPE = retinales Pigmentepithel, qPCR = quantitative polymerase chain reaction, SEM = Standardfehler des Mittelwertes, Tab. = Tabelle

4.2 Gene des visuellen Zyklus

4.2.1 Zentrale Komponenten des visuellen Zyklus stehen unter tageszeitlicher Regulation

Die visuelle Verarbeitung unterliegt der circadianen Kontrolle. Um herauszufinden, inwieweit dies auch eine Uhren-abhängige Regulation des visuellen Zyklus beinhaltet, wurde untersucht, ob Gene des visuellen Zyklus im RPE rhythmisch exprimiert werden. Hierzu, wurde geprüft, ob die mRNA-Menge der Gene *Lrat*, *Rpe65*, *Rdh5*, *Rdh10*, *Rdh11* und *Rlbp1* tageszeitlichen Schwankungen unterliegt.

Lrat, dessen Genprodukt im visuellen Zyklus die Veresterung von Retinol katalysiert (13, 130), zeigte in der Cosinor-Analyse einen statistisch signifikanten Rhythmus, wohingegen die einfaktorielle ANOVA-Analyse statistisch unauffällig blieb (s. Abb. 11, Tab. 7). Das Maximum der Expression lag bei der ZT5,0, also in der frühen Hellphase vor. Das Minimum der Expression fand in der Dunkelphase zur ZT17,0 statt.

Auch die Expression von *Rpe65*, dessen Genprodukt die Hydrolyse von all-trans-Retinylester und die Isomerisation von all-trans-Retinol zu 11-cis-Retinol katalysiert (130, 131), zeigte in der Cosinor-Analyse einen statistisch signifikanten tageszeitlichen Rhythmus, der ein Maximum der Expression zur ZT3,2 und ein Minimum zur ZT15,2 aufwies. Der höchste Gehalt an *Rpe65*-mRNA lag somit ebenfalls in der frühen Hellphase vor. In der einfaktoriellen ANOVA-Analyse zeigte sich keine statistische Auffälligkeit (s. Abb. 11, Tab. 7).

Die Expression des *Rdh5*-Gens, welches für eine 11-cis-Retinaldehydrogenase codiert (13), zeigte in der Cosinor-Analyse ebenfalls einen statistisch signifikanten Rhythmus, wobei sich das Maximum der Expression bei ZT3,9 befand. *Rdh5* wird folglich ebenfalls in der frühen Hellphase verstärkt exprimiert. Die einfaktorielle ANOVA-Analyse war auch für *Rdh5* statistisch unauffällig (s. Abb. 11, Tab. 7).

Im Gegensatz zu *Rpe65*, *Lrat* und *Rdh5* ließen die Gene *Rlbp1*, *Rdh10* und *Rdh11* weder in der Cosinor- noch in der einfaktoriellen ANOVA-Analyse eine tageszeitliche Periodizität erkennen (s. Abb. 11, Tab. 7).

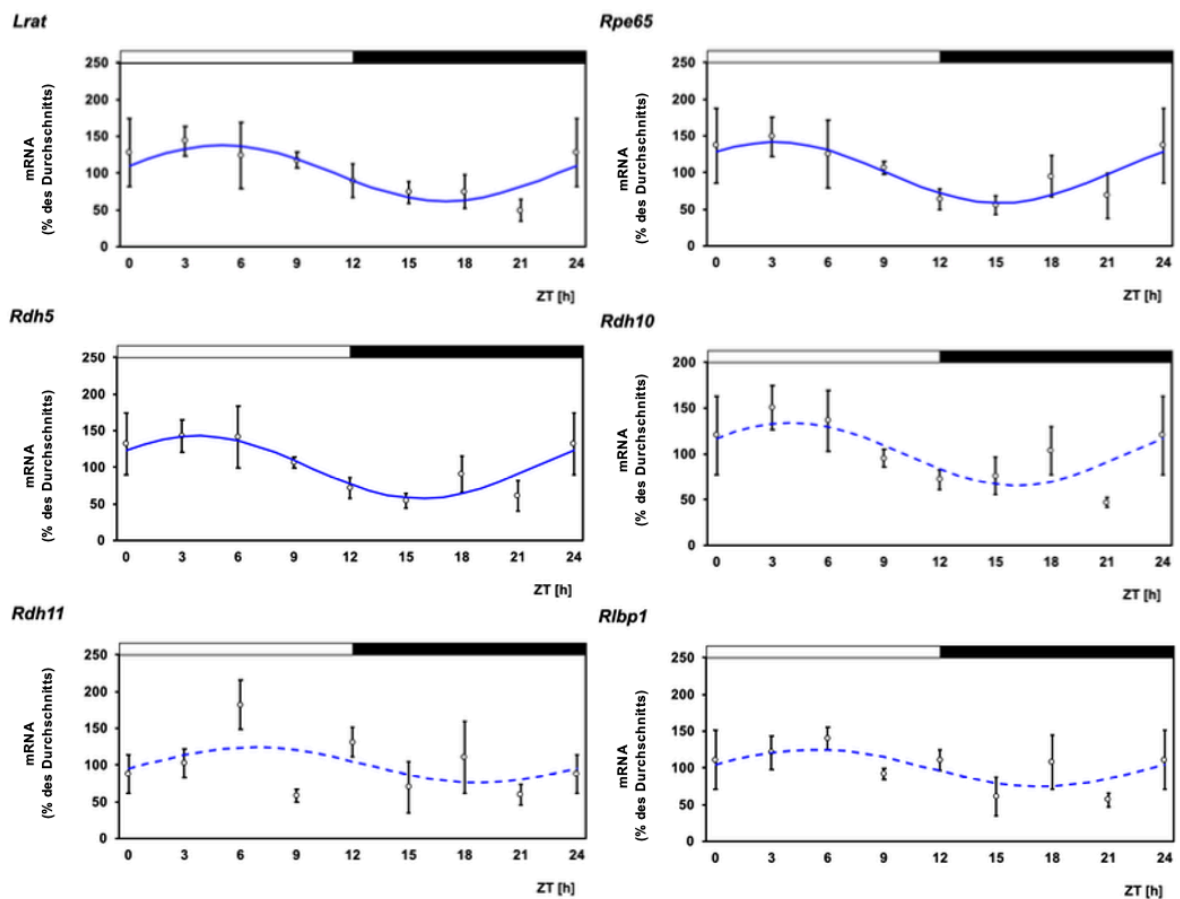


Abb. 11 24-Stunden-Expressionsprofile der Gene des visuellen Zyklus

Die mRNA-Mengen der Gene des visuellen Zyklus (*Rpe65*, *Lrat*, *Rdh5*, *Rdh10*, *Rdh11* und *Rlbp1*) sind als Funktion der ZT unter Licht/Dunkel 12:12 aufgetragen. Die Messung der Transkripte erfolgte in Präparaten des RPEs mittels qPCR. Die Daten entsprechen dem Prozentsatz des durchschnittlichen Wertes der Transkriptmenge über die Periode von 24 Stunden. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert \pm SEM ($n=4$, jedes n repräsentiert ein Tier (zwei Pigmentepithelien)). Der Wert zur ZT0 wurde zweimal (ZT0 und ZT24) aufgetragen. Der schwarze Balken markiert die Dunkelphase. Die Linien entsprechen einer periodischen Sinusfunktion, die mittels Cosinor-Analyse bestimmt wurde (gestrichelte Linie entspricht $p>0,05$). Die statistische Analyse der Profile ist in Tab. 7 aufgeführt. Abkürzungen: *mRNA* = messenger ribonucleic acid, *ZT* = Zeitgeber-Zeit, *RPE* = retinales Pigmentepithel, *qPCR* = quantitative polymerase chain reaction, *SEM* = Standardfehler des Mittelwertes, *Tab.* = Tabelle

Die Expressionsanalysen zeigten, dass die Transkripte der Schlüsselenzyme *Rpe65*, *Lrat* und *Rdh5* eine tageszeitliche Fluktuation mit einem Peak in der frühen Hellphase aufweisen.

Tab. 7 Statistische Analyse der in den Abbildungen 11 und 12 dargestellten Transkriptionsprofile

Gen	ANOVA	COSINOR			
	p-Wert	Acrophase (h)	Phase (h)	Amplitude (%)	p-Wert
<i>Acadm</i>	0,398	-	-	-	p>0,05
<i>Cpt1α</i>	0,037	-	-	-	p>0,05
<i>Pgc1α</i>	0,402	-	-	-	p>0,05
<i>Lrat</i>	0,245	4,99	16,99	38,08	p<0,05
<i>Rpe65</i>	0,284	3,17	15,17	41,66	p<0,05
<i>Rdh5</i>	0,120	3,85	15,85	42,75	p<0,05
<i>Rdh10</i>	0,099	-	-	-	p>0,05
<i>Rdh11</i>	0,075	-	-	-	p>0,05
<i>Rlbp1</i>	0,255	-	-	-	p>0,05

4.2.2 Schlüsselenzyme des Energiestoffwechsels sind arrhythmisch

Es wurde eruiert, ob die in der Retina (90, 132) und der Leber (133) bekanntermaßen Uhren-regulierten Schlüsselenzyme des Metabolismus *Acadm*, *Cpt1 α* und *Pgc1 α* auch im RPE rhythmisch exprimiert werden (s. Abb. 12, Tab. 7).

In der Cosinor-Analyse konnte für keines der drei untersuchten Gene eine signifikante tageszeitliche Periodik nachgewiesen werden. Auch in der ANOVA-Analyse zeigte sich, mit Ausnahme von *Cpt1 α* , keine statistische Signifikanz.

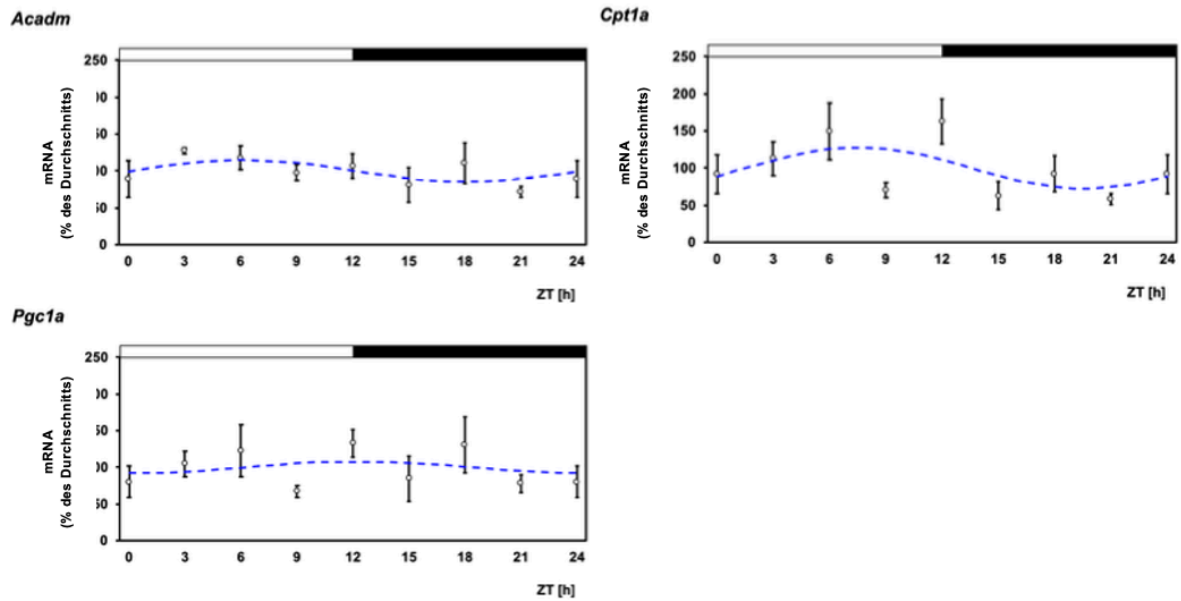


Abb. 12 24-Stunden-Expressionsprofile der Schlüsselenzyme des Energiestoffwechsels

Die mRNA-Mengen der Schlüsselenzyme des Energiestoffwechsels sind als Funktion der ZT unter Licht/Dunkel 12:12 aufgetragen. Die Messung der Transkripte erfolgte in Präparaten des RPEs mittels qPCR. Die Daten entsprechen dem Prozentsatz des durchschnittlichen Wertes der Transkriptmenge über die Periode von 24 Stunden. Jeder Wert entspricht dem Mittelwert \pm SEM ($n=4$, jedes n repräsentiert ein Tier (zwei Pigmentepithelien)). Der Wert zur ZT0 wurde zweimal (ZT0 und ZT24) aufgetragen. Der schwarze Balken markiert die Dunkelphase. Die Linien entsprechen einer periodischen Sinusfunktion, die mittels Cosinor-Analyse bestimmt wurde (gestrichelte Linie entspricht $p>0,05$). Die statistische Analyse der Profile ist in Tab. 7 aufgeführt. Abkürzungen: *mRNA* = messenger ribonucleic acid, *ZT* = Zeitgeber-Zeit, *RPE* = retinales Pigmentepithel, *qPCR* = quantitative polymerase chain reaction, *SEM* = Standardfehler des Mittelwertes, *Tab.* = Tabelle

5. Diskussion

5.1 Circadiane Uhren im retinalen Pigmentepithel

5.1.1 Das retinale Pigmentepithel beherbergt einen molekularen Oszillator

Wie in Abschn. 2.3.3 beschrieben, beruht die Funktionsweise der circadianen Uhren auf molekularer Ebene auf positiven und negativen Rückkopplungsschleifen, welche eine Expression der „Uhrengene“ mit einer 24-stündigen Periodizität sicherstellen (79, 134). Zentrale Bestandteile der Feedbackschleifen sind die Uhrenproteine PER1, PER2, PER3, CRY1, CRY2 sowie BMAL1 (135). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Uhrengene *Per1*, *Per2* und *Per3* im RPE einen signifikanten tageszeitlichen Rhythmus zeigen mit Maxima im Umschwung von der Hell- zur Dunkelperiode (*Per1*: ZT10,4; *Per2*: ZT12,4; *Per3*: ZT9,8) (s. Abb. 11 und Tab. 6). Dies ist mit der Arbeitshypothese im Einklang, dass im RPE ein molekularer Oszillator lokalisiert ist. Unser Nachweis einer Oszillation der *Per2*-mRNA konsistiert mit den Resultaten von Tosini et al. (2010), die ebenfalls zeigen konnten, dass die *Per2*-mRNA-Menge im RPE einen circadianen Rhythmus mit einem Maximum im Umschwung von der Hell- zur Dunkelphase (ZT12) aufweist. Allerdings fanden sie unter LD12:12 einen weiteren Peak im Umschwung von der Dunkel- zur Hellphase (ZT24), der in unseren Untersuchungen nicht zu beobachten war (7).

Eine rhythmische Expression von *Cry1* und *Cry2* sowie von *Bmal1* konnte in unseren Untersuchungen nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten Haque et al. (2002) eine tageszeitliche Rhythmik der *Cry1*-Expression im Hühner-RPE beobachten, wobei sich die höchste Expressionsrate am Tag zur ZT8 zeigte (10), während Milicevic et al. (2019) eine rhythmische Expression des Uhrengens *Bmal1* in kultivierten humanen RPE-Zellen nachweisen konnten (113). Weitere Untersuchungen könnten klären, inwieweit die tageszeitliche Oszillation von *Cry1*, *Cry2* und *Bmal1* im RPE Spezies-abhängig variiert.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte neben der rhythmischen Expression der Gene *Per1*, *Per2* und *Per3* auch eine rhythmische Expression der CCGs *Dbp* und *E4bp4* nachgewiesen werden (s. Abb. 9, Tab. 6). Im RPE lag der Peak der *Dbp*-Expression am späten Nachmittag (ZT7,6). Da die *Per1*-Expression 3 h später (ZT10,4) maximal war, ergibt sich die Möglichkeit, dass *Dbp* die Transkription von *Per1* im RPE über D-Box-Sequenzen induziert (79). Außerdem zeigen die Befunde der vorliegenden Arbeit, dass die höchste *E4bp4*-mRNA-Konzentration in der Nacht zur ZT21 vorliegt. Da die

Expression von *Per1* wenig später ihren Tiefpunkt erreicht, könnte *E4bp4* die *Per1*-Expression über D-Box-Sequenzen inhibieren. Insgesamt scheinen *Dbp* und *E4bp4* im RPE, wie auch in anderen Geweben beschrieben, als Antagonisten zu wirken und die Oszillation der molekularen Uhr zu verstärken.

Wie in Abschn. 2.3.1 und Abschn. 2.3.2 beschrieben, werden in nahezu allen Geweben des Körpers molekulare circadiane Uhren exprimiert (68). Die Funktion der Uhren scheint in allen Geweben auf dem gleichen molekularen Prinzip zu beruhen und doch scheint das zeitliche Expressionsprofil der Uhrengene sowie die externe Kontrolle der circadianen Uhren in den Geweben verschieden zu sein. Im Folgenden soll die Uhr des RPE mit der Uhr der Retina und des SCNs vergleichend analysiert werden.

Wie Tab. 8 zu entnehmen ist, oszillieren die Uhren der Retina und des RPE annähernd synchron, wobei die *Per*-Gene sowohl in der Retina als auch im RPE ihre maximale Expression kurz vor dem Umschwung von der Hell- zur Dunkelphase (RPE *Per1*: 10,4, *Per2*: 12,4, *Per3*: 9,8) aufweisen. Auffallend ist, dass das Maximum der Expression der Uhrengene mit Ausnahme von *Per2* im RPE etwas früher erreicht wird als in der Retina. So zeigen *Per1* und *Per3* eine maximale Expression zur ZT10,4 bzw. zur ZT9,8 im RPE und zur ZT10,5 bzw. zur ZT10,2 in der Retina (2, 7). Hierbei fällt auf, dass *Per1*, 2 und 3 in der Retina nahezu zur gleichen ZT maximal exprimiert werden, wohingegen sie im RPE in der Reihenfolge *Per3*, *Per1* und *Per2* zeitlich versetzt exprimiert werden. Darüber hinaus wird bei Betrachtung der Tab. 8 deutlich, dass die Uhr der Retina mit Ausnahme von *Per2* mit höherer Amplitude oszilliert. Dies könnte darauf zurück zu führen sein, dass das Uhrennetzwerk der Retina aus weniger Uhren besteht, sodass die Rhythmik der einzelnen Uhren durch „Überlagerungseffekte“ weniger beeinträchtigt wird.

In Studien konnte nachgewiesen werden, dass die maximale Expression der Uhrengene in vielen peripheren Geweben etwa 3-9 h nach dem Peak im SCN vorliegt (136). Dies konsistiert mit unseren Ergebnissen, die zeigen, dass die Uhrengene im RPE ihre Maxima etwa 3-5 h nach dem SCN erreichen (siehe Tab. 8). So zeigt ein Vergleich der Uhrengene *Per1* und 2 sowie der CGCs *E4bp4* und *Dbp* (siehe Tab. 8) in SCN, Retina und RPE, dass die untersuchten Gene das Maximum der Expression im SCN einige Stunden früher als im RPE und der Retina erreichen. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die angegebenen Maxima der *Per1*- und *Per2*-Expression des SCN aus Untersuchungen an Ratten stammen. Dies ist ein Hinweis

darauf, dass auch der circadiane Rhythmus des RPEs über neurohumorale Signale an die Oszillation des SCNs adaptiert wird (137).

Wie oben bereits beschrieben, zeigte sich im RPE eine Oszillation der *Dbp*- und der *E4bp4*-mRNA in Antiphase zueinander mit einem Maximum der *Dbp*-Expression am späten Nachmittag zur ZT8 und einer maximalen *E4bp4*-mRNA-Konzentration in der Nacht zur ZT21. Im SCN wurde für die Gene *Dbp* und *E4bp4* ein ähnlicher zeitlicher Abstand der Expressionsmaxima beobachtet mit einem morgendlichen Peak der *Dbp*-mRNA-Expression zur ZT4 (65) und einem nächtlichen Peak der *E4bp4*-Expression zur ZT16 (138). Sowohl im RPE als auch im SCN akkumulieren die *Dbp*- und *Per1*-mRNA mit einer zeitlichen Diskrepanz von etwa 2 h und im SCN wurde nachgewiesen, dass DBP-Protein und *Per1*-Transkript gleichzeitig akkumulieren, sodass DBP die *Per1*-Transkription im SCN induzieren könnte (s. Abschn. 2.3.3). Deshalb lassen unsere Ergebnisse vermuten, dass RPE und SCN eine ähnliche Interaktion zwischen DBP, *E4bp4* und *Per1* zeigen, wobei, wie oben diskutiert, die Phasenverschiebung der genannten Gene zu beachten ist.

Bmal1 zeigte in der vorliegenden Arbeit keine signifikante tageszeitliche Rhythmik im RPE. Im SCN und in der Retina wird *Bmal1* jedoch tageszeitlich mit einem Maximum zur ZT16 (139) bzw. zur ZT17,8 (140) exprimiert und nimmt als Uhrgen eine zentrale Rolle ein. Ein Knock-out von *Bmal1* beeinflusst die circadiane Regulation des retinalen Transkriptoms dramatisch: Storch et al. (2007) zeigten, dass nach Knockout von *Bmal1* nur noch wenige der tausend rhythmisch exprimierten Gene oszillierten (141) und auch im SCN führt ein Knockout von *Bmal1* zu einer nahezu vollkommenen Arrhythmie (136). Kondratov et al. (2006) und Baba et al. (2018) zeigten zudem, dass *Bmal1* für die Gesundheit des Auges essentiell ist: *Bmal1*-Knockout-Mäuse erkrankten signifikant häufiger an Katarakt (142) und die Vitalität der Photorezeptoren war in diesen Mäusen deutlich reduziert (143, 144). Es scheint wahrscheinlich, dass *Bmal1* auch im murinen RPE eine tageszeitliche Rhythmik zeigt, auch wenn dies im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht nachgewiesen werden konnte. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Ergebnisse der Studien von DeVera et al. (2019, 2020). DeVera et al. (2019, 2020) zeigten, dass im RPE exprimierte *Bmal1*-mRNA die tageszeitliche Rhythmik der Phagozytoserate von AS signifikant beeinflusst (145, 146).

Tab. 8 Vergleich der Rhythmik einzelner Gene zwischen RPE, Retina und SCN

Dargestellt sind Amplitude und Maximum der Gene *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Bmal1*, *Dbp* und *E4bp4* in RPE, Retina und SCN. Die Befunde zur Retina wurden den Studien von Hiragaki et al. 2014 (*Per1*, *Per2*, *Bmal1*) (147), Kunst et. al. 2015 (*Dpb*) (89) und Schneider et al. 2010 (*Per3*) (148) entnommen. Die Befunde zum SCN wurden Yamaguchi et al. 2015 (*Per1*, 2, 3) (139), Yamaguchi et al. 2000 (*Dbp*) (65), Oishi et al. 2000 (*Bmal1*) (139) und Mitsui et al. 2001 (*E4bp4*) (138) entnommen. Die Befunde zum RPE entstammen der vorliegenden Dissertation. Abkürzungen: RPE = *retinales Pigmentepithel*, SCN = *Nucleus suprachiasmaticus*

*Hierbei handelt es sich um Befunde aus Ratten-Retina.

Gen	RPE		Retina		SCN
	Amplitude (%)	Peak (ZT)	Amplitude (%)	Peak (ZT)	Peak (ZT)
<i>Per1</i>	45,69	10,39	48	10,51	5,91*
<i>Per2</i>	54,43	12,36	45	10,70	9,28*
<i>Per3</i>	36,73	9,79	40,07*	10,23*	-
<i>Bmal1</i>	-	-	39	17,88	16
<i>Dbp</i>	67,15	7,59	32,4	7,9	4
<i>E4bp4</i>	35,68	21,46	-	-	16

5.1.2 Der Neuromodulator Dopamin spielt im retinalen Pigmentepithel eine entscheidende Rolle als „Entrainer“

In der Retina spielen die Neuromodulatoren DA und Melatonin eine wichtige Rolle in der Erzeugung circadianer Rhythmen. Die Wirkung von DA wird in der Retina v.a. über D4-R vermittelt, welche in der Retina selbst rhythmisch exprimiert werden (1). Doch welche Rolle spielen die Neuromodulatoren bei der Erzeugung circadianer Rhythmen im RPE?

Im RPE zeigte sich keine signifikante tageszeitliche Rhythmik der *Drd4*-Genexpression (s. Abb. 10, Tab. 6). Im Gegensatz dazu lässt sich in der Retina von Ratten und Mäusen sowie in murinen Photorezeptoren ein klarer circadianer Rhythmus der *Drd4*-Expression mit maximaler Expression während der Dunkelphase nachweisen (149). Die tagsüber erniedrigte *Drd4*-Expression der Retina könnte durch eine negative Regulation der *Drd4*-Expression durch Licht hervorgerufen werden (150). Analog zur Retina wurde im Pinealorgan eine rhythmische Expression des D4-R nachgewiesen

werden (151), wobei die Rhythmik der *Drd4*-Expression im Pinealorgan zeitlich nach hinten verschoben ist (149, 152, 153). Nach Ektomie des oberen cervicalen Ganglions bleibt die Rhythmik der *Drd4*-Expression in der Retina erhalten, wohingegen sie im Pinealorgan verloren geht (149). Die rhythmische *Drd4*-Expression scheint folglich im Pinealorgan, nicht aber in der Retina, sympathisch reguliert zu werden.

Welche Rolle könnten DR im RPE spielen? Baba et al. konnten in ihren Studien zeigen, dass DA den circadianen Rhythmus im RPE primär über D2R beeinflusst (115). So führt eine Dysfunktion der D2R im RPE dazu, dass die tageszeitliche Rhythmik der *Per2*-Expression im RPE nicht mehr durch DA beeinflusst werden konnte. Zudem führte die Gabe von Sumanilol, ein hochspezifischer D2R-Agonist, zu einer Verschiebung des circadianen Rhythmus im RPE, wohingegen die Gabe von PD168077, ein hochspezifischer D4R-Agonist, den *Per2*-Rhythmus unbeeinflusst ließ (115). DA scheint im RPE folglich über den D2R am „Entrainment“ der Uhren beteiligt zu sein, wohingegen der ebenfalls zur inhibitorischen D2-R-Familie gehörende D4R den *Per2*-Rhythmus nicht beeinflussen kann (115). Möglicherweise wird die RPE-Uhr mittels DA, das circadian aus amakrinen Zellen der Retina ausgeschüttet wird, mit der retinalen Uhr und schlussendlich den Tag-Nacht-Zyklen der Umwelt synchronisiert. DA würde dieser Arbeitshypothese zur Folge als neurohormonelle Synchronisation zwischen der Uhren von Retina und RPE fungieren (2). Des Weiteren scheint DA den circadianen Rhythmus der Phagozytose der AS zu beeinflussen: Eine Inhibition der DA-Synthese während der frühen Lichtphase führt zu einer signifikanten Reduktion von „disk shedding“ und Phagozytose-Rate (154). Diese Arbeitshypothese wird durch die Studien von Goyal et al. (2020) sowie DeVera et al. (2019) unterstützt. Goyal et al. und DeVera et al. konnten zeigen, dass die tageszeitliche Rhythmik der Phagozytose von AS der Photorezeptoren über D2R im RPE reguliert wird (68). Zudem wiesen die Arbeitsgruppen nach, dass ein Verlust von *Bmal1* in den RPE-Zellen zu einer verringerten Menge an D2R-Protein führte (145). Die tageszeitliche Regulation der Phagozytose von AS der Photorezeptoren scheint folglich über eine RPE-eigene Uhr gesteuert zu werden, wobei *Bmal1* und D2R essentielle Komponenten des RPE-eigenen Uhrennetzwerks zu sein scheinen.

Eine von Pavan et al. (2006) durchgeführte Studie konnte zeigen, dass auch drei AC-Isoformen, die durch Ca^{2+} -hemmbaren Isoformen AC5 und AC6 sowie die Ca^{2+} -unabhängige AC7, in humanen RPE-Zellen rhythmisch exprimiert werden und eine Rolle bei der Regulierung circadianer Rhythmen spielen könnten (9). Die in der Retina rhythmisch exprimierten AC-Isoformen AC1 und AC8 scheinen im Gegensatz dazu im

humanen RPE keinen Beitrag zur Rhythmik zu leisten (9). Es wird vermutet, dass eine Verbindung zwischen dem AC-/Calcium-Signalweg und der Generierung circadianer Rhythmen im RPE besteht (9), wobei der genaue molekulare Mechanismus dieser Verknüpfung bisher unbekannt ist. Interessanterweise könnte ein Defekt in dem AC-Signalweg des RPE mit retinaler Dystrophie assoziiert sein (155). Die RPE-Uhr scheint folglich über mehrere Signalwege an der Generierung tageszeitlicher Rhythmen beteiligt zu sein, wobei noch unklar ist, wie die verschiedenen Wege interagieren.

Neben dem Expressionsmuster von *Drd4* wurde im Rahmen dieser Dissertation auch die Expression von *Gnaz* untersucht. Hierbei wurde die Expression des Gens erstmals im RPE nachgewiesen. Hinton et al. konnten bereits 1990 nachweisen, dass *Gnaz* in neuronalem Gewebe exprimiert wird, u.a. in Ganglionzellen der Retina, in Purkinjezellen des Cerebellums und im Hippocampus (156). Des Weiteren konnte *Gnaz* in Photorezeptoren (132, 157) und in Pinealozyten nachgewiesen werden (132). Im RPE konnte im Tagesverlauf keine signifikante rhythmische Expression von *Gnaz* nachgewiesen werden (siehe Abb. 10). Im Gegensatz dazu weisen *Gnaz* und sein Proteinprodukt $G\alpha 2$ in der Retina und den Photorezeptoren eine tageszeitliche Rhythmik der Expression mit einem Maximum in der Nacht auf (132).

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass DA über D2R die circadiane Uhr des RPEs synchronisiert (115). Doch auch Melatonin (117), Histamin (118) sowie der AC-/Calcium-Signalweg (9) scheinen an der Integration der RPE-Uhr in das übergeordnete Uhrenwerk des Körpers beteiligt zu sein.

5.2 Funktionelle Relevanz der molekularen Uhr im retinalen Pigmentepithel

5.2.1 Der visuelle Zyklus wird tageszeitlich reguliert

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit lassen vermuten, dass die Expression von *Lrat*, *Rpe65* und *Rdh5* im RPE einen tageszeitlichen Rhythmus mit morgendlichem Maximum (*Lrat*: ZT5,0, *Rpe65*: ZT3,2, *Rdh5*: ZT3,9) (s. Abb. 11, Tab. 7) aufweist. Während des Tages werden die Photopigmente in Stäbchen und Zapfen in einer hohen Rate gebleicht, wohingegen nur eine sehr kleine Menge Chromophor in der Nacht verbraucht wird (158). Der Chromophor-Verbrauch wird folglich durch die im Tagesverlauf fluktuierende Lichtintensität bestimmt. Vor diesem Hintergrund könnte die tageszeitliche Rhythmik der für die Regeneration des Chromophors benötigten Enzyme eine Adaption an den tageszeitlich wechselnden Bedarf an Chromophor-Regeneration darstellen. Die tageszeitliche Regulation der Genexpression der Gene des visuellen Zyklus könnte somit zur optimalen Adaption des Sehens an die sich im Tagesverlauf ändernden Lichtintensitäten beitragen.

In weiterführenden Untersuchungen unserer AG wurde gezeigt, dass die Periodik der untersuchten Gene unter DD-Verhältnissen nicht persistierte (159). Dies belegt, dass die Genregulation des visuellen Zyklus im RPE vom Licht-/Dunkel-Zyklus abhängig und nicht circadian ist. Dies lässt den Schluss zu, dass die tageszeitliche Regulation des visuellen Zyklus nicht über die circadiane Uhr des RPE reguliert wird.

Mutationen in den Genen des visuellen Zyklus des RPE führen zu verschiedenen retinalen Erkrankungen wie bspw. Lebersche kongenitale Amaurosis (*Lrat*, *Rpe65*) (36, 160) und Fundus albipunctus (*Rdh5*) (161). Die tageszeitliche Regulation könnte folglich für die Gesundheit der Retina essentiell sein.

Die tageszeitliche Regulation des visuellen Zyklus im RPE scheint Teil der tageszeitlichen Regulation der gesamten visuellen Wahrnehmung zu sein. Neben den in dieser Doktorarbeit untersuchten Genen *Rpe65*, *Lrat* und *Rdh5* zeigen auch die in der neuronalen Retina und den Photorezeptoren exprimierten Gene *Rdh12*, *Arr1* und *Arr4* tageszeitliche Oszillationen in ihren Expressionsprofilen (159). Interessanterweise persistierte die Rhythmik der Gene *Rdh12*, *Arr1* und *Arr4* auch unter DD-Bedingungen, was dafür spricht, dass die Expression dieser Gene im Gegensatz zu den untersuchten Genen des RPEs über eine „echte“ circadiane Uhr gesteuert wird (159). Die Adaption der visuellen Wahrnehmung an die im Tagesverlauf wechselnden Lichtverhältnisse wird folglich einerseits über Uhren-kontrollierte Gene

in der Retina sowie den Photorezeptoren und andererseits über Licht-kontrollierte Gene im RPE reguliert (7, 71).

Rdh12 spielt zwar keine entscheidende Rolle im visuellen Zyklus, aber es dient dem Schutz der Retina vor toxischen Retinaldehyden (162, 163). Die circadiane Hochregulation der *Rdh12*-Expression könnte demnach dem Ziel dienen, die Photorezeptoren vor der steigenden Konzentration an toxischen Retinaldehyden während der Lichtexposition zu schützen (164, 165). Der Bedarf an *Rdh12* ist dabei abhängig von der Menge der anfallenden Retinaldehyde und demnach auch von der *Rpe65*-Aktivität. Die Hochregulation der *Rdh12*-Expression scheint den *Rpe65*-abhängigen Anstieg der Retinaldehyde-Menge auszugleichen (166). Diese Hypothese ist konsistent mit der Beobachtung, dass die *Rpe65*-Rhythmik mit einem Maximum zur ZT1,3 der *Rdh12*-Expression mit einem Maximum zur ZT9,4 vorausläuft. Die circadiane Expression von *Rdh12* könnte folglich essentiell für die Gesundheit der Photorezeptoren sein (167).

Die Vermutung, dass die Gene des visuellen Zyklus lichtabhängig am Tag stärker exprimiert werden, um den erhöhten Bedarf an Chromophor zu decken, steht jedoch in Kontrast zu den Ergebnissen von Xue et al. (2015) (158). Xue et al. zeigten, dass die *Rpe65*-Expression durch Licht supprimiert wird. Die tageszeitliche Regulation des visuellen Zyklus scheint dabei durch den Einfall von Licht (konsistent mit unseren Ergebnissen) und die im Tagesverlauf fluktuierende Ausschüttung von Melatonin bestimmt zu werden (158). Die Bleichung und Regeneration des Sehpigments involviert multiple enzymatische Schritte und benötigt demnach signifikante Mengen Energie. Eine Verlangsamung des visuellen Zyklus bei Lichteinfall würde Energie sparen und damit zu einem geringen Anfall von toxischen Nebenprodukten führen, was retinale Schäden minimieren würde (158). Diese Möglichkeit konsistiert mit der Beobachtung, dass eine geringere *Rpe65*-Expression mit einer geringeren Licht-induzierten Stäbchen-Degeneration einhergeht (168). Zudem konnte in Ratten gezeigt werden, dass die Retina nachts anfälliger für Licht-induzierte Schäden ist (169, 170). Die Beobachtung von Xue et al., dass der visuelle Zyklus nachts schneller abläuft und somit mehr toxische Nebenprodukte anfallen, könnte eine Erklärung hierfür darstellen (158).

Die Beobachtung, dass die Retina nachts anfälliger für Licht-induzierte Schäden ist, lässt sich jedoch auch mit der tageszeitlichen Rhythmik von *Rdh12* erklären. *Rdh12* wird zum ZT7,8 maximal und in der Dunkelphase minimal exprimiert. Geht man davon aus, dass dem Anstieg der *Rdh12*-Expression auch ein Anstieg der RDH-Protein-

Menge folgt, steht in Dunkelheit folglich weniger Enzym zur Verfügung, um toxische Retinaldehyd zu verstoffwechseln und die anfallenden Nebenprodukte könnten zu retinalen Schäden führen.

Zusammengefasst lassen unsere Daten den Schluss zu, dass die tageszeitliche und circadiane Kontrolle der Gene des visuellen Zyklus und der Phototransduktion eine optimale Adaption an die 24 h-Periodizität der Lichtintensität gewährleistet.

5.2.2 Einfluss des molekularen Oszillators auf den Metabolismus im retinalen Pigmentepithel

Das RPE ist dazu in der Lage, Fettsäuren über β -Oxidation zu verstoffwechseln (171). Interessanterweise stammen die im RPE metabolisierten Fettsäuren hauptsächlich aus phagozytierten AS der Photorezeptoren. Adijanto et al. (2014) konnten zeigen, dass die RPE-Zellen Fettsäuren zu β -Hydroxybutyrat (β -Hb) metabolisieren können, was dann von der Retina als Substrat für ihren oxidativen Metabolismus genutzt wird (171). In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass die Schlüsselenzyme der β -Oxidation im Gegensatz zur Retina (90) im RPE keine rhythmische Expression aufweisen. Für diesen Befund sind grundsätzlich zwei verschiedene Erklärungsansätze denkbar: Entweder wird im RPE, anders als in der Retina, kein circadianer „Stoffwechselrhythmus“ exprimiert oder es existiert zwar ein „Stoffwechselrhythmus“, aber dieser umfasst andere metabolische Wege als die β -Oxidation.

Wie bereits erwähnt, zeigte sich im RPE für keines der für den Fettstoffwechsel relevanten Gene (*Acadm*, *Cpt1 α* , *Pgc1 α*) eine tageszeitliche Rhythmik der Genexpression (s. Abb. 12, Tab. 7). Eine Erklärung hierfür wäre, dass das RPE im Tagesverlauf einen konstant hohen Energiebedarf aufweist und der Metabolismus somit nicht an einen veränderten Energieverbrauch adaptiert werden muss, sodass ein circadianer „Stoffwechselrhythmus“ überflüssig wäre.

Viele der essenziellen Aufgaben des RPEs sind aber mit einem hohen Energiebedarf verbunden: Die Anlieferung von Nährstoffen sowie die Aufnahme und der Abtransport von Metaboliten sind energieverbrauchende Prozesse, die Enzymsysteme des visuellen Zyklus werden allosterisch über ATP aktiviert und auch die Phagozytose sowie der lysosomale Abbau der AS der Photorezeptoren stellen ATP verbrauchende Prozesse dar (172). Das RPE benötigt folglich einen Metabolismus, der seinen hohen Energiebedarf decken kann. Da einige der im RPE ablaufenden ATP verbrauchenden

Prozesse, wie bspw. die Phagozytose von AS (173) und der visuelle Zyklus (siehe Abschn. 4.2.1), einer circadianen Rhythmik unterliegen, scheint es naheliegend, dass der Energiemetabolismus entsprechend dem tageszeitlichen Energiebedarf ebenfalls circadian reguliert wird. Über einen solchen circadian regulierten „Stoffwechselrhythmus“ könnte eine optimale Adaption an den aktuellen Energiebedarf gewährleistet werden. Es ist also denkbar, dass im RPE ein „Stoffwechselrhythmus“ existiert, der jedoch nicht die β -Oxidation, sondern einen anderen metabolischen Weg zur Energiegewinnung umfasst. Für diese Hypothese spricht, dass im RPE v.a. die aerobe Glykolyse (174) und die reduktive Carboxylierung für die Energiegewinnung genutzt werden (175, 176). Du et al. (2016) konnten zeigen, dass RPE-Zellen durch einen Energiemetabolismus, der als „reduktive Carboxylierung“ bezeichnet wird, charakterisiert sind (175, 176). Bisher wurde jedoch noch nicht untersucht, ob die Schlüsselenzyme der reduktiven Carboxylierung zyklisch exprimiert werden (176). Zudem postulierten Kanow et al. (2017), dass der Metabolismus des RPEs eng mit dem Energiemetabolismus der Retina verbunden ist: Die Photorezeptoren verbrauchen zur Energiegewinnung in erster Linie Glucose und das entstehende Laktat dient den RPE-Zellen als „Treibstoff“ (176). Außerdem supprimiert Laktat in den RPE-Zellen die Glykolyse, sodass mehr Glucose die Retina erreichen kann und für ihren Metabolismus zur Verfügung steht (176). Kommt es zu einem Ungleichgewicht im „Retina-RPE-System“, z.B. durch einen Untergang von RPE-Mitochondrien und einer damit einhergehenden Hochregulation der Glykolyse im RPE, kann dies zu retinalen Erkrankungen wie bspw. der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) führen (176). Das hypothetische Modell, dass Retina und RPE eine metabolische Einheit bilden, eröffnet die Möglichkeit, dass die circadiane Regulation des retinalen Energiestoffwechsels eine tageszeitliche Adaption auch der Energieversorgung des RPE gewährleistet. Diese Vermutung wird durch die Erkenntnis unterstützt, dass das Gen *SLC16A1*, welches für den im RPE exprimierten Laktattransporter MT1 codiert, rhythmisch exprimiert wird (177).

Im Gegensatz zum RPE werden die Gene *Acadm* und *Cpt1 α* , welche für wichtige Regulorenzyme der β -Oxidation von Fettsäuren codieren, in der Retina rhythmisch exprimiert, wobei sich ein Peak am Tag zeigt und die Periodizität auch in DD konstant bleibt (89, 90). Die uhrenabhängige Hochregulation von *Cpt1 α* und *Acadm* während des Tages könnte dazu beitragen, eine suffiziente Energieversorgung der Retina zum Einbruch der Dunkelheit zu gewährleisten (90). Dies ist für die Funktion der Retina unabdingbar, da ihr Energieverbrauch in Dunkelheit am höchsten ist: Die

Aufrechterhaltung des Dunkelstroms erfordert die konstante Aktivität der Na⁺/K⁺-ATPasen, die große Mengen der „Energiewährung“ ATP verbrauchen (178).

Eine circadiane Regulation von *Cpt1α* wurde jedoch nicht nur in der Retina, sondern auch in anderen Geweben wie der Leber, dem Skelettmuskel und der Lunge beobachtet (179). Dies suggeriert, dass die circadiane Kontrolle des *Cpt1α*-Gens weit verbreitet ist und den verschiedenen Geweben ermöglicht, sich an den tageszeitabhängigen Energiebedarf zu adaptieren. Weiterhin zeigte sich, dass ein Verlust oder eine Störung der Uhrenkontrolle des Metabolismus mit abnormalen metabolischen Phänotypen assoziiert ist, die zu Symptomen des metabolischen Syndroms führen (88, 179).

In peripheren Geweben wird die Regulation der *Cpt1α*-Expression u.a. über den Transkriptionscoaktivator *Pgc-1α* beeinflusst (92). Die *Pgc-1α*-Expression wird in Photorezeptoren diurnal reguliert und könnte in der Retina die circadiane Kontrolle der *Cpt1α*-Transkription vermitteln (92, 180). Der Transkriptionscoaktivator koordiniert jedoch nicht nur den Energiemetabolismus in peripheren Geweben, sondern er stellt auch einen Coaktivator von *Rora* dar, wodurch er die Uhrenfunktion und Rhythmik direkt beeinflussen kann (91).

Zum Abschluss der vorliegenden Dissertation muss kritisch angemerkt werden, dass im Rahmen dieser Doktorarbeit nur die rhythmische Oszillation der Transkriptmenge der untersuchten Gene mittels qPCR beobachtet wurde. Ob die Oszillation der mRNA also auch eine Oszillation der Proteine zur Folge hat, ist zwar wahrscheinlich, aber kann durch die vorliegende Arbeit letztendlich nicht bewiesen werden.

6. Zusammenfassung

Tageszeitliche Rhythmen finden sich in den meisten Organismen und werden über molekulare Uhren generiert. Auch im RPE finden sich Hinweise auf die Existenz von Uhren-abhängigen tageszeitlichen Rhythmen. So stehen bspw. die Phagozytose der AS der Photorezeptoren (158) sowie die Expression von SLC16A1, einem Laktattransporter, unter circadianer Kontrolle (177). Die molekularen Uhren, die die tageszeitlichen Rhythmen im RPE generieren, könnten sowohl in den Photorezeptoren als auch im RPE selbst zu liegen (11). Für die Existenz einer molekularen Uhr im RPE spricht die von Baba et al. 2010 beobachtete tageszeitliche Rhythmik in der Expression des Uhrengens *Per2* (7, 137).

Ein Ziel dieser Arbeit war die weitere Charakterisierung der molekularen Uhr des RPE. Hierzu wurden die tageszeitlichen Expressionsprofile der Uhrengene *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Cry1*, *Cry2* und *Bmal1* sowie der Uhren-regulierten Gene *Dbp* und *E4bp4* mittels quantitativer PCR analysiert. Darüber hinaus wurde untersucht, inwieweit die bekanntermaßen in der Retina rhythmisch exprimierten Gene *Cpt1 α* , *Acadm*, *Pgc1a*, *Gnaz* und *Drd4* auch im RPE eine Rhythmik zeigen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war zu prüfen, inwieweit die Regeneration des Photopigments 11-cis-Retinal einer tageszeitlichen Adaptation unterliegt. Hierzu wurde eruiert, inwieweit die zentralen Gene des visuellen Zyklus (*Lrat*, *Rpe65*, *Rdh5*, *Rdh10*, *Rdh11* und *Rib1*) eine tageszeitliche Regulation ihrer Expression aufweisen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass wichtige Komponenten des molekularen Oszillators, nämlich sowohl die Uhrengene *Per1*, *Per2* und *Per3* als auch die CCGs *Dbp* und *E4bp4*, im RPE vorhanden sind und rhythmisch exprimiert werden. Hierbei sind die tageszeitlichen Expressionsprofile der Uhrengene und CCGs mit der molekularen Organisation der circadianen Uhren konsistent. Insofern stützen die vorliegenden Ergebnisse die Arbeitshypothese, dass das RPE einen tageszeitlichen Oszillator besitzt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Schlüsselenzyme des visuellen Zyklus *Lrat*, *Rpe65* und *Rdh5* einer tageszeitlichen Rhythmik mit maximalen Expressionsraten in den frühen Morgenstunden unterliegen. Auf der Grundlage dieses Befundes kann postuliert werden, dass die tageszeitliche Regulation der visuellen Wahrnehmung auch auf eine rhythmische Kontrolle des visuellen Zyklus zurückzuführen ist.

Literaturverzeichnis

1. Guido ME, Garbarino-Pico E, Contin MA, Valdez DJ, Nieto PS, Verra DM, et al. Inner retinal circadian clocks and non-visual photoreceptors: novel players in the circadian system. *Progress In Neurobiology*. 2010;924:484-504.
2. McMahon DG, Iuvone PM, Tosini G. Circadian organization of the mammalian retina: from gene regulation to physiology and diseases. *Progress In Retinal and Eye Research*. 2014;39:58-76.
3. Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, et al. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*. 2000;288:682-685.
4. Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:517-549.
5. Iuvone PM, Galli CL, Garrison-Gund CK, Neff NH. Light stimulates tyrosine hydroxylase activity and dopamine synthesis in retinal amacrine neurons. *Science*. 1978;202:901-902.
6. Tosini G, Pozdeyev N, Sakamoto K, Iuvone PM. The circadian clock system in the mammalian retina. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. 2008;30:624-633.
7. Baba K, Sengupta A, Tosini M, Contreras-Alcantara S, Tosini G. Circadian regulation of the PERIOD 2::LUCIFERASE bioluminescence rhythm in the mouse retinal pigment epithelium-choroid. *Molecular Vision*. 2010;16:2605-2611.

8. Yoshikawa A, Shimada H, Numazawa K, Sasaki T, Ikeda M, Kawashima M, et al. Establishment of human cell lines showing circadian rhythms of bioluminescence. *Neurosci Lett*. 2008;446:40-44.
9. Pavan B, Frigato E, Pozzati S, Prasad PD, Bertolucci C, Biondi C. Circadian clocks regulate adenylyl cyclase activity rhythms in human RPE cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;350:169-173.
10. Haque R, Chaurasia SS, Wessel JH, 3rd, Iuvone PM. Dual regulation of cryptochrome 1 mRNA expression in chicken retina by light and circadian oscillators. *Neuroreport*. 2002;13:2247-2251.
11. Ko GY. Circadian regulation in the retina: From molecules to network. *The European Journal of Neuroscience*. 2018.
12. Kiser PD, Palczewski K. Retinoids and Retinal Diseases. *Annu Rev Vis Sci*. 2016;2:197-234.
13. Kiser PD, Golczak M, Maeda A, Palczewski K. Key enzymes of the retinoid (visual) cycle in vertebrate retina. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821:137-151.
14. Kellner U, Wachtlin J. *Retina: Diagnostik und Therapie von Erkrankungen des hinteren Augenabschnitts*: Georg Thieme Verlag; 2008.
15. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen. 2., komplett überarb. Aufl.* ed. Stuttgart u.a.: Thieme; 2006.
16. McCaa CS. The eye and visual nervous system: anatomy, physiology and toxicology. *Environmental Health Perspectives*. 1982;44:1-8.
17. Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Current Molecular Medicine*. 2010;10:802-823.
18. Gekle M. *Taschenlehrbuch Physiologie: 70 Tabellen*. Stuttgart; 2010.

19. Hoon M, Okawa H, Santana LD, Wong ROL. Functional Architecture of the Retina: Development and Disease. *Progress In Retinal and Eye Research*. 2014;42:44-84.
20. Simo R, Villarroel M, Corraliza L, Hernandez C, Garcia-Ramirez M. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:190724.
21. Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, Bhattacharya SS. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Rev Genet*. 2010;11:273-284.
22. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*. 2005;85:845-881.
23. Engelmann W. *Zelluhren*. Tobias-lib. 2009; 113-115.
24. Kennedy CJ, Rakoczy PE, Constable IJ. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye (London, England)*. 1995;9:763-771.
25. Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC. Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *The Journal of Experimental Medicine*. 2004;200:1539-1545.
26. Beharry S, Zhong M, Molday RS. N-retinylidene-phosphatidylethanolamine is the preferred retinoid substrate for the photoreceptor-specific ABC transporter ABCA4 (ABCR). *The Journal of Biological Chemistry*. 2004;279:53972-53979.
27. Ahn J, Wong JT, Molday RS. The effect of lipid environment and retinoids on the ATPase activity of ABCR, the photoreceptor ABC transporter responsible for Stargardt macular dystrophy. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;275:20399-20405.

28. Weng J, Mata NL, Azarian SM, Tzekov RT, Birch DG, Travis GH. Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in *abcr* knockout mice. *Cell*. 1999;98:13-23.
29. Gonzalez-Fernandez F. Interphotoreceptor retinoid-binding protein—an old gene for new eyes. *Vision Research*. 2003;43:3021-3036.
30. Wu Q, Blakeley LR, Cornwall MC, Crouch RK, Wiggert BN, Koutalos Y. Interphotoreceptor retinoid binding protein is the physiologically relevant carrier that removes retinol from rod photoreceptor outer segments. *Biochemistry*. 2007;46:8669-8679.
31. Barrett DJ, Redmond TM, Wiggert B, Oprian DD, Chader GJ, Nickerson JM. cDNA clones encoding bovine interphotoreceptor retinoid binding protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1985;131:1086-1093.
32. den Hollander AI, McGee TL, Ziviello C, Banfi S, Dryja TP, Gonzalez-Fernandez F, et al. A homozygous missense mutation in the IRBP gene (*RBP3*) associated with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:1864-1872.
33. Muniz A, Greene WA, Plamper ML, Choi JH, Johnson AJ, Tsin AT, et al. Retinoid uptake, processing, and secretion in human iPS-RPE support the visual cycle. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:198-209.
34. Ruiz A, Winston A, Lim YH, Gilbert BA, Rando RR, Bok D. Molecular and biochemical characterization of lecithin retinol acyltransferase. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:3834-3841.
35. Moiseyev G, Chen Y, Takahashi Y, Wu BX, Ma J. RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102:12413-12418.

36. Marlhens F, Bareil C, Griffoin JM, Zrenner E, Amalric P, Eliaou C, et al. Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nature Genetics*. 1997;17:139-141.
37. Gu SM, Thompson DA, Srikumari CR, Lorenz B, Finckh U, Nicoletti A, et al. Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nature Genetics*. 1997;17:194-197.
38. Thompson DA, Li Y, McHenry CL, Carlson TJ, Ding X, Sieving PA, et al. Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy. *Nature Genetics*. 2001;28:123-124.
39. Rattner A, Smallwood PM, Nathans J. Identification and characterization of all-trans-retinol dehydrogenase from photoreceptor outer segments, the visual cycle enzyme that reduces all-trans-retinal to all-trans-retinol. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(15):11034-43.
40. Jang GF, McBee JK, Alekseev AM, Haeseleer F, Palczewski K. Stereoisomeric Specificity of the Retinoid Cycle in the Vertebrate Retina. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;275:28128-138.
41. Moiseyev G, Takahashi Y, Chen Y, Gentleman S, Redmond TM, Crouch RK, et al. RPE65 is an iron(II)-dependent isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;281:2835-2840.
42. Wang J, Chai X, Eriksson U, Napoli JL. Activity of human 11-cis-retinol dehydrogenase (Rdh5) with steroids and retinoids and expression of its mRNA in extra-ocular human tissue. *Biochemical Journal*. 1999;338:23-27.
43. Kurth I, Thompson DA, Ruther K, Feathers KL, Chrispell JD, Schroth J, et al. Targeted disruption of the murine retinal dehydrogenase gene *Rdh12* does not limit visual cycle function. *Mol Cell Biol*. 2007;27:1370-1379.
44. Hirota T, Fukada Y. Resetting mechanism of central and peripheral circadian clocks in mammals. *Zoological Science*. 2004;21:359-368.

45. Challet E. Minireview: Entrainment of the suprachiasmatic clockwork in diurnal and nocturnal mammals. *Endocrinology*. 2007;148:5648-5655.
46. Pfeffer M, Korf HW, Wicht H. Synchronizing effects of melatonin on diurnal and circadian rhythms. *General and Comparative Endocrinology*. 2018;258:215-221.
47. Astiz M, Heyde I, Oster H. Mechanisms of Communication in the Mammalian Circadian Timing System. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20.
48. Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM. Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron*. 1995;14:697-706.
49. Aton SJ, Herzog ED. Come together, right...now: synchronization of rhythms in a mammalian circadian clock. *Neuron*. 2005;48:531-534.
50. Morin LP, Allen CN. The circadian visual system, 2005. *Brain Research reviews*. 2006;51:1-60.
51. Michel S, Itri J, Han JH, Gniotczynski K, Colwell CS. Regulation of glutamatergic signalling by PACAP in the mammalian suprachiasmatic nucleus. *BMC Neuroscience*. 2006;7:15.
52. Zhang X, Odom DT, Koo SH, Conkright MD, Canettieri G, Best J, et al. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102:4459-4464.
53. Shigeyoshi Y, Taguchi K, Yamamoto S, Takekida S, Yan L, Tei H, et al. Light-induced resetting of a mammalian circadian clock is associated with rapid induction of the mPer1 transcript. *Cell*. 1997;91:1043-1053.

54. Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF, Jr., Reppert SM. Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*. 1997;19:1261-1269.
55. Gachon F, Nagoshi E, Brown SA, Ripperger J, Schibler U. The mammalian circadian timing system: from gene expression to physiology. *Chromosoma*. 2004;113:103-112.
56. Besharse JC, McMahon DG. The Retina and Other Light-sensitive Ocular Clocks. *J Biol Rhythms*. 2016;31:223-243.
57. Bell-Pedersen D, Cassone VM, Earnest DJ, Golden SS, Hardin PE, Thomas TL, et al. Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms. *Nat Rev Genet*. 2005;6:544-556.
58. Duong HA, Robles MS, Knutti D, Weitz CJ. A molecular mechanism for circadian clock negative feedback. *Science*. 2011;332(6036):1436-1439.
59. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002;418:935-941.
60. Iuvone PM, Tosini G, Pozdeyev N, Haque R, Klein DC, Chaurasia SS. Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2005;24:433-456.
61. Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics*. 2006;15 Spec No 2:271-277.
62. Gaucher J, Montellier E, Sassone-Corsi P. Molecular Cogs: Interplay between Circadian Clock and Cell Cycle. *Trends Cell Biol*. 2018;28:368-379.
63. Hastings MH, Field MD, Maywood ES, Weaver DR, Reppert SM. Differential regulation of mPER1 and mTIM proteins in the mouse suprachiasmatic nuclei: new insights into a core clock mechanism. *J Neurosci*. 1999;19:Rc11.

64. Yamajuku D, Shibata Y, Kitazawa M, Katakura T, Urata H, Kojima T, et al. Cellular DBP and E4BP4 proteins are critical for determining the period length of the circadian oscillator. *FEBS Letters*. 2011;585:2217-2222.
65. Yamaguchi S, Mitsui S, Yan L, Yagita K, Miyake S, Okamura H. Role of DBP in the Circadian Oscillatory Mechanism. *Molecular and Cellular Biology*. 2000;20:4773.
66. Travnickova-Bendova Z, Cermakian N, Reppert SM, Sassone-Corsi P. Bimodal regulation of mPeriod promoters by CREB-dependent signaling and CLOCK/BMAL1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:7728-7733.
67. Liu C, Fukuhara C, Wessel JH, 3rd, Iuvone PM, Tosini G. Localization of Aa-nat mRNA in the rat retina by fluorescence in situ hybridization and laser capture microdissection. *Cell Tissue Res*. 2004;315:197-201.
68. DeVera C, Baba K, Tosini G. Retinal Circadian Clocks are Major Players in the Modulation of Retinal Functions and Photoreceptor Viability. *Yale J Biol Med*. 2019;92:233-240.
69. Liu X, Zhang Z, Ribelayga CP. Heterogeneous expression of the core circadian clock proteins among neuronal cell types in mouse retina. *PloS one*. 2012;7:50602.
70. Dorenbos R, Contini M, Hirasawa H, Gustincich S, Raviola E. Expression of circadian clock genes in retinal dopaminergic cells. *Visual Neuroscience*. 2007;24:573-580.
71. Ruan GX, Zhang DQ, Zhou T, Yamazaki S, McMahon DG. Circadian organization of the mammalian retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:9703-9708.

72. Ruan GX, Allen GC, Yamazaki S, McMahon DG. An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA. *PLoS Biology*. 2008;6:249.
73. Dkhissi-Benyahya O, Coutanson C, Knoblauch K, Lahouaoui H, Leviel V, Rey C, et al. The absence of melanopsin alters retinal clock function and dopamine regulation by light. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. 2013;70:3435-3447.
74. Hannibal J, Georg B, Hindersson P, Fahrenkrug J. Light and darkness regulate melanopsin in the retinal ganglion cells of the albino Wistar rat. *J Mol Neurosci*. 2005;27:147-155.
75. Kojima D, Mori S, Torii M, Wada A, Morishita R, Fukada Y. UV-sensitive photoreceptor protein OPN5 in humans and mice. *PloS One*. 2011;6:26388.
76. Buhr ED, Yue WW, Ren X, Jiang Z, Liao HW, Mei X, et al. Neuropsin (OPN5)-mediated photoentrainment of local circadian oscillators in mammalian retina and cornea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112:13093-13098.
77. Cameron MA, Barnard AR, Hut RA, Bonnefont X, van der Horst GT, Hankins MW, et al. Electroretinography of wild-type and Cry mutant mice reveals circadian tuning of photopic and mesopic retinal responses. *J Biol Rhythms*. 2008;23:489-501.
78. Xu L, Ruan G, Dai H, Liu AC, Penn J, McMahon DG. Mammalian retinal Müller cells have circadian clock function. *Molecular Vision*. 2016;22:275-283.
79. Tosini G, Fukuhara C. The mammalian retina as a clock. *Cell Tissue Res*. 2002;309:119-126.
80. Ribelayga C, Cao Y, Mangel SC. The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling. *Neuron*. 2008;59:790-801.

81. Rushton WA. The sensitivity of rods under illumination. *The Journal of Physiology*. 1965;178:141-160.
82. Boynton RM, Whitten DN. Visual adaptation in monkey cones: recordings of late receptor potentials. *Science*. 1970;170:1423-1426.
83. Gekakis N, Staknis D, Nguyen HB, Davis FC, Wilsbacher LD, King DP, et al. Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science*. 1998;280:1564-1569.
84. Sakamoto K, Oishi K, Shiraishi M, Hamano S, Otsuka H, Miyake Y, et al. Two circadian oscillatory mechanisms in the mammalian retina. *Neuroreport*. 2000;11:3995-3997.
85. von Schantz M, Lucas RJ, Foster RG. Circadian oscillation of photopigment transcript levels in the mouse retina. *Brain Research Molecular Brain Research*. 1999;72:108-114.
86. Lin MK, Kim SH, Zhang L, Tsai Y-T, Tsang SH. Rod metabolic demand drives progression in retinopathies. *Taiwan Journal of Ophthalmology*. 2015;5:105-108.
87. Wong-Riley MTT. Energy metabolism of the visual system. *Eye Brain*. 2010;2:99-116.
88. Sancar G, Brunner M. Circadian clocks and energy metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. 2014;71:2667-2680.
89. Kunst S, Wolloscheck T, Kelleher DK, Wolfrum U, Sargsyan SA, Iuvone PM, et al. Pgc-1alpha and Nr4a1 Are Target Genes of Circadian Melatonin and Dopamine Release in Murine Retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:6084-6094.

90. Vancura P, Wolloscheck T, Baba K, Tosini G, Iuvone PM, Spessert R. Circadian and Dopaminergic Regulation of Fatty Acid Oxidation Pathway Genes in Retina and Photoreceptor Cells. *PLoS One*. 2016;11:e0164665.
91. Liu C, Li S, Liu T, Borjigin J, Lin JD. Transcriptional coactivator PGC-1alpha integrates the mammalian clock and energy metabolism. *Nature*. 2007;447:477-481.
92. Liu C, Lin JD. PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2011;43:248-257.
93. Escribano BM, Díaz-Moreno A, Tasset I, Túnez I. Impact of light/dark cycle patterns on oxidative stress in an adriamycin-induced nephropathy model in rats. *PLoS One*. 2014;9:e97713-e.
94. Hardeland R, Coto-Montes A, Poeggeler B. Circadian rhythms, oxidative stress, and antioxidative defense mechanisms. *Chronobiology International*. 2003;20:921-962.
95. Davies MH, Bozighian HP, Merrick BA, Birt DF, Schnell RC. Circadian variations in glutathione-S-transferase and glutathione peroxidase activities in the mouse. *Toxicol Lett*. 1983;19:23-27.
96. Baydas G, Gursu MF, Yilmaz S, Canpolat S, Yasar A, Cikim G, et al. Daily rhythm of glutathione peroxidase activity, lipid peroxidation and glutathione levels in tissues of pinealectomized rats. *Neurosci Lett*. 2002;323:195-198.
97. Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms. *Horm Metab Res*. 1997;29:363-372.
98. Witkovsky P. Dopamine and retinal function. *Documenta Ophthalmologica*. 2004;108:17-39.
99. Nir I, Haque R, Iuvone PM. Diurnal metabolism of dopamine in the mouse retina. *Brain Research*. 2000;870:118-125.

100. Jackson CR, Chaurasia SS, Zhou H, Haque R, Storm DR, Iuvone PM. Essential roles of dopamine D4 receptors and the type 1 adenylyl cyclase in photic control of cyclic AMP in photoreceptor cells. *Journal of Neurochemistry*. 2009;109:148-157.
101. Tosini G, Dirden JC. Dopamine inhibits melatonin release in the mammalian retina: in vitro evidence. *Neurosci Lett*. 2000;286:119-122.
102. Witkovsky P. Dopamine and retinal function. *Documenta ophthalmologica Advances in Ophthalmology*. 2004;108:17-40.
103. Tosini G, Pozdeyev N, Sakamoto K, Iuvone PM. The circadian clock system in the mammalian retina. *BioEssays : News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*. 2008;30:624-633.
104. Tosini G, Baba K, Hwang CK, Iuvone PM. Melatonin: an underappreciated player in retinal physiology and pathophysiology. *Exp Eye Res*. 2012;103:82-89.
105. Klein DC. Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(7):4233-4237.
106. Chen W, Baler R. The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator. *Brain Research Molecular Brain Research*. 2000;81:43-50.
107. Wiechmann AF, Summers JA. Circadian rhythms in the eye: the physiological significance of melatonin receptors in ocular tissues. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2008;27:137-160.
108. Tosini G, Menaker M. Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science*. 1996;272:419-421.

109. Nowak JZ, E ZU, Zawilska J. Melatonin and its generating system in vertebrate retina: circadian rhythm, effect of environmental lighting and interaction with dopamine. *Neurochemistry International*. 1989;14:397-406.
110. Bloomfield SA, Volgyi B. The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10:495-506.
111. Sakamoto K, Liu C, Kasamatsu M, Iuvone PM, Tosini G. Intraocular injection of kainic acid does not abolish the circadian rhythm of arylalkylamine N-acetyltransferase mRNA in rat photoreceptors. *Molecular Vision*. 2006;12:117-124.
112. Li H, Zhang Z, Blackburn MR, Wang SW, Ribelayga CP, O'Brien J. Adenosine and dopamine receptors coregulate photoreceptor coupling via gap junction phosphorylation in mouse retina. *J Neurosci*. 2013;33:3135-3150.
113. Milicevic N, Mazzaro N, de Bruin I, Wils E, Ten Brink J, Asbroek AT, et al. Rev-Erbalpha and Photoreceptor Outer Segments modulate the Circadian Clock in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Sci Rep*. 2019;9:11790.
114. Peirson SN, Bovee-Geurts PH, Lupi D, Jeffery G, DeGrip WJ, Foster RG. Expression of the candidate circadian photopigment melanopsin (Opn4) in the mouse retinal pigment epithelium. *Brain Research Molecular Brain Research*. 2004;123:132-135.
115. Baba K, DeBruyne JP, Tosini G. Dopamine 2 Receptor Activation Entrain Circadian Clocks in Mouse Retinal Pigment Epithelium. *Sci Rep*. 2017;7:5103.
116. Nash MS, Osborne NN. Pertussis toxin-sensitive melatonin receptors negatively coupled to adenylate cyclase associated with cultured human and rat retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36(1):95-102.
117. Laurent V, Sengupta A, Sanchez-Bretano A, Hicks D, Tosini G. Melatonin signaling affects the timing in the daily rhythm of phagocytic activity by the retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res*. 2017;165:90-95.

118. Morioka E, Kanda Y, Koizumi H, Miyamoto T, Ikeda M. Histamine Regulates Molecular Clock Oscillations in Human Retinal Pigment Epithelial Cells via H1 Receptors. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9:108.
119. Ikarashi R, Akechi H, Kanda Y, Ahmad A, Takeuchi K, Morioka E, et al. Regulation of molecular clock oscillations and phagocytic activity via muscarinic Ca(2+) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *Scientific Reports*. 2017;7:44175.
120. LaVail MM. Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1980;19:407-411.
121. LaVail MM. Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science*. 1976;194:1071-1074.
122. Besharse JC, Hollyfield JG, Rayborn ME. Turnover of rod photoreceptor outer segments. II. Membrane addition and loss in relationship to light. *The Journal of cell biology*. 1977;75:507-527.
123. Teirstein PS, Goldman AI, O'Brien PJ. Evidence for both local and central regulation of rat rod outer segment disc shedding. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1980;19:1268-1273.
124. Terman JS, Reme CE, Terman M. Rod outer segment disk shedding in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*. 1993;605:256-264.
125. Grace MS, Wang LM, Pickard GE, Besharse JC, Menaker M. The tau mutation shortens the period of rhythmic photoreceptor outer segment disk shedding in the hamster. *Brain Research*. 1996;735:93-100.
126. Terman JS, Remé CE, Terman M. Rod outer segment disk shedding in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research*. 1993;605:256-264.

127. Ruggiero L, Connor MP, Chen J, Langen R, Finnemann SC. Diurnal, localized exposure of phosphatidylserine by rod outer segment tips in wild-type but not *Itgb5*^{-/-} or *Mfge8*^{-/-} mouse retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109:8145-8148.
128. Genewsky A, Jost I, Busch C, Huber C, Stindl J, Skerka C, et al. Activation of endogenously expressed ion channels by active complement in the retinal pigment epithelium. *Pflugers Arch*. 2015;467:2179-2191.
129. Nandrot EF, Anand M, Sircar M, Finnemann SC. Novel role for α v β 5-integrin in retinal adhesion and its diurnal peak. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290:C1256-C1262.
130. Nguyen-Legros J, Hicks D. Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *International Review of Cytology*. 2000;196:245-313.
131. Moiseyev G, Chen Y, Takahashi Y, Wu BX, Ma JX. RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102:12413-12418.
132. Vancura P, Abdelhadi S, Csicsely E, Baba K, Tosini G, Iuvone PM, et al. Gnaz couples the circadian and dopaminergic system to G protein-mediated signaling in mouse photoreceptors. *PloS One*. 2017;12:e0187411.
133. Li S, Lin JD. Transcriptional control of circadian metabolic rhythms in the liver. *Diabetes Obes Metab*. 2015;17 Suppl 1:33-38.
134. Storch KF, Paz C, Signorovitch J, Raviola E, Pawlyk B, Li T, et al. Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information. *Cell*. 2007;130:730-741.
135. Takahashi JS. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet*. 2017;18:164-179.

136. Ruan GX, Gamble KL, Risner ML, Young LA, McMahon DG. Divergent roles of clock genes in retinal and suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *PloS One*. 2012;7:e38985.
137. Yoo S-H, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, et al. *PERIOD2::LUCIFERASE* real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101:5339-5346.
138. Mitsui S, Yamaguchi S, Matsuo T, Ishida Y, Okamura H. Antagonistic role of E4BP4 and PAR proteins in the circadian oscillatory mechanism. *Genes & Development*. 2001;15:995-1006.
139. Oishi K, Fukui H, Ishida N. Rhythmic Expression of BMAL1 mRNA Is Altered in Clock Mutant Mice: Differential Regulation in the Suprachiasmatic Nucleus and Peripheral Tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2000;268:164-171.
140. Hiragaki S, Baba K, Coulson E, Kunst S, Spessert R, Tosini G. Melatonin signaling modulates clock genes expression in the mouse retina. *PloS One*. 2014;9:e106819.
141. Storch K-F, Paz C, Signorovitch J, Raviola E, Pawlyk B, Li T, et al. Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information. *Cell*. 2007;130:730-741.
142. Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV, Antoch MP. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes & Development*. 2006;20:1868-1873.
143. Baba K, Ribelayga CP, Michael Iuvone P, Tosini G. The Retinal Circadian Clock and Photoreceptor Viability. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1074:345-350.

144. Baba K, Piano I, Lyuboslavsky P, Chrenek MA, Sellers JT, Zhang S, et al. Removal of clock gene Bmal1 from the retina affects retinal development and accelerates cone photoreceptor degeneration during aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2018;115:13099-13104.
145. DeVera C, Dixon J, Chrenek MA, Baba K, Iuvone PM, Tosini G. The circadian clock in the retinal pigment epithelium controls the diurnal rhythm of phagocytic activity. *BioRxiv*. 2020:408799.
146. De Vera C, Dixon JA, Chrenek MA, Baba K, Iuvone PM, Tosini G. Removal of the circadian clock gene Bmal1 in the RPE abolishes the daily peak of photoreceptor outer segment disc phagocytosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2019;60:2377.
147. Hiragaki S, Baba K, Coulson E, Kunst S, Spessert R, Tosini G. Melatonin signaling modulates clock genes expression in the mouse retina. *PLoS One*. 2014;9:e106819.
148. Schneider K, Tippmann S, Spiwox-Becker I, Holthues H, Wolloscheck T, Spatkowski G, et al. Unique clockwork in photoreceptor of rat. *Journal of Neurochemistry*. 2010;115:585-594.
149. Klitten LL, Rath MF, Coon SL, Kim J-S, Klein DC, Møller M. Localization and regulation of dopamine receptor D4 expression in the adult and developing rat retina. *Experimental Eye Research*. 2008;87:471-477.
150. Jackson CR, Chaurasia SS, Hwang CK, Iuvone PM. Dopamine D(4) receptor activation controls circadian timing of the adenylyl cyclase 1/cyclic AMP signaling system in mouse retina. *The European Journal of Neuroscience*. 2011;34:57-64.
151. Humphries A, Klein D, Baler R, Carter DA. cDNA array analysis of pineal gene expression reveals circadian rhythmicity of the dominant negative helix-loop-

- helix protein-encoding gene, Id-1. *Journal of Neuroendocrinology*. 2002;14:101-108.
152. Bai L, Zimmer S, Rickes O, Rohleder N, Holthues H, Engel L, et al. Daily oscillation of gene expression in the retina is phase-advanced with respect to the pineal gland. *Brain Research*. 2008;1203:89-96.
 153. Fukuhara C, Tosini G. Analysis of daily and circadian gene expression in the rat pineal gland. *Neurosci Res*. 2008;60:192-198.
 154. Reme´ C, Wirz-Justice A, Rhyner A, Hofmann S. Circadian rhythm in the light response of rat retinal disk-shedding and autophagy. *Brain Research*. 1986;369:356-360.
 155. Gregory CY, Abrams TA, Hall MO. cAMP production via the adenylyl cyclase pathway is reduced in RCS rat RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1992;33:3121-3124.
 156. Hinton DR, Blanks JC, Fong HK, Casey PJ, Hildebrandt E, Simons MI. Novel localization of a G protein, Gz-alpha, in neurons of brain and retina. *J Neurosci*. 1990;10:2763-7270.
 157. Fong HK, Yoshimoto KK, Eversole-Cire P, Simon MI. Identification of a GTP-binding protein alpha subunit that lacks an apparent ADP-ribosylation site for pertussis toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85:3066-3070.
 158. Xue Y, Shen SQ, Corbo JC, Kefalov VJ. Circadian and light-driven regulation of rod dark adaptation. *Sci Rep*. 2015;5:17616.
 159. Vancura P, Csicsely E, Leiser A, Iuvone PM, Spessert R. Rhythmic Regulation of Photoreceptor and RPE Genes Important for Vision and Genetically Associated With Severe Retinal Diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59:3789-3799.

160. Chacon-Camacho OF, Zenteno JC. Review and update on the molecular basis of Leber congenital amaurosis. *World Journal of Clinical Cases*. 2015;3:112-124.
161. Skorczyk-Werner A, Pawłowski P, Michalczyk M, Warowicka A, Wawrocka A, Wicher K, et al. Fundus albipunctatus: review of the literature and report of a novel RDH5 gene mutation affecting the invariant tyrosine (p.Tyr175Phe). *Journal of Applied Genetics*. 2015;56:317-327.
162. Chen C, Thompson DA, Koutalos Y. Reduction of all-trans-retinal in vertebrate rod photoreceptors requires the combined action of RDH8 and RDH12. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012;287:24662-24670.
163. Chrispell JD, Feathers KL, Kane MA, Kim CY, Brooks M, Khanna R, et al. Rdh12 activity and effects on retinoid processing in the murine retina. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009;284:21468-21477.
164. Maeda A, Maeda T, Imanishi Y, Sun W, Jastrzebska B, Hatala DA, et al. Retinol dehydrogenase (RDH12) protects photoreceptors from light-induced degeneration in mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006;281:37697-37704.
165. Mackay DS, Dev Borman A, Moradi P, Henderson RH, Li Z, Wright GA, et al. RDH12 retinopathy: novel mutations and phenotypic description. *Molecular Vision*. 2011;17:2706-2716.
166. Maiti P, Kong J, Kim SR, Sparrow JR, Allikmets R, Rando RR. Small molecule RPE65 antagonists limit the visual cycle and prevent lipofuscin formation. *Biochemistry*. 2006;45:852-860.
167. Ait-Hmyed O, Felder-Schmittbuhl MP, Garcia-Garrido M, Beck S, Seide C, Sothilingam V, et al. Mice lacking Period 1 and Period 2 circadian clock genes exhibit blue cone photoreceptor defects. *The European Journal of Neuroscience*. 2013;37:1048-1060.

168. Wenzel A, Reme CE, Williams TP, Hafezi F, Grimm C. The Rpe65 Leu450Met variation increases retinal resistance against light-induced degeneration by slowing rhodopsin regeneration. *J Neurosci*. 2001;21:53-58.
169. Vaughan DK, Nemke JL, Fliesler SJ, Darrow RM, Organisciak DT. Evidence for a circadian rhythm of susceptibility to retinal light damage. *Photochem Photobiol*. 2002;75:547-553.
170. Organisciak DT, Vaughan DK. Retinal light damage: mechanisms and protection. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2010;29:113-134.
171. Adijanto J, Du J, Moffat C, Seifert EL, Hurle JB, Philp NJ. The retinal pigment epithelium utilizes fatty acids for ketogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014;289:20570-20582.
172. Schutt F, Aretz S, Auffahrt GU, Kopitz J. Role of energy metabolism in retinal pigment epithelium. *Ophthalmologe*. 2013;110:346-352.
173. Bobu C, Hicks D. Regulation of retinal photoreceptor phagocytosis in a diurnal mammal by circadian clocks and ambient lighting. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:3495-3502.
174. Glocklin VC, Potts AM. The metabolism of retinal pigment cell epithelium II. Respiration and glykolysis. *Investigative Ophthalmology*. 1965;4:226-234.
175. Du J, Yanagida A, Knight K, Engel AL, Vo AH, Jankowski C, et al. Reductive carboxylation is a major metabolic pathway in the retinal pigment epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113:14710-14715.
176. Kanow MA, Giarmarco MM, Jankowski CS, Tsantilas K, Engel AL, Du J, et al. Biochemical adaptations of the retina and retinal pigment epithelium support a metabolic ecosystem in the vertebrate eye. *Elife*. 2017;6.

177. Milićević N, ten Brink JB, ten Asbroek ALMA, Bergen AA, Felder-Schmittbuhl M-P. The circadian clock regulates RPE-mediated lactate transport via SLC16A1 (MCT1). *Experimental Eye Research*. 2020;190:107861.
178. Ames A, 3rd, Li YY, Heher EC, Kimble CR. Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na⁺ transport. *J Neurosci*. 1992;12:840-853.
179. Gooley JJ, Chua EC. Diurnal regulation of lipid metabolism and applications of circadian lipidomics. *Journal of Genetics and Genomics = Yi chuan xue bao*. 2014;41:231-250.
180. Kunst S, Wolloscheck T, Holter P, Wengert A, Grether M, Sticht C, et al. Transcriptional analysis of rat photoreceptor cells reveals daily regulation of genes important for visual signaling and light damage susceptibility. *Journal of Neurochemistry*. 2013;124:757-769.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater für die hervorragende Betreuung der Doktorarbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt dabei für die stetige Unterstützung bei inhaltlichen und formalen Fragen. Vielen Dank dafür, dass Sie stets geduldig waren und sich sehr viel Zeit genommen haben.

Zudem möchte ich meinen Kolleginnen für die tatkräftige Unterstützung während meiner experimentellen Phase und ihrer unermüdlichen Geduld und Hilfsbereitschaft danken. Des Weiteren möchte ich einem weiteren Kollegen meinen Dank aussprechen, der mich nicht nur bei der Einarbeitung in die Laborarbeit, sondern auch beim Schreiben meiner Dissertation mit viel Geduld unterstützt hat. Weiterhin bedanke ich mich bei allen nicht-namentlich erwähnten Mitarbeitern des Instituts für Funktionelle und Klinische Anatomie der Universitätsmedizin Mainz und der Arbeitsgruppe Spessert für das stets freundliche Arbeitsklima und die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Meinem Zweit-Gutachter möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen. Vielen Dank, dass Sie die Korrektur meiner Doktorarbeit, trotz des hohen Arbeitspensums in der Viszeralchirurgie, als Zweit-Gutachter übernommen haben.

Abschließend möchte ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich bei der Erstellung der Doktorarbeit stets unterstützt haben. Euch alle namentlich zu erwähnen, würde den Rahmen dieser Dissertation sprengen, deshalb muss ich es allgemein halten: Danke, dass ihr immer für mich da seid!

Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Annalisa Leiser
Geburtsdatum	28.10.1993
Geburtsort	Flörsheim am Main

Studium und Schulausbildung

04/2014 - 11/2020	Studium der Humanmedizin an der Johannes Gutenberg-Universität
08/2004 - 06/2013	Allgemeine Hochschulreife am Graf-Stauffenberg-Gymnasium in Flörsheim

Praktisches Jahr

11/2019 - 01/2020	Wahlfach Neurologie: Kantonsspital St. Gallen
01/2020 – 03/2020	Wahlfach Neurologie: Universitätsmedizin Mainz
03/2020 - 06/2020	Chirurgie: Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Neurochirurgie und Kinderchirurgie der Universitätsmedizin Mainz
07/2020 - 10/2020	Innere Medizin: I. und III. Medizinische Klinik der Universitätsmedizin Mainz

Famulaturen

03/2018 - 04/2018	Allgemeinmedizin: Gemeinschaftspraxis Holz/Großner/Walch Worms
09/2017	Neurologie: Kantonsspital Aarau
09/2016 – 10/2016	Neurochirurgie: Universitätsmedizin Mainz