

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

Untersuchungen zur tageszeitlichen Rhythmik von G-Protein alpha-Untereinheiten in  
der murinen Retina

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

Schaima Abdelhadi  
aus Darmstadt

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild  
1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat et med. habil R. Spessert  
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Claus Pietrzik

Tag der Promotion: 27.06.2024

Teile dieser Dissertation wurden bereits publiziert in „*Gnaz* couples the circadian and dopaminergic system to G protein-mediated signaling in mouse photoreceptors“, PLOS ONE, Public Library of Science, Oktober 2017

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	6
1 Einleitung und Zielsetzung .....	10
2 Literaturdiskussion .....	12
2.1. Das circadiane System der Säugetiere .....	12
2.1.1. Der anatomische Aufbau des circadianen Systems .....	12
2.1.2. Das circadiane System auf molekularer Ebene.....	13
2.2 Das circadiane System der Retina .....	15
2.2.1 Die circadiane Uhr der Retina.....	15
2.2.2 Die Rolle von <i>Clock</i> im circadianen System der Retina .....	16
2.2.3 Die Funktion der retinalen Uhren .....	17
2.2.4 Einfluss der circadianen Uhren auf die Vitalität der Retina.....	19
2.3 Signaltransduktion in der Retina über Heterotrimere G-Proteine .....	20
2.3.1 Heterotrimere G-Proteine.....	20
2.3.2 Das retinale G-Protein $\alpha$ -Transducin und die visuelle Signaltransduktion .....	22
3 Material und Methoden.....	23
3.1 Materialien.....	23
3.1.1 Versuchstiere .....	23
3.1.2 Laborgeräte .....	24
3.1.3 Chemikalien und Enzyme .....	25
3.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	26
3.1.5 Software.....	26
3.1.6 Primer.....	27
3.2 Methoden .....	29
3.2.1 Entnahme der Retinae.....	29
3.2.2 Gewebefixierung mit der HOPE-Technik.....	29
3.2.3 Isolation der Photorezeptoren mittels LMPC-Technik.....	30
3.2.4 RNA-Extraktion.....	31
3.2.5 Reverse Transkription.....	32
3.2.6 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion.....	33
3.2.7 Statistische Auswertung.....	35
4 Ergebnisse.....	36
4.1 Genexpression in der Gesamtretina unter Licht-Dunkel-Bedingungen.....	37
4.2 Expression von <i>Gnaz</i> in der Gesamtretina unter Dauerdunkel (DD).....	42
4.3 Expression von <i>Gnaz</i> in den Photorezeptoren unter Licht/Dunkel (12:12) .....	44

<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>46</b>
<b>5.1</b>	<b>Tageszeitliche Rhythmik der für die G-Protein-Untereinheiten (<math>\alpha</math>-, <math>\beta</math>-, und <math>\gamma</math>) kodierenden Gene in der Wildtyp-Retina.....</b>	<b>47</b>
<b>5.2</b>	<b>Die circadiane Regulation von <i>Gnaz</i>.....</b>	<b>48</b>
<b>5.3</b>	<b>Die <i>Clock</i>-abhängige Regulation von <i>Gnaz</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>5.4</b>	<b>Die Expression und Rhythmik von <i>Gnaz</i> in den Photorezeptoren.....</b>	<b>51</b>
<b>5.5</b>	<b>Funktionelle Bedeutung der circadianen Regulation von <i>Gnaz</i>.....</b>	<b>53</b>
<b>5.6</b>	<b>Einfluss des circadianen Systems auf die visuelle Signalverarbeitung.....</b>	<b>54</b>
<b>5.7</b>	<b>Verwendung Melatonin-profizienter Mäuse.....</b>	<b>56</b>
<b>5.8</b>	<b>Verwendung der one-way ANOVA und der Cosinor-Analyse .....</b>	<b>56</b>
<b>5.9</b>	<b>Limitationen der Dissertation .....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>67</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>74</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
&	und
°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µM	Mikromol pro Liter
µm	Mikrometer
µm <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
<i>Aanat</i>	<i>Arylalkylamine N-acetyltransferase</i>
Abb.	Abbildung
AC1	Adenylatcyclase 1
<i>Acadm</i>	<i>Acyl-CoA Dehydrogenase Medium Chain</i>
ad libitum	nach Belieben
<i>Adcy1</i>	<i>Adenylyl cyclase type 1</i>
<i>Arr1</i>	<i>Arrestin 1</i>
<i>Arr4</i>	<i>Arrestin 4</i>
bHLH	basische Helix-Loop-Helix
<i>Bmal1</i>	<i>Brain and muscle aryl hydrocarbon receptor</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosin-monophosphat
CCG	<i>clock controlled genes</i>
cDNA	komplementäre DNA (complementary DNA)
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
<i>Clock</i>	<i>circadian locomotor output cycles kaput</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
<i>Cpt-1a</i>	<i>Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1A</i>
<i>Cry1</i>	Cryptochrome 1
<i>Cry2</i>	Cryptochrome 2
CT	circadian time
C <sub>t</sub>	Schwellenwertzyklus (treshold cycle)
D4-Rezeptor	Dopamin-D4-Rezeptor

<i>Dbp</i>	<i>Albumin gene-D-site binding protein</i>
DD	Dauerdunkel
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>Drd4</i>	<i>dopamine receptor D4</i>
E-Box	Enhancer Box
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	englisch
et al.	et alii (und andere)
g	Gramm
<i>Gapdh</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GPgR	G-Protein gekoppelten Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde (hour)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HOPE	hepes-glutamic acid buffer mediated organic solvent protection effect
ipRGC	Intrinsisch photosensitive Ganglienzellen
kDa	Kilodalton
KO	knock-out
l	Liter
lat.	Latein
LD	Licht-Dunkel
LMPC	laser microdissection and pressure catapulting
lux	Beleuchtungsstärke
M	mol pro Liter
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimol pro Liter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MT1	Melatonin Rezeptor 1

MT2	Melatonin Rezeptor 2
NaCl	Natriumchlorid
<i>Nr4a1</i>	<i>nuclear receptor subfamily 4 group A member 1</i>
<i>Npas2</i>	<i>neuronal PAS domain protein 2</i>
NSC	Nucleus suprachiasmaticus
NTC	no template control
<i>Opn4</i>	Opsin 4
<i>Opn5</i>	Opsin 5
PCR	polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterasen
<i>Per1</i>	<i>period circadian clock 1</i>
<i>Per2</i>	<i>period circadian clock 2</i>
<i>Per3</i>	<i>period circadian clock 3</i>
<i>Pgc-1α</i>	<i>peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
PRZ	Photorezeptorzelle
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
rd	retinal degeneration
<i>Rev-erba</i>	<i>Reverse erythroblastic leukemia viral oncogene homolog alpha</i>
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNAse	Ribonuklease
<i>Rora</i>	<i>RAR-related orphan receptor alpha</i>
<i>Rorb</i>	<i>RAR-related orphan receptor beta</i>
RRE	REV-ERB/ROR responsive element
RT	Reverse Transkription
SE	Standardabweichung (standard error)
sek	Sekunden
SEM	Vertrauensbereich des Mittelwerts
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZT	Zeitgeber time

## Abbildungen

- Abb. 1: Vereinfachtes Schema des molekularen Mechanismus der circadianen Uhr
- Abb. 2: Einfluss des circadianen Systems auf verschiedene physiologische Parameter der Retina
- Abb. 3: PCR-Protokoll
- Abb. 4: Tageszeitliche Profile der Transkriptmengen der G-Protein-Untereinheiten in der Retina unter Licht-Dunkel-Bedingungen bei Wildtyp- und Clock-defizienten Mäusen
- Abb. 5: Tageszeitliches Profil der *Gnaz*-Expression in der Retina unter Dauerdunkel
- Abb. 6: Tageszeitliches Profil der *Gnaz*-Expression in Photorezeptoren unter Licht-Dunkel Bedingungen

## Tabellen

- Tab. 1: Überblick über die G-Protein-Untergruppen und deren Funktion
- Tab. 2: Heterotrimere G-Proteine mit ihren verschiedenen Subtypen von Untereinheiten
- Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Primer
- Tab. 4: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die cDNA-Synthese
- Tab. 5: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes
- Tab. 6: Statistische Auswertung der in Abb. 4 dargestellten tageszeitlichen Expressionsprofile
- Tab. 7: Lineare Regressionsanalyse der tageszeitlichen Profile der *Gnaz*-Expression zwischen Wildtyp und Clock-defizienten Mäusen
- Tab. 8: Statistische Auswertung der in Abb. 5 dargestellten tageszeitlichen Expressionsprofile
- Tab. 9: Lineare Regressionsanalyse der tageszeitlichen Profile der *Gnaz*-Expression unter Licht-Dunkel-Bedingungen (LD) und Dauerdunkel (DD)
- Tab. 10: Statistische Auswertung der in Abb. 6 dargestellten tageszeitlichen Expressionsprofile
- Tab. 11: Lineare Regressionsanalyse der tageszeitlichen Profile der *Gnaz*-Expression zwischen Gesamtretina und Photorezeptoren

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Biologische Rhythmen sind in der Natur ein weit verbreitetes Phänomen. Um sich den periodischen Veränderungen der Umwelt, wie z.B. dem tageszeitlichen Wechsel von Licht und Dunkel oder der jahreszeitlichen Klimaschwankungen, anzupassen, entwickelten nahezu alle Organismen ein System aus sog. inneren Uhren [1-4]. Dieses System besteht bei Säugetieren aus einer „Meisteruhr“ im Nucleus suprachiasmaticus (NSC) und peripheren Uhren, die in nahezu allen Geweben vorkommen und der Meisteruhr in der Regel untergeordnet sind [5-10].

Die innere Uhr des NSC ist in der Lage auch ohne äußeren Antrieb einen Rhythmus aufrechtzuerhalten [4, 11]. Dieser Rhythmus hat eine Periodenlänge von näherungsweise 24 Stunden und wird deshalb als „circadian“ bezeichnet (lat. circa dies = ungefähr ein Tag) [4, 11, 12]. Äußere Reize können jedoch den Rhythmus der circadianen Uhr mit den äußeren Bedingungen synchronisieren [4, 11, 13]. Diese Reize werden als „Zeitgeber“ bezeichnet. Licht zählt zu den wichtigsten Zeitgebern und ermöglicht es, den Rhythmus der inneren Uhr mit der tatsächlichen Tageslänge und Tageszeit zu synchronisieren [4, 11, 13]. Das Phänomen der Zeitgeber-induzierten Beeinflussung der inneren Uhr wird als „*entrainment*“ bezeichnet [14, 15]. Weitere wichtige Zeitgeber sind Nahrungsverfügbarkeit und -aufnahme [16, 17], Temperatur [18] und soziale Interaktionen [19].

Circadiane Uhren kommen auch in der Retina vor und konnten in verschiedenen Zelltypen wie z.B. den Photorezeptoren (Zapfen und Stäbchen) nachgewiesen werden [6, 20-22]. Die retinalen Uhren ermöglichen der Retina die Adaptation an die wechselnden äußeren Lichtbedingungen [5, 23, 24]. Die Uhren-gesteuerte Adaptation der Retina betrifft viele physiologische Prozesse wie z.B. die Regulation des retinalen Energiestoffwechsel [25, 26], die Melatonin- und Dopaminsynthese [6, 23, 27, 28] und insbesondere die visuelle Signalverarbeitung [5, 29]. So konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die Expression der Photorezeptorpigmente [30, 31], die Erneuerung der Photorezeptor-Außensegmente [32] und die Expression von Komponenten der visuellen Signaltransduktion [33, 34] circadian reguliert werden.

Die visuelle Signaltransduktion in den Photorezeptoren wird über G-Proteine vermittelt. Das hierfür verantwortliche G-Protein ist das visuelle  $\alpha$ -Transducin [35]. Es gehört der

G-Protein-Untergruppe Gnat an und wird von den Genen *Gnat1* und/oder *Gnat2* kodiert. Das Gen *Gnaz*, das der G-Protein-Untergruppe Gnaz angehört, hat eine hohe Sequenzähnlichkeit zu der G-Protein-Untergruppe Gnat und wird ebenfalls als  $\alpha$ -Transducin bezeichnet. Es hat jedoch, soweit bekannt, keine Funktion in der visuellen Signaltransduktion und wird deshalb als nicht-visuelles  $\alpha$ -Transducin bezeichnet [35-38]. Interessanterweise wird in der Literatur eine tageszeitliche Rhythmik in der  $\alpha$ -Transducin-Synthese beschrieben [39, 40]. Jedoch ist unklar, ob die beobachtete Rhythmik den visuellen  $\alpha$ -Transducinen *Gnat1* und *Gnat2* oder/und dem nicht-visuellen  $\alpha$ -Transducin *Gnaz* zuzuschreiben ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu eruieren, inwieweit die Expression von G-Proteinen in der Retina und in den Photorezeptoren circadian reguliert wird. Hierbei sollte insbesondere geklärt werden, inwieweit die in der Literatur beschriebene circadiane Regulation von  $\alpha$ -Transducin für die visuelle Signalverarbeitung des Photorezeptors von Relevanz ist.

Hierfür wurden die tageszeitlichen Profile der für die unterschiedlichen G-Protein-Untereinheiten kodierenden Gene (*Gnaz*, *Gnat1*, *Gnat2*, *Gna11*, *Gna12*, *Gna13*, *Gai1*, *Gai2*, *Gai3*, *Gnal*, *Gnao*, *Gnaq*, *Gnb1*, *Gnb2*, *Gnb3*, *Gnb4*, *Gnb5*, *Gngt1* und *Gngt2*) mithilfe von qPCR in Wildtyp- und *Clock*-defizienten Mäusen ermittelt.

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1. Das circadiane System der Säugetiere**

#### **2.1.1. Der anatomische Aufbau des circadianen Systems**

Die tageszeitliche Rhythmogenese der Säugetiere basiert auf dem sog. circadianen System. An der Spitze dieses hierarchisch organisierten Systems befindet sich die sog. „Meisteruhr“ im NSC. Der NSC ist ein paarig angelegtes Kerngebiet aus ca. 20.000 Neuronen, das an der Basis des Hypothalamus, unmittelbar oberhalb des Chiasma opticums lokalisiert ist [41]. Die einzelnen Neurone des NSC besitzen jeweils zelleigene Uhren mit einem eigenen circadianen Rhythmus [42]. Um einen einheitlichen Rhythmus zu generieren erfolgt die Koordination dieser Uhren über interzelluläre Kontakte wie z.B. GABAerge Synapsen [42, 43] und *gap junctions* [44, 45].

Der NSC dient als zentraler Schrittmacher, der die Rhythmik von peripher vorkommenden Uhren synchronisiert und so die zeitliche Koordination der verschiedenen Vorgänge im Gesamtorganismus gewährleistet [8, 23, 41]. Der NSC selbst wird durch den Zeitgeber Licht an die äußeren Lichtbedingungen adaptiert [46, 47]. Hierbei wird die Lichtinformation von Melanopsin-haltigen und damit photosensitiven Ganglienzellen (ipRCG= intrinsically photosensitive retinal ganglion cells) über den Truncus retinohypothalamicus an den NSC weitergeleitet [48-51].

### 2.1.2. Das circadiane System auf molekularer Ebene

Auf molekularer Ebene bestehen circadiane Uhren aus transkriptionellen-translationellen autoregulatorischen Rückkopplungsschleifen, die jeweils positive und negative Anteile haben (Abb. 1) [52]. Essentiell sind dabei die Uhren-Gene *Period1* (*Per1*), *Period2* (*Per2*), *Cryptochrom1* (*Cry1*), *Cryptochrom2* (*Cry2*), *circadian locomotor output cycle kaput* (*Clock*), *brain and muscle arnt-like protein-1* (*Bmal1*), *reverse erythroblastic leukemia viral oncogene homolog alpha* (*Rev-Erba*) und *retinoic acid-related orphan receptor alpha* (*Rora*) [23, 41, 53, 54].

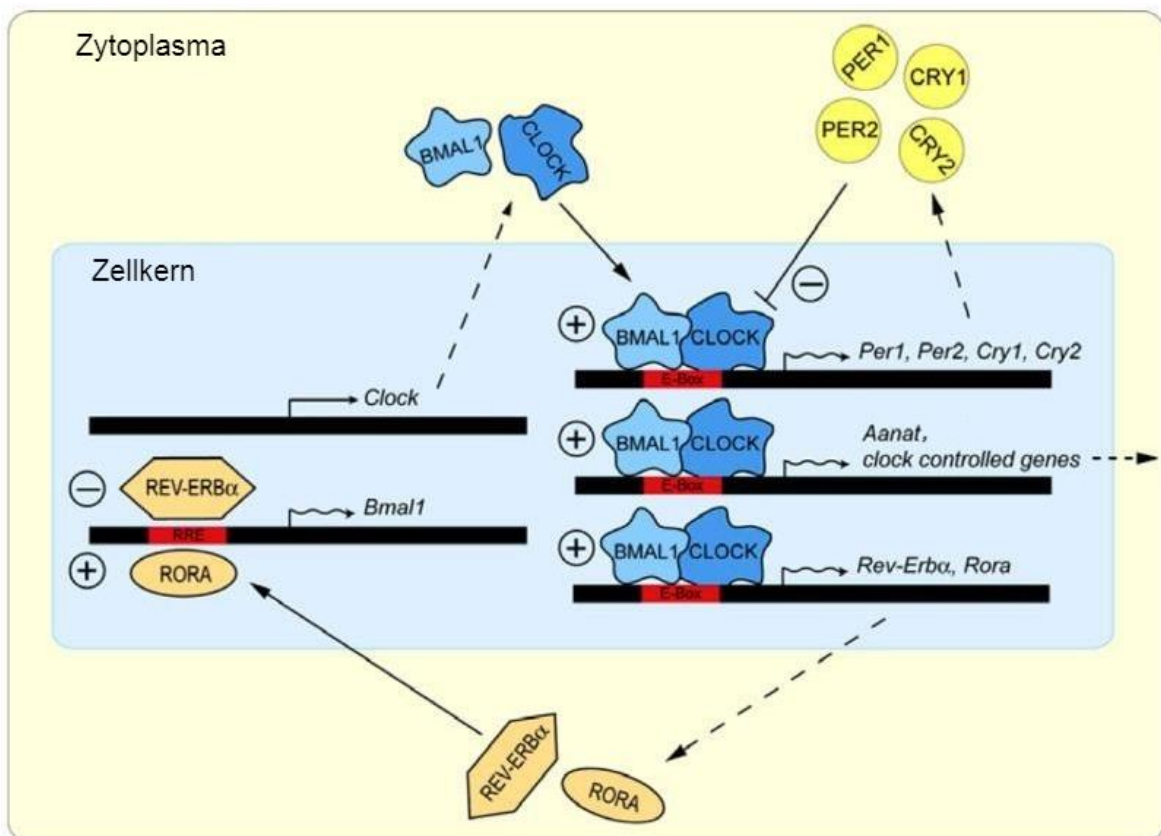
In der ersten Rückkopplungsschleife aktivieren *Clock* und *Bmal1* die Transkription von *Per1*, *Per2*, *Cry1* und *Cry2*. *Clock* und *Bmal1* kodieren für zwei Transkriptionsfaktoren, die jeweils durch eine basic helix-loop-helix(bHLH)-Domäne und eine Period-Arnt-single-minded(PAS)-Domäne charakterisiert sind. Die bHLH-Domäne ermöglicht eine Bindung an die DNA und die PAS-Domäne ist an der Heterodimerisierung von *Clock* und *Bmal1* beteiligt [55-57]. Das *Clock/Bmal1*-Heterodimer bindet an die E-Box-Sequenzen in den Promotorregionen der Gene *Per1*, *Per2*, *Cry1* und *Cry2* und initiiert so ihre Transkription (positiver Feedback) [55, 57]. Die entstandenen Per- und Cry-Proteine akkumulieren im Zytoplasma und bilden ebenso heterodimere Transkriptionskomplexe. Sobald eine bestimmte Schwellenkonzentration erreicht ist, translozieren diese zurück in den Zellkern und hemmen die eigene Transkription durch Inhibition des *Clock-Bmal1*-Komplexes (negativer Feedback). Infolge der allmählichen Proteolyse Per- und Cry nimmt deren Konzentration ab und es kommt zur Aufhebung der *Clock-Bmal1*-Inhibition und damit zum Start eines neuen Zyklus [23, 41, 53, 58-60].

In einer zweiten Rückkopplungsschleife aktiviert der *Clock-Bmal1*-Komplex die Transkription von *Rev-Erba* und *Rora*. Die resultierenden Proteine konkurrieren um die *Rev-Erb/Ror-response-element*-Bindungsstelle (RRE-Bindungsstelle) in der *Bmal1*-Promotorregion und hemmen (*Rev-Erba*) bzw. aktivieren (*Rora*) dessen Transkription [23, 41, 53, 54].

Außerdem reguliert der *Clock-Bmal1*-Komplex die Transkription von sog. Uhrenkontrollierten Genen (*clock controlled genes*, CCG), die gewebespezifisch exprimiert werden und die Uhren-abhängige Regulation weiterer Gene vermitteln [61, 62], wie z.B. die Expression der *Arylalkylamine N-acetyltransferase* (*Aanat*). So bildet die

Clock/Bmal-abhängige Regulation des *Anat*-Gens die Grundlage der circadianen Rhythmik der Melatoninsynthese (s. Abschnitt 2.2.2) [63-66].

Posttranslationelle Modifikationen wie Phosphorylierung und proteosomale Proteolyse spielen in den autoregulatorischen Rückkopplungsschleifen ebenfalls eine essentielle Rolle [59]. So fördert die Phosphorylierung von Per1 durch die Caseinkinase1 $\epsilon$  (CK1 $\epsilon$ ) dessen Translokation in den Zellkern [67]. Des Weiteren phosphoryliert die CK1 $\epsilon$  mehrere Uhren-Gene, darunter *Clock* und *Bmal1* [67, 68], was deren Transkriptionsaktivierende Rolle zu modulieren scheint [69].



**Abb. 1: Vereinfachtes Schema des molekularen Mechanismus der circadianen Uhr**  
 Erläuterung siehe Text (Abb. aus Tosini et al., BioEssays, 2008 [6])

## 2.2 Das circadiane System der Retina

### 2.2.1 Die circadiane Uhr der Retina

Die Retina von Säugetieren verfügt über ein endogenes, vom NSC unabhängiges, circadianes System, das auch in Kulturen isolierter Retinae die circadiane Rhythmik aufrechterhält [21, 70, 71]. Dieses System besteht aus mehreren zelleigenen Uhren, die in den verschiedenen Zelltypen der Retina (Ganglienzellen [21], Horizontalzellen [21], Amakrinzellen [21, 72] und Photorezeptoren [22, 73, 74]) lokalisiert sind.

Bis jetzt konnte die Expression aller Uhren-Gene in der Retina nachgewiesen werden [70, 73-76], jedoch unterscheiden sich die Expressionslevel je nach Zelltyp. Beispielsweise zeigten in der Ratte die Gene *Per1*, *Bmal1* und *Clock* in Neuronen der inneren Retina höhere Expressionsraten als in den Photorezeptoren [77, 78].

Die Annahme, dass auch Photorezeptoren circadiane Systeme besitzen, basiert auf der Beobachtung, dass die Uhren-Gene *Clock*, *Bmal1*, *Per1* und *Per2* in den Photorezeptoren von Ratten rhythmisch exprimiert werden [21, 57, 73, 74, 79, 80]. Ebenso konnte in Photorezeptoren von Mäusen eine rhythmische Expression der sechs Uhren-Gene *Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-Erba* und *Rora* beobachtet werden, wobei andere Studien keine Rhythmik für *Per1* nachweisen konnten [5, 6, 21, 71, 81, 82]. Des Weiteren wird die Annahme einer circadianen Uhr in Photorezeptoren durch den Befund unterstützt, dass in kultivierten Photorezeptoren die rhythmische Melatoninsynthese für 5 Tage im Dauerdunkel persistierte [22].

Das circadiane System der Retina wird durch den Zeitgeber Licht synchronisiert [14, 82]. Hierbei spielen, wie schon in 2.1.1. erwähnt, die Melanopsin-produzierenden Ganglienzellen eine Schlüsselrolle. So konnte gezeigt werden, dass eine Defizienz des für das Photopigment Melanopsin kodierenden Gens *Opn4* bei Mäusen zum Verlust der lichtinduzierten Expression von *Per1* und *Per2* und der tageszeitlichen Rhythmik der Uhren-Gene *Per2*, *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*, *Rev-Erba* und *Rora* führt [82]. Allerdings lässt eine neuere Studie vermuten, dass ein anderer Ganglienzell-Subtyp für die lichtabhängige Synchronisation der Retina eine wichtige Rolle spielt [83]. Dieser Subtyp exprimiert das für das Photopigment Neuropsin kodierende Gen *Opn5* [83-85]. So führt eine *Opn5*-Defizienz bei Mäusen zum Verlust der lichtabhängigen Synchronisation der Retina [83].

### 2.2.2 Die Rolle von *Clock* im circadianen System der Retina

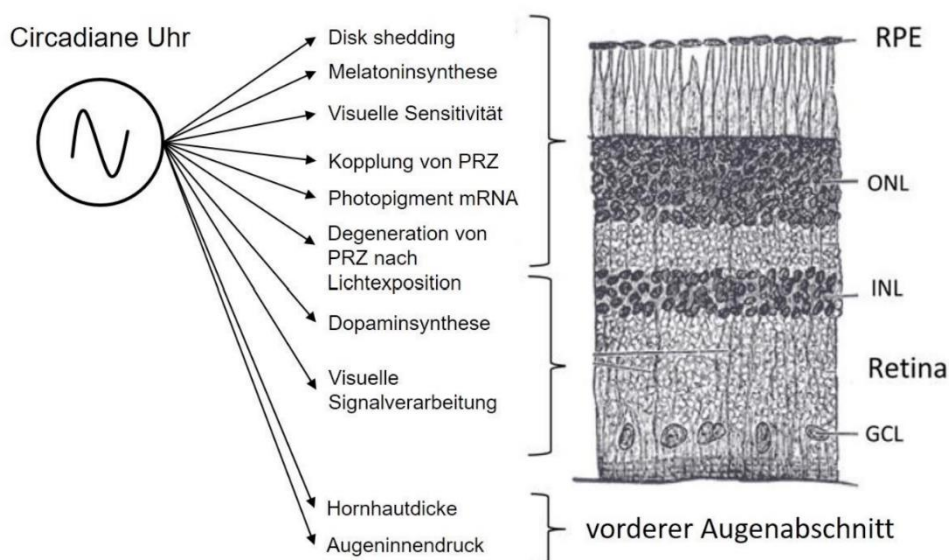
Das *Clock*-Gen wurde 1994 vom Neurowissenschaftler Joseph Takahashi entdeckt [86]. Es besitzt 24 Exons (eins für jede Stunde) und kodiert für einen Transkriptionsfaktor mit über 100.000 bp [87]. Das Genprodukt ist Bestandteil der autoregulatorischen Rückkopplungsschleifen der circadianen Uhr und ist über E-Box-Enhancer-Sequenzen an der Regulation der Expression von sog. *clock controlled genes* (CCG) beteiligt [23, 57, 63-66, 87-89].

In der Retina zeigt *Clock* ein rhythmisches Expressionsmuster mit einem Expressionsmaximum während der Lichtphase [73, 74, 77]. Es wird vor allem in Zellen der inneren Retina, Ganglienzellen und Photorezeptoren exprimiert [90] und spielt eine essentielle Rolle in der Generierung circadianer Rhythmen in der Retina [91, 92]. So konnte gezeigt werden, dass eine *Clock*-Defizienz zu einer signifikanten Amplitudenreduktion der retinalen Uhren-Genexpression führte [93].

Zu den E-Box-regulierten CCGs zählt das *Aanat*-Gen [63, 94-96]. *Aanat* wird ausschließlich in der Glandula pinealis und der Retina, und hier insbesondere in den Photorezeptoren, exprimiert [94, 97] und zeigt ein rhythmisches Expressionsprofil mit einem Maximum während der Dunkelperiode [94, 98]. Die rhythmische Expression des *Aanat*-Gens persistiert auch unter Dauerdunkel, was die circadiane Regulation des Gens bestätigt [94, 98]. Da das *Aanat*-Gen für das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Melatoninsynthese kodiert, determiniert die *Clock*-abhängige Regulation des Gens das Ausmaß der Melatoninsynthese. Dementsprechend zeigt auch die Melatoninsynthese in der Retina eine circadiane Rhythmik mit Maximalwerten in der Dunkelperiode [27, 94, 98, 99].

### 2.2.3 Die Funktion der retinalen Uhren

Das circadiane System der Retina reguliert viele physiologische Prozesse (Abb. 2) [23]. Dies ermöglicht der Retina eine Adaptation an die wechselnden Umweltbedingungen und die Aufrechterhaltung ihrer Vitalität über die gesamte Lebensspanne eines Organismus [17, 18, 23]. Beispielsweise ist der retinale Energiebedarf u.a. durch die nächtlich gesteigerte Transmittersynthese und -ausschüttung der Photorezeptoren nachts höher als tagsüber [25, 100-104]. Die circadiane Uhr ermöglicht es, den retinalen Stoffwechsel an den gesteigerten nächtlichen Energiebedarf anzupassen [25, 26]. So reguliert sie unter anderem die Expression der Gene *Cpt-1a* und *Acadm*, deren Proteinprodukte als Enzyme in der  $\beta$ -Oxidation fungieren [25, 105, 106] sowie die des Stoffwechselregulators *Pgc-1 $\alpha$*  [26, 107, 108]



**Abb. 2: Einfluss des circadianen Systems auf verschiedene physiologische Parameter der Retina**

Die Abbildung zeigt eine Auswahl von Uhren-regulierten Parametern in der Retina und deren Zuordnung zur entsprechenden Schicht. RPE= Retinales Pigmentepithel (retinal pigment epithelium); ONL= äußere Körnerschicht (outer nuclear layer); INL= innere Körnerschicht (inner nuclear layer); GCL= Ganglienzellschicht (ganglion cell layer)

(Abbildung modifiziert nach McMahon et al., 2014 [23])

Des Weiteren ist die retinale Uhr für die visuelle Signalverarbeitung der Retina von besonderer Bedeutung. Dies beinhaltet insbesondere die Hell-Dunkel-Adaptation der visuellen Signalverarbeitung, die die Optimierung der visuellen Wahrnehmung unter tageszeitlich wechselnden äußeren Lichtbedingungen ermöglicht [5, 6, 23, 29, 109]. Hierzu gehört beispielsweise die circadiane Regulation der Stäbchen-Zapfen-Kopplung [5, 29, 109, 110]. Zapfen können ihre Sensitivität innerhalb weniger Minuten verändern und den Lichtbedingungen anpassen und bleiben auch bei sehr hellem Licht photosensitiv [111]. Daher sind sie für das „photopisches Sehen“ (Tagsehen) verantwortlich [111]. Stäbchen erreichen bereits bei geringen Lichtintensitäten eine Sättigung und sind bei Tageslicht zumeist nicht funktional [29]. Daher sind sie für das „skotopisches Sehen“ (Nachtsehen) verantwortlich. Die Retina ist durch die circadian gesteuerte Stäbchen-Zapfen-Kopplung in der Lage Zapfen während des Tages und Stäbchen während der Nacht zu nutzen [5, 29, 109, 110].

Auch die Erneuerung der phototransduktiven Kompartimente in den Außensegmenten der Stäbchen und Zapfen, das sog. „disc shedding“, wird durch die retinale Uhr reguliert [32]. Hierbei erfolgt das „disc shedding“ in den Stäbchen primär zu Beginn der Lichtphase [112, 113] und in den Zapfen in erster Linie zu Beginn der Dunkelphase [23, 113].

Des Weiteren beeinflusst die retinale Uhr die visuelle Signalverarbeitung über die Uhren-abhängige Regulation visueller Gene [34]. So konnte gezeigt werden, dass die visuellen Gene Arrestin1 (*Arr1*) in Stäbchen [114] und Arrestin4 (*Arr4*) in Zapfen [115] eine circadiane Expression in der Mausretina aufweisen [34]. Das Genprodukt Arrestin bindet an das aktivierte Photopigment und führt so zur Deaktivierung der Signaltransduktion in den Photorezeptoren [33, 114-117]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression der Schlüsselenzyme des visuellen Zyklus *Lrat*, *Rpe65* und *Rdh5* in der Mausretina einen tageszeitlichen Rhythmus ausweisen [34].

Die Uhren-abhängige Regulation der visuellen Signalverarbeitung beinhaltet die Neuromodulatoren Melatonin und Dopamin [6, 23, 27, 28, 118]. Dopamin wird von den dopaminergen amakrinen Zellen der inneren Retina synthetisiert und zeigt eine circadiane Rhythmik mit maximalen Werten am Tag, sowie eine lichtinduzierte Synthese [6, 23, 27, 28, 119-121]. Es vermittelt über den Dopamin-D4-Rezeptor die Helladaptation der Photorezeptoren und inhibiert die Melatoninsynthese [28, 119, 120].

Die Synthese von Melatonin erfolgt in der Retina von Säugetieren in den Photorezeptoren und zeigt erhöhte nächtliche Werte [6, 122]. Es wirkt über die Melatonin-Rezeptoren Typ 1 und Typ 2 (MT1 und MT2) und ermöglicht die Dunkeladaptation [123-125]. Hierbei scheint Melatonin über MT1 die visuelle Signalverarbeitung und über MT2 die Rhythmik der Uhren-Gene zu regulieren [124, 125].

#### **2.2.4 Einfluss der circadianen Uhren auf die Vitalität der Retina**

Die fundamentale Rolle der retinalen Uhr für die Physiologie und den Metabolismus der Retina lässt vermuten, dass ihre Störung an der Pathogenese verschiedener ophthalmologischer Erkrankungen beteiligt ist [6, 23, 126]. So könnte die Pathogenese der diabetischen Retinopathie mit der Störung des circadianen Systems der Retina assoziiert sein [127-130]. Hierbei zeigte sich, dass die Diabetes-induzierte chronische Inflammation zu einer Störung der circadianen Rhythmik der retinalen Uhren führen kann [127-130]. Diese Störung wiederum scheint die Entwicklung der diabetischen Retinopathie zu begünstigen [127-130].

Interessanterweise scheint die Diabetes-induzierte chronische Inflammation ebenfalls zu einer Störung der rhythmischen Expression mehrerer Gene zu führen, die an der circadianen Regulation der Dopaminfreisetzung aus den amakrinen Zellen der inneren Retina beteiligt sind [25, 26, 36, 131]. Hierbei handelt es sich um die Gene *Acadm* [25], *Adcy1* [131], *Cpt1a* [25] und *Nr4a1* [26]. Dies lässt vermuten, dass die Störung der circadianen Rhythmik der retinalen Uhren bei diabetischen Mäusen unter anderem auf eine Funktionsstörung im dopaminergen System der Retina zurückzuführen ist [128].

Dies korrespondiert mit den Ergebnissen früherer Studien, die zeigten, dass eine Erniedrigung des retinalen Dopaminspiegels an der Sehstörung bei Diabetes mellitus beteiligt ist und durch Behandlung mit dem Dopaminvorläufer (L-DOPA) ein Fortschreiten der Sehstörung gemildert werden kann [132].

## 2.3 Signaltransduktion in der Retina über Heterotrimere G-Proteine

### 2.3.1 Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei mit  $\alpha$  (36 - 52 kDa),  $\beta$  (35 - 36 kDa) und  $\gamma$  (8 - 10 kDa) bezeichneten Untereinheiten. Die  $\alpha$ -Untereinheit bindet ein Guaninnukleotid, je nach Aktivitätszustand GDP oder GTP. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten bilden einen Komplex und sind über einen Lipidanker in der Zellmembran verankert. Die Bindung eines Liganden an den G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPgR) führt zur Konformationsänderung des Rezeptors, die zum Austausch des an die  $\alpha$ -Untereinheit gebundene GDP gegen GTP führt. Die nun aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit löst sich von der  $\beta/\gamma$ -Untereinheit und gelangt zum Effektormolekül. Dieses wird nun aktiviert oder inhibiert, was wiederum zur entsprechenden intrazellulären Antwort der Zelle auf den Liganden führt (Tab. 1) [133].

Die verschiedenen heterotrimeren G-Proteine unterscheiden sich durch die Subtypen der einzelnen Untereinheiten. So sind beim Menschen sechzehn Subtypen von  $\alpha$ -Untereinheiten, fünf Subtypen von  $\beta$ -Untereinheiten und dreizehn Subtypen von  $\gamma$ -Untereinheiten bekannt (Tab. 2) [133]. Anhand der Eigenschaften der  $\alpha$ -Untereinheit werden die heterotrimeren G-Proteine in vier Familien eingeteilt:  $G_{\alpha i}$  ( $G_i$ ),  $G_{\alpha s}$  ( $G_s$ ),  $G_{\alpha q}$  ( $G_q$ ) und  $G_{\alpha 12/13}$  ( $G_{12/13}$ ). Mitglieder einer Familie sind strukturell ähnlich und zeigen gemeinsame funktionale Eigenschaften [133]. Die  $G_{\alpha i}$  ( $G_i$ )-Familie ist die umfangreichste und wird wiederum in vier Subfamilien  $G_{\alpha i1}$ ,  $G_{\alpha i2}$ ,  $G_{\alpha i3}$  und  $G_{\alpha i4}$  eingeteilt [133, 134].

**Tab. 1: Überblick über die G-Protein-Untergruppen und deren Funktion**

G-Proteinfamilie	Liganden (Auswahl)	Wirkung auf Effektorenzym (Auswahl)
$G_{\alpha i}$ ( $G_i$ )	Photonen, Opsin, Rhodopsin, Angiotensin, Geschmacksstoffe Histamin, Katecholamine	Hemmung der Adenylatcyclase, Aktivierung der cGMP-Phosphodiesterase
$G_{\alpha s}$ ( $G_s$ )	Angiotensin, Histamin, Glicagon, LSH, FSH, TSH, Vasopressin	Aktivierung der Adenylatcyclase
$G_{\alpha q}$ ( $G_q$ )	Bradykinin, Bombesin, Angiotensin, Katecholamine	Aktivierung der Phospholipase C
$G_{\alpha 12/13}$ ( $G_{12/13}$ )	Bradykinin, Bombesin, TSH	Aktivierung der Rho-Kinase

Der  $\beta/\gamma$ -Komplex wurde ursprünglich als passiver Partner der  $\alpha$ -Untereinheit angesehen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die von der  $\alpha$ -Untereinheit dissoziierten  $\beta/\gamma$ -Komplexe ebenfalls regulatorisch wirken [135]. So sind sie in der Regulation der Aktivität von Ionenkanälen [136], der Adenylatcyclase [137], der Phospholipase C [138], sowie der Phosphoinositid-3-Kinase beteiligt [139].

**Tab. 2: Heterotrimere G-Proteine mit ihren verschiedenen Subtypen von Untereinheiten**

(Modifiziert nach Wettschureck et al. 2005 [133])

Name	Gen	Expression
<b><math>\alpha</math>-Untereinheiten</b>		
Gnai ( $G_i$ )		
G $\alpha_{i1}$	GNAI1	weit verbreitet
G $\alpha_{i2}$	GNAI2	Ubiquitär
G $\alpha_{i3}$	GNAI3	weit verbreitet
G $\alpha_o$	GNAO	neuronaes, neuroendokrines Gewebe
G $\alpha_z$	GNAZ	neuronaes Gewebe, Thrombozyten
G $\alpha_{gust}$	GNAT3	Geschmackszellen, Bürstenzellen
G $\alpha_{t-r}$	GNAT1	Stäbchen, Geschmackszellen
G $\alpha_{t-c}$	GNAT2	Zapfen
Gnas ( $G_s$ )		
G $\alpha_s$	GNAS	Ubiquitär
G $\alpha_{olf}$	GNAL	olfaktorisches Epithel
Gnaq ( $G_q$ )		
G $\alpha_q$	GNAQ	Ubiquitär
G $\alpha_{11}$	GNA11	Ubiquitär
G $\alpha_{14}$	GNA14	Niere, Lunge, Milz
G $\alpha_{15/16}$	GNA16(GNA15)	hämatopoetische Stammzellen
Gna12/13 ( $G_{12/13}$ )		
G $\alpha_{12}$	GNA12	Ubiquitär
G $\alpha_{13}$	GNA13	Ubiquitär
<b><math>\beta</math>-Untereinheiten</b>		
$\beta_1$	GNB1	weit verbreitet, Stäbchen
$\beta_2$	GNB2	weit verbreitet
$\beta_3$	GNB3	weit verbreitet, Zapfen
$\beta_4$	GNB4	weit verbreitet
$\beta_5$	GNB5	hauptsächlich im Gehirn
<b><math>\gamma</math>-Untereinheiten</b>		
$\gamma_1, \gamma_{rod}$	GNGT1	Stäbchen, Gehirn
$\gamma_{14}, \gamma_{cone}$	GNGT2	Zapfen, Gehirn
$\gamma_2$	GNG2	weit verbreitet
$\gamma_3$	GNG3	Gehirn, Blut
$\gamma_4$	GNG4	Gehirn
$\gamma_5$	GNG5	weit verbreitet
$\gamma_7$	GNG7	weit verbreitet
$\gamma_{8,9}$	GNG8	olfaktorisches Epithel
$\gamma_{10}$	GNG10	weit verbreitet
$\gamma_{11}$	GNG11	weit verbreitet
$\gamma_{12}$	GNG212	weit verbreitet
$\gamma_{13}$	GNG13	Gehirn, Geschmacksknospen

### 2.3.2 Das retinale G-Protein $\alpha$ -Transducin und die visuelle Signaltransduktion

Das in den Photorezeptoren vorkommende, für die visuelle Signaltransduktion verantwortliche, heterotrimere G-Protein wird als  $\alpha$ -Transducin bezeichnet [35]. Es gehört der G-Protein-Untergruppe Gnat an, die aus den Genen *Gnat1* und *Gnat2* besteht. Aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit wird die G-Protein-Untergruppe Gnaz, die ausschließlich aus dem Gen *Gnaz* besteht ebenfalls als  $\alpha$ -Transducin bezeichnet. Sie hat jedoch, soweit bekannt, keine Funktion in der visuellen Signaltransduktion und wird deshalb als nicht-visuelles  $\alpha$ -Transducin bezeichnet [35-38]. In der visuellen Signaltransduktion bindet die aktivierte Form des Photopigments an  $\alpha$ -Transducin und induziert den Austausch von GDP gegen GTP. Die nun aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit löst sich von der  $\beta/\gamma$ -Untereinheit und aktiviert die cGMP-abhängige Phosphodiesterase (PDE), die nun cGMP zu GMP hydrolysiert. Der sinkende cGMP-Spiegel bewirkt, dass die cGMP-gesteuerten Natrium-Ionenkanäle in der Zellmembran des Photorezeptors geschlossen werden. Dies führt zur Hyperpolarisation, dem „Lichtsignal“ der Zelle [140, 141]. Die intrinsische GTPase der  $\alpha$ -Untereinheit spaltet das GTP in GDP und Phosphat. Dadurch löst sich die  $\alpha$ -Untereinheit von der PDE und lagert sich nun wieder mit der  $\beta/\gamma$ -Untereinheit zusammen und bildet den ursprünglichen Transducin-Komplex [140, 141].

Bereits im Jahre 1987 konnten Brann und Cohen einen tageszeitlichen Rhythmus in der  $\alpha$ -Transducin-Synthese in Ratten beobachten [39]. Kurz darauf bestätigten Bowes, van Veen und Farber diese Beobachtung bei Mäusen [40]. Jedoch ist unklar, ob die beobachtete Rhythmik den visuellen  $\alpha$ -Transducinen *Gnat1* und *Gnat2* oder dem nicht-visuellen  $\alpha$ -Transducin *Gnaz* zuzuschreiben ist.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Versuchstiere

Für die Durchführung der Versuche kamen ausgewachsene (10 - 12 Wochen alte) *Clock*-profiziente (*Clock*<sup>+/+</sup>) und *Clock*-defiziente (*Clock*<sup>-/-</sup>) Mäuse (männlich und weiblich) mit intakten Photorezeptoren ohne *rd*-Mutation zum Einsatz. Die verwendeten Mäuse des Modells (C3H/He*Clock*<sup>+/+</sup> und C3H/He*Clock*<sup>-/-</sup>) beruhen auf einem Melatonin-profizienten Hintergrund (C3H.C-Pde6b2H) und wurden durch Kreuzung über zehn Generationen mit Mäusen des Stammes B6.129S4-*Clock*<sup>tm1.1Rep/J</sup>-bezogen von Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) - generiert. Die Melatonin-profizienten Mäuse wurden uns freundlicherweise von Dr. Russel G. Foster vom Nuffield Laboratory of Ophthalmology and the Sleep and Circadian Neuroscience Institute, University of Oxford zur Verfügung gestellt. Die Genotypisierung der Versuchstiere erfolgte mittels PCR-Analyse genomischer DNA aus Biopsien von Schwanzspitzen anhand des entsprechenden Protokolls von Jackson Laboratory.

Die Versuchstiere wurden im Tierstall des Instituts für Funktionelle und Klinische Anatomie der Universitätsmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz unter standardisierten Laborbedingungen (Beleuchtung mit 200 Lux am Tag und gedimmtes Rotlicht (< 5 Lux) in der Nacht, Temperatur 20 °C ± 1 °C, Luftfeuchtigkeit ca. 50 %, Wasser und Futter ad libitum) gehalten und über einen Zeitraum von drei Wochen einem Lichtregime mit 12 h Licht und 12 h Dunkelheit (LD 12:12) ausgesetzt. Die Zeitgeber „Licht an“ und „Licht aus“ sind definiert als Zeitgeber Zeit (ZT) 0 bzw. ZT12. Die Entnahme der Retinae (s. 3.2.1) erfolgte nach letaler Anästhesie der Tiere mit CO<sub>2</sub> und anschließender Dekapitation in 3-h-Intervallen über einen Zyklus von 24 h zu den ZTs 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 und 21. Um eine mutmaßliche circadiane Adaptation zu evaluieren, wurden Mäuse, die zuvor an LD 12:12 adaptiert waren, für einen Zyklus von 24 h unter konstanter Dunkelheit (DD) gehalten und die Retinae während des nächsten Zyklus unter DD entnommen.

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

### 3.1.2 Laborgeräte

Brutschrank	Heraeus, Deutschland
CFX96 Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, Deutschland
Gefriertruhe (-80 °C)	Heraeus, Deutschland
Gefriertruhe (-20 °C)	Liebherr, Deutschland
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr, Deutschland
Färbeküvetten	Resolab, Deutschland
Feinwaage	DCS, Deutschland
Heizblock	HTA-BioTec, Deutschland
LMPC-System (PALM MicroBeam System)	Zeiss, Deutschland
Magnetrührer	IKA-Werk, Deutschland
Mikroskop	Leica, Deutschland
Mikrotom	Leica, Deutschland
Spektralphotometer NanoDrop™ 2000	Peqlab, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research, Deutschland
Streckbad	Medax Nagel, Deutschland
Schüttler	Peqlab, Deutschland
Thermocycler (RT)	Peqlab, Deutschland
UV-Lampe	VWR, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Zentrifugen	Heraeus, Deutschland

### 3.1.3 Chemikalien und Enzyme

Aceton	Merck, Deutschland
Aqua destillata	Roth, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth, Deutschland
DEPC-behandeltes Wasser (DNase-frei, RNase-frei)	Roth, Deutschland
Ethanol	Merck, Deutschland
HOPE® I und II Lösung	DCS, Deutschland
Isopropanol	Merck, Deutschland
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad, USA
Kresylviolettacetat	Sigma-Aldrich, Deutschland
Proteinase K	Qiagen, Deutschland
QiAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Deutschland
Thermo Scientific Verso™ cDNA Synthesis Kit	Abgene, UK
Tris-Puffer	Roth, Deutschland

### 3.1.4 Verbrauchsmaterialien

Objektträger, MembraneSlides NF	P.A.L.M, Deutschland
Gitterkassetten	Miles Inc., Deutschland
Glasküvetten	Resulab, Deutschland
Auffanggefäße PALM AdhesiveCaps	P.A.L.M, Deutschland
PCR-Platten 96-Well	Bio-Rad, USA
PCR-Folie	Bio-Rad, USA
Paraffin	Polyscience Europe, Deutschland
Pipettenspitzen ohne Filter	Sarstedt, Deutschland
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym Scientific, Deutschland
Reaktionsgefäße (Tubes)	Peqlab, Deutschland
QIAquick Säulen	Qiagen, Deutschland

### 3.1.5 Software

Bio-Rad CFX Manager 3.1	Bio-Rad, Deutschland
EndNote X9.1	Thomson Reuters, USA
IBM SPSS Statistic Version 23	IBM Corporation, USA
Microsoft Office Excel 2016	Microsoft, USA
Microsoft Office Word 2016	Microsoft, USA
PALM Robo Software	P.A.L.M, Deutschland

### 3.1.6 Primer

Die verwendeten Primer wurden mittels Clone Manager Suite 7 (Sci-Ed) Software kreiert und als Lysophilisat von Eurofins MWG Operon, Deutschland bezogen. Zur Resuspendierung wurden die Primer nach Herstellerangaben in Tris-EDTA-Puffer (10 mM Tris und 1 mM EDTA) gelöst und anschließend im Verhältnis 1:10 mit 10 mM Tris-Puffer verdünnt. Gelagert wurden die so gefertigten Gebrauchslösungen lichtgeschützt bei -20 °C. Nachfolgend sind alle verwendeten Primer mit ihren Sequenzen und der GenBank Accession Number des entsprechenden Gens aufgelistet (Tab. 3).

**Tab. 3: Übersicht über die verwendeten Primer**

Gen	GenBank Accession Number	Primer-Sequenz 5' nach 3'	Länge PCR-Produkt (bp)
<i>18s</i>	NR_003278.3	Vorwärts: CAACACGGGAAACCTCAC Rückwärts: TCGCTCCACCAACTAAGAAC	110
<i>Gapdh</i>	BC082592.1	Vorwärts: CATCCCAGAGCTGAAC Rückwärts: TCAGATGCCTGCTTCAC	144
<i>Gna11</i>	NM_010301.3	Vorwärts: GCATGACAGAGCCCTAGAG Rückwärts: ACAGGAGAGGAGCCTAGTG	106
<i>Gna12</i>	NM_010302.2	Vorwärts: TGCAGGAGAACCTGAAAG Rückwärts: TGGTGTGGATTCGAGATG	149
<i>Gna13</i>	NM_010303.3	Vorwärts: CCGTTGTACCACCACTTC Rückwärts: GAGCTGCTTCAGGTTGTC	102
<i>Gai1</i>	NM_010305.1	Vorwärts: CCGCGTATATTCAGTGTC Rückwärts: CTGCACGTTCTTCGTATC	101
<i>Gai2</i>	NM_008138.4	Vorwärts: TGTTAGGTGCTGGAGAGTC Rückwärts: CTGGATGGTGTGCTGTAG	125
<i>Gai3</i>	NM_010306.3	Vorwärts: AGCAGGTCCAGGGAATATC Rückwärts: CTCCACAATGCCTGTAGTC	138
<i>Gnal</i>	NM_010307.3	Vorwärts: TGCTTCACAGTGGGAAATCG Rückwärts: GATGATACCGCTGGTAAAGTGG	114

<i>Gnao</i>	NM_010308.3	Vorwärts: GACGTGGTGAGTCGTATG Rückwärts: TACTCCCGAGATCGGTTG	116
<i>Gnaq</i>	NM_008139.5	Vorwärts: GCCACAGCAGGATTGTAAAG Rückwärts: TTAAAGGGCAAGGGTGAAG	120
<i>Gnat1</i>	NM_008140.2	Vorwärts: TTCGCCACAACGTCTATC Rückwärts: GTGTTAGGTCCATCGTAGTC	110
<i>Gnat2</i>	NM_008141.3	Vorwärts: GCAGAGTTCCAGCTCAATG Rückwärts: CTCGATGATGCCTGTTGTC	129
<i>Gnaz</i>	NM_010311.3	Vorwärts: GGTCTACATCCAACGTCAGTTC Rückwärts: TCTGTCACTGCGTCAAACAC	123
<i>Gnb1</i>	NM_008142.4	Vorwärts: CTGTGGTGGCCTGGATAAC Rückwärts: CCGGCAACAGGACAGATAAC	112
<i>Gnb2</i>	NM_010312.4	Vorwärts: GATTCCATGTGCCGACAG Rückwärts: GGTCAAAGAGGCGACAAG	121
<i>Gnb3</i>	NM_013530.1	Vorwärts: CTGGCTGAGCTTGTGTCTG Rückwärts: CATCCTGCGAGGCACTTAC	142
<i>Gnb4</i>	NM_013531.4	Vorwärts: TACTTCTGTGGCCTTCTC Rückwärts: CACACCTAAGCAGCTAAC	142
<i>Gnb5</i>	NM_010313.2	Vorwärts GCTATGCACACCAACTACC Rückwärts: GCTGTCCACTTTCCACATC	112
<i>Gngt1</i>	NM_010314.2	Vorwärts: AGTCCTAGCTGTCTGGAAATC Rückwärts: TGGCGCACGCCTTTAATAC	103
<i>Gngt2</i>	NM_023121.2	Vorwärts: AAGGAGCTGTTGAGGATG Rückwärts: TCTTCTGGGATGCCTTTG	146
<i>Nrl</i>	NM_008736.3	Vorwärts: GTGGAGGAACGGTCCAGATG Rückwärts: GAACTGGAGGGCTGGGTTAC	149
<i>Th</i>	NM_009377.1	Vorwärts: CAGCCCTACCAAGATCAAAC Rückwärts: GTACGGGTCAAACCTTCACAG	129

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Entnahme der Retinae**

Zur Entnahme der Retina wurde der Bulbus oculi mit einer Pinzette fixiert, stichinzisiert, das Corpus vitreum vorsichtig entfernt und im Anschluss die Retina entnommen. Die entnommenen Retinae wurden dann entweder für die Isolation von Photorezeptorzellen mittels HOPE-Technik fixiert (s. 3.2.2), oder in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Isolation der RNA aus gesamten Retinae bei -80 °C gelagert. Die Entnahme der Retinae während der Dunkelphase bzw. unter DD erfolgte unter gedimmtem Rotlicht (< 5 Lux).

### **3.2.2 Gewebefixierung mit der HOPE-Technik**

Zur Fixierung der entnommenen Retinae mittels HOPE-Technik (Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect) wurden diese zunächst in 1,5 ml HOPE® I-Lösung für 48 h bei 0 – 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Dehydrierung der Retinae in zwei Schritten. Im ersten Schritt wurde die HOPE® I-Lösung durch eine Mischung aus 100 µl HOPE® II-Lösung und 100 ml reinem Aceton ersetzt und die Proben bei 0 – 2 °C für 2 h inkubiert. Im zweiten Schritt wurde insgesamt dreimal eiskaltes Aceton (1,5 ml) auf die Proben pipettiert und diese erneut für jeweils 2 h bei 0 – 2 °C inkubiert. Nach Abschluss der Dehydrierung wurden die Proben in flüssigem Paraffin mit niedrigem Schmelzpunkt (52 – 54 °C) eingebettet und nach Aushärtung mit einem Mikrotom 10 µm dicke Dünnschnitte angefertigt. Die Dünnschnitte wurden anschließend in einem Streckbad bei ca. 36 °C gestreckt, auf DNase/RNase-freie Objektträger (PALM MembranSlides NF-Objektträger; P.A.L.M, Deutschland) platziert, über Nacht bei 37 °C getrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert.

### 3.2.3 Isolation der Photorezeptoren mittels LMPC-Technik

Zur kontakt- und kontaminationsfreien Isolation der Photorezeptorzellen aus den Retinae wurde die laser microdissection and pressure catapulting (LMPC)-Technik angewandt. Hierfür wurden die vorbereiteten Dünnschnitte durch eine zweimalige Inkubation in 100 %igem Isopropanol für je 10 min bei 60 °C entparaffiniert, anschließend mit Kresylviolettacetat (1 % W/V in Ethanol) gefärbt und mit 70 % bzw. 100 %igem Ethanol gewaschen.

Für die darauffolgende Isolation der Photorezeptorzellen aus den Dünnschnitten wurde das PALM MicroBeam System mit der PALM RoboSoftware (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Deutschland) eingesetzt. Die Photorezeptor-Zellschicht wurde unter dem 10x Objektiv markiert und mittels gepulstem UV-A Stickstofflaser ausgeschnitten und in die Kappe eines 0,5 ml microfuge tubes (PALM AdhesiveCaps; P.A.L.M.) katapultiert. Um pro Genotyp und ZT eine ausreichende Probenmenge von ca 3 – 4 Mio.  $\mu\text{m}^2$  zu erreichen, wurde der Vorgang mehrmals wiederholt und die gewonnenen Photorezeptorzellen aus mehreren Schnitten derselben Probe vereint. Zu den isolierten Photorezeptorzellen wurde anschließend 150  $\mu\text{l}$  Lysispuffer ( $\beta$ -Mercaptoethanol und RLT-Puffer im Verhältnis 1:100) gegeben und die Proben bei -80 °C gelagert.

Um den Reinheitsgrad der extrahierten Photorezeptorzellen zu überprüfen, wurde die mRNA-Menge des photorezeptorspezifischen Gens *neural retina leucine zipper (Nrl)* derjenigen von *Tyrosin hydroxylase (Th)*, eines Genmarkers für amakrine Zellen der inneren Retina, gegenübergestellt. In den isolierten Photorezeptorzellen war das Verhältnis von *Nrl* zu *Th*, verglichen mit Präparationen der gesamten Retina, um das 84-Fache erhöht.

### 3.2.4 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA erfolgte, sowohl für Proben der gesamten Retina als auch für isolierte Photorezeptorzellen, mithilfe des RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach den Herstellerangaben.

Für die RNA-Extraktion aus der gesamten Retina erfolgte zunächst die Homogenisierung der Proben in 350 µl Lysispuffer (1 ml RLT-Puffer und 10 µl β-Mercaptoethanol) mittels Ultraschall und anschließender Zentrifugation für 3 Minuten bei 17.000 g. Der Überstand wurde mit 350 µl 70 %igem Ethanol versetzt und auf die Membran der Extraktionssäulchen (RNeasy MinElute Spin column) transferiert. Nach erneuter Zentrifugation für 15 sek bei 8.000 g, wurde der Durchfluss verworfen, die Proben mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen und erneut für 15 sek bei 8.000 g zentrifugiert. Als nächstes wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurden pro Probe 80 µl DNase-1-Inkubationsmix, bestehend aus 10 µl DNase-I-Lösung und 70 µl RDD-Puffer (Qiagen) angesetzt, auf die Proben pipettiert und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgten mehrere Waschschrirte: Zunächst mit 350 µl RW1-Puffer und Zentrifugation der Säulen für 15 sek bei 8.000 g, danach zweimal mit je 500 µl RPE-Puffer. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Durchfluss verworfen. Nach Trocknung der Säulen durch Zentrifugation (5 min, 17.000 g) erfolgte die Elution der RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation für 60 sek bei 17.000 g.

Für die RNA-Extraktion aus isolierten Photorezeptorzellen wurden die Proben zunächst mit 295 µl RNase-freiem Wasser und 5 µl Proteinase K (Qiagen) versetzt, bei 55 °C für 10 min inkubiert und daraufhin für 3 min bei 10.000 g zentrifugiert. Zum Überstand wurden 350 µl Ethanol gegeben, die Proben erneut zentrifugiert (8.000 g, 15 sek) und der Durchfluss verworfen. Nach Waschen der Proben mit 350 µl RW1-Puffer fand ein DNase Verdau wie bereits beschrieben statt. Anschließend wurden die Proben mit 350 µl RW1-Puffer, mit 500 µl RPE-Puffer und 500 µl 80 %igem Ethanol gewaschen. Zuletzt erfolgte die Elution der RNA mit 14 µl RNase-freiem Wasser.

Nach Bestimmung der RNA-Konzentration in den Proben mittels NanoDrop Photospektrometer wurde die extrahierte RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.2.5 Reverse Transkription

Die extrahierte RNA wurde mithilfe des Thermo Scientific Verso cDNA Synthesis Kit in komplementäre DNA (cDNA) nach Herstellerprotokoll transkribiert. Es wurde je ein Versuchsansatz mit extrahierter RNA und ein Kontrollansatz ohne RNA (= non-template control; NTC) durchgeführt. Für die Reaktionsansätze wurden folgende Volumina eingesetzt:

**Tab. 4: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die cDNA-Synthese**

Reagenzien	Volumina (µl)
5x cDNA Synthese Puffer	4,0
dnTP Mix (0,5 mM)	1,8
Anchored oligo-dt Primer	0,8
RT Enhancer	0,8
Verso Enzyme Mix	0,8
RNase-freies Wasser	0,8

Die Reaktionsansätze wurden nach Zugabe von 300 ng RNA im Fall von Präparationen der gesamten Retina bzw. 12 µl RNA-Extrakt im Fall von isolierten Photorezeptorzellen mit RNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von jeweils 20 µl aufgefüllt. In einem Thermocycler (PeqLab) wurden die Proben entsprechend des RT-Programmes nach Herstellerangaben zunächst auf 110 °C erhitzt, anschließend bei 42 °C für 30 min inkubiert, dann für 2 min auf 92 °C erhitzt und zum Schluss auf 12 °C abgekühlt.

Die so synthetisierte cDNA wurde anschließend mit sterilem, DNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:4 verdünnt und bei -20 °C gelagert.

### 3.2.6 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation und Quantifizierung der zu untersuchende Gene erfolgte die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) unter Verwendung des iTaq™ Universal SYBR® Green Mix (BioRad, Deutschland). Die hierfür verwendeten Primer sind in Tabelle 1 aufgeführt. Die Quantifizierung erfolgte dabei mittels Fluoreszenz-Messung mit dem CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA) und der CFX Manager™ Software (Bio-Rad, USA).

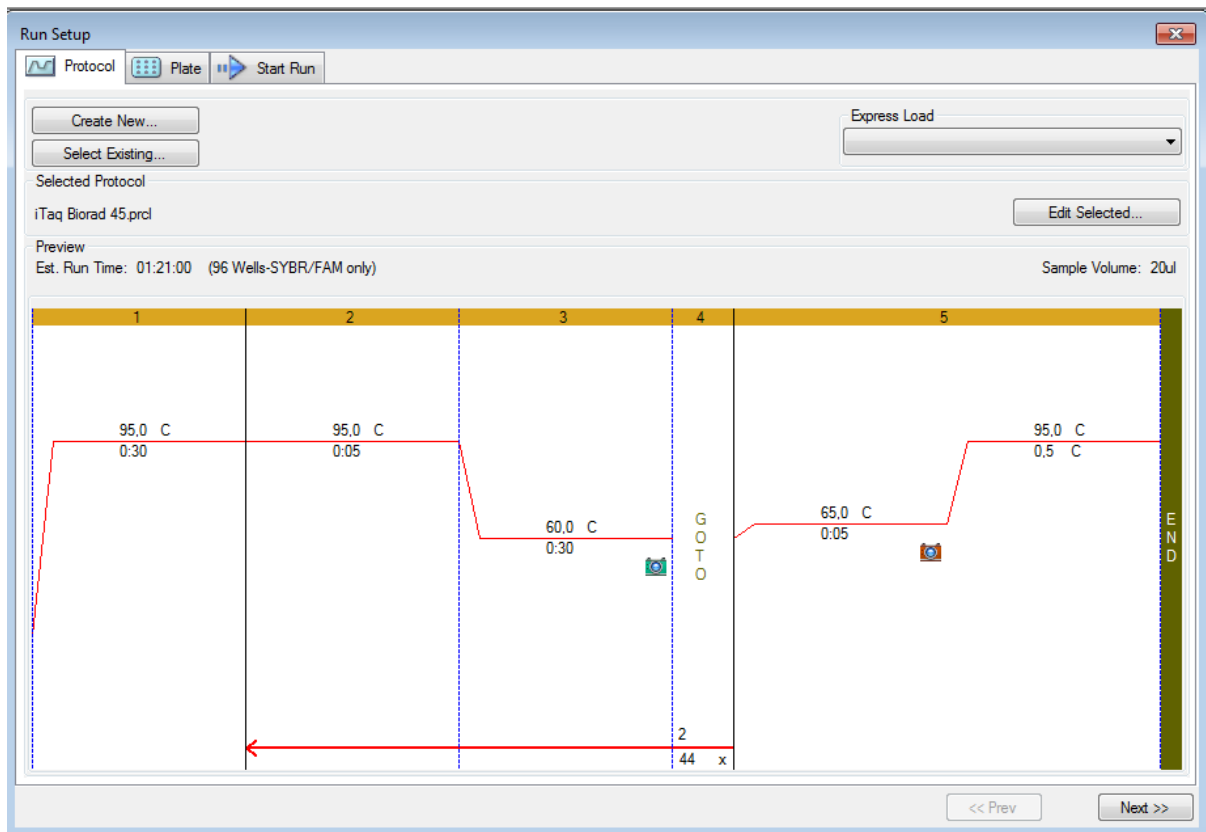
Zur Durchführung der qPCR wurde ein Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 15 µl wie folgt hergestellt:

**Tab. 5: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes**

Reagenzien	Volumina (µl)
RNase-freies Wasser	4,6
SYBR GREEN	10
3'-Primer	0,2
5'-Primer	0,2

Auf Hard-Shell® PCR-Platten wurden jeweils 5 µl der Proben und einer Standardreihe (10-fach serielle Verdünnungsreihe mit bekanntem cDNA-Gehalt von  $10^8$  –  $10^1$  Kopien/µl) pipettiert, und dazu jeweils 15 µl Reaktionsansatz gegeben. Alle Messungen erfolgten in Doppelbestimmung. Die PCR-Platten wurden mit PCR-Klebefolie (Bio-Rad, USA) versiegelt und für 1 min bei 2.000 g zentrifugiert.

Die PCR-Reaktion erfolgte entsprechend folgendem Protokoll (Abb. 3): Denaturierung der Proben zu einzelsträngiger DNA für 30 sek bei 95 °C, gefolgt von 45 Amplifizierungszyklen zur Primerhybridisierung und Elongation für 5 sek bei 95 °C und 30 sek bei 60 °C. Nach der Amplifizierung wurden Schmelzkurven durch Erhitzen der Proben in 0,5 °C Schritten von 65 °C auf 95 °C erstellt, um die Reinheit der amplifizierten Produkte zu überprüfen.



**Abb. 3: PCR-Protokoll**

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Phasenverlaufs der Real-Time PCR-Amplifikation.

Die Transkriptmenge der untersuchten Gene in den Proben wurde mit Hilfe des  $C_T$  Wertes (engl. threshold cycle= Schwellenwertzyklus) bestimmt. Der  $C_T$ -Wert ist der Amplifizierungszyklus, bei dem die emittierte Fluoreszenz erstmals signifikant die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Anhand der  $C_T$ -Werte der Standardreihe kann durch Logarithmieren der  $C_T$ -Werte der Proben, die Transkriptmenge in den Proben kalkuliert werden.

### 3.2.7 Statistische Auswertung

Zur Bestimmung tageszeitlicher Transkriptschwankungen wurden für jedes untersuchte Gen vier unabhängige Versuchsreihen durchgeführt (n = 4).

Die qPCR-Ergebnisse sind als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt und auf die zuvor gemessenen mRNA-Mengen der Haushaltsgene *Gapdh* und *18s* normiert. Um das tageszeitliche Profil der Genexpression darzustellen, wurde der Durchschnitt der Transkriptmenge aller acht ZTs als 100 % festgesetzt und die Expression zu jeder einzelnen ZT relativ dazu berechnet.

Zur statistischen Analyse der tageszeitlichen Expression wurde zum einen eine einfaktorische Varianzanalyse (one-way Anova) durchgeführt, bei der Aussagen über statistisch auffällige Schwankungen der mRNA-Menge im tageszeitlichen Profil eines Gens getroffen werden können.

Zur statistischen Bewertung einer putativen rhythmischen Genexpression im 24-h - Profil wurde darüber hinaus die Cosinor-Analyse angewandt. Hierbei wurden p-Wert  $< 0,05$  als signifikant angesehen. Bei der Cosinor-Analyse werden durch Anpassung der erhobenen Daten an eine Sinuskurve, mathematische Schätzwerte wie der Zeitpunkt der maximalen Genexpression (Acrophase) und die Amplitude der tageszeitlichen Schwingung bestimmt. Das zugrundeliegende Modell kann gemäß der folgenden Gleichung ausgedrückt werden:

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

Hierbei gibt  $f(t)$  den relativen Wert der Genexpression zum Zeitpunkt  $t$  der Probenentnahme an.  $A$  bezeichnet den Mittelwert der Cosinus-Kurve, den sog. Mesor (midline estimating statistic of rhythm),  $B$  die Amplitude als maximale Auslenkung vom Mesor,  $C$  die Acrophase und  $T$  die Periodenlänge, die auf 24 h festgelegt wurde.

Um zu untersuchen ob die Unterschiede der tageszeitlichen Schwankungen zwischen Wildtyp und Knockout Mäusen statistisch auffällig sind, wurde unter Verwendung der absoluten Messwerte für jedes Genprofil eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Hierbei wurde die Analyse als explorativ angesehen. Dementsprechend wurden keine Signifikanzniveaus festgelegt und die p-Werte als rein deskriptiv betrachtet. Als auffällig wurden p-Werte  $< 0,05$  bezeichnet.

## 4 Ergebnisse

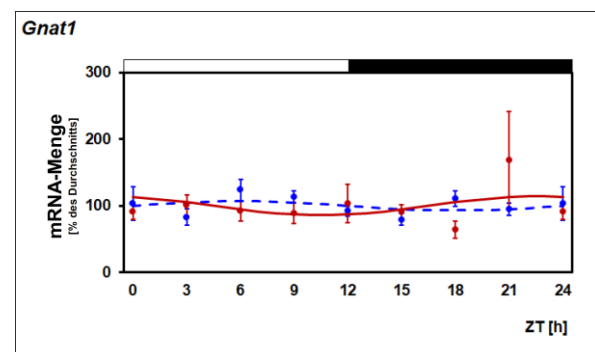
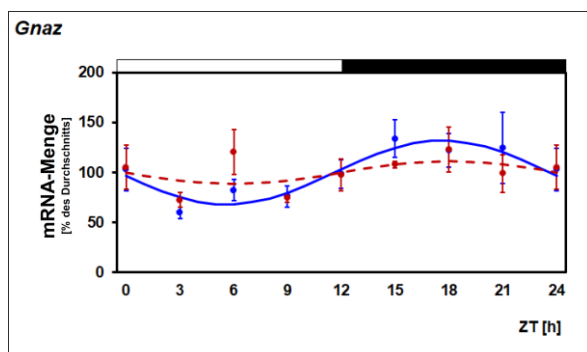
Es wurden die tageszeitlichen Profile der für die unterschiedlichen G $\alpha$ -Untereinheiten (*Gnaz*, *Gnat1*, *Gnat2*, *Gna11*, *Gna12*, *Gna13*, *Gai1*, *Gai2*, *Gai3*, *Gnal*, *Gnao*, und *Gnaq*), G $\beta$ -Untereinheiten (*Gnb1*, *Gnb2*, *Gnb3*, *Gnb4* und *Gnb5*) und G $\gamma$ -Untereinheiten (*Gngt1* und *Gngt2*) kodierenden Gene mithilfe von qPCR in Retina und Photorezeptoren von Wildtyp- und *Clock*-defizienten Mäusen ermittelt. Hierbei wurde untersucht, ob die genannten Gene tageszeitliche Schwankungen der mRNA-Menge zeigen und inwieweit das tageszeitliche Profil durch eine *Clock*-Defizienz beeinflusst wird.

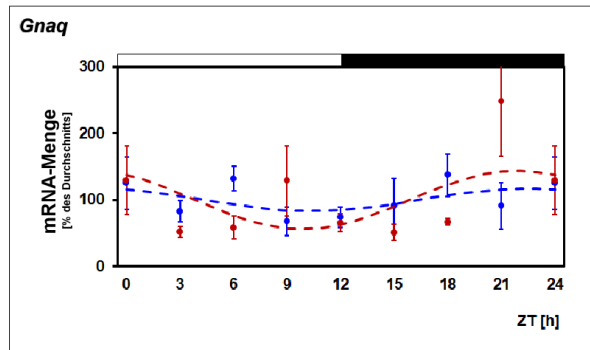
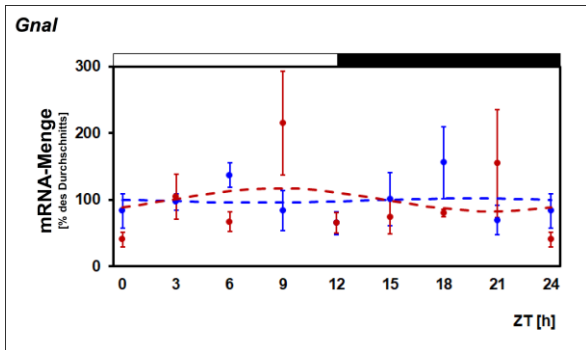
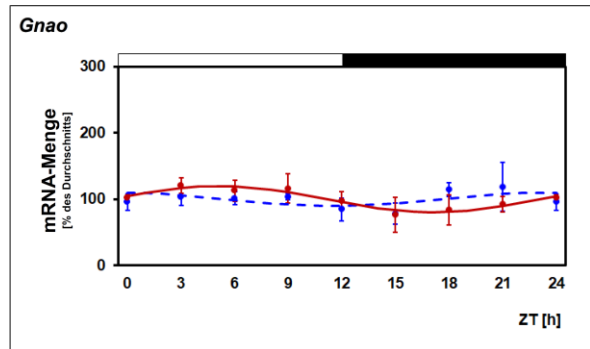
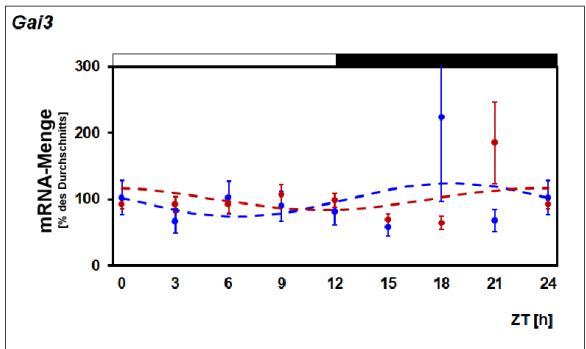
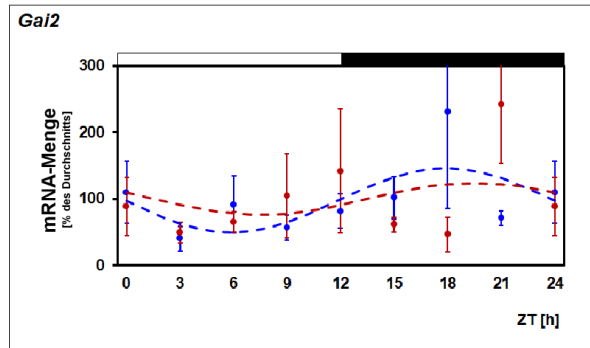
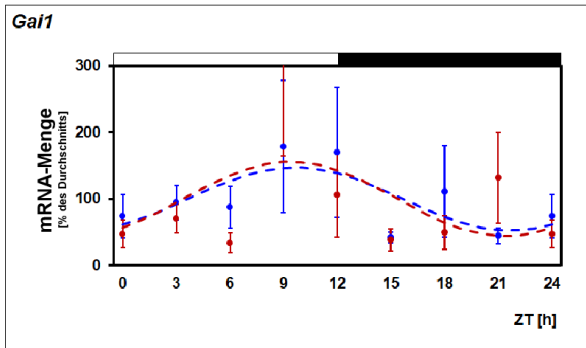
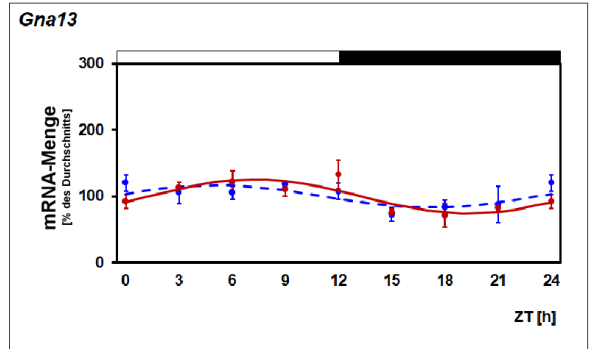
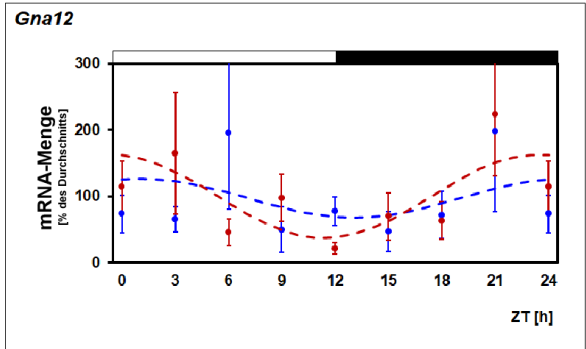
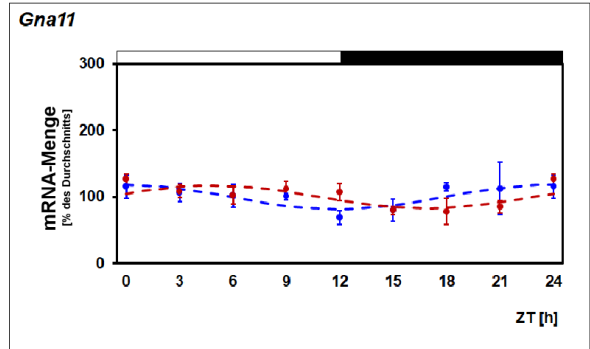
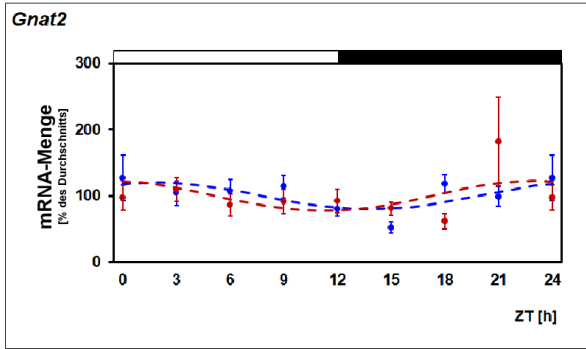
## 4.1 Genexpression in der Gesamtretna unter Licht-Dunkel-Bedingungen

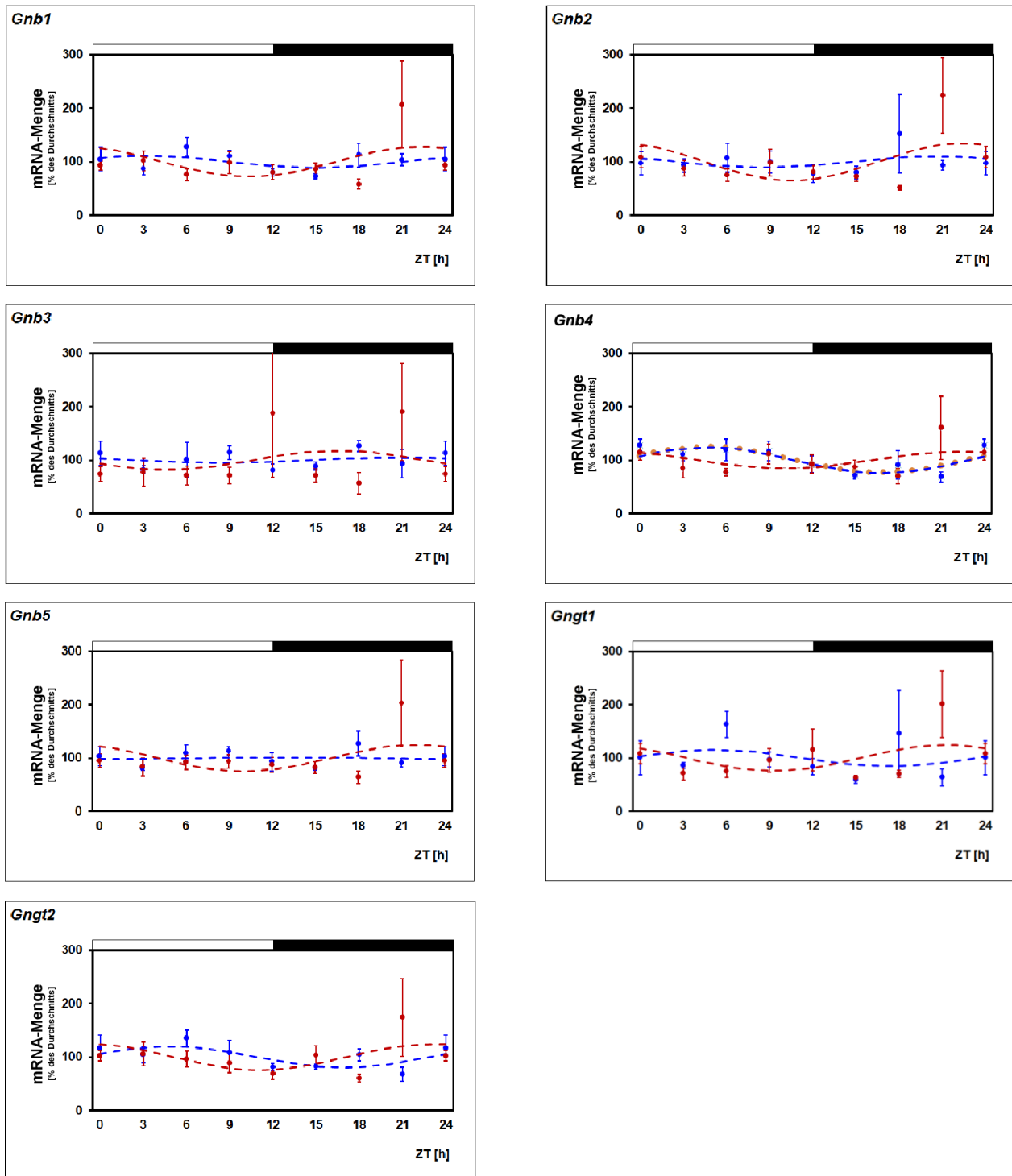
In der ersten Versuchsreihe erfolgte die Datenerhebung aus Retinaprobe von Mäusen, die einem Lichtregime mit 12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit (LD 12:12) ausgesetzt waren.

Bei den Wildtyp-Mäusen zeigte in der Cosinor-Analyse von allen untersuchten Genen nur *Gnaz* eine statistisch auffällige Rhythmik ( $p < 0,05$ ; Acrophase: ZT16,85; Amplitude: 31,92) (Abb. 4; Tab. 6). In der Anova-Analyse zeigte keines der Gene statistisch auffällige tageszeitliche Schwankungen (Tab. 6).

Bei den *Clock*-defizienten Mäusen zeigten in der Cosinor-Analyse die Gene *Gnat1* ( $p < 0,05$ ; Acrophase: ZT22,49; Amplitude: 13,94), *Gna13* ( $p < 0,05$ ; Acrophase: ZT8,08; Amplitude: 25,60) und *Gnao* ( $p < 0,05$ ; Acrophase: ZT1,63; Amplitude: 19,60) eine statistisch auffällige Rhythmik (Abb. 4; Tab. 6). Die *Clock*-Defizienz führt somit in der Cosinor-Analyse zu einem Verlust der tageszeitlichen Rhythmik von *Gnaz*. In der Anova-Analyse zeigten sich statistisch auffällige Schwankungen für die Gene *Gna13* ( $p = 0,022$ ), *Gnaq* ( $p = 0,027$ ), *Gnb2* ( $p = 0,012$ ) und *Gngt1* ( $p = 0,05$ ) (Tab. 6). Somit war auch bei einer *Clock*-Defizienz in der Anova-Analyse eine tageszeitliche Schwankung von *Gna13* zu beobachten.







**Abb. 4: Tageszeitliche Profile der Transkriptmengen der G-Protein-Untereinheiten in der Retina unter Licht-Dunkel-Bedingungen bei Wildtyp- und Clock-defizienten Mäusen**

Die mRNA-Mengen sind als Funktion der Zeitgeber Zeit (ZT) dargestellt. Die Messung der Transkriptmengen erfolgte mittels qPCR der Gesamtretina von Wildtyp-Mäusen (blaue Linien) und Clock-defiziten Mäusen (rote Linien) unter Licht/Dunkel (LD). Die Linien repräsentieren die aus der Cosinor-Analyse errechnete sinusoidale Funktion mit  $p < 0,05$  (durchgezogene Linie) oder  $p > 0,05$  (gepunktete Linie).

Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM aus vier Versuchen ( $n=4$ ; jedes  $n$  repräsentiert zwei Retinae eines Tieres). Die gemessenen Werte wurden auf die Transkriptmengen der Haushaltsgene *Gapdh* und *18s* der jeweiligen Probe normiert und als Prozentsatz des Durchschnittswerts der Transkriptmenge des 24h-Zeitraums dargestellt. Der Wert von ZT0 ist sowohl bei ZT0 als auch bei ZT24 zweimal aufgetragen. Die Lichtverhältnisse werden durch den weißen Balken für Licht und den schwarzen Balken für Dunkel dargestellt.



Tab. 6: Statistische Auswertung der in Abb. 4 dargestellten tageszeitlichen Expressionsprofile

Gene	Anova	Cosinor-Analyse			Gene	Anova	Cosinor-Analyse		
	p-Wert	p-Wert	Acrophase (h)	Amplitude (%)		p-Wert	p-Wert	Acrophase (h)	Amplitude (%)
<i>Gnaz</i>	0,106	<0.05	16,85	31,92	<i>Gnaz</i>	0,303	>0.05	-	-
<i>Gnat1</i>	0,281	>0.05	-	-	<i>Gnat1</i>	0,446	<0.05	22,49	-
<i>Gnat2</i>	0,173	>0.05	-	-	<i>Gnat2</i>	0,177	>0.05	-	-
<i>Gna11</i>	0,568	>0.05	-	-	<i>Gna11</i>	0,076	>0.05	-	-
<i>Gna12</i>	0,490	>0.05	-	-	<i>Gna12</i>	0,189	>0.05	-	-
<i>Gna13</i>	0,250	>0.05	-	-	<i>Gna13</i>	0,022	<0.05	8,08	25,60
<i>Gai1</i>	0,605	>0.05	-	-	<i>Gai1</i>	0,087	>0.05	-	-
<i>Gai2</i>	0,514	>0.05	-	-	<i>Gai2</i>	0,229	>0.05	-	-
<i>Gai3</i>	0,382	>0.05	-	-	<i>Gai3</i>	0,052	>0.05	-	-
<i>Gnao</i>	0,731	>0.05	-	-	<i>Gnao</i>	0,610	<0.05	1,63	19,60
<i>Gnal</i>	0,381	>0.05	-	-	<i>Gnal</i>	0,140	>0.05	-	-
<i>Gnaq</i>	0,536	>0.05	-	-	<i>Gnaq</i>	0,027	>0.05	-	-
<i>Gnb1</i>	0,199	>0.05	-	-	<i>Gnb1</i>	0,084	>0.05	-	-
<i>Gnb2</i>	0,759	>0.05	-	-	<i>Gnb2</i>	0,012	>0.05	-	-
<i>Gnb3</i>	0,616	>0.05	-	-	<i>Gnb3</i>	0,454	>0.05	-	-
<i>Gnb4</i>	0,110	>0.05	-	-	<i>Gnb4</i>	0,280	>0.05	-	-
<i>Gnb5</i>	0,280	>0.05	-	-	<i>Gnb5</i>	0,119	>0.05	-	-
<i>Gngt1</i>	0,309	>0.05	-	-	<i>Gngt1</i>	0,050	>0.05	-	-
<i>Gngt2</i>	0,093	>0.05	-	-	<i>Gngt2</i>	0,277	>0.05	-	-

In der linearen Regressionsanalyse der tageszeitlichen Expressionsprofile von *Gnaz* zeigte sich zwischen WT und *Clock*-defizienten Mäusen kein statistisch relevanter Unterschied (Tab. 7).

Tab. 7: Lineare Regressionsanalyse der tageszeitlichen Profile der *Gnaz*-Expression zwischen Wildtyp und *Clock*-defizienten Mäusen

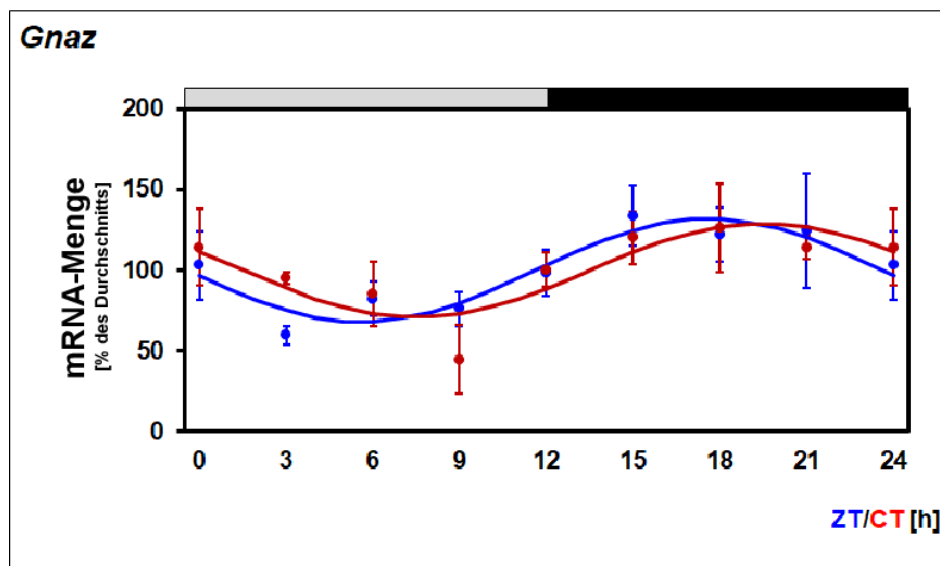
Gen	<i>Gnaz</i>
p-Wert	=0,321

## 4.2 Expression von *Gnaz* in der Gesam retina unter Dauerdunkel (DD)

Um den Einfluss der circadianen Uhr auf die Genexpression von *Gnaz* zu untersuchen, wurden Retinae von Mäusen, die einem Lichtregime mit Dauerdunkel (DD) ausgesetzt waren, verwendet.

Die unter LD 12:12 in der Cosinor-Analyse gezeigte Rhythmik von *Gnaz* ( $p < 0,05$ ; Acrophase: ZT16,85; Amplitude: 31,92) blieb auch unter Dauerdunkel evident ( $p < 0,05$ ; Acrophase: ZT18,79; Amplitude: 29,24), wobei das Maximum der Expression unter DD verspätet war (ZT16.86 unter LD; ZT18.79 unter DD) (Abb. 5; Tab. 8).

Wie unter LD-Bedingungen zeigte *Gnaz* in der Anova-Analyse unter DD keine statistisch auffällige, tageszeitliche Schwankung (LD:  $p = 0,106$ , DD:  $p = 0,081$ ) (Tab. 8).



**Abb. 5: Tageszeitliches Profil der *Gnaz*-Expression in der Retina unter Dauerdunkel**

Die mRNA-Menge ist als Funktion der Zeitgeber Zeit (ZT) bzw. der circadianen Zeit (CT) dargestellt. Die Messung der Transkriptmengen erfolgte mittels qPCR der Retina von Wildtyp-Mäusen unter LD (blaue Linie) und unter DD (rote Linie). Die Linien repräsentieren die aus der Cosinor-Analyse errechnete sinusoidale Funktion mit  $p < 0,05$  (durchgezogene Linie) oder  $p > 0,05$  (gepunktete Linie)

Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM aus vier Versuchen ( $n=4$ ; jedes  $n$  repräsentiert zwei Retinae eines Tieres). Die gemessenen Werte wurden auf die Transkriptmengen der Haushaltsgene *Gapdh* und *18s* der jeweiligen Probe normiert und als Prozentsatz des Durchschnittswerts der Transkriptmenge des 24h-Zeitraums dargestellt. Der Wert von ZT0 ist sowohl bei ZT0 als auch bei ZT24 zweimal aufgetragen. Die Lichtverhältnisse werden durch den grauen Balken für subjektiver Tag und den schwarzen Balken für subjektive Nacht dargestellt.

**Tab. 8: Statistische Auswertung der in Abb. 5 dargestellten tageszeitlichen Expressionsprofile**

	Anova	Cosinor-Analyse		
	p-Wert	p-Wert	Acrophase (h)	Amplitude (%)
LD	0,106	<0.05	16,85	31,92
DD	0,081	<0.05	18,79	29,24

In der linearen Regressionsanalyse der tageszeitlichen Expressionsprofile von *Gnaz* bei Wildtyp-Mäusen zeigte sich zwischen LD und DD kein statistisch relevanter Unterschied (Tab. 9).

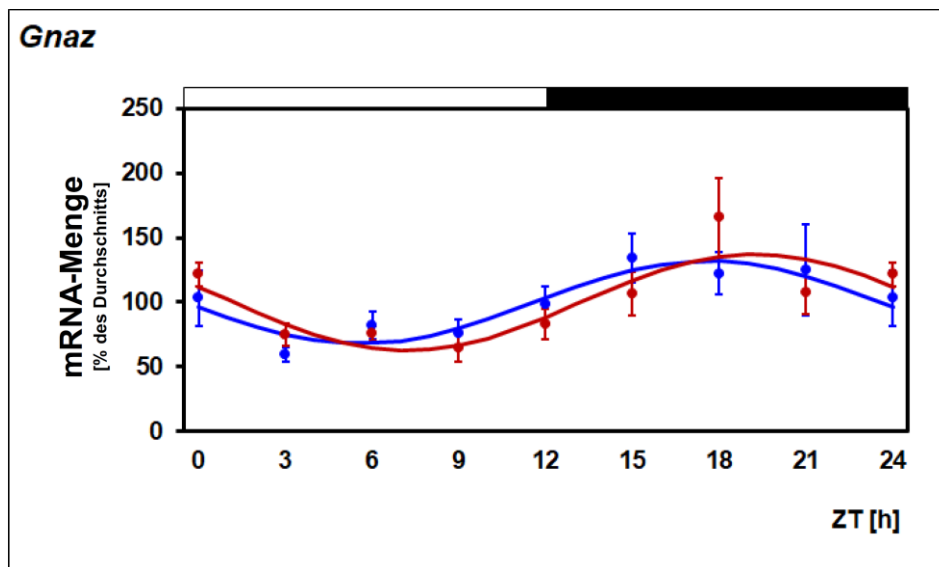
**Tab. 9: Lineare Regressionsanalyse der tageszeitlichen Profile der *Gnaz*-Expression unter Licht-Dunkel-Bedingungen (LD) und Dauerdunkel (DD)**

<b>Gen</b>	<i>Gnaz</i>
<b>p-Wert</b>	=0,904

### 4.3 Expression von *Gnaz* in den Photorezeptoren unter Licht/Dunkel (12:12)

Um der Frage nachzugehen, ob *Gnaz* auch in den Photorezeptoren rhythmisch exprimiert wird, wurden die tageszeitlichen Profile der *Gnaz*-Transkripte in Photorezeptoren ermittelt, die mittels der LMPC-Technik isoliert wurden.

Wie in der Gesamtretna, zeigte *Gnaz* sowohl in der Cosinor-Analyse ( $p < 0,05$ ; Acrophase: ZT19,87; Amplitude: 37,50) als auch in der Anova ( $p = 0,00$ ) eine tageszeitliche Rhythmik, wobei das Expressionsmaximum von ZT16.09 auf ZT19.87 verschoben war (Abb. 6; Tab. 10).



**Abb. 6: Tageszeitliches Profil der *Gnaz*-Expression in Photorezeptoren unter Licht-Dunkel-Bedingungen**

Die mRNA-Menge ist als Funktion der Zeitgeber Zeit (ZT) dargestellt. Die Messung der Transkriptmengen erfolgte mittels qPCR der Photorezeptoren (rote Linie) und der Gesamtretna (blaue Linie) von Wildtyp-Mäusen unter Licht/Dunkel (LD 12:12). Die Linien repräsentieren die aus der Cosinor-Analyse errechnete sinusoidale Funktion mit  $p < 0,05$  (durchgezogene Linie) oder  $p > 0,05$  (gepunktete Linie).

Jeder Wert repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  SEM aus vier Versuchen ( $n=4$ ; jedes  $n$  repräsentiert zwei Retinae eines Tieres). Die gemessenen Werte wurden auf die Transkriptmengen der Haushaltsgene *Gapdh* und *18s* der jeweiligen Probe normiert und als Prozentsatz des Durchschnittswerts der Transkriptmenge des 24h-Zeitraums dargestellt. Der Wert von ZT0 ist sowohl bei ZT0 als auch bei ZT24 zweimal aufgetragen. Die Lichtverhältnisse werden durch den weißen Balken für Licht und den schwarzen Balken für Dunkel dargestellt.

Tab. 10: Statistische Auswertung der in Abb. 6 dargestellten tageszeitlichen Expressionsprofile

	Anova	Cosinor-Analyse		
	p-Wert	p-Wert	Acrophase (h)	Amplitude (%)
Retina	0,106	<0.05	16,85	31,92
PRZ	0,002	<0.05	19,87	37,50

In der linearen Regressionsanalyse der tageszeitlichen Expressionsprofile von *Gnaz* zeigte sich zwischen Gesamtretina und Photorezeptoren kein statistisch relevanter Unterschied (Tab. 11).

Tab. 11: Lineare Regressionsanalyse der tageszeitlichen Profile der *Gnaz*-Expression zwischen Gesamtretina und Photorezeptoren

Gen	<i>Gnaz</i>
p-Wert	=0,295

## 5 Diskussion

Das circadiane System der Retina ermöglicht eine tageszeitliche Adaptation an die wechselnden Umwelt- und Lichtbedingungen und die Aufrechterhaltung ihrer Vitalität über die gesamte Lebensspanne eines Organismus [5, 17, 18, 23]. Die tageszeitliche Adaptation umfasst viele physiologische Prozesse der Retina insbesondere auch die visuelle Signalverarbeitung [5, 29]. Hierbei spielt die Uhren-abhängige Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle. [25, 26]. So konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die Expression der Photorezeptorpigmente [30, 31] circadian reguliert wird. Ebenso unterliegen Gene des visuellen Zyklus, beispielsweise die visuellen Gene Arrestin1 (*Arr1*) in Stäbchen [114] und Arrestin4 (*Arr4*) in Zapfen [115] einer circadianen Regulation [34]. Das Genprodukt Arrestin bindet an das aktivierte Photopigment und führt so zur Deaktivierung der Signaltransduktion in den Photorezeptoren [33, 114-117]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression der Schlüsselenzyme des visuellen Zyklus *Lrat*, *Rpe65* und *Rdh5* in der Mausretina einen tageszeitlichen Rhythmus ausweisen [34].

Ziel dieser Arbeit war es, zu klären, inwieweit die circadiane Uhr die tageszeitliche Adaptation der Retina auch über die expressionelle Kontrolle von G-Proteinen reguliert. Hierbei wurde die Arbeitshypothese verfolgt, dass die circadiane Uhr die Physiologie der Retina über eine Modifikation G-Protein-vermittelter Signaltransduktionswege reguliert. Dies impliziert die Möglichkeit, dass die circadiane Uhr über eine Kontrolle der Expression des visuellen Transducin, die visuelle Signaltransduktionskaskade und hiermit die visuelle Signalverarbeitung beeinflusst.

## 5.1 Tageszeitliche Rhythmik der für die G-Protein-Untereinheiten ( $\alpha$ -, $\beta$ -, und $\gamma$ ) kodierenden Gene in der Wildtyp-Retina

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass unter allen untersuchten Genen (*Gnaz*, *Gnat1*, *Gnat2*, *Gna11*, *Gna12*, *Gna13*, *Gai1*, *Gai2*, *Gai3*, *Gnal*, *Gnao*, *Gnaq*, *Gnb1*, *Gnb2*, *Gnb3*, *Gnb4*, *Gnb5*, *Gngt1* und *Gngt2*) nur das Gen *Gnaz* eine tageszeitliche Rhythmik in der Wildtyp-Retina aufweist.

Dieser Befund erweitert das bisherige Wissen über die tageszeitliche Rhythmik von  $\alpha$ -Transducin [39, 40], indem er vermuten lässt, dass die schon früher beobachtete Rhythmik von  $\alpha$ -Transducin [39, 40] auf das nicht-visuelle  $\alpha$ -Transducin *Gnaz*, nicht jedoch auf die visuellen Typen von  $\alpha$ -Transducin *Gnat1* und *Gnat2* zurückzuführen ist.

Die in dieser Studie vorgenommene Differenzierung der verschiedenen  $\alpha$ -Transducine wurde durch die Verwendung spezifischer Oligodesoxynukleotidsonden ermöglicht, die die Unterscheidung zwischen *Gnaz* und *Gnat1* bzw. *Gnat2* erlauben, während die in früheren Studien verwendeten Oligodesoxynukleotidsonden hochkomplementär zu allen  $\alpha$ -Transducin-Typen waren (*Gnaz*: 82%, *Gnat1*: 93%, *Gnat2*: 79%) und somit eine differenzierte Betrachtung der einzelnen G-Protein-Subtypen nicht möglich war [39].

Das tageszeitliche Profil der *Gnaz*-Expression zeigt einen Anstieg nach dem Licht-Dunkel-Übergang und einen Abfall nach dem Dunkel-Licht-Übergang. Hierbei lag das Expressionsmaximum in der Dunkelphase bei ZT16,85. Da die früher beobachtete tageszeitliche Rhythmik von  $\alpha$ -Transducin ein ähnliches tageszeitliches Profil aufwies [39, 40], bestärkt dieser Befund die oben beschriebene Annahme, dass die tageszeitliche Rhythmik von  $\alpha$ -Transducin auf *Gnaz* beruht.

Ein nächtliches Expressionsmaximum ist bei vielen circadian gesteuerten Genen zu sehen [5]. So zeigten Storch et al., dass unter LD-Bedingungen mehr als die Hälfte aller rhythmisch exprimierten Gene ein Expressionsmaximum während der Dunkelphase aufweisen [5]. Hiermit gehört *Gnaz* zu der Mehrzahl der circadianen Gene, die ein nächtliches Expressionsmaximum zeigen [5].

Die Gene *Gna11*, *Gna12*, *Gna13*, *Gai1*, *Gai2*, *Gai3*, *Gnal*, *Gnao* und *Gnaq* zeigten keine rhythmische Expression und scheinen daher keine bedeutende Rolle im circadianen System der Retina zu haben.

## 5.2 Die circadiane Regulation von *Gnaz*

Die circadiane Uhr der Retina reguliert im Zusammenspiel mit dem Licht/Dunkel-Wechsel die tageszeitliche Adaptation der retinalen Genexpression [5]. Storch et al. haben mit Hilfe der Microarray-Analyse gezeigt, dass in der Retina circa 3.000 Gene eine tageszeitliche Rhythmik aufweisen, wobei circa 300 dieser Gene das rhythmische Expressionsmuster auch unter DD behalten, also circadian reguliert werden, d. h. primär durch die circadiane Uhr und nicht durch äußere Lichtbedingungen beeinflusst werden [5]. Die tageszeitliche Rhythmik von  $\alpha$ -Transducin hingegen wurde bisher nur unter Licht/Dunkel-Wechsel, nicht jedoch unter DD untersucht [39, 40, 142].

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass *Gnaz* auch unter Dauerdunkel ein rhythmisches Expressionsprofil aufweist, also circadian reguliert wird.

Allerdings zeigte sich eine leichte Reduktion der Amplitude unter DD im Vergleich zu LD, was möglicherweise durch eine lichtabhängige Verstärkung der Rhythmik der Genexpression zu erklären ist. Eine Reduktion unter DD wurde bereits in früheren Studien für mehrere circadian regulierten Gene wie z.B. *Drd4*, *Nr4a1*, *cFos* beschrieben [14, 26, 131]. Dies lässt vermuten, dass *Gnaz* zu einer Gruppe von circadianen Genen der Retina gehört, deren rhythmische Expression durch den Licht/Dunkel-Wechsel verstärkt wird. Die tageszeitliche Rhythmik der Genexpression kann jedoch auch direkt lichtgesteuert sein [5, 143]. So konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die Expression der Gene *Grk1* und *Pgc-1 $\alpha$*  in der Retina und Photorezeptoren von Ratten direkt lichtgesteuert ist [143]. Unter DD kam es zum Verlust der rhythmischen Expression dieser Gene, was vermuten lässt, dass zur Aufrechterhaltung dieser Rhythmik ein Lichtsignal notwendig ist [143]. Des Weiteren zeigte das Gen *Drd4* unter LD trotz Uhrengen-Defizienz eine tageszeitliche Rhythmik, was impliziert, dass Licht die Genexpression direkt beeinflusst [5]. Die tageszeitliche Rhythmik der Genexpression kann also circadian und/oder direkt lichtgesteuert reguliert werden. Dieses Zusammenspiel ermöglicht der Retina die optimale Adaptation an die wechselnden Umwelt- und Lichtbedingungen [5, 17, 18, 23].

Das Expressionsmaximum zeigte sich auch unter DD in der Dunkelphase, jedoch mit einer zeitlichen Verzögerung von ZT16.86 auf ZT18.79. Dies ist möglicherweise

dadurch zu erklären, dass unter DD der Einfluss des Zeitgebers „Licht“ ausbleibt, so dass ausschließlich die circadiane Uhr die Rhythmik der Genexpression bestimmt. [14]. Eine zeitliche Verzögerung des Expressionsmaximums unter DD wurde bereits in früheren Studien für mehrere circadian regulierte Gene wie z.B. *Pde8a* und *Adra1b* beschrieben [143].

### 5.3 Die *Clock*-abhängige Regulation von *Gnaz*

Das *Clock*-Gen spielt als Transkriptionsfaktor und wesentlicher Bestandteil der autoregulatorischen Rückkopplungsschleife eine essentielle Rolle bei der Generierung circadianer Rhythmen [14, 23]. Dabei unterscheidet sich die funktionelle Relevanz von *Clock* zwischen NSC und peripheren Geweben, einschließlich der Retina [93, 144-147]. Die Meisteruhr im NSC scheint *Clock*-unabhängig zu sein, da die circadiane Rhythmik im NSC bei *Clock*-defizienten Mäusen persistiert [144-146]. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Transkriptionsfaktor *Npas2* im NSC in der Lage ist, *Clock* funktionell zu ersetzen [144-146].

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der *Clock*-Defizienz auf die Rhythmik von *Gnaz* in der Retina untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die *Clock*-Defizienz unter LD zu einem absoluten Verlust der tageszeitlichen Rhythmik von *Gnaz* führt. Dies lässt vermuten, dass die *Gnaz*-Expression durch die organeigene circadiane Uhr der Retina und nicht durch die Meisteruhr im NSC reguliert wird, da diese *Clock*-unabhängig zu sein scheint [144-146]. Dieses Ergebnis unterstützt die Vorstellung, dass die Adaptation der Retina durch ein retinales circadianes System und nicht durch die Meisteruhr im NSC reguliert wird, da die circadiane Rhythmik im NSC auch bei einer *Clock*-Defizienz, aufgrund des *Clock*-Homologen *Npas2*, persistiert [144-146].

Das nächtliche Expressionsmaximum von *Gnaz* ist mit der Annahme einer *Clock*-abhängigen Expression im Einklang, denn sowohl *Clock* als auch das CLOCK-Protein zeigen eine rhythmische Expression mit einem Maximum während der Lichtphase [73, 74, 77, 90]. Die zeitliche Differenz zwischen den Maxima von *Gnaz* und *Clock* könnte das Zeitintervall für die Translation der *Clock*-mRNA, der Synthese des CLOCK-Proteins und die darauffolgende *Clock*-abhängige Transkription des *Gnaz*-Gens widerspiegeln.

## 5.4 Die Expression und Rhythmik von *Gnaz* in den Photorezeptoren

Das circadiane System der Retina besteht aus einem Netzwerk von zelleigenen Uhren, die in verschiedenen Zelltypen der Retina zu finden sind [21, 22, 72-74] und unabhängig vom NSC circadiane Rhythmen generieren [21, 70, 71]. Mehrere Studien lassen vermuten, dass eine dieser zelleigenen Uhren in Photorezeptoren lokalisiert ist [22].

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass *Gnaz* auch in Photorezeptoren exprimiert wird und die Expression eine signifikante tageszeitliche Rhythmik aufweist. Dabei zeigte *Gnaz* in Gesamtretina und Photorezeptoren ein ähnliches Expressionsprofil mit einer geringen Amplitudendifferenz, was vermuten lässt, dass die tageszeitliche Rhythmik von *Gnaz* in der Gesamtretina teilweise oder vollständig auf die tageszeitliche Veränderung der *Gnaz*-Expression in Photorezeptoren zurückzuführen ist.

Wie in der Gesamtretina lag das Maximum der *Gnaz*-Expression in den Photorezeptoren in der Dunkelphase, allerdings im Vergleich zur Gesamtretina um ca. 3h verzögert. Diese Diskrepanz könnte darauf zurückzuführen sein, dass – neben Photorezeptoren – auch andere Zelltypen der Retina eine *Gnaz*-Rhythmik aufweisen, diese aber einen zeitlich verschiedenen Verlauf zeigen.

Da die hier angewandte Methode zur Isolierung der Photorezeptoren, die LMPC-Technik, die gesamte äußere Körnerschicht ausschneidet, enthalten die Proben sowohl Zapfen als auch Stäbchen und die Ergebnisse der Messungen können nicht spezifisch einem Photorezeptor-Typ zugeordnet werden. Dies bedeutet, dass offenbleibt, inwieweit die beobachtete *Gnaz*-Rhythmik Stäbchen oder Zapfen oder auch beiden Zelltypen zuzuschreiben ist. Bemerkenswerterweise scheinen nur Zapfen-Photorezeptoren eine circadiane Uhr zu besitzen [90]. Unter der Annahme, dass die Rhythmik der *Gnaz*-Expression durch eine zelleigene Uhr erzeugt wird, spricht dieser Befund für eine circadiane Regulation von *Gnaz* in Zapfen.

Des Weiteren scheint die *Gnaz*-Expression in den Photorezeptoren einer dopaminergen Regulation zu unterliegen [36]. Diese Annahme basiert auf der

Beobachtung, dass eine *Drd4*-Defizienz in Mäusen zum Verlust der tageszeitlichen Rhythmik von *Gnaz* in den Photorezeptoren führt [36]. Da Dopamin in den dopaminergen amakrinen Zellen der inneren Retina synthetisiert [6, 23, 27, 28, 119-121] und seine Wirkung auf die Photorezeptoren hauptsächlich über die Dopamin-D4-Rezeptoren vermittelt wird [28, 119, 120], könnte die circadiane Regulation der *Gnaz*-Expression in den Photorezeptoren auf die circadiane Uhr der inneren Retina zurückzuführen sein.

Interessanterweise zeigte *Gnaz* in Mäusen mit diabetischer Retinopathie keine rhythmische Expression [36]. Da die diabetische Retinopathie zu einem verminderten retinalen Dopaminspiegel [132] und zu einer gestörten rhythmischen Expression von *Drd4* in der Retina [36] führt, lässt die gestörte circadiane Regulation von *Gnaz* möglicherweise auf eine Funktionsstörung im dopaminergen System der Retina unter diabetischen Bedingungen zurückschließen.

Melatonin scheint jedoch nicht essentiell für die circadiane Rhythmik der *Gnaz*-Expression zu sein [36]. So führte eine *MT1*-Defizienz bei Mäusen lediglich zur Phasenverschiebung der rhythmischen Expression von *Gnaz*, nicht jedoch zum absoluten Verlust der tageszeitlichen Rhythmik von *Gnaz* [36].

Die circadiane Regulation von *Gnaz* in den Photorezeptoren zeigt sich nicht nur in der expressionellen Kontrolle, sondern auch in der Synthese und subzellulären Lokalisation des Genprodukts  $G\alpha_z$  innerhalb des Photorezeptors [36]. So konnte bei Mäusen mittels Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass  $G\alpha_z$  bei ZT6 am stärksten im Innensegment und bei ZT18 am stärksten im Außensegment nachweisbar war [36]. Dies führt zu der Annahme, dass  $G\alpha_z$  nicht nur einer circadianen Regulation seiner Expression, sondern auch einer lichtregulierten Translokation unterliegt.

## 5.5 Funktionelle Bedeutung der circadianen Regulation von *Gnaz*

Das *Gnaz*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 22 an Position 11 (22q11) lokalisiert [148] und kodiert für ein spezielles G-Protein der G<sub>i</sub>-Unterfamilie, Gaz, dessen Gewebeverteilung sich hauptsächlich auf neuronales und endokrines Gewebe [149, 150], einschließlich der Retina [151-153] und den Photorezeptoren (diese Arbeit), beschränkt.

Die circadiane Rhythmik der *Gnaz*-Expression führt in den Photorezeptoren zu einer korrespondierenden Rhythmik in der Gaz-Synthese [36]. Bisher ist bekannt, dass Gaz wichtige regulatorische Eigenschaften aufweist, wie z.B. die Hemmung der Adenylatcyclase [154, 155], und seine Wirkung über verschiedene GPgR vermittelt wird [154-157]. Dies lässt vermuten, dass Gaz das circadiane System der Retina mit der G-Protein-abhängigen Signaltransduktion verbindet. So führt Gaz möglicherweise über die Hemmung der Adenylatcyclase zu einer circadianen Regulation des cAMP-Spiegels [99, 131]. Die Annahme wird dadurch bestärkt, dass die Gaz-Proteinmenge in der Retina Maximalwerte nachts und Tiefstwerte tagsüber aufweist [36] und somit reziprok mit dem retinalen cAMP-Spiegel korreliert [131]. Über den cAMP-Spiegel wird die Aanat-Aktivität reguliert [95]. Da die Aanat für das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Melatoninsynthese kodiert [27, 97, 158], spielt *Gnaz* möglicherweise eine modulierende Rolle in der circadianen Rhythmik der Melatoninsynthese.

Des Weiteren konnte in Geweben außerhalb der Retina gezeigt werden, dass Gaz an sog. D2-like-Rezeptoren gekoppelt ist [159, 160]. D2-like-Rezeptoren sind eine Subklasse von Dopaminrezeptoren, die eine essentielle Rolle in der visuellen Verarbeitung [161-163] und Aufrechterhaltung der retinalen Vitalität [132] zu besitzen scheinen.

Die vorliegenden Befunde lassen vermuten, dass *Gnaz* das circadiane und das dopaminerge System an die G-Protein-abhängige Signaltransduktion in der Retina koppelt und somit eine wichtige Rolle in der tageszeitlichen Adaptation und Vitalität der Photorezeptoren spielen könnte.

Weitere Untersuchungen unter Verwendung von *Gnaz*-defizienten Mäusen sind notwendig, um die Funktion von *Gnaz* in Photorezeptoren und Retina und den Einfluss einer *Gnaz*-Defizienz auf die circadiane, dopaminerge und/oder melatoninerge Regulation und die Pathogenese retinaler Erkrankungen zu ermitteln.

## 5.6 Einfluss des circadianen Systems auf die visuelle Signalverarbeitung

Die circadiane Uhr der Retina spielt eine wesentliche Rolle in der visuellen Signalverarbeitung und ermöglicht den Säugetieren ihre visuelle Wahrnehmung an die tageszeitlich wechselnden äußeren Lichtverhältnisse anzupassen [5, 6, 23, 29, 109]. Hierbei ermöglicht die circadiane Uhr der Retina eine Adaptation der retinalen Funktionen vor dem Lichtwechsel, d.h. sie ist in der Lage die Adaptation der Retina zeitlich vorwegzunehmen. Die visuelle Adaptation der Retina betrifft unter anderem die expressionelle Kontrolle visueller Gene [34, 164].

Von diesen Befunden ausgehend, war Ziel dieser Arbeit, zu klären, ob die für die visuelle Signaltransduktion verantwortlichen visuellen  $\alpha$ -Transducine *Gnat1* und *Gnat2* einer circadianen Regulation unterliegen. In dieser Arbeit zeigten weder *Gnat1* noch *Gnat2* eine tageszeitliche Rhythmik in ihrer Expression und scheinen somit keiner circadianen Regulation zu unterliegen.

Jedoch ist aus der Literatur bekannt, dass viele Gene die in den Photorezeptoren an der visuellen Signalverarbeitung beteiligt sind, circadian reguliert werden. So konnte gezeigt werden, dass die „visuellen Gene“ (*Arr1*) in Stäbchen [114] und Arrestin4 (*Arr4*) in Zapfen [115], deren Genprodukt Arrestin zu der Deaktivierung der visuellen Signaltransduktion führt [33, 114-117], circadian reguliert werden [34]. Des Weiteren zeigt das Gen *nuclear receptor subfamily 2 group E member 3 (Nr2e3)* in den Photorezeptoren eine circadiane Regulation [26, 31]. Als Transkriptionsfaktor reguliert es die Expression des Phototransduktionsgens *Rhodopsin* und ist somit von essentieller Bedeutung für die visuelle Funktion der Retina [30, 165]. Ein weiteres Beispiel ist das circadian regulierte Gen *Kcnv2*, das für einen spannungsabhängigen Kaliumkanal kodiert und bei Mäusen und Menschen eine Rolle der visuellen Signalverarbeitung spielt [164, 166, 167].

Die Bedeutung der Rolle des circadianen Systems in der visuellen Adaptation beruht auf dem Zusammenhang zwischen der gestörten retinalen Adaptionsfähigkeit und ophthalmologischen Erkrankungen. So konnte gezeigt werden, dass Mutationen in einigen circadian regulierten visuellen Genen zu einer gestörten visuellen Adaptation und pathologischen Veränderungen der Retina führen. So konnte gezeigt werden,

dass eine *Kcnv2*-Mutation ursächlich für eine Form der retinalen Dystrophie ist [167, 168]. Ebenso ist eine *Nr2e3*-Defizienz mit der Retinopathia pigmentosa und dem Goldman-Favre Syndrom assoziiert [169].

Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass auch Uhrengen-Mutationen mit ophthalmologischen Erkrankungen assoziiert sind. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die beiden Uhren-Gene *Rev-Erba* und *Rora* eine Rolle in der altersbedingten-Makuladegeneration (AMD) zu spielen scheinen [151].

## 5.7 Verwendung Melatonin-profizienter Mäuse

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Melatonin-profiziente Mäuse verwendet, da in mehreren Studien gezeigt werden konnte, dass Melatonin die retinale Uhrenfunktion beeinflusst [6, 79, 170] und Melatonin-profiziente Mäuse somit die retinale Physiologie besser widerspiegeln als Melatonin-defiziente Mäuse [6, 23, 102, 125]. So wurden insbesondere in den bisherigen Studien zur Untersuchung des Einfluss von *Clock* auf die retinale Uhrenfunktion [93] und die Rolle von *Clock* in peripheren Geweben [144, 147] Melatonin-defiziente Mäuse mit C57BL/6-Stammeshintergrund verwendet. Insofern ist anzunehmen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit auch hinsichtlich der Rolle von *Clock* eher mit den physiologischen Gegebenheiten nahekommen.

## 5.8 Verwendung der one-way ANOVA und der Cosinor-Analyse

Für die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse in der vorliegenden Arbeit wurden die einfaktorielle Varianzanalyse (one-way ANOVA) und die Cosinor-Analyse verwendet.

Die one-way ANOVA ermöglicht eine rein deskriptive Aussage über die statistisch auffälligen Schwankungen in den tageszeitlichen Expressionsprofilen, jedoch erlaubt sie keine Aussage über die Signifikanz der Rhythmizität [171-173]. Um der Frage nachzugehen, ob die gemessenen Expressionsprofile eine signifikante tageszeitliche Rhythmik aufweisen wurde deshalb in dieser Studie die Cosinor-Analyse durchgeführt. Sie ermöglicht auf Basis der normierten Mittelwerte die Darstellung einer sigmoidalen Kurve, wodurch die Acrophase – der Zeitpunkt der maximalen Genexpression – und die Amplitude ermittelt werden konnten [171-173].

## 5.9 Limitationen der Dissertation

Die vorgestellte Arbeit bringt Limitationen mit sich, die hier selbstkritisch betrachtet werden sollen. So ist zu beachten, dass die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Werte der *Gnaz*-Rhythmik der Gesamtretina, die Summe der *Gnaz*-Rhythmen vieler verschiedener Zelltypen repräsentieren könnte und nicht der *Gnaz*-Rhythmik eines einzelnen Zelltyps entsprechen muss.

Des Weiteren ist zu beachten, dass die hier angewandte Methode zur Isolierung der Photorezeptoren, die LMPC-Technik, nur den größten Teil der äußeren Retinaschichten entfernt, und somit die Anreicherung der Photorezeptoren begrenzt ist. Darüber hinaus enthalten die Proben sowohl Zapfen als auch Stäbchen und die Ergebnisse der Messungen können nicht spezifisch einem Photorezeptor-Typ zugeordnet werden.

## 6 Zusammenfassung

Die Retina verfügt über ein endogenes, vom NSC unabhängiges, circadianes System, das ihr die funktionelle Adaptation an die wechselnden äußeren Lichtbedingungen ermöglicht. Dieses System besteht aus mehreren zelleigenen Uhren, die in den verschiedenen Zelltypen der Retina, wie z.B. den Photorezeptoren, nachgewiesen werden konnten. Die tageszeitliche Adaptation der Retina betrifft viele physiologische Prozesse, unter anderem die visuelle Signalverarbeitung. Hierbei spielt die Uhren-abhängige Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle.

Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob die circadiane Uhr die tageszeitliche Adaptation der Retina auch über die expressionelle Kontrolle von G-Proteinen reguliert. Hierzu wurden in Gesamtretina und Photorezeptoren eines Melatonin-profizienten Mausstammes mithilfe der qPCR die tageszeitlichen Profile der für die unterschiedlichen G-Protein-Untereinheiten kodierenden Gene (*Gnaz*, *Gnat1*, *Gnat2*, *Gna11*, *Gna12*, *Gna13*, *Gai1*, *Gai2*, *Gai3*, *Gnal*, *Gnao*, *Gnaq*, *Gnb1*, *Gnb2*, *Gnb3*, *Gnb4*, *Gnb5*, *Gngt1* und *Gngt2*) zwischen Wildtyp- und *Clock*-defizienten Mäusen ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass die in den Photorezeptoren für die visuelle Signaltransduktion verantwortlichen visuellen  $\alpha$ -Transducine *Gnat1* und *Gnat2* keine tageszeitliche Rhythmik aufweisen und somit keiner circadianen Regulation unterliegen.

Hingegen zeigte das für das nicht-visuelle  $\alpha$ -Transducin kodierende Gen *Gnaz* eine circadiane Rhythmik, die im Dauerdunkel persistierte und in *Clock*-defizienten Mäusen nicht mehr nachweisbar war. Dies führt zu der Annahme, dass die rhythmische Expression von *Gnaz* durch die circadiane Uhr der Retina reguliert wird. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Rhythmik der *Gnaz*-Expression – zumindest unter anderem – in Photorezeptoren stattfindet.

Die Befunde der vorliegenden Dissertation zeigen erstmals, dass *Gnaz* auch in Photorezeptoren exprimiert wird und die Expression durch die circadiane Uhr der Retina reguliert wird. Des Weiteren konnte erstmals gezeigt werden, dass die bisher beobachtete Rhythmik von  $\alpha$ -Transducin [39, 40] nur auf das nicht-visuelle  $\alpha$ -Transducin *Gnaz*, nicht jedoch auf die visuellen Typen von  $\alpha$ -Transducin *Gnat1* und *Gnat2* zurückzuführen ist.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Pittendrigh, C.S., *Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher*. Annu Rev Physiol, 1993. **55**: p. 16-54.
  2. Woelfle, M.A., et al., *The adaptive value of circadian clocks: an experimental assessment in cyanobacteria*. Curr Biol, 2004. **14**(16): p. 1481-6.
  3. Albrecht, U. and G. Eichele, *The mammalian circadian clock*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(3): p. 271-7.
  4. Vitaterna, M.H., J.S. Takahashi, and F.W. Turek, *Overview of circadian rhythms*. Alcohol Res Health, 2001. **25**(2): p. 85-93.
  5. Storch, K.F., et al., *Intrinsic circadian clock of the mammalian retina: importance for retinal processing of visual information*. Cell, 2007. **130**(4): p. 730-741.
  6. Tosini, G., et al., *The circadian clock system in the mammalian retina*. Bioessays, 2008. **30**(7): p. 624-33.
  7. Yamazaki, S., et al., *Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats*. Science, 2000. **288**(5466): p. 682-5.
  8. Ralph, M.R., et al., *Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period*. Science, 1990. **247**(4945): p. 975-8.
  9. Herzog, E.D. and G. Tosini, *The mammalian circadian clock shop*. Semin Cell Dev Biol, 2001. **12**(4): p. 295-303.
  10. Ma, M.A. and E.H. Morrison, *Neuroanatomy, Nucleus Suprachiasmatic*, in *StatPearls*. 2024, StatPearls Publishing
- Copyright © 2024, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
11. Aschoff, J., *CIRCADIAN RHYTHMS IN MAN*. Science, 1965. **148**(3676): p. 1427-32.
  12. Herzog, E.D., *Neurons and networks in daily rhythms*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(10): p. 790-802.
  13. Aschoff, J., *Exogenous and endogenous components in circadian rhythms*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1960. **25**: p. 11-28.
  14. Golombek, D.A. and R.E. Rosenstein, *Physiology of circadian entrainment*. Physiol Rev, 2010. **90**(3): p. 1063-102.
  15. Xiao, N., et al., *A single photoreceptor splits perception and entrainment by cotransmission*. Nature, 2023. **623**(7987): p. 562-570.
  16. Mistlberger, R.E., *Circadian food-anticipatory activity: formal models and physiological mechanisms*. Neurosci Biobehav Rev, 1994. **18**(2): p. 171-95.
  17. Lamia, K.A., K.F. Storch, and C.J. Weitz, *Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15172-7.
  18. Barrett, R.K. and J.S. Takahashi, *Temperature compensation and temperature entrainment of the chick pineal cell circadian clock*. J Neurosci, 1995. **15**(8): p. 5681-92.
  19. Levine, J.D., et al., *Resetting the circadian clock by social experience in Drosophila melanogaster*. Science, 2002. **298**(5600): p. 2010-2.
  20. Tosini, G. and M. Menaker, *Circadian rhythms in cultured mammalian retina*. Science, 1996. **272**(5260): p. 419-21.
  21. Ruan, G.X., et al., *Circadian organization of the mammalian retina*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(25): p. 9703-8.
  22. Tosini, G., et al., *Localization of a circadian clock in mammalian photoreceptors*. Faseb j, 2007. **21**(14): p. 3866-71.
  23. McMahan, D.G., P.M. Iuvone, and G. Tosini, *Circadian organization of the mammalian retina: from gene regulation to physiology and diseases*. Prog Retin Eye Res, 2014. **39**: p. 58-76.
  24. Tosini, G. and C. Fukuhara, *The mammalian retina as a clock*. Cell Tissue Res, 2002. **309**(1): p. 119-26.

25. Vancura, P., et al., *Circadian and Dopaminergic Regulation of Fatty Acid Oxidation Pathway Genes in Retina and Photoreceptor Cells*. PLoS One, 2016. **11**(10): p. e0164665.
26. Kunst, S., et al., *Pgc-1 $\alpha$  and Nr4a1 Are Target Genes of Circadian Melatonin and Dopamine Release in Murine Retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015. **56**(10): p. 6084-94.
27. Iuvone, P.M., et al., *Circadian clocks, clock networks, arylalkylamine N-acetyltransferase, and melatonin in the retina*. Prog Retin Eye Res, 2005. **24**(4): p. 433-56.
28. Green, C.B. and J.C. Besharse, *Retinal circadian clocks and control of retinal physiology*. J Biol Rhythms, 2004. **19**(2): p. 91-102.
29. Ribelayga, C., Y. Cao, and S.C. Mangel, *The circadian clock in the retina controls rod-cone coupling*. Neuron, 2008. **59**(5): p. 790-801.
30. Cheng, H., et al., *Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(15): p. 1563-75.
31. Haider, N.B., et al., *Nr2e3-directed transcriptional regulation of genes involved in photoreceptor development and cell-type specific phototransduction*. Exp Eye Res, 2009. **89**(3): p. 365-72.
32. Nguyen-Legros, J. and D. Hicks, *Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium*. Int Rev Cytol, 2000. **196**: p. 245-313.
33. Deming, J.D., et al., *Arrestin 1 and Cone Arrestin 4 Have Unique Roles in Visual Function in an All-Cone Mouse Retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015. **56**(13): p. 7618-28.
34. Vancura, P., et al., *Rhythmic Regulation of Photoreceptor and RPE Genes Important for Vision and Genetically Associated With Severe Retinal Diseases*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2018. **59**(10): p. 3789-3799.
35. Arshavsky, V.Y., T.D. Lamb, and E.N. Pugh, Jr., *G proteins and phototransduction*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 153-87.
36. Vancura, P., et al., *Gnaz couples the circadian and dopaminergic system to G protein-mediated signaling in mouse photoreceptors*. PLoS One, 2017. **12**(10): p. e0187411.
37. Terakita, A., *The opsins*. Genome Biol, 2005. **6**(3): p. 213.
38. Kojima, D., et al., *A novel Go-mediated phototransduction cascade in scallop visual cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(37): p. 22979-82.
39. Brann, M.R. and L.V. Cohen, *Diurnal expression of transducin mRNA and translocation of transducin in rods of rat retina*. Science, 1987. **235**(4788): p. 585-7.
40. Bowes, C., T. van Veen, and D.B. Farber, *Opsin, G-protein and 48-kDa protein in normal and rd mouse retinas: developmental expression of mRNAs and proteins and light/dark cycling of mRNAs*. Exp Eye Res, 1988. **47**(3): p. 369-90.
41. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Coordination of circadian timing in mammals*. Nature, 2002. **418**(6901): p. 935-41.
42. Welsh, D.K., et al., *Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms*. Neuron, 1995. **14**(4): p. 697-706.
43. Liu, C. and S.M. Reppert, *GABA synchronizes clock cells within the suprachiasmatic circadian clock*. Neuron, 2000. **25**(1): p. 123-8.
44. Colwell, C.S., *Rhythmic coupling among cells in the suprachiasmatic nucleus*. J Neurobiol, 2000. **43**(4): p. 379-88.
45. Jiang, Z.G., et al., *Membrane properties and synaptic inputs of suprachiasmatic nucleus neurons in rat brain slices*. J Physiol, 1997. **499** ( Pt 1)(Pt 1): p. 141-59.
46. Stephan, F.K. and I. Zucker, *Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(6): p. 1583-6.

47. Moore, R.Y. and N.J. Lenn, *A retinohypothalamic projection in the rat*. J Comp Neurol, 1972. **146**(1): p. 1-14.
48. Panda, S., et al., *Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting*. Science, 2002. **298**(5601): p. 2213-6.
49. Gooley, J.J., et al., *Melanopsin in cells of origin of the retinohypothalamic tract*. Nat Neurosci, 2001. **4**(12): p. 1165.
50. Güler, A.D., et al., *Melanopsin cells are the principal conduits for rod-cone input to non-image-forming vision*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 102-5.
51. Contreras, E., et al., *Melanopsin activates divergent phototransduction pathways in intrinsically photosensitive retinal ganglion cell subtypes*. Elife, 2023. **12**.
52. Reppert, S.M. and D.R. Weaver, *Molecular analysis of mammalian circadian rhythms*. Annu Rev Physiol, 2001. **63**: p. 647-76.
53. Takahashi, J.S., et al., *The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(10): p. 764-75.
54. Akashi, M. and T. Takumi, *The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(5): p. 441-8.
55. Bunger, M.K., et al., *Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals*. Cell, 2000. **103**(7): p. 1009-17.
56. Hastings, M.H., A.B. Reddy, and E.S. Maywood, *A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(8): p. 649-61.
57. Gekakis, N., et al., *Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism*. Science, 1998. **280**(5369): p. 1564-9.
58. Shearman, L.P., et al., *Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock*. Science, 2000. **288**(5468): p. 1013-9.
59. Lee, C., et al., *Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock*. Cell, 2001. **107**(7): p. 855-67.
60. Kume, K., et al., *mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop*. Cell, 1999. **98**(2): p. 193-205.
61. Panda, S., et al., *Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock*. Cell, 2002. **109**(3): p. 307-20.
62. Akhtar, R.A., et al., *Circadian cycling of the mouse liver transcriptome, as revealed by cDNA microarray, is driven by the suprachiasmatic nucleus*. Curr Biol, 2002. **12**(7): p. 540-50.
63. Chen, W. and R. Baler, *The rat arylalkylamine N-acetyltransferase E-box: differential use in a master vs. a slave oscillator*. Brain Res Mol Brain Res, 2000. **81**(1-2): p. 43-50.
64. Ripperger, J.A. and U. Schibler, *Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions*. Nat Genet, 2006. **38**(3): p. 369-74.
65. Ripperger, J.A., et al., *CLOCK, an essential pacemaker component, controls expression of the circadian transcription factor DBP*. Genes Dev, 2000. **14**(6): p. 679-89.
66. Jin, X., et al., *A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock*. Cell, 1999. **96**(1): p. 57-68.
67. Vielhaber, E., et al., *Nuclear entry of the circadian regulator mPER1 is controlled by mammalian casein kinase I epsilon*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(13): p. 4888-99.
68. Eide, E.J., et al., *The circadian regulatory proteins BMAL1 and cryptochromes are substrates of casein kinase I epsilon*. J Biol Chem, 2002. **277**(19): p. 17248-54.
69. Cheng, M.Y., et al., *Prokineticin 2 transmits the behavioural circadian rhythm of the suprachiasmatic nucleus*. Nature, 2002. **417**(6887): p. 405-10.
70. Kamphuis, W., et al., *Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **330**(1): p. 18-26.
71. Tosini, G. and M. Menaker, *The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration*. Brain Res, 1998. **789**(2): p. 221-8.

72. Ruan, G.X., et al., *An autonomous circadian clock in the inner mouse retina regulated by dopamine and GABA*. PLoS Biol, 2008. **6**(10): p. e249.
73. Schneider, K., et al., *Unique clockwork in photoreceptor of rat*. J Neurochem, 2010. **115**(3): p. 585-94.
74. Sandu, C., D. Hicks, and M.P. Felder-Schmittbuhl, *Rat photoreceptor circadian oscillator strongly relies on lighting conditions*. Eur J Neurosci, 2011. **34**(3): p. 507-16.
75. Tosini, G., M. Kasamatsu, and K. Sakamoto, *Clock gene expression in the rat retina: effects of lighting conditions and photoreceptor degeneration*. Brain Res, 2007. **1159**: p. 134-40.
76. Peirson, S.N., et al., *Comparison of clock gene expression in SCN, retina, heart, and liver of mice*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **351**(4): p. 800-7.
77. Namihira, M., et al., *Circadian rhythms and light responsiveness of mammalian clock gene, Clock and BMAL1, transcripts in the rat retina*. Neurosci Lett, 1999. **271**(1): p. 1-4.
78. Namihira, M., et al., *Circadian pattern, light responsiveness and localization of rPer1 and rPer2 gene expression in the rat retina*. Neuroreport, 2001. **12**(3): p. 471-5.
79. Dinet, V., et al., *Clock gene expression in the retina of melatonin-proficient (C3H) and melatonin-deficient (C57BL) mice*. J Pineal Res, 2007. **42**(1): p. 83-91.
80. Yujnovsky, I., et al., *Signaling mediated by the dopamine D2 receptor potentiates circadian regulation by CLOCK:BMAL1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(16): p. 6386-91.
81. Witkovsky, P., et al., *Cellular location and circadian rhythm of expression of the biological clock gene Period 1 in the mouse retina*. J Neurosci, 2003. **23**(20): p. 7670-6.
82. Dkhissi-Benyahya, O., et al., *The absence of melanopsin alters retinal clock function and dopamine regulation by light*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(18): p. 3435-47.
83. Buhr, E.D., et al., *Neuropsin (OPN5)-mediated photoentrainment of local circadian oscillators in mammalian retina and cornea*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(42): p. 13093-8.
84. Kojima, D., et al., *UV-sensitive photoreceptor protein OPN5 in humans and mice*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26388.
85. Yamashita, T., et al., *Opn5 is a UV-sensitive bistable pigment that couples with Gi subtype of G protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(51): p. 22084-9.
86. Vitaterna, M.H., et al., *Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior*. Science, 1994. **264**(5159): p. 719-25.
87. King, D.P., et al., *Positional cloning of the mouse circadian clock gene*. Cell, 1997. **89**(4): p. 641-53.
88. Darlington, T.K., et al., *Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim*. Science, 1998. **280**(5369): p. 1599-603.
89. Muñoz, E., M. Brewer, and R. Baler, *Modulation of BMAL/CLOCK/E-Box complex activity by a CT-rich cis-acting element*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **252**(1-2): p. 74-81.
90. Liu, X., Z. Zhang, and C.P. Ribelayga, *Heterogeneous expression of the core circadian clock proteins among neuronal cell types in mouse retina*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50602.
91. Whitmore, D., et al., *Zebrafish Clock rhythmic expression reveals independent peripheral circadian oscillators*. Nat Neurosci, 1998. **1**(8): p. 701-7.
92. Li, P., et al., *CLOCK is required for maintaining the circadian rhythms of Opsin mRNA expression in photoreceptor cells*. J Biol Chem, 2008. **283**(46): p. 31673-8.
93. Ruan, G.X., et al., *Divergent roles of clock genes in retinal and suprachiasmatic nucleus circadian oscillators*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e38985.
94. Niki, T., et al., *The localization of the site of arylalkylamine N-acetyltransferase circadian expression in the photoreceptor cells of mammalian retina*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **248**(1): p. 115-20.
95. Ivanova, T.N. and P.M. Iuvone, *Circadian rhythm and photic control of cAMP level in chick retinal cell cultures: a mechanism for coupling the circadian oscillator to the*

- melatonin-synthesizing enzyme, arylalkylamine N-acetyltransferase, in photoreceptor cells.* Brain Res, 2003. **991**(1-2): p. 96-103.
96. Grève, P., et al., *Serotonin N-acetyltransferase mRNA levels in photoreceptor-enriched chicken retinal cell cultures: elevation by cyclic AMP.* J Neurochem, 1999. **73**(5): p. 1894-900.
  97. Coon, S.L., et al., *The human serotonin N-acetyltransferase (EC 2.3.1.87) gene (AANAT): structure, chromosomal localization, and tissue expression.* Genomics, 1996. **34**(1): p. 76-84.
  98. Sakamoto, K. and N. Ishida, *Circadian expression of serotonin N-acetyltransferase mRNA in the rat retina.* Neurosci Lett, 1998. **245**(2): p. 113-6.
  99. Fukuhara, C., et al., *Gating of the cAMP signaling cascade and melatonin synthesis by the circadian clock in mammalian retina.* J Neurosci, 2004. **24**(8): p. 1803-11.
  100. Okawa, H., et al., *ATP consumption by mammalian rod photoreceptors in darkness and in light.* Curr Biol, 2008. **18**(24): p. 1917-21.
  101. Liu, C., et al., *Localization of Aa-nat mRNA in the rat retina by fluorescence in situ hybridization and laser capture microdissection.* Cell Tissue Res, 2004. **315**(2): p. 197-201.
  102. Tosini, G., et al., *Melatonin: an underappreciated player in retinal physiology and pathophysiology.* Exp Eye Res, 2012. **103**: p. 82-9.
  103. Ames, A., 3rd, et al., *Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na<sup>+</sup> transport.* J Neurosci, 1992. **12**(3): p. 840-53.
  104. Wong-Riley, M.T., *Energy metabolism of the visual system.* Eye Brain, 2010. **2**: p. 99-116.
  105. Bonnefont, J.P., et al., *Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects.* Mol Aspects Med, 2004. **25**(5-6): p. 495-520.
  106. Lim, S.C., et al., *Loss of the Mitochondrial Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation Protein Medium-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Disrupts Oxidative Phosphorylation Protein Complex Stability and Function.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 153.
  107. Liu, C. and J.D. Lin, *PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism.* Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011. **43**(4): p. 248-57.
  108. Egger, A., et al., *PGC-1 $\alpha$  determines light damage susceptibility of the murine retina.* PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31272.
  109. Wang, Y. and S.C. Mangel, *A circadian clock regulates rod and cone input to fish retinal cone horizontal cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(10): p. 4655-60.
  110. Ribelayga, C., Y. Wang, and S.C. Mangel, *Dopamine mediates circadian clock regulation of rod and cone input to fish retinal horizontal cells.* J Physiol, 2002. **544**(3): p. 801-16.
  111. Boynton, R.M. and D.N. Whitten, *Visual adaptation in monkey cones: recordings of late receptor potentials.* Science, 1970. **170**(3965): p. 1423-6.
  112. Besharse, J.C., J.G. Hollyfield, and M.E. Rayborn, *Turnover of rod photoreceptor outer segments. II. Membrane addition and loss in relationship to light.* J Cell Biol, 1977. **75**(2 Pt 1): p. 507-27.
  113. Young, R.W., *The daily rhythm of shedding and degradation of rod and cone outer segment membranes in the chick retina.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 1978. **17**(2): p. 105-16.
  114. Brown, B.M., et al., *Visual Arrestin 1 contributes to cone photoreceptor survival and light adaptation.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(5): p. 2372-80.
  115. Deming, J.D., et al., *Visual Cone Arrestin 4 Contributes to Visual Function and Cone Health.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015. **56**(9): p. 5407-16.
  116. Nikonov, S.S., et al., *Mouse cones require an arrestin for normal inactivation of phototransduction.* Neuron, 2008. **59**(3): p. 462-74.
  117. Chan, S., et al., *Functional comparisons of visual arrestins in rod photoreceptors of transgenic mice.* Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(5): p. 1968-75.

118. Kinane, C., et al., *Dopamine modulates the retinal clock through melanopsin-dependent regulation of cholinergic waves during development*. BMC Biol, 2023. **21**(1): p. 146.
119. Witkovsky, P., *Dopamine and retinal function*. Doc Ophthalmol, 2004. **108**(1): p. 17-40.
120. Nir, I., R. Haque, and P.M. Iuvone, *Diurnal metabolism of dopamine in the mouse retina*. Brain Res, 2000. **870**(1-2): p. 118-25.
121. Iuvone, P.M., et al., *Light stimulates tyrosine hydroxylase activity and dopamine synthesis in retinal amacrine neurons*. Science, 1978. **202**(4370): p. 901-2.
122. Tosini, G. and C. Fukuhara, *Photic and circadian regulation of retinal melatonin in mammals*. J Neuroendocrinol, 2003. **15**(4): p. 364-9.
123. Wiechmann, A.F. and J.A. Summers, *Circadian rhythms in the eye: the physiological significance of melatonin receptors in ocular tissues*. Prog Retin Eye Res, 2008. **27**(2): p. 137-60.
124. Baba, K., et al., *Melatonin modulates visual function and cell viability in the mouse retina via the MT1 melatonin receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(35): p. 15043-8.
125. Hiragaki, S., et al., *Melatonin signaling modulates clock genes expression in the mouse retina*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e106819.
126. Carrero, L., et al., *Circadian rhythm disruption and retinal dysfunction: a bidirectional link in Alzheimer's disease?* Neural Regen Res, 2024. **19**(9): p. 1967-1972.
127. Wang, Q., et al., *Regulation of retinal inflammation by rhythmic expression of MiR-146a in diabetic retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(6): p. 3986-94.
128. Vancura, P., et al., *Evidence for a dysfunction and disease-promoting role of the circadian clock in the diabetic retina*. Exp Eye Res, 2021. **211**: p. 108751.
129. Ye, S., et al., *Diabetes Reshapes the Circadian Transcriptome Profile in Murine Retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2023. **64**(13): p. 3.
130. Silk, R.P., et al., *Mapping the daily rhythmic transcriptome in the diabetic retina*. Vision Res, 2024. **214**: p. 108339.
131. Jackson, C.R., et al., *Dopamine D<sub>4</sub> receptor activation controls circadian timing of the adenylyl cyclase 1/cyclic AMP signaling system in mouse retina*. Eur J Neurosci, 2011. **34**(1): p. 57-64.
132. Aung, M.H., et al., *Dopamine deficiency contributes to early visual dysfunction in a rodent model of type 1 diabetes*. J Neurosci, 2014. **34**(3): p. 726-36.
133. Wettschureck, N. and S. Offermanns, *Mammalian G proteins and their cell type specific functions*. Physiol Rev, 2005. **85**(4): p. 1159-204.
134. Simon, M.I., M.P. Strathmann, and N. Gautam, *Diversity of G proteins in signal transduction*. Science, 1991. **252**(5007): p. 802-8.
135. Clapham, D.E. and E.J. Neer, *G protein beta gamma subunits*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1997. **37**: p. 167-203.
136. Wickman, K.D. and D.E. Clapham, *G-protein regulation of ion channels*. Curr Opin Neurobiol, 1995. **5**(3): p. 278-85.
137. Sunahara, R.K., C.W. Dessauer, and A.G. Gilman, *Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1996. **36**: p. 461-80.
138. Exton, J.H., *Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1996. **36**: p. 481-509.
139. Vanhaesebroeck, B., et al., *Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 535-602.
140. *Sobotta Lehrbuch Histologie*. 2006: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag.
141. Gao, Y., et al., *Structures of the Rhodopsin-Transducin Complex: Insights into G-Protein Activation*. Mol Cell, 2019. **75**(4): p. 781-790.e3.
142. Bhoi, J.D., et al., *Circadian clock organization in the retina: From clock components to rod and cone pathways and visual function*. Prog Retin Eye Res, 2023. **94**: p. 101119.

143. Kunst, S., et al., *Transcriptional analysis of rat photoreceptor cells reveals daily regulation of genes important for visual signaling and light damage susceptibility*. J Neurochem, 2013. **124**(6): p. 757-69.
144. Debruyne, J.P., et al., *A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function*. Neuron, 2006. **50**(3): p. 465-77.
145. DeBruyne, J.P., D.R. Weaver, and S.M. Reppert, *CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock*. Nat Neurosci, 2007. **10**(5): p. 543-5.
146. Debruyne, J.P., *Oscillating perceptions: the ups and downs of the CLOCK protein in the mouse circadian system*. J Genet, 2008. **87**(5): p. 437-46.
147. DeBruyne, J.P., D.R. Weaver, and S.M. Reppert, *Peripheral circadian oscillators require CLOCK*. Curr Biol, 2007. **17**(14): p. R538-9.
148. Wilkie, T.M., et al., *Evolution of the mammalian G protein alpha subunit multigene family*. Nat Genet, 1992. **1**(2): p. 85-91.
149. Matsuoka, M., et al., *Sequence analysis of cDNA and genomic DNA for a putative pertussis toxin-insensitive guanine nucleotide-binding regulatory protein alpha subunit*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(15): p. 5384-8.
150. Ho, M.K. and Y.H. Wong, *G(z) signaling: emerging divergence from G(i) signaling*. Oncogene, 2001. **20**(13): p. 1615-25.
151. Hinton, D.R., et al., *Novel localization of a G protein, Gz-alpha, in neurons of brain and retina*. J Neurosci, 1990. **10**(8): p. 2763-70.
152. Hollborn, M., et al., *The human Müller cell line MIO-M1 expresses opsins*. Mol Vis, 2011. **17**: p. 2738-50.
153. Jiang, M., et al., *Guanine nucleotide-binding regulatory proteins in retinal pigment epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(9): p. 3907-11.
154. Yang, J., et al., *Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors*. J Biol Chem, 2002. **277**(48): p. 46035-42.
155. Kimple, M.E., et al., *Galphaz negatively regulates insulin secretion and glucose clearance*. J Biol Chem, 2008. **283**(8): p. 4560-7.
156. Sánchez-Blázquez, P., et al., *Brain-specific Galphaz interacts with Src tyrosine kinase to regulate Mu-opioid receptor-NMDAR signaling pathway*. Cell Signal, 2009. **21**(9): p. 1444-54.
157. Chan, A.S., et al., *Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins*. Cell Signal, 2002. **14**(3): p. 249-57.
158. Klein, D.C., et al., *The melatonin rhythm-generating enzyme: molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland*. Recent Prog Horm Res, 1997. **52**: p. 307-57; discussion 357-8.
159. Leck, K.J., et al., *Gz proteins are functionally coupled to dopamine D2-like receptors in vivo*. Neuropharmacology, 2006. **51**(3): p. 597-605.
160. van den Buuse, M., et al., *Enhanced effect of dopaminergic stimulation on prepulse inhibition in mice deficient in the alpha subunit of G(z)*. Psychopharmacology (Berl), 2005. **183**(3): p. 358-67.
161. Jackson, C.R., et al., *Retinal dopamine mediates multiple dimensions of light-adapted vision*. J Neurosci, 2012. **32**(27): p. 9359-68.
162. Hwang, C.K., et al., *Circadian rhythm of contrast sensitivity is regulated by a dopamine-neuronal PAS-domain protein 2-adenylyl cyclase 1 signaling pathway in retinal ganglion cells*. J Neurosci, 2013. **33**(38): p. 14989-97.
163. Nir, I., et al., *Dysfunctional light-evoked regulation of cAMP in photoreceptors and abnormal retinal adaptation in mice lacking dopamine D4 receptors*. J Neurosci, 2002. **22**(6): p. 2063-73.
164. Hölter, P., et al., *The retinal clock drives the expression of Kcnv2, a channel essential for visual function and cone survival*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. **53**(11): p. 6947-54.

165. Mollema, N.J., et al., *Nuclear receptor Rev-erb alpha (Nr1d1) functions in concert with Nr2e3 to regulate transcriptional networks in the retina*. PLoS One, 2011. **6**(3): p. e17494.
166. Czirják, G., Z.E. Tóth, and P. Enyedi, *Characterization of the heteromeric potassium channel formed by kv2.1 and the retinal subunit kv8.2 in Xenopus oocytes*. J Neurophysiol, 2007. **98**(3): p. 1213-22.
167. Wu, H., et al., *Mutations in the gene KCNV2 encoding a voltage-gated potassium channel subunit cause "cone dystrophy with supernormal rod electroretinogram" in humans*. Am J Hum Genet, 2006. **79**(3): p. 574-9.
168. Wissinger, B., et al., *Cone dystrophy with supernormal rod response is strictly associated with mutations in KCNV2*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(2): p. 751-7.
169. Schorderet, D.F. and P. Escher, *NR2E3 mutations in enhanced S-cone sensitivity syndrome (ESCS), Goldmann-Favre syndrome (GFS), clumped pigmentary retinal degeneration (CPRD), and retinitis pigmentosa (RP)*. Hum Mutat, 2009. **30**(11): p. 1475-85.
170. Dinet, V. and H.W. Korf, *Impact of melatonin receptors on pCREB and clock-gene protein levels in the murine retina*. Cell Tissue Res, 2007. **330**(1): p. 29-34.
171. Refinetti, R., G.C. Lissen, and F. Halberg, *Procedures for numerical analysis of circadian rhythms*. Biol Rhythm Res, 2007. **38**(4): p. 275-325.
172. Lentz, M.J., *Time-series analysis--cosinor analysis: a special case*. West J Nurs Res, 1990. **12**(3): p. 408-12.
173. Cornelissen, G., *Cosinor-based rhythmometry*. Theor Biol Med Model, 2014. **11**: p. 16.

## 8 Anhang

Tabellarische Aufführung der in den Abbildungen 4 bis 6 dargestellten tageszeitlichen Expressionsprofile

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock+/+</i>			
<i>Gnaz</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	103,14	42,72	21,36
3	59,59	11,36	5,68
6	82,23	21,22	10,61
9	76,03	21,08	10,54
12	98,19	28,69	14,34
15	133,84	38,16	19,08
18	122,37	33,53	16,77
21	124,62	70,57	35,29

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock-/-</i>			
<i>Gnaz</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	105,25	44,09	22,05
3	72,36	14,91	7,46
6	120,51	45,24	22,62
9	74,38	9,05	4,52
12	97,39	32,12	16,06
15	108,02	6,57	3,28
18	122,96	45,23	22,62
21	99,13	37,64	18,82

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock+/+</i>			
<i>Gnat1</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	103,10	51,00	25,50
3	82,87	24,54	12,27
6	123,59	30,72	15,36
9	113,50	18,07	9,04
12	91,83	13,94	6,97
15	79,31	17,32	8,66
18	111,16	23,36	11,68
21	94,64	17,53	8,76

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock-/-</i>			
<i>Gnat1</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	91,33	23,01	11,50
3	100,45	31,25	15,63
6	92,39	31,40	15,70
9	88,83	31,98	15,99
12	103,29	57,53	28,77
15	90,75	22,67	11,34
18	64,09	24,68	12,34
21	168,86	144,23	72,12

LD 12:12 Gesamtretna <i>Clock+/+</i>			
<i>Gnat2</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	126,76	68,87	34,43
3	103,96	37,41	18,71
6	106,88	36,73	18,36
9	113,87	34,82	17,41
12	79,82	20,51	10,25
15	52,40	17,42	8,71
18	117,79	28,00	14,00
21	98,52	29,28	14,64

LD 12:12 Gesamtretna <i>Clock-/-</i>			
<i>Gnat2</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	96,86	38,31	19,15
3	109,54	35,95	17,98
6	86,22	33,32	16,66
9	91,39	36,59	18,29
12	92,11	36,11	18,05
15	80,65	20,29	10,15
18	61,32	23,77	11,89
21	181,90	133,64	66,82

LD 12:12 Gesamtretna <i>Clock+/+</i>			
<i>Gna11</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	115,08	34,35	17,17
3	106,13	27,25	13,62
6	101,73	34,15	17,08
9	100,64	9,39	4,70
12	69,29	20,31	10,15
15	79,96	32,97	16,49
18	114,71	11,98	5,99
21	112,46	77,69	38,84

LD 12:12 Gesamtretna <i>Clock-/-</i>			
<i>Gna11</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	126,61	16,69	8,35
3	108,80	19,10	9,55
6	102,63	26,23	13,11
9	112,47	23,42	11,71
12	107,05	24,86	12,43
15	79,72	12,41	6,21
18	78,08	38,74	19,37
21	84,65	18,79	9,39

LD 12:12 Gesamtretna <i>Clock+/+</i>			
<i>Gna12</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	73,55	56,87	28,43
3	65,09	37,58	18,79
6	195,90	229,66	114,83
9	49,83	68,22	34,11
12	77,93	42,62	21,31
15	47,09	60,28	30,14
18	71,73	71,00	35,50
21	197,83	242,50	121,25

LD 12:12 Gesamtretna <i>Clock-/-</i>			
<i>Gna12</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	113,89	78,06	39,03
3	164,55	183,05	91,52
6	46,05	40,65	20,33
9	97,29	71,28	35,64
12	21,69	16,75	8,38
15	70,03	71,49	35,75
18	63,18	57,08	28,54
21	223,32	185,06	92,53

LD 12:12 Gesamtretna <i>Clock</i> +/+			
<i>Gna13</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	144,74	105,25	52,62
3	55,28	53,98	26,99
6	162,97	148,55	74,28
9	73,36	47,53	23,77
12	77,33	65,23	32,62
15	52,06	21,95	10,98
18	143,88	151,05	75,53
21	90,38	54,54	27,27

LD 12:12 Gesamtretna <i>Clock</i> -/-			
<i>Gna13</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	92,21	20,69	10,35
3	112,90	16,30	8,15
6	121,66	32,82	16,41
9	110,91	21,99	11,00
12	132,85	42,45	21,23
15	75,08	11,56	5,78
18	71,74	36,17	18,08
21	82,66	8,39	4,20

LD 12:12 Gesamtretna <i>Clock</i> +/+			
<i>Gai1</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	73,45	64,86	32,43
3	94,35	51,49	25,75
6	87,41	62,95	31,47
9	178,63	197,98	98,99
12	169,39	194,60	97,30
15	41,85	15,82	7,91
18	110,93	137,69	68,85
21	43,97	23,55	11,78

LD 12:12 Gesamtretna <i>Clock</i> -/-			
<i>Gai1</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	47,20	42,36	21,18
3	70,09	43,02	21,51
6	33,96	30,22	15,11
9	323,23	317,99	159,00
12	106,11	127,18	63,59
15	38,38	34,02	17,01
18	49,62	50,01	25,00
21	131,41	137,00	68,50

LD 12:12 Gesamtretna <i>Clock</i> +/+			
<i>Gai2</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	109,93	93,67	46,84
3	40,47	31,85	18,39
6	91,65	85,80	42,90
9	56,96	38,67	19,34
12	81,79	52,18	26,09
15	101,96	64,03	32,01
18	231,26	291,63	145,82
21	71,10	22,43	11,22

LD 12:12 Gesamtretna <i>Clock</i> -/-			
<i>Gai2</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	88,84	87,44	43,72
3	49,48	30,87	15,43
6	65,46	29,80	14,90
9	104,05	126,52	63,26
12	141,99	185,35	92,67
15	61,01	23,18	11,59
18	46,55	51,81	25,90
21	242,62	179,19	89,60

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock</i> +/+			
<i>Gai3</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	102,54	51,11	25,55
3	66,96	31,71	18,31
6	102,35	48,74	24,37
9	89,80	44,94	22,47
12	80,92	40,16	20,08
15	57,98	24,78	12,39
18	223,38	253,51	126,76
21	67,81	32,44	16,22

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock</i> -/-			
<i>Gai3</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	92,32	14,07	7,04
3	92,08	23,64	11,82
6	91,87	26,09	13,05
9	106,73	31,22	15,61
12	98,48	20,55	10,28
15	69,24	17,44	8,72
18	64,26	19,26	9,63
21	185,03	122,51	61,25

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock</i> +/+			
<i>Gnao</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	95,61	24,05	12,03
3	103,82	26,78	13,39
6	101,48	19,65	9,83
9	103,54	9,55	4,78
12	84,56	33,90	16,95
15	78,00	31,73	15,86
18	114,41	21,65	10,83
21	118,58	72,77	36,38

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock</i> -/-			
<i>Gnao</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	101,78	10,05	5,02
3	119,99	23,33	11,67
6	112,56	32,58	16,29
9	115,96	43,99	22,00
12	97,14	29,24	14,62
15	76,74	53,15	26,58
18	83,86	45,31	22,66
21	91,97	23,08	11,54

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock</i> +/+			
<i>Gnal</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	83,18	50,57	25,28
3	96,76	24,01	12,00
6	136,84	36,90	18,45
9	84,14	59,95	29,97
12	64,92	35,01	17,50
15	101,09	79,71	39,85
18	155,64	107,07	53,53
21	69,37	44,58	22,29

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock</i> -/-			
<i>Gnal</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	40,33	21,62	10,81
3	105,00	67,31	33,66
6	67,08	29,15	14,57
9	214,66	155,40	77,70
12	65,29	29,61	14,81
15	73,53	50,47	25,23
18	79,57	11,02	5,51
21	154,54	161,42	80,71

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock+/+</i>			
<i>Gnaq</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	124,84	78,68	39,34
3	82,49	31,93	15,96
6	132,04	36,88	18,44
9	67,64	43,42	21,71
12	73,55	30,54	15,27
15	91,35	82,08	41,04
18	137,18	64,52	32,26
21	90,91	69,99	34,99

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock-/-</i>			
<i>Gnaq</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	129,48	103,75	51,88
3	51,76	15,03	7,51
6	58,12	34,70	17,35
9	128,77	105,67	52,83
12	65,52	27,05	13,53
15	51,15	24,17	12,09
18	67,09	9,24	4,62
21	248,12	166,05	83,03

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock+/+</i>			
<i>Gnb1</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	104,90	43,65	21,82
3	87,51	24,64	12,32
6	127,90	36,27	18,13
9	110,96	20,77	10,39
12	79,48	13,49	6,74
15	73,05	9,66	4,83
18	112,56	45,33	22,66
21	103,65	22,06	11,03

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock-/-</i>			
<i>Gnb1</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	93,05	17,75	8,88
3	101,70	36,14	18,07
6	76,07	21,90	10,95
9	98,16	40,02	20,01
12	80,30	27,43	13,71
15	85,60	23,66	11,83
18	58,24	19,05	9,52
21	206,86	161,41	80,71

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock+/+</i>			
<i>Gnb2</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	97,30	42,70	21,35
3	92,95	24,28	12,14
6	107,52	54,67	27,34
9	99,59	39,65	19,82
12	77,08	33,18	16,59
15	79,53	23,45	11,72
18	152,76	145,77	72,89
21	93,25	18,22	9,11

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock-/-</i>			
<i>Gnb2</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	108,82	39,81	19,91
3	87,81	29,98	14,99
6	75,49	23,74	11,87
9	98,49	50,82	25,41
12	80,69	25,30	12,65
15	72,58	19,36	9,68
18	52,01	8,75	4,37
21	224,11	141,15	70,58

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock</i> +/+			
<i>Gnb3</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	112,82	45,15	22,57
3	82,57	15,04	7,52
6	100,71	65,42	32,71
9	114,09	26,04	13,02
12	81,04	24,77	12,38
15	89,12	14,60	7,30
18	126,64	21,16	10,58
21	93,01	52,63	26,32

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock</i> -/-			
<i>Gnb3</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	73,82	27,62	13,81
3	77,34	52,00	26,00
6	71,13	35,57	17,79
9	71,54	30,25	15,13
12	188,05	238,18	119,09
15	71,45	26,92	13,46
18	56,45	41,16	20,58
21	190,23	181,59	90,79

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock</i> +/+			
<i>Gnb4</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	128,21	22,33	11,17
3	110,81	22,89	11,45
6	119,34	40,99	20,49
9	117,25	36,91	18,46
12	92,82	30,65	15,33
15	71,66	13,42	6,71
18	91,35	52,76	26,38
21	68,55	18,94	9,47

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock</i> -/-			
<i>Gnb4</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	114,87	29,51	14,76
3	85,05	34,78	17,39
6	77,47	13,07	6,54
9	111,74	37,13	18,57
12	92,51	34,51	17,26
15	87,59	25,93	12,96
18	70,21	27,06	13,53
21	160,56	117,91	58,96

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock</i> +/+			
<i>Gnb5</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	103,05	35,80	17,90
3	81,78	8,99	4,49
6	109,80	29,44	14,72
9	113,16	16,66	8,33
12	93,00	34,61	17,31
15	81,32	9,08	4,54
18	126,84	46,96	23,48
21	91,06	15,24	7,62

LD 12:12 Gesamtretina <i>Clock</i> -/-			
<i>Gnb5</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	94,97	25,53	12,76
3	83,64	34,41	17,21
6	91,86	27,69	13,84
9	93,78	25,45	12,73
12	86,98	27,84	13,92
15	82,03	22,71	11,36
18	64,09	24,01	12,01
21	202,65	161,06	80,53

LD 12:12 Gesamtretna <i>Clock</i> +/+			
<i>Gngt1</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	100,28	64,69	32,35
3	85,90	11,04	5,52
6	163,34	49,14	24,57
9	97,34	27,51	13,75
12	83,75	31,73	15,87
15	59,08	13,94	6,97
18	146,81	158,87	79,43
21	63,50	32,63	16,31

LD 12:12 Gesamtretna <i>Clock</i> -/-			
<i>Gngt1</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	107,82	38,26	19,13
3	71,65	25,29	12,65
6	75,08	22,09	11,04
9	95,69	43,97	21,99
12	115,14	78,40	39,20
15	63,16	8,94	4,47
18	70,55	13,23	6,62
21	200,91	125,29	62,64

LD 12:12 Gesamtretna <i>Clock</i> +/+			
<i>Gngt2</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	116,65	47,93	23,97
3	104,48	29,31	14,65
6	135,03	31,38	15,69
9	108,78	44,57	22,29
12	80,96	13,12	6,56
15	82,12	9,56	4,78
18	104,27	22,42	11,21
21	67,71	25,33	12,67

LD 12:12 Gesamtretna <i>Clock</i> -/-			
<i>Gngt2</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	102,35	19,33	9,66
3	105,75	45,22	22,61
6	96,47	29,28	14,64
9	88,22	35,54	17,77
12	69,48	21,64	10,82
15	102,98	36,37	18,19
18	60,78	15,42	7,71
21	173,97	145,89	72,94

DD Gesamtretna <i>Clock</i> +/+			
<i>Gnaz</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	114,04	47,55	23,77
3	95,17	7,50	3,75
6	85,28	39,96	19,98
9	44,70	41,88	20,94
12	100,10	21,49	10,74
15	120,35	32,70	16,35
18	126,11	54,39	27,20
21	114,26	14,55	7,27

LD 12:12 Photorezeptoren <i>Clock</i> +/+			
<i>Gnaz</i>			
ZT	Mittelwert	SE	SEM
0	121,50	17,71	8,85
3	74,89	16,63	8,32
6	75,79	11,12	5,56
9	64,79	20,78	10,39
12	83,13	23,09	11,54
15	106,36	33,34	16,67
18	165,53	61,29	30,64
21	108,02	33,61	16,80

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. et med. habil. Rainer Spessert für die Vergabe dieses sehr interessanten Dissertationsthemas und vor allem für seine herzliche und geduldige Betreuung.

Mein weiterer Dank gilt der gesamten AG Spessert für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt Frau Ute Frederiksen, Frau Kristina Schäfer und Herrn Dr. Patrick Vancura für die geduldige Einarbeitung, stetige Unterstützung sowie für das Korrekturlesen der Dissertationsschrift.

Für die statistische Beratung möchte ich mich bei Frau Dr. Veronika Weyer-Elberich und Herrn Philipp Mildenerger aus dem Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik bedanken.

Mein ausdrücklicher Dank gilt **meiner besten Freundin Salsabeel Amro** für ihr unermüdliches, geduldiges Zuhören und die unaufhörliche Ermutigung und Aufmunterung. Sie hat sicherlich maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit, insbesondere in der schwierigen Endphase, beigetragen.

Ganz besonders möchte ich mich ebenfalls bei **meinem Bruder und besten Freund Abdallah** bedanken, für die vielen Jahre, die wir gemeinsam in unserem Studium fern von Heimat und Familie überstanden haben. Ohne seine Unterstützung und die vielen witzigen, schönen und manchmal frustrierende Zeiten, die wir zusammen erlebt haben, hätte ich diesen schwierigen Weg nicht bewältigen können. Mein Dank gilt ebenfalls seiner lieben Frau Hebh, die mir stets wie eine eigene Schwester steht und für mich da ist.

An letzter, doch eigentlich an erster Stelle, **möchte ich meinen Eltern, Abdelnasser und Halima**, von ganzem Herzen danken und ihnen diese Arbeit widmen. Ich bin zutiefst dankbar eure bedingungslose Liebe, euren Glauben an mich, eure Geduld und eure unermüdliche Hilfe in Wort und Tat. Ohne euch wäre mein bisheriger Weg nicht möglich gewesen.

Danke!