

Untersuchung zur morphologischen Integrität der organotypischen Retinakultur von adulten C57Bl6 Mäusen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Leonie Luise Laucke
aus Braunschweig

Gießen 2017

Aus der Arbeitsgruppe experimentelle Ophthalmologie (Prof. Dr. Dr. Knut Stieger) der
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde (Direktorin: Prof. Dr. Birgit Lorenz), der Justus-
Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Gutachter: PD Dr. Ulrich Gärtner

Tag der Disputation: 05.12.2017

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Anatomie des Wirbeltierauges	2
1.1.1 Aufbau der Retina	2
1.1.2 Photorezeptoren.....	3
1.1.2.1 Ribbon Synapse	5
1.1.3 Bipolarzellen.....	7
1.1.4 Gliazellen	7
1.1.4.1 Makroglia	8
1.1.4.2 Mikroglia	9
1.2 Neurodegenerative Vorgänge in der Netzhaut.....	9
1.2.1 Neuronale Veränderungen: Sprouting	11
1.2.2 Gliale Veränderungen: Gliose	11
1.2.3 Zelltod: Apoptose	12
1.2.4 Retinitis Pigmentosa	13
1.2.4.1 Therapiemöglichkeiten	14
1.3 Organotypische Retinakultur	17
1.4 Ziel der Arbeit.....	17
2 Material und Methodik.....	18
2.1 Herstellung der organotypischen Retinakultur.....	18
2.1.1 Präparation der Retina	18
2.1.2 Vorbereitung der Retina für die Herstellung von Kryostatschnitten	18
2.1.3 Herstellung von Kryostatschnitten.....	19
2.1.4 TUNEL-Assay	19
2.1.5 Immunfärbungen	20
2.1.6 Antigen-Retrieval.....	21
2.1.7 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	22
2.1.8 Bildbearbeitung	23
2.1.9 Kernreihenzählung	23
2.1.10 Verwendete Antikörper.....	24
2.2 Verwendete Materialien	26
2.2.1 Puffer, Farbstoffe, Assays und Medien	26
2.2.2 Primärantikörper.....	27
2.2.3 Sekundärantikörper	28
2.2.4 Verbrauchsmaterialien	28

2.2.5 Geräte und Software	29
3 Ergebnisse	31
3.1 Identifizierung verschiedener Phänotypen der organotypischen Retinakultur	31
3.1.1 Identifizierung anhand der PKC α +CtBP2-Färbung	31
3.1.2 Identifizierung anhand der ONL-Dicke	35
3.1.3 Identifizierung anhand der Zellkernmorphologie	39
3.2 Morphologische Veränderungen der retinalen Neurone und Gliazellen während der Retinakultur.....	40
3.2.1 GFAP und GS	40
3.2.2 TUNEL	44
3.2.3 AIF	46
3.3 Nachweis und Vorkommen von DNA-Schadens-und Reparaturproteinen während der Retinakultur.....	48
3.3.1 γ H2AX	48
3.3.2 53BP1	51
3.3.3 Ku80	53
3.3.4 CtIP	55
4 Diskussion	57
4.1 Ursachen verschiedener Phänotypen der organotypischen Retinakultur ..	57
4.2 Morphologische Veränderungen der retinalen Neurone und Gliazellen während der Retinakultur.....	58
4.3 Zelleigene DNA-Reparaturwege in der Retinakultur	60
4.4 Apoptose-Nachweis	63
4.5 Schlussfolgerungen	65
5 Zusammenfassung.....	67
6 Summary	68
Abbildungsverzeichnis	69
Tabellenverzeichnis	69
Literaturverzeichnis	70
Erklärung zur Dissertation	80
Danksagung.....	81

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
53BP1	p53 <i>binding protein 1</i>
AAV	adeno-assoziierte Viren
AIF	<i>apoptosis-inducing-factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bak	Bcl-2 Killer Proteine
Bax	Bcl-2 assoziierte X-Proteine
CC	<i>connecting cilium</i>
CtBP2	C-terminales Bindungsprotein 2
CtIP	<i>C-terminal binding interacting protein</i>
d	days (Tage)
DISC	<i>death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
GCL	<i>ganglion cell layer</i> (Ganglienzellschicht)
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GS	Glutaminsynthetase
HDR	<i>homology directed repair</i>
ILM	<i>inner limiting membrane</i> (innere Grenzmembran)
INL	<i>inner nuclear layer</i> (innere Körnerschicht)
IPL	<i>inner plexiform layer</i> (innere plexiforme Schicht)
IS	<i>inner segments</i> (Innensegmente der Photorezeptoren)
LCA	<i>Leber's congenital amaurosis</i> (Lebersche kongenitale Amaurose)
MMEJ	<i>microhomology-mediated end joining</i>
ms	mouse (Maus)
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
OLM	<i>outer limiting membrane</i> (äußere Grenzmembran)
ONL	<i>outer nuclear layer</i> (äußere Körnerschicht)
OPL	<i>outer plexiform layer</i> (äußere Körnerschicht)
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PKC α	<i>protein kinase C alpha</i>
rb	<i>rabbit</i> (Kaninchen)
RPE	retinales Pigmentepithel
RPGR	<i>retinitis pigmentosa GTPase regulator</i>

siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TdT	<i>terminal desoxynucleotidyl transferase</i>
TUNEL	<i>Tdt-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
W	Watt
XLRP	<i>x-linked retinitis pigmentosa</i>

1 Einleitung

Retinitis pigmentosa ist eine mutationsbedingte Netzhauterkrankung, bei der es zum Absterben der Photorezeptoren kommt. Erste Symptome äußern sich in Nachtblindheit. Im weiteren Verlauf kann die Erkrankung zu einem stark eingeschränkten Sichtfeld bis hin zum Tunnelblick und in schweren Formen zur Erblindung führen. Für Retinitis pigmentosa sowie für viele andere mutationsbedingte degenerative Erkrankungen der Retina gibt es derzeit noch keine Therapiemöglichkeiten.

Aussichtsreich erscheint die Methode der Gentherapie. Als intermediäres System zwischen *in-vivo*-Experimenten und primären Zellkulturen stellt die organotypische Retinakultur ein bereits vielfach genutztes System dar. Sie bietet die Möglichkeit, die *in-vivo*-Situation im Labor zu simulieren.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, ob sich die adulte, 9 Monate alte, murine organotypische Retinakultur als Modell eignet, um Methoden der Gentherapie als Therapiemöglichkeit für Retinitis pigmentosa erforschen zu können. Für den theoretischen Hintergrund werden zunächst der Aufbau des Wirbeltierauges und anschließend die Retina mit ihren zellulären Bestandteilen beschrieben. Es folgt eine Darstellung der neurodegenerativen Prozesse, wie sie in degenerativen Erkrankungen der Retina vorkommen können. Anschließend wird die Gentherapie als Therapiemöglichkeit der Retinitis pigmentosa vorgestellt und die organotypische Retinakultur beschrieben. Darauf aufbauend wird die oben angegebene Kernfrage beantwortet, indem im Ergebnisteil immunhistochemische Färbungen der organotypischen Retinakultur beschrieben werden. Während der Kultivierung konnte das Auftreten zweier morphologisch verschiedener Phänotypen beobachtet werden, deren Unterschiede dargestellt werden. Weiterhin werden die morphologischen Veränderungen und das Vorkommen zelleigener DNA-Schadens- und Reparaturproteine während der Retinakultur aufgezeigt. Der Diskussionsteil der Arbeit beinhaltet schließlich die Interpretation der Ergebnisse und beleuchtet mögliche Ursachen für das Vorkommen der beiden morphologisch unterschiedlichen Phänotypen.

1.1 Anatomie des Wirbeltierauges

Das Auge ist ein kugelförmiges, lichtempfindliches Sinnesorgan, das Lichtreize aufnimmt und in elektrische Signale umwandelt. Der Augapfel lässt sich in folgende drei Häute unterteilen: Die äußere Augenhaut (Tunica fibrosa bulbi) bestehend aus der Lederhaut (Sklera) und der Hornhaut (Cornea), der mittleren Augenhaut (Tunica vasculosa bulbi) bestehend aus der Regenbogenhaut (Iris), dem Ziliarkörper (Corpus ciliare) und der Aderhaut (Choroidea) und der inneren Augenhaut. Letztere wird von der Retina gebildet (Abb. 1A, Veleri et al. 2015). Das Licht passiert zunächst die Cornea, welche den Hauptteil der Lichtbrechung zur Bildfokussierung übernimmt (Purves et al. 2008). Anschließend passiert das Licht die Linse. Durch die an ihr ansetzenden Ziliarmuskeln kann die Brechkraft der Linse verändert und dadurch das Fokussieren des Auges ermöglicht werden. Vergleicht man den Aufbau des menschlichen Auges mit dem der Maus, so liegt der wesentliche Unterschied in der deutlich größeren Linse des Mausauges (Abb. 1A, Veleri et al. 2015). Im Innenraum des Auges befindet sich der Glaskörper. Nachdem das Licht den physikalisch-optischen Teil passiert hat, kann es durch den rezeptiven Teil des Auges, der Retina wahrgenommen werden (Kolb 2007). Der Aufbau der Retina ist Gegenstand des nun folgenden Unterabschnittes.

1.1.1 Aufbau der Retina

Die Retina befindet sich im Inneren des Augapfels und enthält Zellen zur Lichtwahrnehmung und ersten Bildverarbeitung. Entwicklungsgeschichtlich ist die Retina ein Teil des Gehirns. Sie lässt sich in mehrere Schichten gliedern, wobei drei zellkernreiche von zwei zellkernarmen Schichten unterbrochen werden (Abb. 1B). Die äußerste Schicht wird durch das retinale Pigmentepithel (*RPE*) gebildet. Das RPE stellt eine Barriere für das eintreffende Licht dar, infolge des schwarz gefärbten Melanins (Strauss 2005). Das eintreffende Licht wird dadurch absorbiert, die Streustrahlung reduziert und somit der darunter liegende Teil des Auges vor phototoxischen Schäden geschützt (Acharya et al. 2008; Slijkerman et al. 2015). Des Weiteren ist das RPE für die Versorgung der Photorezeptoren mit Retinal und das Recyclen der Photorezeptormembranscheiben zuständig (Baehr et al. 2003). Das RPE ist Teil der Blut-Retina-Schranke und wird durch die Bruch-Membran von der Choroidea getrennt (Campbell & Humphries 2013). Dem RPE liegt nach innen die äußere Körnerschicht, die *ONL* (*outer nuclear layer*) auf, die durch die Zellkerne der Photorezeptoren gebildet wird. Das Licht passiert zuerst alle Schichten der Retina, bis es von den Photorezeptoren aufgenommen und zuerst in ein biochemisches Signal und anschließend in ein elektrisches Signal umgewandelt wird (Kolb 2005). Die auf die ONL folgende, nach innen

gerichtete Schicht ist die *OPL* (*outer plexiform layer*). In dieser Schicht sind die synaptischen Verschaltungen lokalisiert, über welche das Signal von den Axonterminalien der Photorezeptoren an die Dendriten der Bipolar- bzw. Horizontalzellen weitergeleitet wird (Cuenca et al. 2014). Dieser Signalfuss kann durch die Horizontalzellen moduliert werden. Glaskörperwärts davon befindet sich die *INL* mit den Zellkörpern der Bipolar-, Horizontal-, Müller- und Amakrinzellen. In der sich nach innen anschließenden *IPL* wird das Signal der Bipolarzellen an die Ganglienzellen weitergeleitet. Die Amakrinzellen können über laterale Verbindungen auf die Signalübertragung einwirken. Die Ganglienzellen bilden mit ihren Axonen den Sehnerv und leiten die Information an das Gehirn weiter. Im Folgenden sollen die zellulären Bestandteile der Retina näher beleuchtet werden.

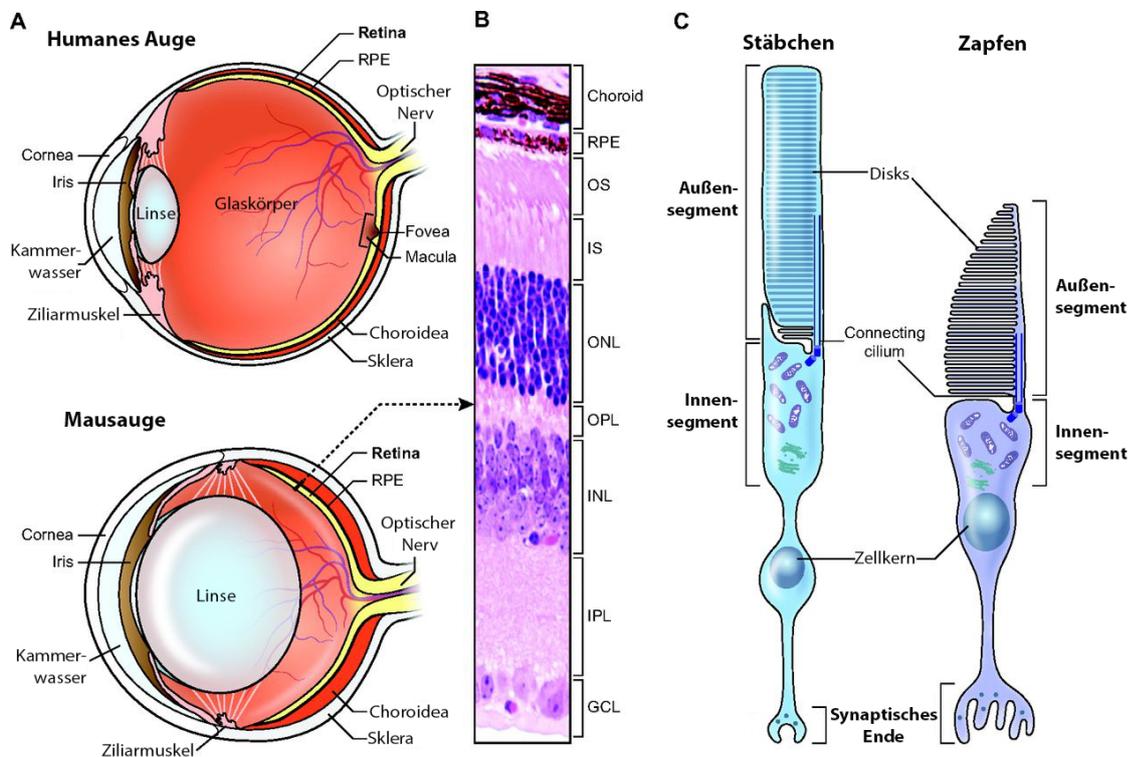


Abbildung 1: Aufbau eines humanen und eines Mausauges. (A) Schematischer Querschnitt (B) Färbung eines Retina-Schnittes mit Hämatoxylin und Eosin (C) Schematischer Aufbau von Stäbchen und Zapfen. Abbildung aus Veleri et al. 2015, modifiziert. Erläuterung siehe Text.

1.1.2 Photorezeptoren

Die Photorezeptoren der Retina sind für die Aufnahme und Umwandlung des Lichtes in elektrische Signale zuständig. Bei den Photorezeptoren lassen sich Außensegment, Innensegment, Zellkern und Axon unterscheiden (Abb. 1C). Der Zellkern des Photorezeptors ist in der ONL lokalisiert. Das Außensegment wird von mehreren Stapeln aus Membranscheiben, den sogenannten Photorezeptordisks, gebildet. Hier findet die

Einleitung

Phototransduktion statt. Die Membranscheiben werden zeitlebens kontinuierlich erneuert (Wolfrum & Schmitt 2000), wobei die verbrauchten Scheiben am distalen Ende des Außensegments durch Zellen des retinalen Pigmentepithels phagozytiert werden (Young 1976). Außerdem können toxische Produkte, die durch die Phototransduktion entstanden sind, ausgeschleust werden (Kuznetsov 2013). Im Innensegment der Photorezeptoren findet die Proteinbiosynthese von neuen Proteinen statt, wie Membranbausteine, Proteine der Sehkaskade und Rhodopsin, die im Außensegment gebraucht werden. Die beiden Segmente des Photorezeptors werden durch eine dünne Verbindungsstelle, dem Connecting Cilium (CC), miteinander verbunden. Durch intrazelluläre Transportproteine werden die Membranbausteine durch das CC an das Außensegment des Photorezeptors befördert (Schmitt & Wolfrum 2001).

Bei den Photorezeptoren werden Stäbchen und Zapfen unterschieden. Die Stäbchen sind für das Hell- und Dunkelsehen, die Zapfen für das hochauflösende Tages- und Farbsehen zuständig. Stäbchen können bereits eine geringe Intensität von Licht wahrnehmen und ermöglichen so die Nachtsicht (Sampath & Rieke 2004). Zapfen sind 100 mal weniger sensibel auf Licht, können aber deutlich schneller reagieren als Stäbchen (Hoon et al. 2014). Beim menschlichen Auge gibt es drei verschiedene Zapfentypen, sie sind somit Trichromaten. Jeder Zapfentyp ist auf eine bestimmte Wellenlänge sensibel. Die S- (short, blau) Zapfen haben ihr Absorptionsmaximum bei kurzen Wellenlängen von 420 nm, die M- (middle, grün) Zapfen bei mittleren Wellenlängen von 530 nm und die L- (long, rot) Zapfen bei langen Wellenlängen von 560 nm (Solomon & Lennie 2007; Calkins & Sterling 1999).

Beim Menschen und den meisten Primaten gibt es eine Region, die ausnahmslos nur Zapfen aufweist, die Fovea centralis (Hofmann & Palczewski 2015). Hier sind hauptsächlich M- und L-Zapfen lokalisiert. Es besteht eine Verschaltung von 1:1, d. h. jeder Photorezeptor ist über eine Bipolarzelle mit einer Ganglienzelle verschaltet (Kolb 2003). Dadurch wird in der Fovea centralis das größte Auflösungsvermögen erreicht und somit der Punkt des schärfsten Sehens.

Die Anatomie der Netzhaut ist optimal an die Umgebung der jeweiligen Spezies angepasst. Mäuse sind nachtaktiv und besitzen eine stäbchendominierte Retina (97,2 %) mit nur wenigen Zapfen (2,8 %) (Jeon et al. 1998; Cuenca et al. 2014). Sie sind Dichromaten, d. h., sie besitzen nur zwei verschiedene Zapfentypen, die M- und S-Zapfen (Haverkamp 2005). Die M-Zapfen der Maus sind auf Licht mittlerer Wellenlänge nahe 510 nm und die S-Zapfen auf Licht nahe der Wellenlänge von 350 nm sensibel,

also UV-sensitiv (Lyubarsky et al. 1999; Jacobs et al. 2004). Die M-Zapfen existieren ausschließlich in der dorsalen Hälfte der Mausretina, hingegen sind die UV-Zapfen grundsätzlich auf die ventrale Hälfte verteilt (Szel et al. 1992). In der Mausretina gibt es keine Fovea (Veleri et al. 2015).

1.1.2.1 Ribbon Synapse

Nachdem das Licht von den Photorezeptoren in ein neuronales Signal umgewandelt wurde, wird es über die Ribbon-Synapse an die Bipolarzellen (s. 1.1.3) weitergeleitet. Die Ribbon-Synapse ist eine neuronale Synapse, hochspezialisiert auf die Anforderungen von Sinneswahrnehmungen wie Sehen (Sejnowski & Yodlowski 1982). Ihre komplexe Anatomie ermöglicht die extrem schnelle Weitergabe von Informationen an das nachgeschaltete Neuron. Das sogenannte Ribbon ist ein elektronendichtes Band in der Nähe der aktiven Zone der Synapse (Abb. 2). Hieran sind Hunderte von synaptischen Vesikeln gekoppelt. Somit können deutlich höhere Mengen an Vesikeln in den synaptischen Spalt freigegeben werden als bei anderen neuronalen Synapsen (Lenzi & Von Gersdorff 2001). Pro Ribbon können bis zu 500 Vesikel pro Sekunde ausgeschüttet werden, was es den Photorezeptoren ermöglicht, bereits kleine Unterschiede in der Lichtintensität wahrzunehmen (Schmitz 2009). Stäbchen-Synapsen beinhalten ein großes Ribbon (200 nm Länge), welches sich um die Postsynapse biegt und dadurch eine hufeisenförmige Struktur aufweist. Zapfen haben größere Terminalien und besitzen mehrere kleine Ribbons mit kürzerer aktiver Zone. Im Lichtmikroskop erscheinen sie perlschnurartig (Tom Dieck & Brandstätter 2006). Synaptische Ribbons ragen ungefähr 200 nm in den synaptischen Spalt und sind circa 30 nm dick (Sterling & Matthews 2005).

Das synaptische Ribbon ist aus einem Proteingerüst aufgebaut, wobei noch nicht alle Proteine vollständig identifiziert wurden (Tom Dieck et al. 2005). Ein zentraler Baustein des Ribbons ist RIBEYE. Es ist das bisher einzig bekannte Protein, das ausschließlich in der Ribbon-Synapse vorkommt. RIBEYE besteht aus einer A- und einer B-Domäne (Heidelberger et al. 2005). Die B-Domäne ist nahezu identisch mit dem C-terminalen Bindeprotein 2 (CtBP2, Magupalli et al. 2008). Ein weiteres mit dem Ribbon assoziiertes Protein ist das Kinesin Motorprotein KIF3A, dessen Funktion noch nicht hinreichend geklärt ist (Tom Dieck et al. 2005). Zudem konnten Piccolo und Bassoon als Komponenten identifiziert werden. Bassoon scheint bedeutend für die Verankerung des Ribbons zu sein, da bei Bassoon-Knockout-Mäusen die Ribbons frei schwimmend im Zytoplasma vorzufinden waren (Tom Dieck et al. 2005).

Einleitung

Konventionelle Neuronen nutzen Aktionspotentiale, um Informationen weiterzugeben. Dies ist für komplexe Sinne wie Sehen nicht hinreichend. Photorezeptoren wirken über den neuronalen Transmitter Glutamat. Dieser wird im Dunkeln dauerhaft ausgeschüttet. Bei Lichteinfall kommt es zur Hyperpolarisation des Photorezeptors und zur Hemmung der Glutamatausschüttung. Durch Anfärbung der Vesikel konnte bei der Exozytose beobachtet werden, dass die Vesikel vor der Membran pausieren und schließlich beim Öffnen der Kalziumkanäle innerhalb von kürzester Zeit in den synaptischen Spalt ausgeschüttet werden (Zenisek et al. 2000). Anschließend kam es binnen Millisekunden zur Entfärbung, was für den *Kiss-and-Run*-Fusionsmechanismus spricht (Zenisek et al. 2002). Hierbei geben die Vesikel ihren Neurotransmitter ab, verschmelzen anschließend wieder mit der präsynaptischen Membran und können so recycelt werden (Llobet et al. 2003). Weiterhin ist die aktive Zone in der Lage, während starker Stimulation die Neurotransmitterausschüttung über mehrere Millisekunden aufrechtzuerhalten (Sterling & Matthews 2005). Dies impliziert zwei verschiedene Vorräte an Vesikeln, einen für die direkte Ausschüttung und einen anderen für die kontinuierliche Freigabe der Vesikel (Mennerick & Matthews 1996; Von Gersdorff et al. 1998; Singer & Diamond 2003). Das stärkt die Hypothese, bei dem synaptischen Ribbon handle es sich um eine Vorratsplattform für die Glutamatvesikel (Sterling & Matthews 2005). Die Funktionen des Ribbons wurden jedoch noch nicht ausreichend geklärt.

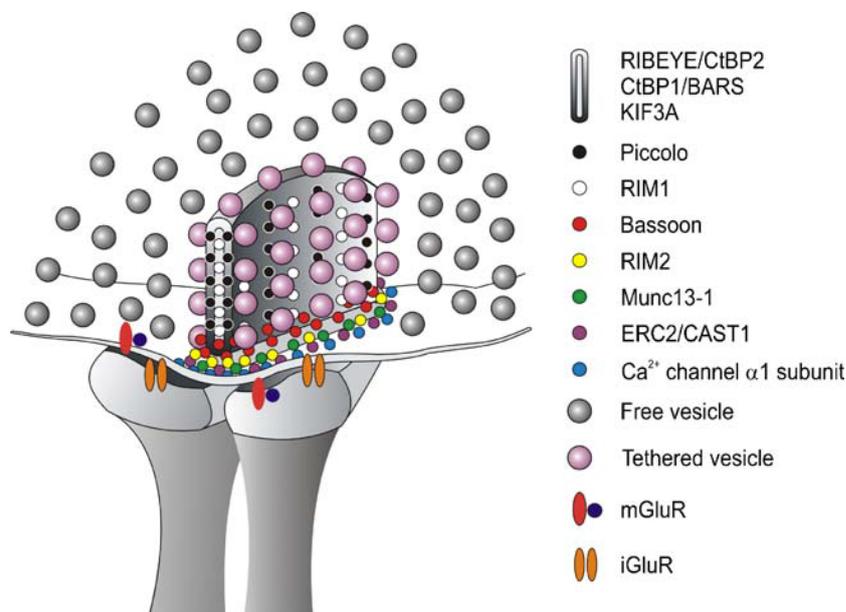


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines synaptischen Ribbons. Horizontal verlaufend die präsynaptische Photorezeptormembran, unterhalb zwei Bipolarzellendendriten, Abbildung aus Tom Dieck und Brandstätter, 2006.

1.1.3 Bipolarzellen

Nachdem das Licht von den Photorezeptoren in ein neuronales Signal umgewandelt wurde, wird es über die Ribbon-Synapse an die Bipolarzellen weitergeleitet. Diese sammeln das Signal und können modulierend darauf einwirken. Anschließend geben sie die Information an die Ganglienzellen weiter. Die Synapsen mit den Photorezeptoren formen in der OPL ein dichtes Netzwerk. Der Zellkörper der Bipolarzellen befindet sich in der INL. Morphologisch können Bipolarzellen anhand ihrer Form, dendritischer und axonaler Verzweigungen sowie der Anzahl an Photorezeptorkontakten unterteilt werden (Wassle et al. 2009; Greferath et al. 1990; Masland 2001). Demnach gibt es in der Säugetierretina bis zu zwölf verschiedene Typen an Bipolarzellen (Masland 2012).

Funktionell können Bipolarzellen in Stäbchen- und Zapfenbipolarzellen eingeteilt werden. Dabei bilden Zapfenbipolarzellen Kontakte zu Zapfen und Stäbchenbipolarzellen zu Stäbchen aus. Zapfenbipolarzellen können weiterhin in ON- und OFF-Bipolarzellen unterschieden werden. ON-Bipolarzellen depolarisieren und OFF-Bipolarzellen hyperpolarisieren bei Zunahme der Lichtintensität (Hoon et al. 2014). Dies ist durch die Expression von unterschiedlichen Glutamatrezeptoren an den Synapsen zu erklären (Wassle et al. 2009). Die Dendriten der Stäbchenbipolarzellen sind feiner als die der Zapfenbipolarzellen, sie ragen tiefer in die ONL hinein und ihr Dendritenbaum ist stärker verzweigt (Greferath et al. 1990).

In der Mäuseretina wurden bisher elf Zapfenbipolarzellen und eine Stäbchenbipolarzelle identifiziert. Es wird davon ausgegangen, dass hiermit der Zellkatalog vervollständigt wurde (Wassle et al. 2009). Es konnte bestätigt werden, dass jeder Zapfen mit den elf verschiedenen Bipolarzellen synaptische Verbindungen eingehen kann. Eine Ausnahme bildet die blaue Zapfenbipolarzelle, welche ausschließlich mit den S-Zapfen in Kontakt tritt (Masland 2012).

In der Fovea von Menschen und Primaten findet sich noch ein weiterer Bipolarzelltyp, die Midgetbipolarzelle. Diese ist mit lediglich einem Photorezeptor verschaltet und gibt ihre Information an eine einzige Ganglienzelle weiter (Provis et al. 2013). Dadurch wird in der Fovea das schärfste Auflösungsvermögen erreicht.

1.1.4 Gliazellen

Gliazellen sind Zellen, die von den Neuronen im Nervensystem abzugrenzen sind und zunächst nur als Hilfs- und Stütznetzwerk für das neuronale Gewebe bekannt waren. Heute ist wissenschaftlich nachgewiesen, dass Gliazellen weitaus mehr Aufgaben erfüllen, sie sind jedoch nicht an der Erregungsleitung beteiligt. In der Säugetierretina

gibt es drei verschiedene Typen Gliazellen. Man unterscheidet die Mikroglia und zwei Formen Makroglia, zu denen die Müllerglia und die Astrozyten zählen.

1.1.4.1 Makroglia

Mit einem Anteil von 90 % sind die Müllerglia die am häufigsten vorkommenden Glia in der Retina (Vecino et al. 2016). Sie durchziehen sie radiär und bilden ihre innere und äußere Grenzmembran (*inner limiting membrane*, ILM und *outer limiting membrane*, OLM), wobei sich ihre Zellkörper in der INL befinden. Nach apikal erstrecken sich mehrere Mikrovilli zwischen den Innensegmenten der Photorezeptoren, auf der basalen Seite befindet sich ein Endfuß. Insbesondere bei degenerativen Vorgängen werden die Zellkörper der Photorezeptoren von den Fortsätzen der Müllerzellen umhüllt (Hernández et al. 2010). Außerdem dienen sie als Bindeglied für den metabolischen Austausch zwischen Kompartimenten, wie Blutgefäßen, Glaskörperkammer und subretinalem Raum, mit den Neuronen und sind an der Blut-Retina-Schranke beteiligt (Bringmann, Pannicke, et al. 2009). Die Müllerzelle kann als Kern einer Mikroeinheit gesehen werden, dessen Milieu sie aufrechterhält (Vecino et al. 2016). So spielt die Müllerzelle eine entscheidende Rolle bei der Homöostase des Wasser- und Ionenhaushaltes der Retina (Bringmann et al. 2004). Ferner sind Müllerzellen am Glucosemetabolismus beteiligt und stellen Ausgangsstoffe für die Synthese von Neurotransmittern bereit (Bringmann et al. 2006). Durch die Entfernung von Glutamat aus dem Extrazellulärraum verhindern sie eine laterale Erregungsleitung (Rauen & Wießner 2000). Darüber hinaus sind sie für die Phagozytose von neuronalen Fragmenten zuständig (Kolb 1999). In der Literatur wird vorherrschend die Auffassung vertreten, dass die Müllerzellen lichtleitende Funktionen in der Retina erfüllen, die die Streuung reduzieren und als Lichtkollektor dienen (Franze et al. 2007; Labin & Ribak 2010). Hervorzuheben ist die sogenannte Gliose (s. 1.2.2), die eine Antwort der Müllerglia auf pathologische Veränderungen in der Retina ist.

Die Astrozyten werden ebenfalls zur Gruppe der Makroglia gezählt. Ihr Name leitet sich von ihrem sternförmigen Äußerem ab. Ihre Zellkörper befinden sich fast ausschließlich in den innersten Retinaschichten (Kolb 1999). Da sie über die Blutgefäße in die Retina eintreten, korrelieren Anzahl und Verteilung der Astrozyten mit dem Vorhandensein von Blutgefäßen (Vecino et al. 2016). Astrozyten sind die Hauptproduzenten des VEGFs (Vascular endothelial growth factor) und spielen somit eine bedeutende Rolle bei der retinalen Durchblutung. Viele ihrer Aufgaben haben sie mit den Müllerzellen gemeinsam. Ebenso wie diese können sie eine Gliose hervorrufen. Sie kontrollieren die retinale Homöostase und sind an der Blut-Retina-Schranke beteiligt, so können sie einerseits

neuroprotektive andererseits aber auch neurodegenerative Prozesse hervorrufen (Kim et al. 2006; Zhang et al. 2004; Pekny et al. 2014).

1.1.4.2 Mikroglia

Beim Menschen sind die Mikroglia in allen Retinaschichten lokalisiert (Kolb 1999). Bei der Maus sitzen die Mikroglia in den plexiformen Schichten (Karlstetter et al. 2014). Sie haben ein polymorphes Aussehen mit kleinem eiförmigen Zellkörper und vielen unregelmäßigen Verzweigungen (Garcia-Valenzuela et al. 2005). Mikroglia können in verschiedenen Aktivitätszuständen vorliegen. Als „ruhender“ oder „wachsender“ Typ haben sie einen kleinen Zellkörper mit großem Zellkern. Beim „aktivierten“ Zustand findet man amöboide Strukturen und Pseudopodien vor (Kettenmann et al. 2011). Es können zahlreiche Zwischenstadien vorkommen. Sie spielen in erster Linie durch ihre Phagozytoseaktivität eine Schlüsselrolle bei der Immunreaktion (Carson et al. 2006). Nennenswert in Bezug auf die Phagozytoseaktivität der Mikroglia ist der sogenannte „spider effect“. Spürt eine Spinne Vibrationen eines Eindringlings, so bewegt sie sich zunächst zu der Seite der Beute, jedoch anschließend zurück zur sicheren Seite in die Mitte des Netzes zurück. Ähnlich antworten Mikroglia auf lokale pathologische Prozesse. In Abhängigkeit vom extrazellulären Vorhandensein von ATP reagieren sie mit dem Zurückziehen ihrer Fortsätze und der anschließenden Bewegung in Richtung des Schadens (Davalos et al. 2005; Jonas et al. 2012). Mikroglia können auf bestimmte Stimuli mit der Sekretion von Zytokinen und neurotrophischen Faktoren reagieren. Außerdem haben sie enge Beziehungen zu den Neuronen und tragen zum Umbau der neuronalen Synapsen bei, wobei sie neuronale Zellreste und zerrüttete Synapsen eliminieren.

1.2 Neurodegenerative Vorgänge in der Netzhaut

Bei degenerativen Prozessen in der humanen Retina kommt es zu sichtbaren Umbauvorgängen, wodurch die typische Retinastruktur verloren geht. Diese Vorgänge lassen sich in vier verschiedene Phasen einteilen (Marc et al. 2007; Jones & Marc 2005).

In der **ersten Phase** wirkt sich das Vorhandensein von Stress negativ auf die Photorezeptoren aus. Er führt zu diversen molekularen Veränderungen und final zum Zelltod der Photorezeptoren. Klinische Symptome sind jedoch noch nicht erkennbar, die Funktionen der Retina sind nach wie vor gewährleistet (Abb. 3A, Cuenca et al. 2014).

Einleitung

Die **zweite Phase** ist vor allem durch das fortschreitende Absterben von Photorezeptoren und das Auftreten von Gliose (s. 1.2.2) gekennzeichnet. Die Müllerzellen schirmen die Retina durch die Verdickung und Verlängerung ihrer Fortsätze gegen die Umgebung ab (Abb. 3B, Jones & Marc 2005; Jones et al. 2003). Es kommt zur Delokalisation von Rhodopsin aus den Innensegmenten in Zellkerne und Axone der Photorezeptoren (Milam et al. 1998; Fariss et al. 2000). Dies konnte ebenfalls bei Tiermodellen mit Retinitis pigmentosa (s.1.2.4) beobachtet werden (Barhoum et al. 2008). In dieser Phase können viele pyknotische Zellkerne beobachtet werden, d. h. sie schrumpfen und ihr Chromatin verdichtet sich (Charteris et al. 2007). Die Photorezeptoren reagieren mit Verkürzung und Dekonstruktion ihrer Synapsen (Cuenca et al. 2014). Dies erwidern die Bipolarzellen mit Sprouting (s. 1.2.1) und dem Wechseln ihrer neuronalen Antwort von ON zu OFF (Jones et al. 2012).

In der **dritten Phase** kommt es zu massivem Verlust der Photorezeptoren. Bei Tiermodellen mit Retinitis pigmentosa wurde in dieser Phase begleitend der Verlust der visuellen Antwort im Elektroretinogramm nachgewiesen (Strettoi et al. 2002). Die Retina ist in ihrer Dicke deutlich reduziert und die verbleibenden Photorezeptoren weisen eine abnormale Morphologie auf. Dies wird u. a. sichtbar durch den Verlust ihrer Außensegmente (Abb. 3C, Marc et al. 2003). Es tritt eine erhöhte Anzahl an aktivierten Mikroglia auf und durch die gliale Mauer sprießen neue Blutgefäße ein. Die Bipolarzellen sind vollständig entdifferenziert und verstärkte Gliose (s. 1.2.2) ist nachweisbar.

In der **vierten Phase** kommt es aufgrund des Absterbens sämtlicher Photorezeptoren zum vollständigen Verlust der Sehkraft. Das retinale Pigmentepithel, die Bruch-Membran und die Blut-Retina-Schranke zerfallen und weitere Gefäße sprießen ein (Abb. 3D). Amakrin- und Bipolarzellen migrieren in die Ganglienzellschicht und führen zu der Ausbildung von Knoten. In diesen sogenannten Mikroneuromen bilden sich neue Synapsen und somit irreguläre Schaltkreise aus (Jones & Marc 2005). Es kommt außerdem zum Fortschreiten der Gliose (s. 1.2.2) und zu einer Steigerung der Mikrogliaaktivierung.

Die Einteilung in die vier Stadien macht es dem Ophthalmologen möglich, das Stadium der Erkrankung genau einzuordnen, und ist für die Wahl der entsprechenden Therapie hilfreich, da diese je nach Progressionsgrad unterschiedlich sein kann. Einzelne zelluläre Reaktionen, welche die bestimmten Phasen charakterisieren, sollen nun detaillierter dargestellt werden.

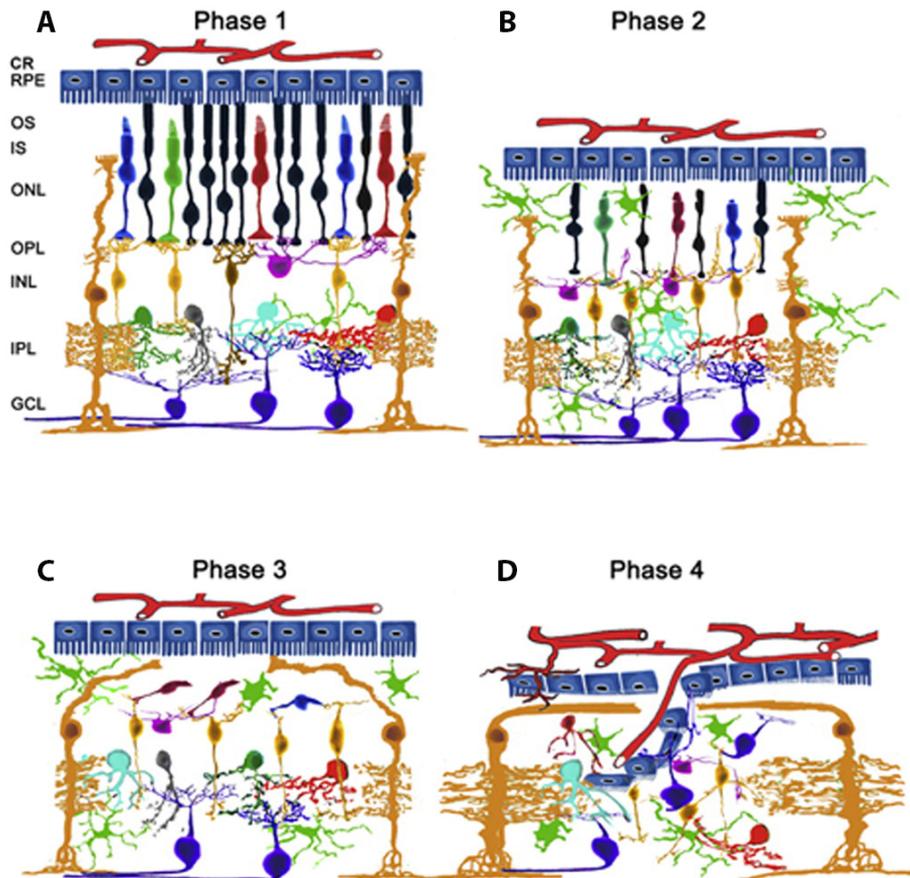


Abbildung 3: Degenerative Vorgänge in der Retina. Schematische Darstellung der verschiedenen Phasen der Degeneration. Abbildung aus Cuenca et al. 2014, modifiziert.

1.2.1 Neuronale Veränderungen: Sprouting

Sprouting ist ein häufig bei degenerativen Erkrankungen der Retina vorkommendes Phänomen. Kommt es in der Retina zum Zelltod der Photorezeptoren, so reagieren ihre synaptischen Partner, die Bipolarzellen, initial, indem sie ihre Dendriten zurückziehen (Cuenca et al. 2014). Anschließend reagieren sie jedoch mit dem sogenannten Sprouting, d. h. der Verlängerung ihrer Fortsätze, in dem Versuch neue synaptische Kontakte mit den verbleibenden Photorezeptoren einzugehen (Martinez-Navarrete et al. 2011). Sprouting wurde u. a. bei Tiermodellen mit Retinitis pigmentosa (s. 1.2.4) beschrieben (Cuenca et al. 2005).

1.2.2 Gliale Veränderungen: Gliose

Bei der Gliose handelt es sich um eine komplexe Reaktion, in welcher diverse Elemente eine Rolle spielen. Nach bspw. einem Trauma, einem ischämischen Schaden, einer Infektion, einer Neuroinflammation oder einer Neurodegeneration reagieren Müllerzellen und Astrozyten mit Gliose. Es wird angenommen, dass krankes oder verletztes Gewebe eine Molekulkaskade auslöst, woraufhin die Gliazellen ihren Status verändern (Fischer & Bongini 2010). Die Müllerzellen und Astrozyten hypertrophieren und rufen die

Verdickung und Verlängerung ihrer Fortsätze hervor (Hjelmeland & Harvey 1988). Typischerweise kommt es zur Hochregulation von Intermediärfilamenten, Expression von GFAP und Vimentin, zu einer erhöhten Proliferation, Entzündungsreaktionen, der Runterregulation der Expression von Glutaminsynthetase sowie zu einem Gewebe- und Gefäßumbau (Belecky-Adams et al. 2013). Die Gliose kann je nach Ausmaß in zwei Stadien eingeteilt werden: Bei der milden Form hypertrophieren die Glia und verändern ihre Funktionen. Nach Beseitigung der Ursache kehren sie zu ihrem ursprünglichen Zustand zurück. Die milde Form ist also reversibel. Bei der schweren Form hypertrophieren die Zellen ebenso, verlieren jedoch endgültig ihre ursprüngliche Funktion und es bildet sich Glia-Narbgewebe aus. Dieser Zustand ist irreversibel, die axonale Regeneration und der Fortbestand der Neurone wird gehemmt (Vecino et al. 2016). Demnach haben die Reaktionen der Müllerzellen und Astrozyten neuroprotektive aber auch neurodegenerative Folgen. Ein möglicher Auslöser für den Übergang der milden in die schwere Form ist der Kollaps der Blut-Retina-Schranke, wonach es zur Infiltration von Immunzellen und Zytokinen kommt (Bringmann, Landiev, et al. 2009).

1.2.3 Zelltod: Apoptose

Eine erhöhte Zellsterberate führt zu degenerativen Prozessen und kann in Bezug auf die Retina zur Erblindung führen, wie dies bei der Erkrankung der Retinitis pigmentosa der Fall ist. Drei verschiedene Arten von Zelltod (Typ I-III) werden unterschieden: Apoptose, Autophagozytose und Nekrose (Schweichel, Ju & Merker 1973; Galluzzi et al. 2009; Krysko et al. 2008).

Bei Typ I, der Apoptose, kommt es zur Kondensation von Kern und Zytoplasma. Die Zelle wird rundlich und schrumpft in sich zusammen (Elmore 2007; Saadat et al. 2015). Anschließend werden die verbleibenden Fragmente durch Makrophagen eliminiert (Murakami et al. 2013).

Bei Typ II, der Autophagozytose, kommt es nicht zur Kondensation oder Schwellung der Zelle, vielmehr werden die Zellorganellen durch Lysosomen degradiert und es bilden sich Einschlüsse im Zytoplasma aus, sogenannte Autolysosomen oder Autophagosomen (Mizushima et al. 2008; Boya et al. 2016).

Bei Typ III, der Nekrose, schwellen das Zytoplasma und die Zellorganellen soweit an, bis die Plasmamembran ruptiert und mit dem Extrazellulärraum in Verbindung tritt, mit der Folge, dass es zu einer Entzündungsreaktion kommt (Vandenabeele et al. 2010). Am häufigsten kommt es bei den Photorezeptoren zum Zelltod durch Apoptose, weshalb dieser Mechanismus nachfolgend genauer erklärt werden soll.

Beim Auslösen von Apoptose spielen Caspasen als Effektormoleküle eine wesentliche Rolle. Es gibt jedoch auch die Caspasen-unabhängige Apoptose. Caspasen werden als inaktive Vorstufen freigesetzt. Die Aktivierung erfolgt dann durch proteolytische Spaltung (Murakami et al. 2013). Die Apoptose kann durch einen extrinsischen (Apoptose Typ I) und einen intrinsischen Weg (Apoptose Typ II) ausgelöst werden. Der extrinsische Weg wird durch die Bindung eines Liganden an sogenannte Todesrezeptoren in der Plasmamembran eingeleitet. Hierbei kommt es zur Aktivierung von Caspase 8 und Bildung eines DISC (*Death inducing signaling complex*), wodurch eine Caspase-Kaskade ausgelöst wird (Peter & Kramer 2003). Bei der intrazellulär ausgelösten Apoptose werden pro-apoptotische Faktoren aus den Mitochondrien freigesetzt. In der Mitochondrienmembran kommt es zur Ausbildung von Bak-(Bcl-2 Killer Proteine) und Bax-(Bcl-2 assoziierte X-Proteine) Kanälen und dadurch zur Freisetzung von Cytochrom C. Cytochrom C bewirkt unter dem Vorhandensein von ATP die Bildung eines Apoptosoms, der aktivierten Form von Caspase 9, welches analog zu Caspase 8 eine Caspase-Kaskade auslöst (Murakami et al. 2013; Li et al. 1997). Wie bereits erwähnt, können auch Caspase-unabhängige Wege zum Photorezeptorzelltod führen. Hierbei kommt es zur Delokalisation von AIF (*apoptosis inducing factor*) aus den Photorezeptor-Mitochondrien in den Zellkern (Landshamer et al. 2008). Dies wird über die Freigabe von Calpain reguliert. Calpaine sind Cystein-Proteasen, die durch hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel aktiviert werden. Calpain reguliert ebenso wie die Freigabe von AIF auch die von Caspase 12 aus dem endoplasmatischen Retikulum (Sanges et al. 2006).

1.2.4 Retinitis Pigmentosa

Retinitis pigmentosa beschreibt eine Gruppe von heterogenen Netzhauterkrankungen, bei denen es zur Degeneration der Photorezeptoren in der Retina kommt. Es handelt sich um die häufigste erblich bedingte Netzhauterkrankung mit einer weltweiten Prävalenz von 1 zu 4000 (Hamel 2006). Typischerweise entwickeln die Patienten Schwierigkeiten bei der Dunkel-Adaption und nachfolgend Nachtblindheit. Außerdem kommt es zur Einschränkung des Gesichtsfeldes bis hin zum sogenannten Tunnelblick. Dies ist dadurch zu erklären, dass es primär zum Absterben der in der Peripherie lokalisierten Stäbchen kommt, die für das Hell-Dunkel-Sehen verantwortlich sind (Guadagni et al. 2015; Ferrari et al. 2011). Es kommt erst sekundär zur Degeneration der vermehrt in der Makula vorkommenden Zapfen, weshalb auch von einer Stäbchen-Zapfen-Degeneration gesprochen wird. Im fortgeschrittenen Stadium führt die Erkrankung daher auch zum Verlust des zentralen Gesichtsfeldes und somit zur vollständigen Erblindung. Es handelt sich jedoch um ein stark variables Krankheitsbild, bei dem manche Patienten bereits im Kindesalter erblinden, andere wiederum bleiben

bis zum mittleren Erwachsenenalter symptomlos (Hartong et al. 2006). Bei vielen Patienten kann es bereits zum schweren Stäbchenverlust vor dem Auftreten erster Symptome gekommen sein, da heutzutage auch die nächtliche Umgebung ausreichend ausgeleuchtet ist (Hartong et al. 2006). Retinitis pigmentosa wird zu 30-40 % autosomal-dominant, zu 50-60 % autosomal-rezessiv und zu 5-15 % X-chromosomal vererbt. Die X-chromosomale Form (*x-linked retinitis pigmentosa*, XLRP) wird bis zu 80 % durch eine Mutation im Retinitis-pigmentosa-GTPase-regulator- (RPGR) Gen verursacht (Guadagni et al. 2015). Hierbei handelt es sich um eine der schwersten Formen, häufig kommt es bereits im Kindesalter zur Erblindung. Sie macht bis zu 20 % aller Retinitis-pigmentosa-Erkrankungen aus (Shu et al. 2006).

1.2.4.1 Therapiemöglichkeiten

Bisher ist es noch nicht gelungen, eine erfolgreiche Therapie für die Erkrankung der Retinitis pigmentosa zu entwickeln. Als aussichtsreiche Methode wird momentan die Gentherapie erforscht, bei der das mutierte Gen durch eine gesunde Kopie ausgetauscht wird. Damit kann seine Funktion wiederhergestellt werden. Mit dieser Methode wird die Behandlung oder gar Heilung der an Retinitis pigmentosa erkrankten Patienten ermöglicht. Um ein therapeutisches Gen oder einen Genbereich *in vivo* in eine Zelle zu transportieren können verschiedene Vektoren genutzt werden. Bei der Transduktion wird das Genom mittels Virus in die Zelle eingebracht. Als Goldstandard wird zur Zeit der Adeno-assoziierte Virus (AAV) angesehen (Surace & Auricchio 2008). Klinische Erfolge konnten 2008 bei Patienten mit dem Befund der Leberschen kongenitalen Amaurose (LCA) nachgewiesen werden, einer degenerativen Netzhauterkrankung, die durch eine Genmutation im RPE65-Gen in den retinalen Pigmentepithelzellen verursacht wird (Maguire et al. 2008; Stieger & Lorenz 2010). In diesem Fall konnte die **Genadditionstherapie** durchgeführt werden. Hierbei wird lediglich eine korrekte cDNA Kopie in die Zelle eingebracht. Voraussetzung hierfür ist, dass das mutierte Protein nicht existent ist oder keinen toxischen Effekt ausübt. Bei Retinitis pigmentosa führt die Mutation jedoch zu einer veränderten Funktion, weshalb die Genadditionstherapie nicht ausreichend ist (Stieger & Lorenz 2010). Vor der Addition der korrekten cDNA Kopie muss die Expression des mutierten Gens runterreguliert werden. Im Englischen wird dies *Repression and Replacement* genannt. Eine solche **Gene silencing Therapie** kann durch *small interfering RNA* (siRNA) Technologie auf RNA-Ebene oder über Promoter *Silencing* auf der DNA-Ebene erfolgen. Diese Methode wurde bereits bei Mausmodellen mit degenerativen Netzhauterkrankungen angewandt (Chadderton et al. 2009). Es bestehen jedoch die Risiken der Entstehung von *Off-Target*-Effekten und die Aktivierung des Immunsystems via Toll-like-Rezeptoren (Grimm 2009). Eine weitere

Therapiemöglichkeit ist die Nutzung von **Homology directed repair** (HDR) über den zelleigenen DNA-Reparaturmechanismus der homologen Rekombination (HR). Diese Methode zielt darauf ab, DNA-Doppelstrangbrüche durch Endonukleasen zu induzieren, um die endogene mutierte Sequenz durch ein exogenes DNA-Reparaturkonstrukt *in vivo* austauschen zu können. DNA-Doppelstrangbrüche lassen sich mittlerweile gezielt durch verschiedene hochspezifische Nukleasen in der DNA hervorrufen (Pingoud & Wende 2011). Kommt es zu einem Doppelstrangbruch in der DNA, können drei verschiedene Reparaturmechanismen greifen (Abb. 4):

- Die homologe Rekombination erfolgt nur während der G2-Phase und S-Phase des Zellzyklus, wenn die Schwesterchromatiden als Template dienen können (Aparicio et al. 2014; Moynahan & Jasin 2010). Nur dann kommt es zu einer fehlerfreien Reparatur.
- *Non homologous end joining* (NHEJ) kann auch ohne Template während der G1- und G0-Phase erfolgen und ist der vorherrschende DNA-Reparaturmechanismus postmitotischer Zellen, zu denen die Photorezeptoren zählen (Lieber 2010). NHEJ erfolgt häufiger als HDR, es können jedoch Fehler wie Insertionen, Deletionen oder Substitutionen vorkommen (Pardo et al. 2009).
- Als dritter Mechanismus ist das seltener vorkommende *Microhomology-mediated end joining* (MMEJ) als Alternative zu NHEJ bekannt.

Durch diese zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen wird die Integrität des Genoms während der Zellteilung und des Zellwachstums gewährleistet. Einer der ersten Schritte im zelleigenen DNA-Reparaturweg ist die Aktivierung von ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) nach einem DNA-Doppelstrangbruch (Abb. 4). Darauf folgend kommt es zur Phosphorylierung des Histons H2AX und der Entstehung von γ H2AX (Yuan et al. 2010). Im weiteren Verlauf kommt es zur Bindung von 53BP1, welches NHEJ einleitet (Zimmermann & De Lange 2014). Ku80 dient dazu, die DNA-Doppelstrangbruchenden zu stabilisieren, um die Verbindung der Enden durch Ligase 4 möglich zu machen (Stracker & Petrini 2011). CtIP (*C-terminal binding interacting protein*) ist in die ersten Schritte der DNA-Prozessierung während des HDR involviert und für die Rekrutierung weiterer DNA-Reparaturproteine verantwortlich (Makharashvili & Paull 2015). Diese genannten DNA-Reparaturproteine wurden im Rahmen dieser Arbeit immunhistologisch untersucht.

Einleitung

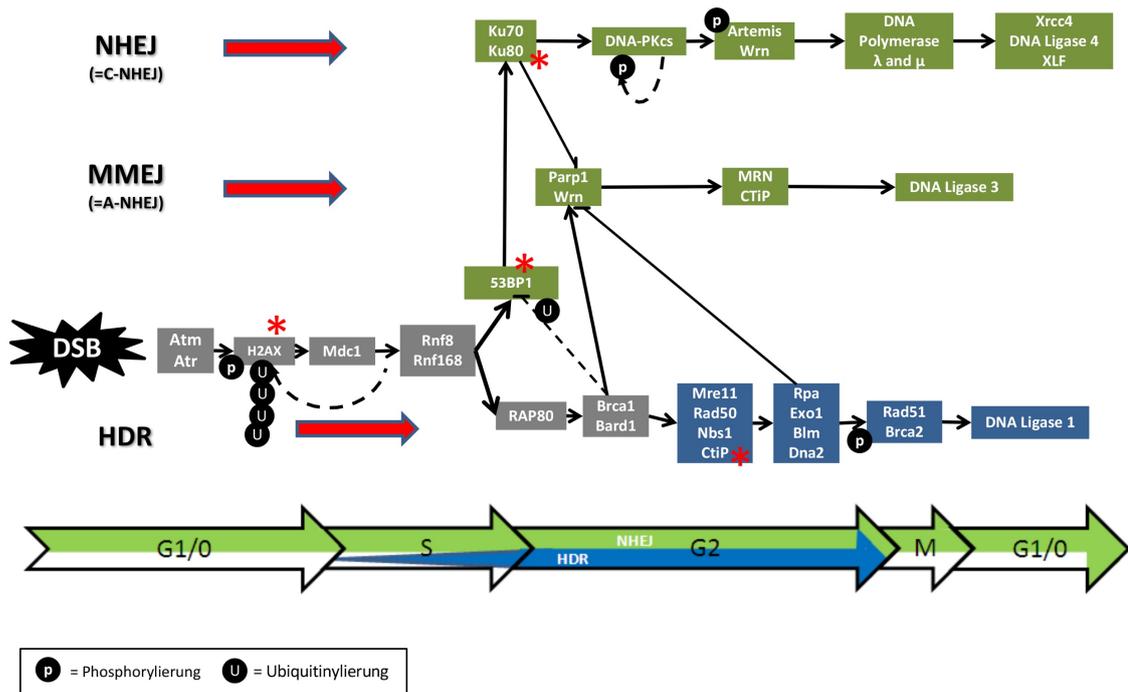


Abbildung 4: Zelleigene Reparaturwege nach einem Doppelstrangbruch in der DNA. Durch den Doppelstrangbruch (double-strand break, DSB) werden die DNA-Schadenserkennungsproteine (grau) aktiviert. Die Zeitleiste unten im Bild zeigt die Phasen des Zellzyklus. Die homologe Rekombination (Homologous directed repair, HDR, blau) erfolgt nur während der G2- und S-Phase des Zellzyklus. Non homologous end joining (NHEJ, classic (c) NHEJ, grün) kann während des gesamten Zellzyklus erfolgen. Microhomology-mediated end joining (MMEJ, alternative (a) NHEJ, grün) ist ein Alternativweg zu NHEJ. Zu weiteren Erläuterungen wird auf den Text verwiesen. Untersuchte Proteine sind durch rote Sternchen markiert. P= Phosphorylierung. U= Ubiquitylierung. Aus Wagner 2015, modifiziert.

Wie bereits dargelegt, ist die Retina ein Organ mit mindestens fünf verschiedenen Typen von Neuronen. Die Photorezeptoren stellen mit 80 % den Hauptteil der retinalen Neurone dar. Bei diesen handelt es sich um postmitotische Zellen, d. h., dass sie nach ihrer Differenzierung nicht mehr in den Zellzyklus eintreten und sich auch nicht mehr teilen können. Diese Tatsache erschwert eine effiziente Gentherapie (Yanik et al. 2016). Ein weiterer Faktor ist, dass Mäuse nachtaktive Tiere sind und daher ihre Photorezeptoren eine invertierte Chromatinanordnung besitzen. In der Mitte ihres Zellkerns ist das Heterochromatin als einzelnes großes Chromozentrum organisiert, begrenzt durch das Euchromatin (Petersen-Jones & Meek 2014, Solovei et al. 2013). Frohns et al. stellten fest, dass adulte murine Wildtyp-Stäbchen aufgrund der Organisation ihres Chromatins eine mangelhafte Reparaturfähigkeit von heterochromatinen Doppelstrangbrüchen aufweisen (Frohns et al. 2014). Die Photorezeptoren von tagaktiven Säugetieren hingegen besitzen eine konventionelle Architektur, die bei fast allen eukaryotischen Zellen vorzufinden ist. Hierbei ist das Heterochromatin in der nukleären Peripherie um das Euchromatin im Zentrum lokalisiert (Solovei et al. 2009). Daher ist es denkbar, dass die DNA-Reparaturkapazität beim Menschen nicht beeinträchtigt ist (Yanik et al. 2016).

1.3 Organotypische Retinakultur

Die organotypische Retinakultur stellt ein gutes intermediäres Modell zwischen *in-vivo*-Versuchen und der *in-vitro*-Zellkultur dar. *In vivo* sind die Möglichkeiten Manipulationen und Experimente durchzuführen oft limitiert. Bei Zellkulturen hingegen geht die komplexe Organisation des Gewebes mit ihren interzellulären Verbindungen und somit die zelluläre Dynamik verloren (Caffé et al. 2001). Bei der organotypischen Retinakultur können die Schichten der Retina und die meisten neuronalen Verbindungen sowie die Funktionen der neuronalen Zellen erhalten werden (Reidel et al. 2006). Physiologische, aber auch degenerative Prozesse und Erkrankungen der Retina lassen sich hiermit nahe an der *in-vivo*-Situation untersuchen (Fernandez-Bueno et al. 2012; Ahuja et al. 2001; Ferrer-Martin et al. 2014; Engelsberg et al. 2004). Es lassen sich adulte und neonatale Retinae kultivieren, wobei die Zellen der neonatalen Retina noch nicht vollständig differenziert sind (Feigenspan et al. 1993). Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Methoden der Retinakultur entwickelt, so kann die Retina mit Choroidea und RPE (Kaempf et al. 2008) oder - so wie in dieser Arbeit - isoliert kultiviert werden.

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die morphologische Charakterisierung der organotypischen Retinakultur von 9 Monate alten adulten C57Bl6-Wildtypmäusen. Es soll untersucht werden, ob sich die Retinakultur als intermediäres Modell zwischen Zellkultur und *in-vivo*-Experimenten eignet, um die Methoden der Gentherapie weiter erforschen zu können. Bis heute ist über die Gentherapie zur möglichen Heilung mutationsbedingter Erkrankungen, wie der Retinitis pigmentosa, noch zu wenig bekannt. Die Retinakultur ermöglicht es, gentherapeutische Verfahren unter kontrollierten externen Bedingungen zu erproben. Das Verhalten der Wildtyp-Retinae in Kultur wurde über einem Zeitraum von 10 Tagen analysiert. Dafür wurden morphologische Veränderungen der retinalen Neurone und Gliazellen untersucht. Für das Prinzip der Gentherapie sollen zelleigene DNA-Reparaturmechanismen genutzt werden, um die mutierte Gensequenz durch eine eingebrachte korrekte Kopie austauschen zu können. Aus diesem Grund wurde die Expression verschiedener DNA-Reparaturproteine immunhistologisch an Gefrierschnitten der Retina untersucht.

2 Material und Methodik

2.1 Herstellung der organotypischen Retinakultur

2.1.1 Präparation der Retina

Aus tierschutzrechtlichen Gründen wurde die Herstellung der Retinaexplantate durch Frau Dr. Brigitte Müller durchgeführt. Hierzu wurden die Mäuse entsprechend den Richtlinien der GV-SOLAS (Gesellschaft für Tierversuchskunde) durch zervikale Dislokation getötet und ihnen anschließend ihre Augen entnommen. Durch die Fixierung der Augenlider und die Erhöhung des Drucks auf das Auge tritt das Auge hervor, sodass der Sehnerv durchtrennt werden kann. Die nachfolgende Präparation erfolgte in einer mit DMEM++- (CO₂-gesättigt) gefüllten Petrischale unter dem OP-Stereomikroskop. Auf Höhe der *Ora serrata* wurde das Auge mit einer spitzen Kanüle (Durchmesser 0,4 mm) angestochen und mit einer Irisschere ringförmig aufgeschnitten. Damit konnte der vordere Teil des Augapfels entfernt und die Retina zugänglich gemacht werden. Weiterhin wurde die Retina an diametral gegenüberliegenden Stellen (3, 6, 9 und 12 Uhr) radial eingeschnitten und von dem retinalen Pigmentepithel und der Sklera gelöst. Dadurch ließ sich die Retina flach ausbreiten. Es entstand eine charakteristische Kleeblattstruktur. Die Retina wurde mit den Photorezeptoren nach unten auf einer Polycarbonatmembran ausgebreitet und zuerst mit DMEM++- und nach 4 Stunden mit DMEM4+ versorgt. Die Kultivierung der Explantate erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für eine Dauer von bis zu 10 Tagen. Ein Mediumwechsel wurde alle 2 Tage durchgeführt. Hierzu wurde unter der Sterilbank das verbrauchte Nährmedium durch ein frisches, auf 37 °C erwärmtes Medium ausgetauscht.

2.1.2 Vorbereitung der Retina für die Herstellung von Kryostatschnitten

Zur Untersuchung der Veränderungen der Retina unter Kulturbedingungen wurden die Retinaexplantate nach einem Zeitraum von einem bis zu 10 Tagen aus dem Inkubator entnommen. Hierzu wurde unter der Sterilbank der Membraneinsatz mit der Retina in eine HBSS enthaltende 6-Well-Schale gegeben und die Retina mit HBSS so lange vorsichtig umspült, bis diese im Medium schwamm. Daraufhin konnte sie mit einer Pasteur-Pipette in eine 4-Well-Platte überführt werden. Die Fixation erfolgte durch die Zugabe von 4 %igem Paraformaldehyd (in 0,1 M PBS) für 45 Minuten. In dieser Zeit wurde die Retina mit einem Parafilm abgedeckt und bei Raumtemperatur auf dem Schüttler platziert. Zum Auswaschen des Fixativs wurde dreimal in PBS Puffer (pH=7,4) für 30 Minuten gewaschen. Als Gefrierschutz wurde eine Immersion in 10 %iger und 20

%iger Saccharose für je eine Stunde und in 30 %iger Saccharose über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C durchgeführt. Sobald die Retina wieder Raumtemperatur erreichte, wurde die Hälfte und nach 2 Stunden die gesamte Saccharose-Lösung durch das Gefriermedium Tissue Tek ersetzt. Nach weiteren 2 Stunden wurde die Retina mithilfe eines Pinsels von der 4-Well-Schale in ein mit Gefriermedium gefülltes Cryomold überführt. Die genaue Platzierung erfolgte mittels Binokular-Mikroskop. Sie wurde durch Fotos dokumentiert. Die Retina wurde dann in einer mit flüssigem Stickstoff gekühlten Kammer eingefroren.

2.1.3 Herstellung von Kryostatschnitten

Zur Anfertigung von Kryostatschnitten wurde die im Gefrierblöckchen befindliche Retinakultur nach leichtem Antauen mit den Händen aus dem Cryomold herausgedrückt und mittig auf dem Objektträger mit Gefriermedium angefroren. Anhand der Fotodokumentation konnte das Gewebe so ausgerichtet werden, dass möglichst viele Gefrierschnitte hergestellt werden konnten. Die Anfertigung der 16 µm dünnen Gewebeschnitte erfolgte bei -16 °C mithilfe eines Gefriermikrotoms. Diese wurden auf Superfrostobjektträger aufgenommen. Um für die Quantifizierung der Kernreihen in der ONL möglichst zentrale Schnitte zur Verfügung zu haben, wurden die Gewebeschnitte während des Schneidens in regelmäßigen Abständen unter dem Binokular überprüft und auf die Lokalisation der Papille geachtet. Die entsprechenden Objektträger wurden markiert. Die Lagerung der Gefrierschnitte erfolgte bei -20 °C in Objektträgerboxen.

2.1.4 TUNEL-Assay

Zur Darstellung der apoptotischen Zellen während der Retinakultur wurde die TUNEL-Methode (*Tdt-mediated-UTP-biotin-nick-end-labeling*) eingesetzt. Geht eine Zelle zugrunde, so kommt es zu Brüchen im DNA-Strang und es werden 3'OH-Gruppen frei. An diesen Enden kann im ersten Schritt der TUNEL-Färbung durch eine Enzymreaktion die terminale Desoxynucleotidyltransferase (*TdT*) angreifen. Es kommt zur Polymerisierung der markierten Nucleotide (TUNEL Reaktion, Watanabe et al. 2012). Im zweiten Schritt der TUNEL-Färbung werden mithilfe der TdT Fluorescein-dUTP-Moleküle angehängt. Diese können dann später mithilfe des Fluoreszenz-Mikroskops erfasst werden (Gavrieli et al. 1992; Schaper et al. 1999). Hierzu wurden die Objektträger zum Trocknen für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und angetrocknet, um ein mögliches Abspülen der Gewebeschnitte zu verhindern. Zum sparsamen Einsatz der Färbelösung und um ihr Ausbreiten zu verhindern, wurden die Gewebeschnitte mit einem wasserabweisenden Pap-Pen umrandet. Anschließend wurde zweimal für fünf

Minuten gewaschen, um das Einbettmedium zu entfernen. Nach dem Trocknen wurden 50 µl TUNEL-Reaktionsgemisch auf die Objektträger gegeben. Auf die Negativkontrolle wurde nur die Färbelösung appliziert. Um Austrocknung zu verhindern und eine gleichmäßige Inkubation zu gewährleisten, wurden die Objektträger mit Parafilm abgedeckt und anschließend für 60 Minuten bei 37 °C in der feuchten, lichtdichten Färbekammer inkubiert. Danach wurde der Parafilm vorsichtig mit der Pinzette von den Objektträgern entfernt und die Objektträger dreimal lichtgeschützt in PBS gewaschen. Es erfolgte eine Gegenfärbung mit DAPI für 5 Minuten und erneutes Waschen in PBS. Schließlich wurden die Objektträger mit einem Eindeckmedium eingedeckt und aufgrund der geringen Persistenz der Fluoreszenz direkt mikroskopiert.

2.1.5 Immunfärbungen

Zur Charakterisierung der organotypischen Retina wurde die indirekte Zwei-Schritt-Methode zur Immunmarkierung verwendet.

Durch die Immunfluoreszenzfärbung können Antigene gezielt im zu untersuchenden Gewebe dargestellt werden. Hierbei bindet ein spezifischer Primärantikörper an ein Gewebs-Antigen. Anschließend bindet ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper an den Primärantikörper. Der Sekundärantikörper kann dann im Fluoreszenzmikroskop durch die Anregung mit Licht der entsprechenden Wellenlänge sichtbar gemacht werden und leuchtet in roter, blauer oder grüner Fluoreszenz. Um die Zellkerne anzufärben, wurde DAPI verwendet, ein Fluoreszenzfarbstoff, der direkt an die DNA bindet.

Beim Standardvorgehen zur Immunfluoreszenzfärbung wurde bei den vorbereitenden Maßnahmen analog zum Protokoll der TUNEL-Färbung (s. 2.1.4) vorgegangen. Zuerst wurden die Objektträger mit den Gewebeschnitten für 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Das Gewebe konnte so am Objektträger antrocknen und einem Abschwemmen beim Waschgang vorgebeugt. Weiterhin wurde das Gewebe mit dem Pap-Pen umrandet, um die benötigte Antikörpermenge zu reduzieren und ein Weglaufen des Antikörpers und dadurch bedingtes Austrocknen der Gewebe zu vermeiden. Um das Tissue-Tek-Einbettmedium auswaschen zu können, wurden die Objektträger anschließend in einer Hellendahl-Küvette für dreimal 10 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur (RT) in PBS gewaschen. Danach wurden die Objektträger durch vorsichtiges Ausschütteln und Abwischen außerhalb der Pap-Pen-Markierung getrocknet und für eine Stunde mit der Präinkubationslösung (10 % NDS [*normal donkey serum*], 1 % BSA [*bovine serum albumin*], 0,5 % Triton X100) in der feuchten Färbekammer bei RT inkubiert. Nach erneutem kurzen Waschen und Trocknen wurde der Erstantikörper auf die Objektträger gegeben und über Nacht in der feuchten Kammer inkubiert. Der Erstantikörper wurde entsprechend seiner Verdünnung mit

Antikörpermedium (3 % NDS, 1 % BSA, 0,5 % Triton X100) angesetzt, die Negativkontrolle wurde nur mit Antikörpermedium inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte erneut ein dreifacher Waschgang in PBS. Für den Zweitantikörperansatz wurde ebenfalls ein Antikörpermedium eingesetzt. Um die Zellkerne anzufärben wurde DAPI verwendet. Bei diesem Vorgang wurde auch die Negativkontrolle mit dem gleichen Ansatz inkubiert. Die fertige Zweitantikörperlösung wurde für fünf Minuten bei einer maximalen Beschleunigung von 13000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Für die Färbung wurde nur der Überstand weiterverwendet, um zu vermeiden, dass das Färberesultat durch mögliche Präzipitate beeinträchtigt wird. Die Inkubation des Zweitantikörpers erfolgte bei Raumtemperatur in der lichtdichten, feuchten Kammer für 1,5 Stunden. Um die Fluoreszenz nicht zu schwächen, wurden die Objektträger auch anschließend lichtgeschützt behandelt. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die Objektträger getrocknet und mit einem Eindeckmedium und Deckgläsern eingedeckt. Zum Trocknen und bis zum Zeitpunkt der mikroskopischen Analyse wurden die Objektträger in der Objektträger-Box bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

2.1.6 Antigen-Retrieval

Die Paraformaldehydfixierung kann dazu führen, dass bestimmte Epitope miteinander vernetzt oder modifiziert werden, sodass sie von ihrem jeweiligen Antikörper nicht mehr erkannt werden. Daher wurde bei bestimmten Färbungen (53BP1 und AIF) eine Antigendemaskierung durchgeführt. Dadurch können Quervernetzungen z. T. wieder rückgängig gemacht werden. Hierbei werden die Objektträger nach dem Antrocknen und anschließendem Waschen in PBS, wie bereits oben beschrieben, in eine Küvette mit Citratpuffer gegeben und darin zweimal für fünf Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend erfolgt eine Mikrowellenbehandlung. Die 120-ml-Hellendahl-Küvette mit den Objektträgern wurde bei 700 W für 15 Sekunden erhitzt, nach 50 Sekunden Pause erfolgte eine erneute Wärmezufuhr. Nach jedem Erhitzungsdurchgang wurde die Temperatur gemessen. Nach 5 bis 6 Wiederholungsdurchgängen wurde in der Regel eine Temperatur von 80 °C erreicht. Als visuelle Kontrolle ließen sich kleine aufsteigende Bläschen identifizieren. Für die 80-ml-Hellendahl Küvette wurde ein Erhitzungsintervall von 10 Sekunden gewählt. Darauffolgend wurde die Küvette bei Raumtemperatur für 30 Minuten abgekühlt. Nach einem kurzen Waschen in PBS erfolgte die Präinkubation. Es wurde dann weiter nach dem bereits unter 2.1.6 beschriebenen Protokoll verfahren.

2.1.7 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Bei der Laser-Scanning-Mikroskopie wird das zu untersuchende Präparat durch einen Laser beleuchtet, wodurch die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden, Licht einer anderen Wellenlänge abzugeben (Abb. 5). Aufgrund der unterschiedlichen Wellenlänge wird nur das Fluoreszenzlicht zum Objektiv durchgelassen, das Anregungslicht wird zurück zur Lichtquelle geleitet. Um nur den zu detektierenden Farbstoff anzuregen, wird ein entsprechender optischer Filter ausgewählt. Bei der konfokalen Mikroskopie kann zusätzlich mittels einer Lochblende eine bestimmte Schicht ausgewählt werden, die bestrahlt werden soll. Somit kann eine jeweilige Fokusebene eingestellt werden. Anschließend können die Ebenen zu einem Bild rekonstruiert werden, wobei sich die einzelnen Schichten getrennt voneinander betrachten lassen. Bei der Fluoreszenzmikroskopie können mit entsprechend hohem Kontrast weitaus kleinere Objekte als mit der Lichtmikroskopie erfasst werden (Claxton et al. 2006). Für diese Arbeit fand das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop Fluoview FV10i von Olympus Verwendung. Es besitzt drei verschiedene Laserdioden (405 nm, 559 nm und 635 nm). Es wurden 2 bis 14 Z-Stack Aufnahmen von 0,7 μm Dicke angefertigt und zu einem Bild überlagert. Die Anfertigung der Aufnahmen erfolgte mit 10- oder 60-facher Vergrößerung und unter Verwendung von Olympus Immersion Öl.

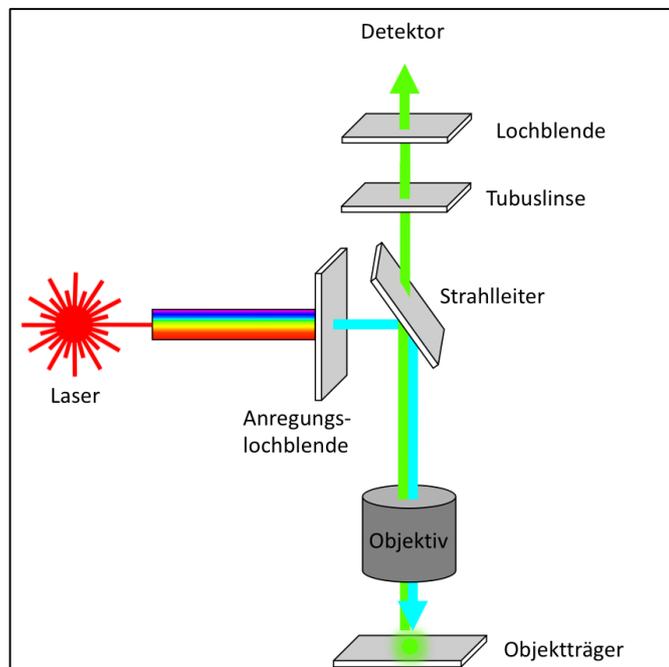


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Laser-Scanning-Mikroskops.

2.1.8 Bildbearbeitung

Die Bildbearbeitung erfolgte mit der Adobe Photoshop CS 6 extended Version 13.0.6 x64. Hierbei wurden die Tonwerte der mikroskopierten Aufnahmen verbessert und die Unschärfe reduziert. Weiterhin wurden zur besseren Übersicht und zur besseren Vergleichbarkeit die DAPI-Kernfärbung bis auf einen Randstreifen ausgeblendet und die Bilder mittels Photoshop entlang der IPL ausgerichtet.

2.1.9 Kernreihenzählung

Um den Verlust an Zellkernen während der Retinakultur zu erfassen, wurden die Anzahl an Kernen in der ONL in einem definierten Abschnitt quantifiziert. Hierfür wurde die Papille lokalisiert und nur zentrale Schnitte analysiert. Diese Daten wurden mit der Anzahl an Kernen in einer Kernreihe abgeglichen. Dabei ließ sich eine Korrelation der beiden Daten feststellen. Dies wird nachfolgend exemplarisch in Abbildung 6 dargestellt. Daher erfolgte die weitere Quantifizierung ausschließlich durch die Zählung der Kernreihen. Pro Retina-Explantat wurde an drei unterschiedlichen mit DAPI gefärbten Gewebeschnitten ausgezählt. Es wurden Einzelaufnahmen oder Projektionen von 2-4 µm Dicke analysiert.

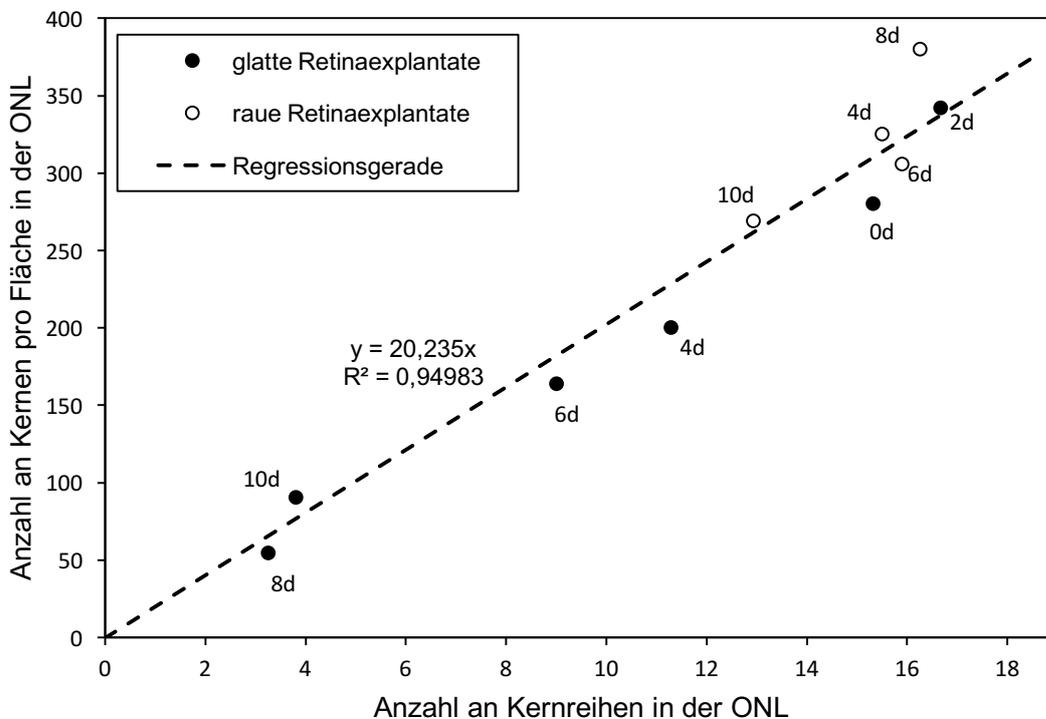


Abbildung 6: Anzahl an Kernen pro Fläche in der ONL in Abhängigkeit von der Anzahl an Kernreihen in der ONL, d: days (Tage).

2.1.10 Verwendete Antikörper

Für diese Arbeit wurde eine Reihe von Antikörpern verwendet, um die adulte organotypische Retinakultur immunhistochemisch charakterisieren zu können. Die genauen Charakteristika sind in den Tabellen 2 und 3 gelistet.

Um die morphologischen Veränderungen der retinalen Zellen während der Kultur darzustellen, wurden diese mit Proteinkinase alpha ($PKC\alpha$) und C-terminalem Bindeprotein 2 (CtBP2) gefärbt. Durch diese Färbung lassen sich die Anordnung der Stäbchen Bipolarzellen in der Retina und ihre Bandsynapse mit den Photorezeptoren in der OPL erkennen (Greferath et al. 1990). Neuronale Veränderungen wie Sprouting lassen sich ebenfalls durch diese Färbung darstellen.

Zur weiteren Analyse erfolgte der Nachweis einer möglichen reaktiven Gliose durch die Anfärbung mit Glia fibrillary acid protein (GFAP) und Glutaminsynthetase (GS). Glutaminsynthetase wird in den Müllerzellen der Retina exprimiert und wandelt die Transmitter Glutamat oder GABA in das unwirksame Glutamin um (Gorovits et al. 1997; Germer et al. 1997). GFAP wird von Müllerzellen und Astrozyten exprimiert. Bei einer Gliose reagieren diese mit verstärkter GFAP-Produktion (Vecino et al. 2016).

Um die absterbenden Zellen in der Retina zu detektieren, wurde neben der TUNEL-Methode die Immunfärbung gegen AIF (*apoptosis inducing factor*) genutzt. Lange war lediglich die Caspasen-abhängige Apoptose (s. 1.2.3) bekannt (Alnemri et al. 1996). AIF ist ein Auslöser der Caspasen-unabhängigen Apoptose. Bei diesem Apoptoseweg kommt es zur Delokalisation von AIF aus den Photorezeptor-Mitochondrien in den Zellkern. Dies wird über die Freigabe von Calpain reguliert. Calpaine sind Cystein-Proteasen, die durch hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel aktiviert werden (Boujrad et al. 2007). Im Zellkern führt AIF zur Kondensation des Chromatins und zur Fragmentierung der DNA.

Um die Aktivität zelleigener DNA-Reparaturmechanismen während der Kultur nachzuweisen, wurden verschiedene DNA-Schadens- und Reparaturproteine mittels Antikörper gefärbt. Eine schematische Übersicht der mit den Reparaturvorgängen in Verbindung stehenden Proteinen wird in Abbildung 4 gezeigt. H2AX ist ein Histon-Variant und spielt eine Schlüsselrolle im DNA-Reparaturweg. Als einer der ersten Schritte kommt es nach einem DNA-Doppelstrangbruch durch die Aktivierung von ATM zur Phosphorylierung von H2AX und der Entstehung von γ H2AX (Yuan et al. 2010; Huang et al. 2004). γ H2AX ist ausschlaggebend für die Rekrutierung weiterer DNA-

Schadens- und Reparaturproteine und die Verstärkung des DNA-Schadenssignals (Paull et al. 2000; Huen & Chen 2010). Nach einem DNA-Doppelstrangbruch kommt es innerhalb von 30 Minuten zur Akkumulierung von γ H2AX Molekülen, die sich um den Doppelstrangbruch formatieren und einen Fokus bilden (Shaposhnikov et al. 2011). Dadurch ist es möglich, DNA-Doppelstrangbrüche mit dem Antikörper gegen γ H2AX zu detektieren (Bonner et al. 2011; Chowdhury et al. 2005; Kuo & Yang 2008). MDC1 (Mediator on Damage Checkpoint protein 1) ist stark mit der H2AX-abhängigen Rekrutierung von 53BP1 (p53 binding protein), BRCA1 (breast cancer 1) und RAP80 (receptor-associated protein 80) assoziiert (Yuan et al. 2010). Neben den H2AX-abhängigen können auch H2AX-unabhängige Reparaturwege vorkommen. In der Abwesenheit von H2AX kann der MRN-Komplex (Mre11/Rad50/NBS1) DNA-Doppelstrangbrüche erkennen und entweder HDR oder NHEJ einleiten (Lamarche et al. 2010).

53BP1 (Tumorsuppressor p53 binding protein 1) ist ein weiteres bei zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen von Doppelstrangbrüchen vorkommendes Protein. Werden Doppelstrangbrüche detektiert, so wird durch die ATM (Ataxia telangiectasia mutated) bedingte Phosphorylierung von H2AX eine Signalkaskade ausgelöst. Aufgrund dessen kommt es zur Akkumulation von 53BP1 und zur Ausbildung H2AX-abhängiger Foki am Chromatin entlang der Bruchseite (Panier & Boulton 2014; Rappold et al. 2001; Bothmer et al. 2011). 53BP1 unterstützt NHEJ, indem es die DNA-Bruchenden verbindet, um ihre Ligation zu erleichtern (Chapman et al. 2012). Dieser Prozess wird Synapsis genannt. Außerdem fördert es die Mobilität von geschädigtem Chromatin (Dimitrova et al. 2008). 53BP1 verhindert die homologe Rekombination, indem es die Doppelstrangbruchenden der DNA vor Resektion schützt (Zimmermann & De Lange 2014).

Ku ist ein Heterodimer und besteht aus den Untereinheiten Ku70 und Ku80, die nach ihren molekularen Gewichten benannt wurden. Ku ist Teil des NHEJ-Reparaturweges und lokalisiert besonders schnell an DNA-Doppelstrangbrüchen, da es eine besonders starke Affinität zu DNA-Enden hat. Ku stabilisiert die DNA-Enden und schützt sie vor nicht spezifischer Prozessierung. Ku70/80 kann ringförmige Strukturen um die Doppelstranghelix bilden. Diese ermöglichen es dem Ku-Heterodimer an die Enden zu rutschen (Walker et al. 2001). Ku80 bindet an das Zuckerrückgrat der DNA und nicht an die Basen. Hieraus folgt, dass Ku sequenzunspezifisch bindet. Nach einer Bindung an die Bruchenden, rekrutiert es weitere NHEJ Faktoren, wie DNA-PKCs oder DNA Ligase IV (Davis & Chen 2013).

CtIP (C-terminal binding interacting protein) ist eine Endonuklease und fördert die homologe Rekombination, indem es die Resektion der DNA-Enden nach einem Doppelstrangbruch einleitet (Reczek et al. 2013). Dies ist ein Prozess, bei dem die 5'-Bruchenden des Doppelstrangs in 3'-Einzelstrang-DNA-Überhänge umgewandelt werden. Voraussetzung hierfür ist die durch ATM bedingte Phosphorylierung von CtIP (Wang et al. 2013). CtIP interagiert stark mit dem MRN- (Mre11-Rad50-Nbs1) Komplex und spielt eine Rolle bei der Rekrutierung von weiteren DNA-Reparaturproteinen. Außerdem handelt es sich um einen Tumorsuppressor. Anhand eines Mausmodells konnte gezeigt werden, dass sich die Inaktivierung von CtIP tödlich auswirkt (Chen et al. 2005). In Abwesenheit des HR-Reparaturmechanismus induzieren CtIP und MRN den alternativen MMEJ-Reparaturweg (Makharashvili & Paull 2015).

2.2 Verwendete Materialien

2.2.1 Puffer, Farbstoffe, Assays und Medien

Lösung	Zusammensetzung
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	DAPI Stammlösung 0,1 mg/ml 1 :1000 in PBS
Antikörperinkubationslösung	3 % NDS 1 % BSA 0,5 % oder 1 % Triton X-100 0,02 % NaN ₃ in PB/PBS/TBS
Paraformaldehyd (PFA) 4 %	4 g PFA in 100 ml PBS (pH 7,4)
Präinkubationslösung	10 % NDS 1 % BSA 0,5 % Triton X-100 in PBS
Triton X-100 Stammlösung	5 % Triton X-100 in PB/PBS
Kulturmedium	50 % DMEM 25 % FBS 25 % HBSS mit 2 mM L-Glutamin, 5.75 mg/ml Glucose und Antibiotika (100 µg/ml Streptomycin und 100 units/ml Penicillin)
Saccharose, 10/ 20/ 30 %ig	10/20/30 g Saccharose 0,5 ml 5 % NaN ₃ auf 100 g in PB lösen
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS), 0,01 M, pH 7,4	8,76 g NaCl 0,20 g KCl 50 ml 0,2 M PB pH 7,4 auf 1 L mit Aqua dest. auffüllen
Phosphatpuffer (PB), 0,2 M, pH 7,4	43,42 g Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O 5,24 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O in 1 L Aqua dest.

Material und Methodik

Tris-gepufferte Salzlösung (TBS), pH 7,4	8,8 g NaCl 3,0 g TRIS 2,0 g KCl In 1 L Aqua dest.
--	--

Tabelle 1: verwendete Lösungen.

Chemikalie	Hersteller
DMEM	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
<i>fetal bovine serum</i> (FBS)	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Normal Donkey Serum</i> (NDS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Penicillin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
Sucrose	Serva, Heidelberg, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
<i>Hanks' Balanced Saline Solution</i> (GIBCO® HBSS)	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland

Tabelle 2: verwendete Chemikalien.

2.2.2 Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Wirt	Hersteller
53BP1	1:300	rb	Bethyl Laboratories, Hamburg, Deutschland
AIF	1:50	rb	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
CtBP2	1:5000	ms	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CtIP	1:500	rb	Abcam, Cambridge, Großbritannien
GFAP	1:1000	rb	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
GS	1:2500	ms	BD Transduction Laboratories, Heidelberg, Deutschland

Material und Methodik

Ku80	1:300	rb	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
PKC α	1:10000	rb	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
γ H2AX	1:3000	rb	Cell Signaling, Leiden, Niederlande

Tabelle 3: verwendete Primärantikörper.

2.2.3 Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor 488	1:500	Molecular Probes, Eugene, USA
Alexa Fluor 594	1:500	Molecular Probes, Eugene, USA
DAPI	1:5000	Molecular Probes, Eugene, USA

Tabelle 4: verwendete Sekundärantikörper.

2.2.4 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aluminiumfolie	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläser L 24xB 50 (10x 100 Stck.)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Falcon 15 ml und 50 ml Tube	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Deckgläschen für Objektträger	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNase I set	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Einmalhandschuhe, Nitril	Ansell GmbH, München, Deutschland
Färbekammer für Objektträger	Science Services GmbH, München, Deutschland
Färbeküvette 50ml, 80ml und 120ml	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Multidish 4 wells	Nunc, Roskilde, Dänemark
Objektträgerkasten mit 50 und 100 Stellplätzen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Olympus IMMOIL-F30CC Immersion Oil Type F	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Pap Pen	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland

Material und Methodik

Parafilm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipetten	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland; Corning Inc., New York, USA
Polycarbonatmembran (TEPC), Porengröße 0.4 µm, 30 mm Durchmesser	Laboglob.com GmbH, Gottmadingen, Deutschland
Rasierklagen	Gebr. Martin, Tuttlingen, Deutschland
Reaktionsgefäße in diversen Größen (Eppis)	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Roti®-Histokitt II	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Super Frost® Plus Objektträger	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tissue Freezing Medium®	Reichert Jung, Unterschleißheim/ München, Deutschland
Tissue-Tek® Cryomold	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
Dewar Transportgefäß, Borosilikatglas 1L Typ 26	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
TUNEL Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien.

2.2.5 Geräte und Software

Konfokales Laser Scanning Mikroskop Fluoview FV10i	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Kryostat MEV	SLEE medical GmbH, Mainz, Deutschland
Schüttler Certomat H	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Vortexmischer	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge 1-15 PK	Sigma, München, Deutschland
Zentrifuge, Mini Star	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 6: verwendete Geräte.

Fluoview FV10-ASW Version 04.01.02.02	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Microsoft Excel für Mac 2016	Microsoft Deutschland GmbH, München, Deutschland
Microsoft PowerPoint für Mac 2016	Microsoft Deutschland GmbH, München, Deutschland
Microsoft Word für Mac 2016	Microsoft Deutschland GmbH, München, Deutschland
Photoshop CS 6 extended	Adobe Systems, München, Deutschland
Sigma Plot 12.0	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland

Tabelle 7: verwendete Software.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung verschiedener Phänotypen der organotypischen Retinakultur

3.1.1 Identifizierung anhand der PKC α +CtBP2-Färbung

Für diese Arbeit wurden insgesamt 29 Augen von 15 Individuen immunhistologisch untersucht. Die Immunfärbungen wurden nach einem Standardprotokoll (s. 2.1.5) durchgeführt. Bei einigen Färbungen erfolgte ein Antigen-Retrieval (s. 2.1.6). Bei allen Immunfärbungen diente die unbehandelte Retina, die frisch entnommen direkt konserviert wurde, als Vergleich zu den kultivierten Explantaten. Sie wird hier als 0-Tage-Explantat bezeichnet. Zum theoretischen Hintergrund der Primärantikörper wird auf den Unterabschnitt 2.1.10 verwiesen.

Vor allem bei der Anfärbung der Bipolarzellen mit PKC α und der Bandsynapsen mit CtBP2 waren zwei unterschiedliche Färbebilder sehr auffällig. Es ließen sich bei den untersuchten Explantaten 9 mit *glatt* und 17 mit *rau* Phänotyp identifizieren (s. Tabelle 8). Bei den drei 0-Tage-Retinae konnten keine unterschiedlichen Phänotypen festgestellt werden. Ein 2-Tage-Explantat vom rauen Phänotyp trat im Laufe dieser Arbeit nicht auf. Die weiteren morphologischen Unterscheidungsmerkmale werden in Abschnitt 3.1 dargestellt.

	1 Tag	2 Tage	4 Tage	6 Tag	8 Tage	10 Tage
glatt	2	3	1	1	1	1
rau	1	0	7	3	3	3

Tabelle 8: Häufigkeit der beiden Phänotypen, gezeigt durch die Anzahl der untersuchten Augen.

In Abbildung 7 ist der glatte Phänotyp abgebildet. Um die Stäbchenbipolarzellen zu markieren, wurde Proteinkinase C alpha (PKC α) verwendet. Das Ribbon der Synapse zwischen den Photorezeptoren und den Bipolarzellen wurde mit dem Antikörper C-terminales Bindeprotein 2 (CtBP2) gefärbt. Bei der 0-Tage-Retina (Abb. 7A) lagen die Bipolarzellen eng gepackt und ihre Dendriten bildeten ein dichtes, fein verästeltes Netzwerk in der OPL. Die Zellkörper der Bipolarzellen wiesen eine ovale Form auf. Nach 1 Tag in Kultur (Abb. 7B) nahmen sie eine rundlichere Form an. Außerdem war das Dendritennetzwerk weniger fein und gleichmäßig strukturiert. Weiterhin ließen sich vereinzelt Aussprossungen der Bipolarzeldendriten (Sprouting, weiße Pfeile) in die ONL erkennen. Dies konnte auch in den darauffolgenden Stadien nachgewiesen werden. Sprouting in die GCL (Abb. 7E und G, schwarze Pfeile) konnte ebenfalls beobachtet

Ergebnisse

werden. Die generelle Morphologie der Bipolarzellen blieb während der gesamten Kulturdauer erhalten. Auch noch nach 10 Tagen in Kultur ließ sich ein intaktes Netzwerk erkennen (Abb. 7G). Die Axone waren bei jedem Kulturstadium durchgängig verfolgbar (weiße Pfeilspitze).

Die Ribbonsynapsen sind gegenüber den Bipolarzellendendriten in der OPL lokalisiert. Ihre charakteristische Hufeisenform war bei der 0-Tage-Retina (Abb. 7A) sehr gut zu erkennen. Nach 6 Tagen in Kultur wurde diese feine Struktur unförmiger und gröber (Abb. 7F).

In Abbildung 8 wird der raue Phänotyp gezeigt. Nach 1 Tag in Kultur (Abb. 8B) wurde eine Veränderung in der Morphologie deutlich. Die Zellkörper wirkten deformiert und weniger regelmäßig ausgerichtet. Die Axone der Bipolarzellen zeigten einen perlschnurartigen Phänotyp und waren nicht durchgängig verfolgbar (weiße Pfeilspitze). Die in der 0-Tage-Retina fein verästelten Dendriten nahmen ein klumpiges Äußeres an. Auch beim rauhen Phänotyp war Sprouting der Bipolarzellen in die ONL erkennbar (weiße Pfeile). Die Struktur der Ribbonsynapsen war bereits nach 1 Tag deutlich punktförmiger als bei der 0-Tage-Retina.

Vergleicht man den rauhen und glatten Phänotyp, so fällt der Unterschied zwischen den Axonen und der Form der Zellkörper der Bipolarzellen auf. Bei den glatten Explantaten blieb die generelle Morphologie der Retina über 10 Tage erhalten. Im Gegensatz dazu wiesen die rauhen Explantate zu jedem Zeitpunkt der Kultur ein körniges Äußeres auf.

3.1.2 Identifizierung anhand der ONL-Dicke

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der rauen und glatten Phänotypen ist die Dicke ihrer ONL.

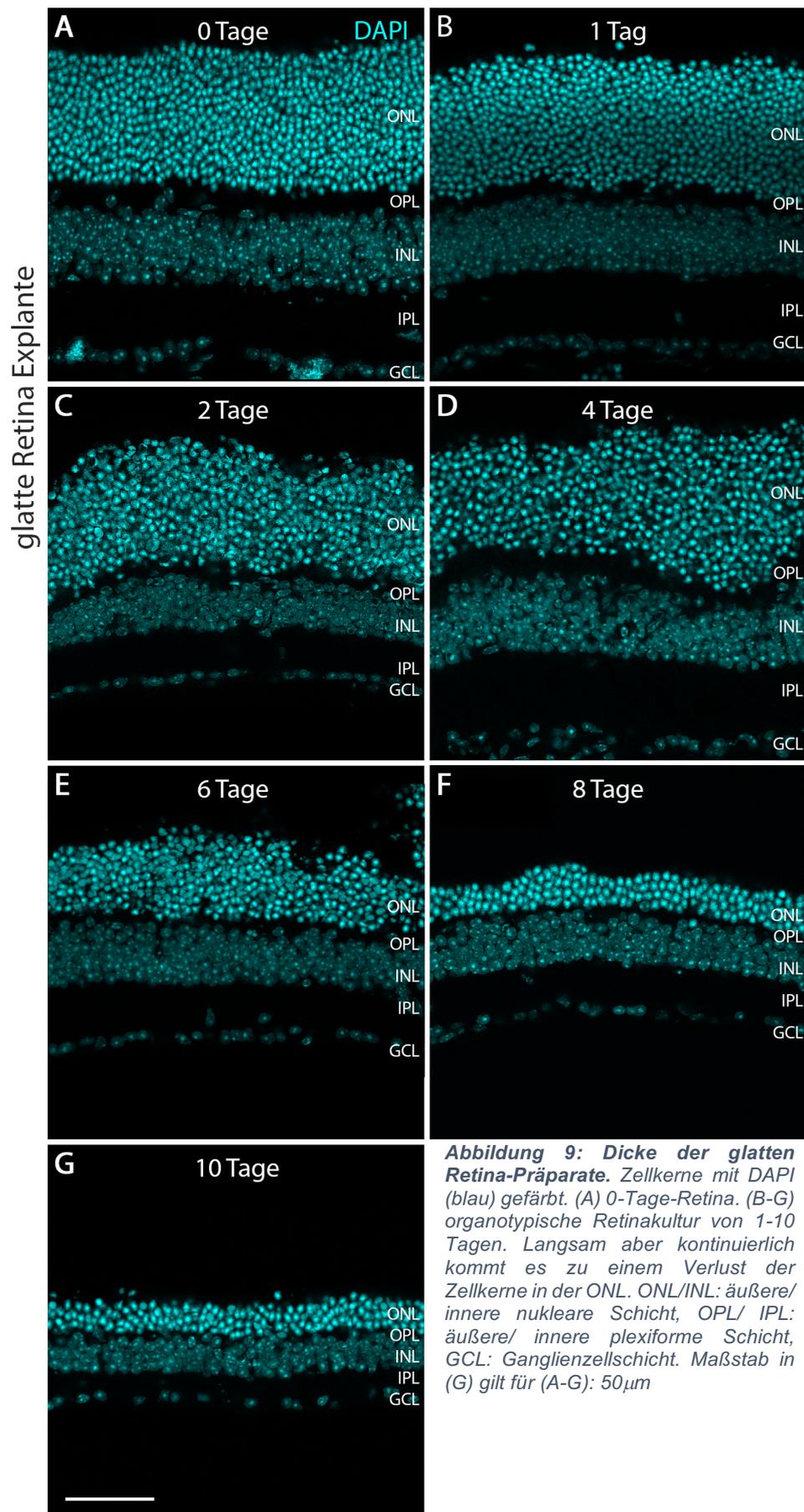
Die glatten Präparate sind in Abbildung 9 dargestellt. Bei der 0-Tage-Retina (Abb. 9A) waren viele dicht und gleichmäßig gepackte Photorezeptorzellkerne zu erkennen. Nach 1 Tag in Kultur war die ONL noch immer gut erhalten und es waren kaum Veränderungen feststellbar (Abb. 9B). Nach 2 und nach 4 Tagen war die Zellkernschicht der Photorezeptoren sichtbar aufgelockert und einige dünnere Areale sichtbar (Abb. 9D und E). Nach 6 Tagen war die Retina merklich reduziert. Im Vergleich zur 0-Tage-Retina waren noch zwei Drittel der Zellkerne vorhanden. Nach 8 Tagen kam es zu einer deutlicheren Reduzierung der Schichtdicke bis auf wenige Zellkernreihen. Die Schichtdicke blieb anschließend bis zu Tag 10 stabil (Abb. 9F und G). Neben den Veränderungen in der Dicke der ONL konnten außerdem Veränderungen in der Zellkernmorphologie festgestellt werden, was in dem Unterabschnitt 3.1.3 dargelegt wird.

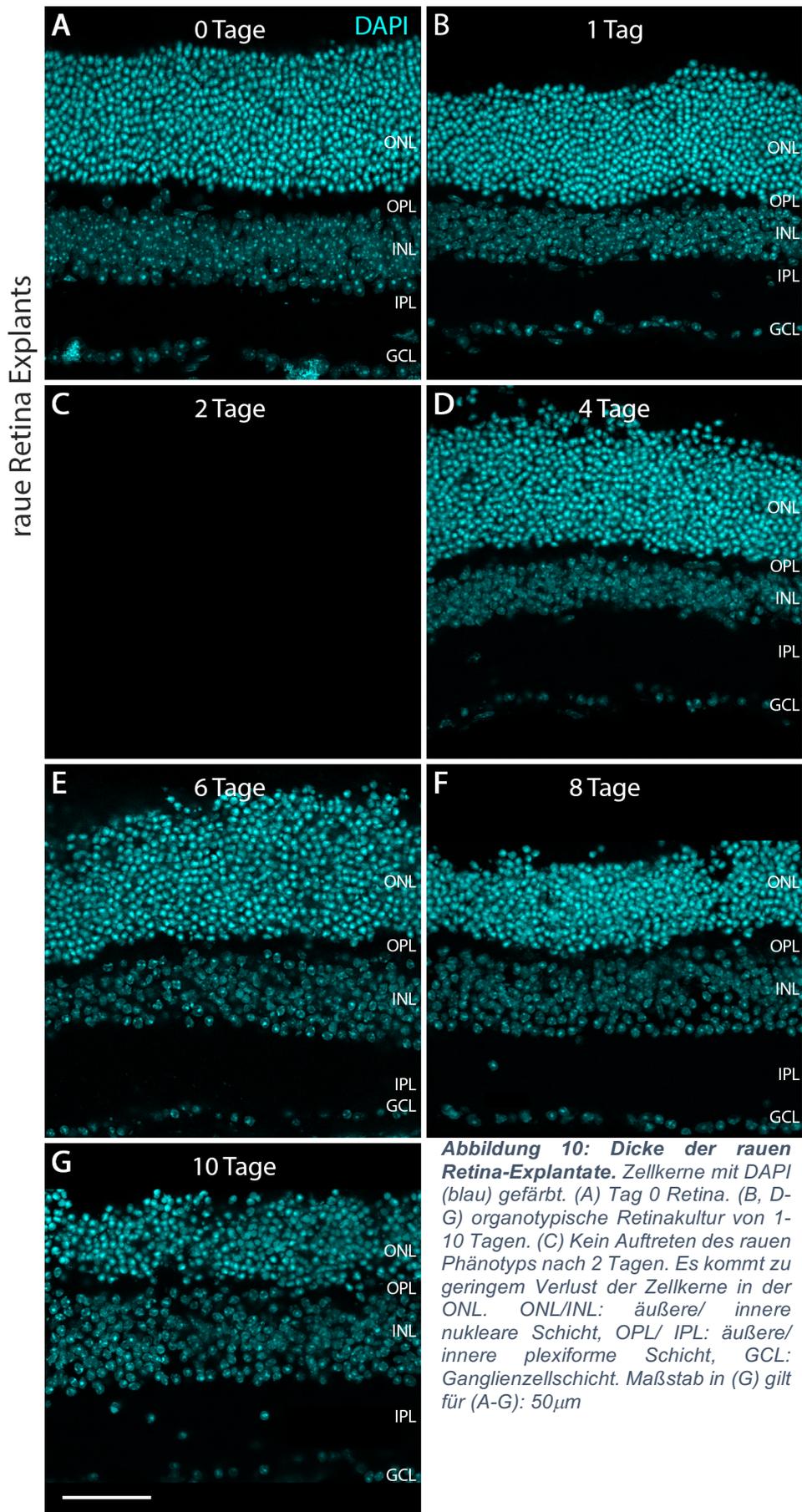
Die rauen Präparate werden in Abbildung 10 gezeigt. Bereits nach 1 Tag in Kultur kam es an einigen Arealen zu einer leichten Verjüngung in der Retina (Abb. 10B). Die Dicke der Retina blieb jedoch bis zu 6 Tagen in Kultur annähernd konstant (Abb. 10 D und E). Nach 8 Tagen kam es zur Reduktion der Retina auf die Hälfte ihrer ursprünglichen Dicke (Abb. 10F). Diese Dicke blieb bis zu 10 Tagen stabil (Abb. 10G). Außerdem konnten die beiden Phänotypen anhand der Morphologie der Zellkerne unterschieden werden. Hierzu wird auf den folgenden Unterabschnitt (s. 3.1.3) verwiesen.

Zur quantitativen Analyse wurden die Zellkerne in der ONL an zentralen, papillennahen Gewebeschnitten ausgezählt. Die Mittelwerte dieser Daten sind in der Abbildung 11 dargestellt. Eine Regressionsgerade wurde erstellt und gibt die Anhängigkeit zwischen den beiden Größen an. Der Bestimmungskoeffizient r^2 ist ein Maß dafür, wie gut das Regressionsmodell die Daten beschreibt. Werte nahe 1 sprechen für eine gute Beschreibung der Beziehung zwischen den Variablen durch die Gleichung. Für die glatten Explantate ist $r^2 \approx 0,857$ gegeben, für die rauen Explantate $r^2 \approx 0,825$. Dies bestätigt eine Korrelation zwischen den Tagen in Kultur und der Anzahl an Kernen in der ONL. Bei beiden Phänotypen gingen die Photorezeptoren nach mehreren Tagen in Kultur stetig zugrunde. Zu allen Zeitpunkten der Retinakultur waren bei den glatten Retina-Explantaten weniger Zellkerne in der ONL nachweisbar als bei den rauen Explantaten.

Ergebnisse

Des Weiteren war der Verlust an Photorezeptorzellkernen im Vergleich zu den rauen Explantaten stärker ausgeprägt. Von den anfänglich 17 Schichten in der Tag-0-Retina ließen sich nach 10 Tagen in Kultur nur noch 7 Schichten an Zellkernen nachweisen. Die leichte Deviation nach 8 Tagen ist durch den biologisch vorkommenden individuellen Unterschied der Tiere zu erklären. Bei den rauen Explantaten blieb die Anzahl der Photorezeptoren über längere Zeit konstant. Hier konnte nach 10 Tagen noch eine Anzahl von 10 Zellkernschichten nachgewiesen werden.





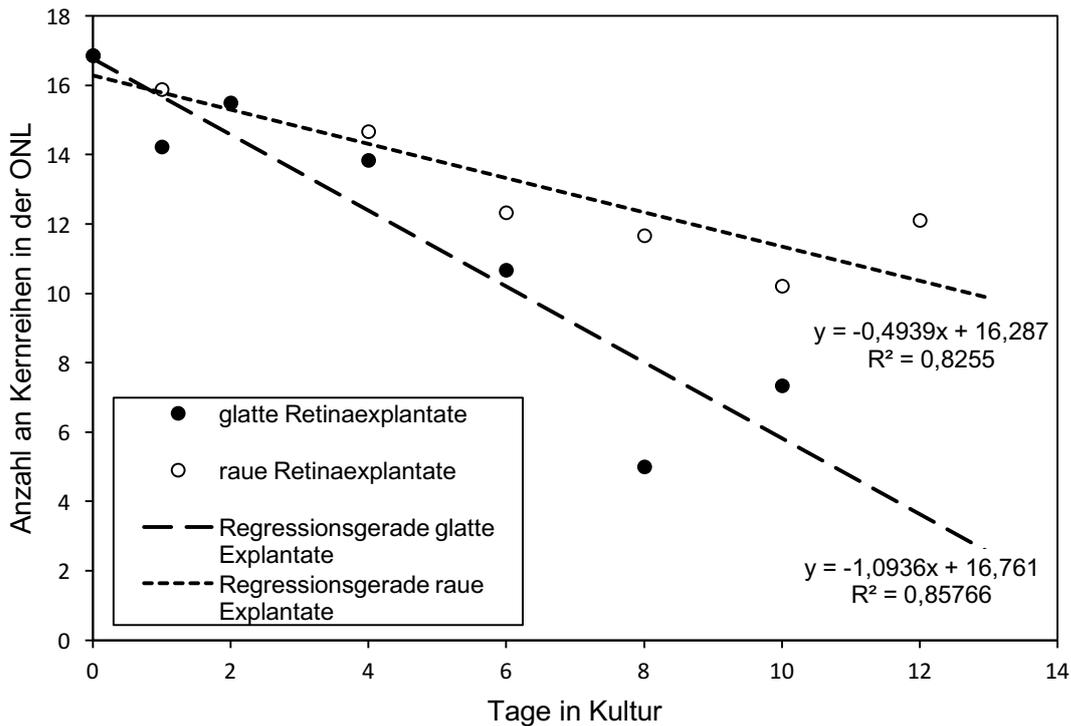


Abbildung 11: Anzahl an Kernen in der ONL. Darstellung der Beziehung zwischen Tagen in Kultur und Anzahl an Kernreihen in der ONL (ONL-Schichtdicke) für glatte (schwarz) und raue (weiß) Explantate. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte, d: days (Tage).

3.1.3 Identifizierung anhand der Zellkernmorphologie

Weitere Unterschiede zwischen den rauen und glatten Phänotypen konnten anhand der Zellkernmorphologie festgestellt werden. Die Zellkerne der ONL der beiden Phänotypen werden beispielhaft in Abbildung 12 abgebildet. Nach 1 Tag in Kultur waren bei beiden Phänotypen die Zellkerne nach wie vor dicht und gleichmäßig gepackt (Abb. 12A und C). Da Mäuse nachtaktive Tiere sind, besitzen ihre Photorezeptoren eine invertierte Chromatin-Anordnung. Das Heterochromatin ist in der Mitte des Zellkerns als einzelnes großes Chromozenter organisiert, begrenzt durch Euchromatin. Die invertierte Chromatinstruktur der Mäuse war gut zu erkennen. Die Zellkerne hatten ein rundes Äußeres. Bei den glatten Explantaten kam es im Laufe der Kulturdauer zur Auflockerung der dichten Zellkernpackung (Abb. 12B). Einige deformierte Zellkerne wurden sichtbar (Abb. 12B, weiße Pfeile). Bei den rauen Explantaten fanden sich weitaus mehr deformierte Zellkerne (Abb. 12D, weiße Pfeile). Außerdem waren diverse hyperplastische Kerne erkennbar (Abb. 12D, weiße Pfeilspitzen). Die Zellkerne wiesen fast ausnahmslos keine runde Form mehr auf.

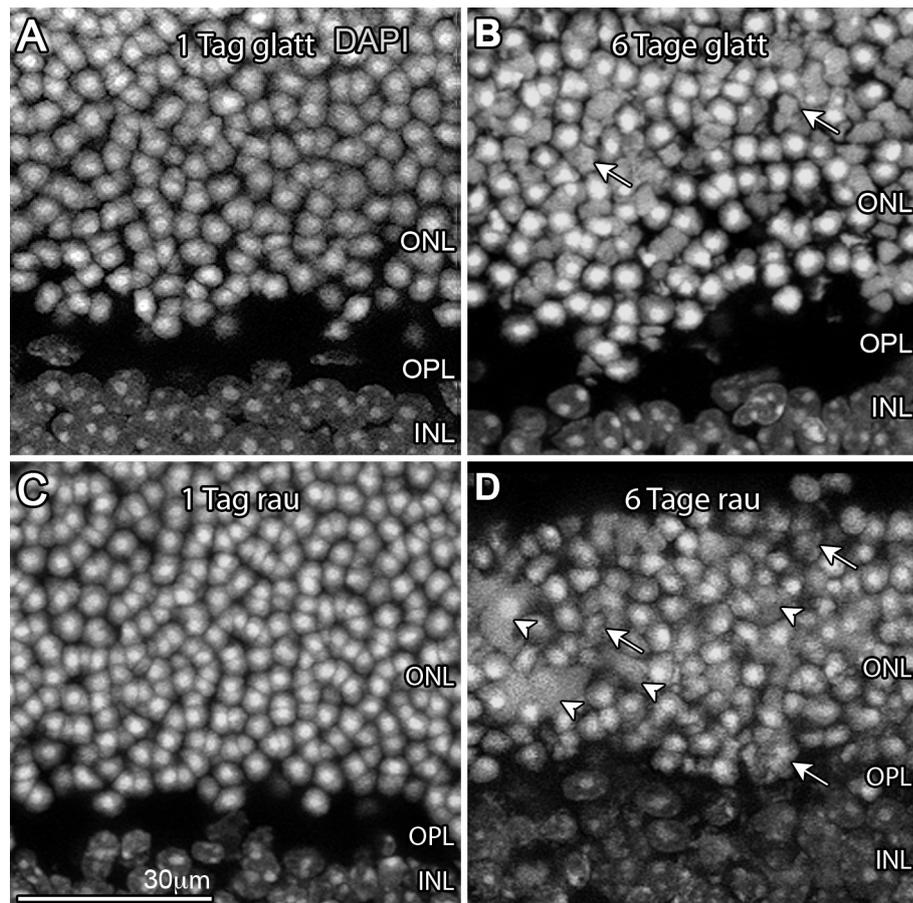


Abbildung 12: Morphologie der Zellkerne der glatten und rauen Phänotypen im Vergleich. Die Zellkerne wurden mit DAPI (hier in grau) gefärbt. (A) und (B) Zellkerne der glatten Explantate. (C) und (D) Zellkerne der rauen Explantate. (A) und (C) Kulturdauer ein Tag. (B) und (D) Kulturdauer 6 Tage. Deformierte Zellkerne wurden durch Pfeile und hyperplastische Kerne durch Pfeilspitzen markiert. ONL: äußere nukleare Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere nukleare Schicht. Maßstab in (C) gilt für (A-C): 30µm.

3.2 Morphologische Veränderungen der retinalen Neurone und Gliazellen während der Retinakultur

3.2.1 GFAP und GS

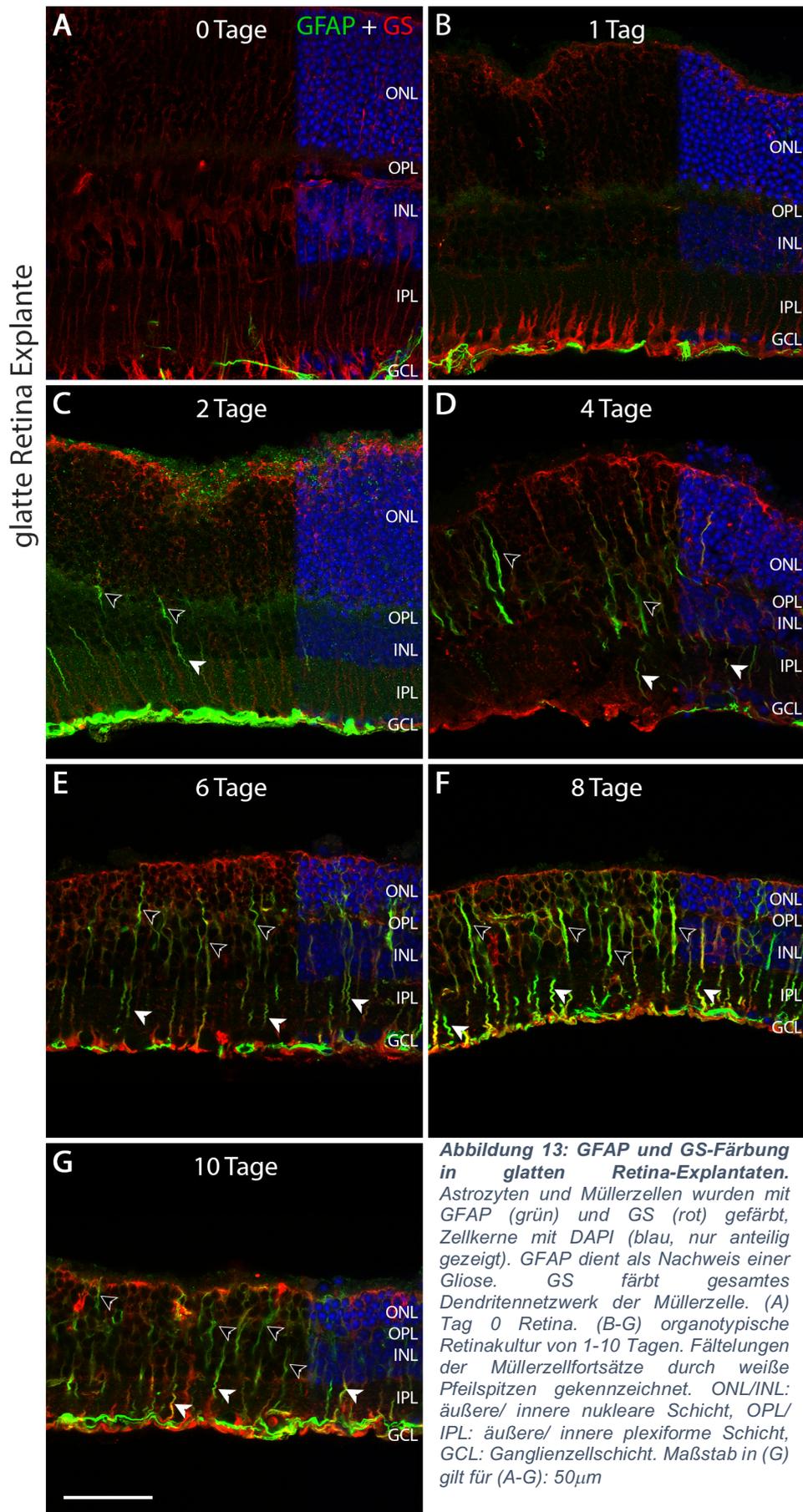
Die Makroglia der Mausretina wurden mit *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) und Glutaminsynthetase (GS) markiert. Bei der Tag-0-Retina ist GFAP ausschließlich basal nachzuweisen und färbt hier die Astrozyten und Müllerzellendfüße an (Abb. 13A und 14A). Im Zuge neurodegenerativer Prozesse reagieren die Müllerzellen und Astrozyten mit verstärkter Expression von GFAP und der Verdickung ihrer Fortsätze. GFAP kann somit als Indikator einer reaktiven Gliose genutzt werden. In Abbildung 13 und 14 werden Immunfärbungen von GFAP und GS in glatten und rauen Explantaten gezeigt. In der Tag-0-Retina wurde Glutaminsynthetase in der gesamten Müllerzelle exprimiert, wodurch ihre Dendriten als dichtes, die gesamte Retina durchziehendes Netzwerk sichtbar wurden (Abb 13A). Nach 1 Tag in Kultur konnte in beiden Phänotypen keine

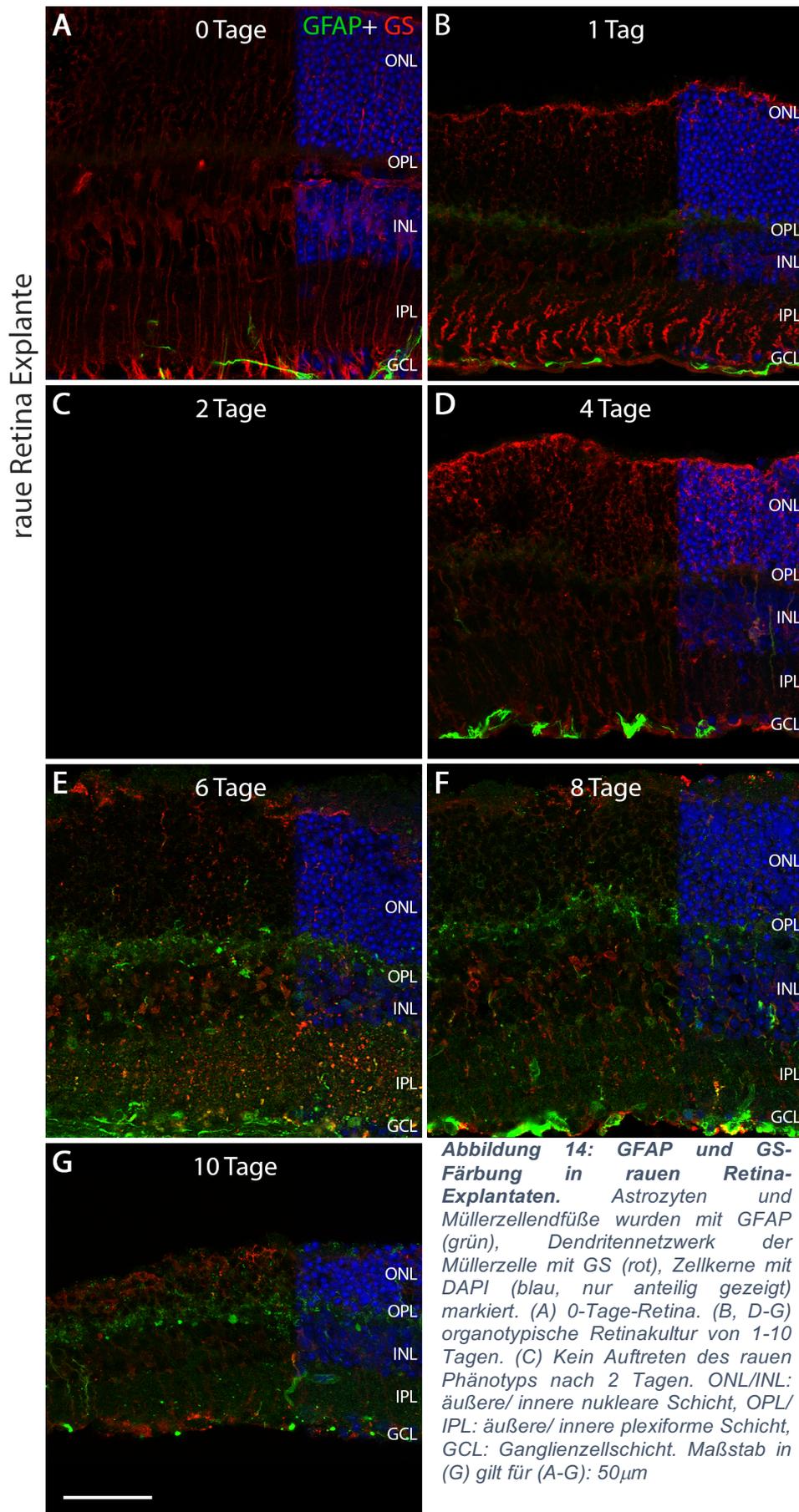
Ergebnisse

Zunahme der Expression von GFAP oder GS beobachtet werden (Abb. 13B). Das Färbepild ähnelte der Tag-0-Retina. Nach 2 Tagen in Kultur waren bei den glatten Explantaten vereinzelt GFAP-gefärbte Müllerzellfortsätze zu erkennen (Abb. 13C, schwarze Pfeilspitzen). Nach 4 Tagen zeigte sich eine sichtbare Zunahme der Expression von GFAP, die nun auch in der äußeren Retina zu beobachten war (Abb. 13D, schwarze Pfeilspitzen). Nach 6 und 8 Tagen wirkten viele der Fortsätze in der IPL ziehharmonikaartig komprimiert (Abb. 13 E und F, weiße Pfeilspitzen), was nur vereinzelt auch in den früheren Stadien dokumentiert wurde. Nach 8 Tagen waren die Fortsätze deutlich geschwollen (Abb. 13F, schwarze Pfeilspitzen). Sie durchzogen die gesamte Retina von der inneren bis zur äußeren limitierenden Membran.

Bei den rauen Explantaten (Abb. 14) wich das Färbepild nach bis zu 4 Tagen in Kultur nicht sonderlich von der Tag-0-Retina ab (Abb. 14B und D). Es konnte keine gesteigerte Expression von GFAP und GS beobachtet werden. Nach 6 Tagen zeigte sich die GS-Färbung nicht mehr als charakteristisches Fasergeflecht der Gliazellen, sondern eher in körnigen Strukturen (Abb. 14E). Eine generelle Zunahme der GFAP-Färbung war vorhanden. Es ließ sich jedoch keine wie für eine Gliose typische Verdickung der Müllerzellfasern nachweisen. Dieses Färbepild blieb auch bei 8 und 10 Tagen bestehen (Abb. 14F und G).

Im Gegensatz zu den glatten Explantaten zeigten die rauen Explantate eine verminderte Expressionssteigerung von GFAP. Bei den glatten Explantaten ließen sich gliotische Veränderungen der Müllerzellen erkennen, wie die Verdickung und Verlängerung ihrer Fortsätze (Abb. 13C-G, schwarze Pfeilspitzen), welche bei den rauen Explantaten nicht sichtbar waren. Bei den glatten Explantaten blieb die Morphologie des durch GS gefärbten Dendritennetzwerks der Müllerzellen über die gesamte Kulturdauer erhalten. Bei den rauen Explantaten ging diese Anordnung nach 6 Tagen (Abb. 14E) verloren.





3.2.2 TUNEL

Zum Nachweis der zugrunde gehenden Zellen wurde die TUNEL-Methode (*Tdt-mediated-UTP-biotin-nick-end-labeling*, siehe 2.1.4) angewendet. Bei der Apoptose, einer Form des programmierten Zelltods, kommt es zu Brüchen im DNA-Strang mit nachfolgender Kondensation von Kern und Zytoplasma. Hierbei werden 3'OH-Gruppen frei, an welche durch eine Enzymreaktion die terminale Desoxynukleotidyltransferase (*TdT*) angreifen kann (Gavrieli et al. 1992). Dadurch werden im zweiten Schritt Fluorescein-dUTP-Moleküle angehängt, welche dann im Laserscanning-Mikroskop sichtbar gemacht werden können.

Die relevanten Stadien der glatten und rauen Explantate sind in Abbildung 15 dargestellt. Bei der Tag-0-Retina wurden keine apoptotischen Zellen mittels TUNEL markiert (Abb. 15A), bei beiden Phänotypen auch nicht nach den Tagen 1 oder 2 (hier nicht gezeigt). Bei den glatten Explantaten wurden erst nach 4 Tagen in der äußersten Schicht der ONL einige wenige fluoreszierende Photorezeptorzellkerne sichtbar (Abb. 15B). Nach 6 Tagen fanden sich bereits vermehrt TUNEL-positive Zellkerne in der ONL (Abb. 15C). Nach 10 Tagen waren zusätzlich auch in der INL angefärbte Kerne sichtbar (Abb. 15D).

Die rauen Explantate wiesen bereits nach 4 Tagen auffällig viele TUNEL-positive Kerne in der ONL und auch einige positive Kerne in der INL auf (Abb. 15E). Nach 6 Tagen waren auch vermehrt TUNEL-positive Fluoreszenzen in der INL nachweisbar (Abb. 15F). Nach 10 Tagen waren bei den rauen Explantaten zusätzlich einige immunpositive Zellkerne in der GCL zu erkennen (Abb. 15G).

Die TUNEL-Färbung an den glatten und rauen Explantaten macht weitere Unterschiede deutlich sichtbar. So kam es bei den glatten Explantaten nach mehreren Tagen in Kultur zu einer kontinuierlichen Zunahme der TUNEL-positiven Kerne. Dies ließ auf einen gleichmäßigen Photorezeptorverlust schließen, der sich in einer Reduktion der Retinadicke zeigte (Abb. 9). Insgesamt war bei den rauen Explantaten die Anzahl an TUNEL-positiven Kernen deutlich höher als bei den glatten Explantaten. Trotzdem nahm die Retinadicke nicht dementsprechend stark ab.

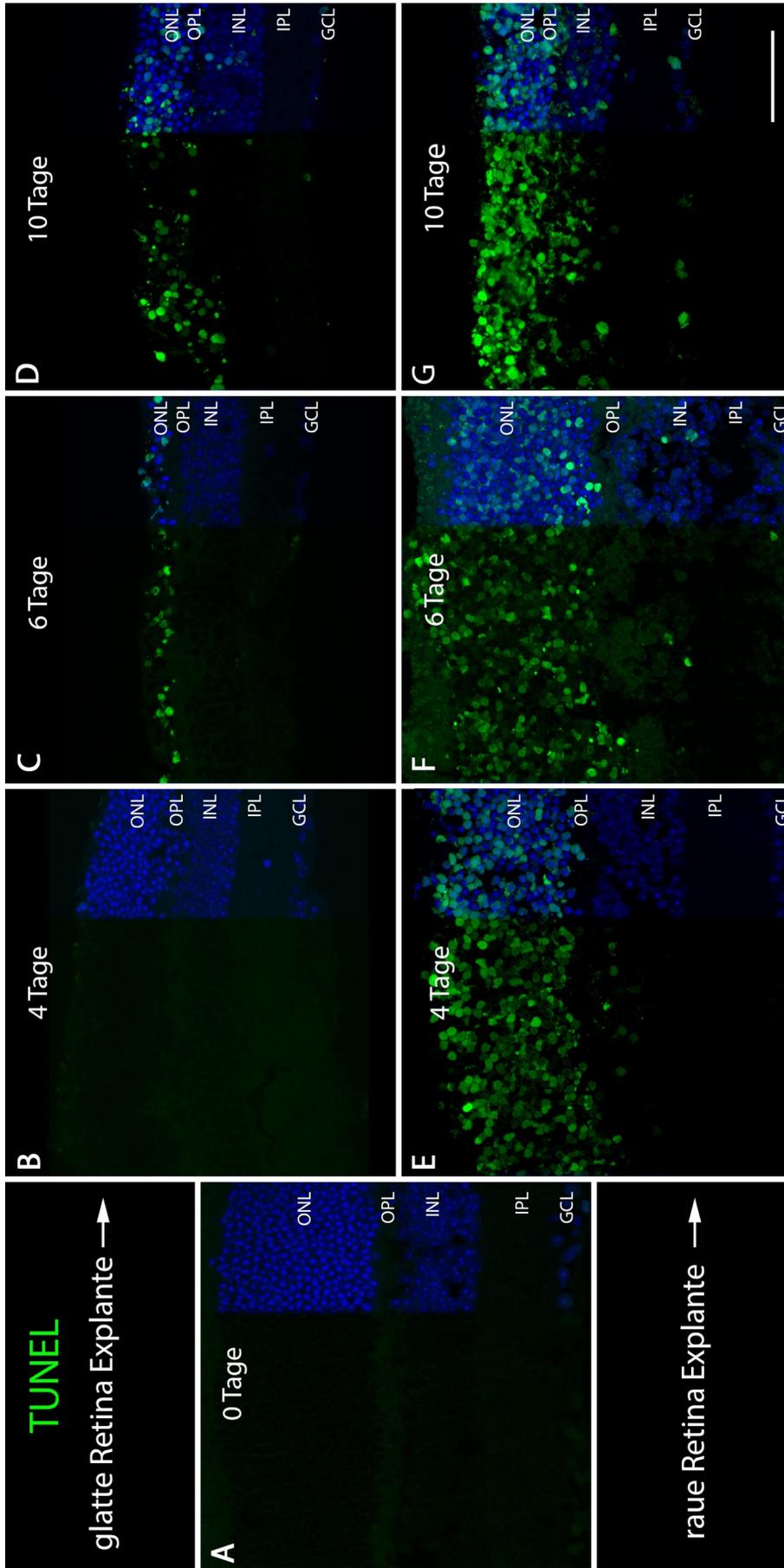


Abbildung 15: Nachweis des Apoptosestatus mittels TUNEL-Assay. (A) 0-Tage-Retina. (B-D) Retinakultur der glatten Explantate, nur anteilig gezeigt. (E-G) Retinakultur der rauen Explantate, nur anteilig gezeigt. ONL/ INL: äußere/ innere nukleare Schicht, OPL/ IPL: äußere/ innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht. Maßstab in (G) gilt für (A-G): 50µm

3.2.3 AIF

AIF (*apoptosis inducing factor*) ist ein Auslöser der Apoptose und wurde somit genutzt, um die zugrunde gehenden Zellen in der Retina zu detektieren. AIF ist in den Mitochondrien der Photorezeptoren lokalisiert. Bei apoptotischen Prozessen kommt es zur Delokalisation von AIF in den Zellkern. Zum weiteren theoretischen Hintergrund wird auf den Unterabschnitt 2.1.10 verwiesen.

Die relevanten Stadien der glatten und rauen Explantate sind in Abbildung 16 dargestellt. Bei der Tag-0-Retina imponierten die mitochondrienreichen Innensegmente der Photorezeptoren mit deutlich sichtbarer Fluoreszenz. Bei den glatten Explantaten war nach 1 Tag eine deutliche Verkürzung und Verklumpung der Innensegmente zu erkennen (Abb. 16B). Dies setzte sich in den weiteren Stadien fort (Abb. 16C und D). Nach 10 Tagen war in den glatten Explantaten nur noch ein dünnes Band an Innensegmenten vorhanden (Abb. 16D). Weiterhin waren die plexiformen Schichten verstärkt immunpositiv, was auf eine erhöhte Mitochondrienansammlung in diesen Schichten schließen lässt. Die Zellkerne der Photorezeptoren nehmen im Vergleich zum Zytoplasma relativ viel Platz ein. Das Zytoplasma umgibt den Kern als rundlicher Saum und wird auch Perikaryon genannt. Es wird durch das im intermembranösen Spalt der Mitochondrien lokalisierte AIF angefärbt. Bei den glatten Explantaten erschien die AIF-Färbung in der ONL und INL als rundliches Gitternetzwerk. Eine Dislokation von AIF in die Zellkerne war in keinem der Stadien sichtbar (Abb. 16C-D).

Bei den Photorezeptoren des rauen Phänotyps war ebenfalls eine Verklumpung der Innensegmente zu erkennen (Abb. 16E-G). Im Verlauf der Kultur konnte jedoch nicht beobachtet werden, dass sich die Innensegmente derartig schnell verkürzten. Das immunpositive Band in den plexiformen Schichten war ebenfalls sichtbar. Die Perikarien der Zellen der ONL und INL erschienen weniger rundlich, was auf deformierte Zellkerne schließen ließ. Außerdem wirkten sie weniger gleichmäßig strukturiert. Eine Dislokation von AIF in die Zellkerne war auch hier nicht zu beobachten.

Stellt man beide Phänotypen gegenüber, so wird der Unterschied vor allem in dem Erscheinungsbild der Perikarien sichtbar. Bei den glatten Explantaten waren diese rundlich, bei den rauen eher polymorph.

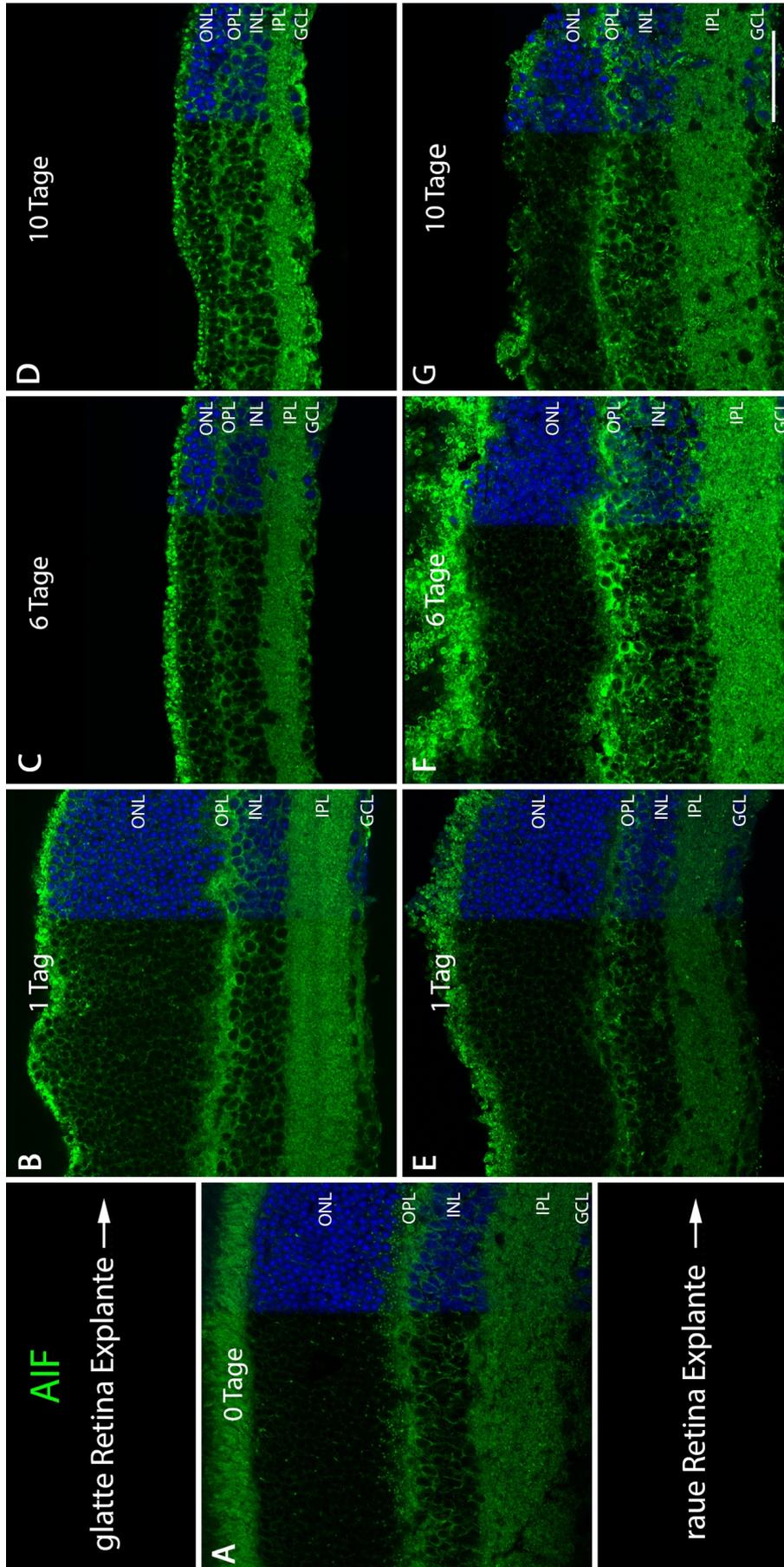


Abbildung 16: Nachweis des Apoptosestatus mittels AIF. (A) 0-Tage-Retina. (B-D) Retinakultur der glatten Explantate, nur anteilig gezeigt. (E-G) Retinakultur der rauen Explantate, nur anteilig gezeigt. Eine Dislokation von AIF in die Zellkerne ist nicht nachzuweisen. ONL/ INL: äußere/innere nukleare Schicht, OPL/ IPL: äußere/innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht. Maßstab in (G) gilt für (A-G): 50µm

3.3 Nachweis und Vorkommen von DNA-Schadens- und Reperaturproteinen während der Retinakultur

Für die Gentherapie als mögliche Therapiemethode mutationsbedingter Erkrankungen sollen zelleigene DNA-Reparaturmechanismen genutzt werden. Diese sollen dazu dienen, das zuvor eingebrachte korrekte Gen in die DNA einzubauen, nachdem die mutierte Sequenz ausgeschnitten wurde. Kommt es zu einem Doppelstrangbruch (DSB) in der DNA, können drei verschiedene zelleigene Reparaturmechanismen aktiviert werden: Homologe Rekombination, *Non homologous end joining* (NHEJ) und *Microhomology-mediated end joining* (MMEJ) (s. 1.2.4.1).

3.3.1 γ H2AX

γ H2AX ist eine Histonvariante und kann als Marker von DNA-Doppelstrangbrüchen genutzt werden. Zu weiterführendem theoretischen Hintergrund wird auf den Unterabschnitt 2.1.10 verwiesen.

Die relevanten Stadien der glatten und rauen Explantate sind in Abbildung 17 dargestellt. Bei der Tag-0-Retina war die γ H2AX-immunpositive Fluoreszenz ausschließlich außerhalb der ONL zu beobachten. Es ließen sich einige wenige Foki in der INL und der GCL ausmachen, ebenso ein γ H2AX-immunpositives Band in der OPL (Abb. 17A). Dieses Band war bei den glatten Explantaten nach 1 Tag in Kultur (Abb. 17B) und bei den rauen Explantaten nach 6 Tagen nicht mehr zu erkennen (Abb. 17F). Bei den glatten Explantaten kam es nach 1 Tag zu einem Anstieg der γ H2AX-immunpositiven Foki innerhalb der INL (Abb. 17B). Nach 6 Tagen waren auch in der ONL γ H2AX-immunpositive Foki zu erkennen. Weiterhin konnten einige pan-nukleäre Färbungen beobachtet werden, bei denen der gesamte Kern auffällig stark fluoreszierte (Abb. 17C, weiße Pfeilspitzen). Bei diesen war im DAPI-Bild keine typische Chromatinstruktur mehr zu erkennen. Nach 8 Tagen in Kultur kam es bei den glatten Explantaten erneut zu einem deutlichen Anstieg der Anzahl an Foki und pan-nukleären Färbungen (hier nicht gezeigt). Das Färbepild entsprach dem von 10 Tagen (Abb. 17D).

Bei den rauen Explantaten waren nach 1 Tag diverse Foki in der INL und der GCL zu sehen sowie einige Foki in der ONL (Abb. 17E). Pan-nukleäre Färbungen kamen bei den rauen Explantaten in allen Stadien vor. Nach 6 Tagen war die Menge an Foki gleichbleibend (Abb. 17F). Nach 10 Tagen waren sichtbar mehr Foki und pan-nukleäre Färbungen in der INL zu erkennen (Abb. 17G).

Ergebnisse

Betrachtet man die gesamte Retina, so ähnelten sich die Färbebilder der γ H2AX-Expression bei den rauen und glatten Phänotypen, wobei nach 10 Tagen bei den rauen deutlich mehr Zellkerne mit pan-nukleärer Färbung beobachtet werden konnten.

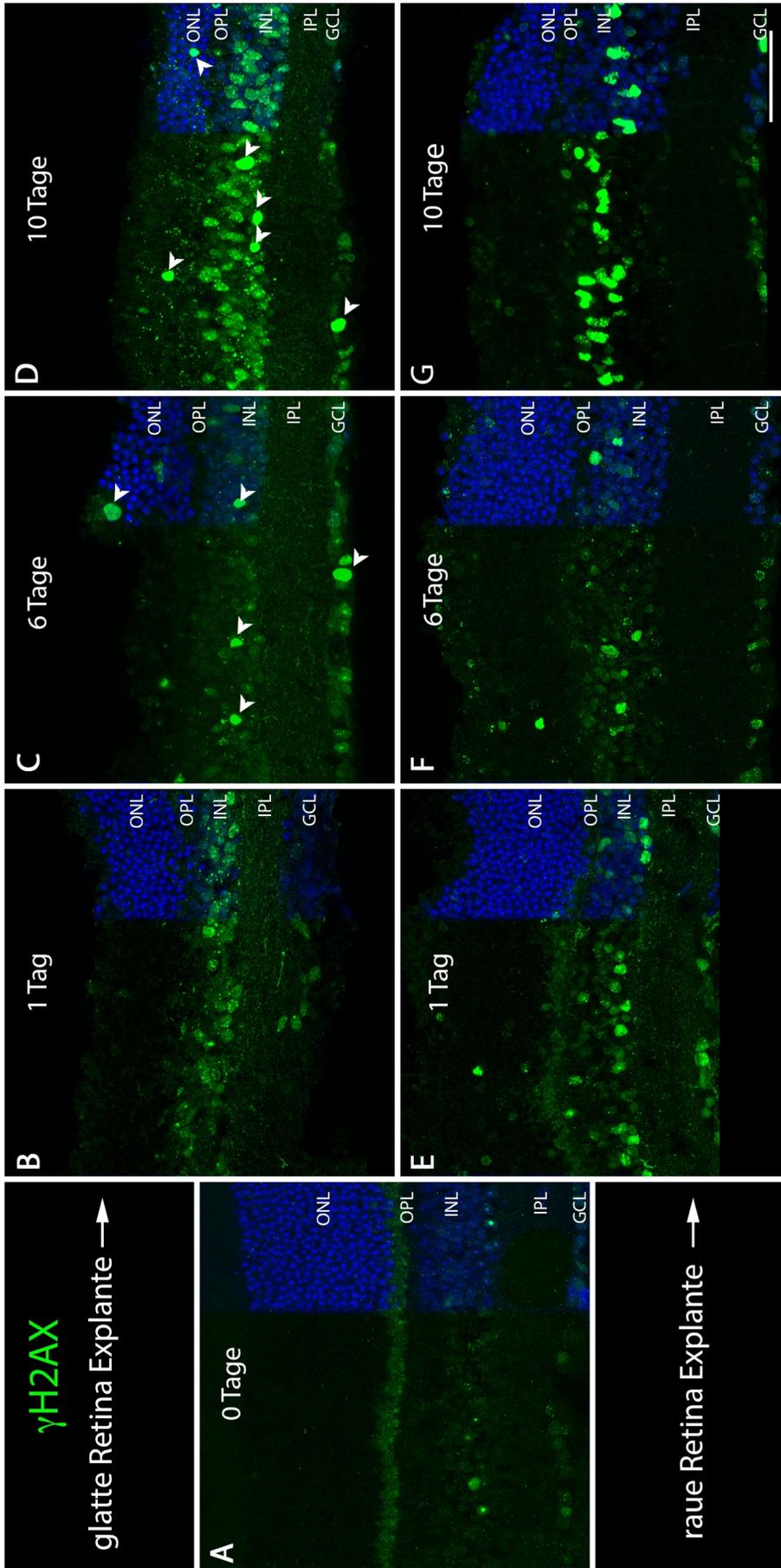


Abbildung 17: Markierung von DNA Doppelstrangbrüchen durch γ H2AX. (A) 0-Tage-Retina. (B-D) Retinakultur der glatten Explantate, nur anteilig gezeigt. (E-G) Retinakultur der rauhen Explantate, nur anteilig gezeigt. Zellkerne mit Verlust der invertierten Chromatinstruktur sind durch Pfeilspitzen markiert. ONL/ INL: äußere/ innere nukleare Schicht, OPL/ IPL: äußere/ innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht. Maßstab in (G) gilt für (A-G): 50 μ m

3.3.2 53BP1

Das Tumorsuppressor-p53-bindende Protein 1 (53BP1) kommt im NHEJ-Reparaturweg von DNA-Doppelstrangbrüchen vor. Für weiteren theoretischen Hintergrund wird auf den Unterabschnitt 2.1.10 verwiesen.

Der glatte und raue Phänotyp der retinalen Explantkultur ist in Auszügen in Abbildung 18 abgebildet. Bei der Tag-0-Retina wurden der basale Teil und einige apikale Zellen der INL, diverse Zellkerne der GCL und die Innensegmente der OPL angefärbt. Bei den glatten Explantaten waren nach 1 Tag die inneren Kernreihen der INL und die gesamte GCL immunpositiv (Abb. 18B). Das gleiche Färbesbild ergab sich nach 2 Tagen (hier nicht gezeigt). Nach 6 Tagen konnte die Färbung in der gesamten INL beobachtet werden (Abb. 18C). Nach 8 und 10 Tagen waren einige wenige 53BP1-immunpositive Nuklei in der ONL zu erkennen (Abb. 18D). In allen Stadien der glatten Retinakultur wies das Zytoplasma der Photorezeptoren eine leichte Immunfluoreszenz auf, die im Laufe der Zeit noch zunahm.

Ebenso wie bei den glatten, waren bei den rauen Explantaten nach Tag 1 die basalen Schichten der INL und die GCL mit Foki angefärbt (Abb. 18E). Nach 2 Tagen waren bei den rauen Explantaten jedoch deutlich weniger 53BP1-immunpositive Nuklei zu erkennen als bei den glatten (hier nicht gezeigt), was während der weiteren Kulturdauer auch konstant so blieb (Abb. 18 F-G). Ebenfalls war die 53BP1-Immunfluoreszenz des Zytoplasmas der Photorezeptoren in der ONL verringert.

Zusammenfassend lässt sich die Aussage treffen, dass bei den beiden Phänotypen nach 1 Tag in Kultur eine ähnliche Expression von 53BP1 zu beobachten war. Ab 4 Tagen in Kultur war bei den rauen Explantaten allerdings deutlich weniger Aktivität von 53BP1 nachweisbar als bei den glatten Explantaten.

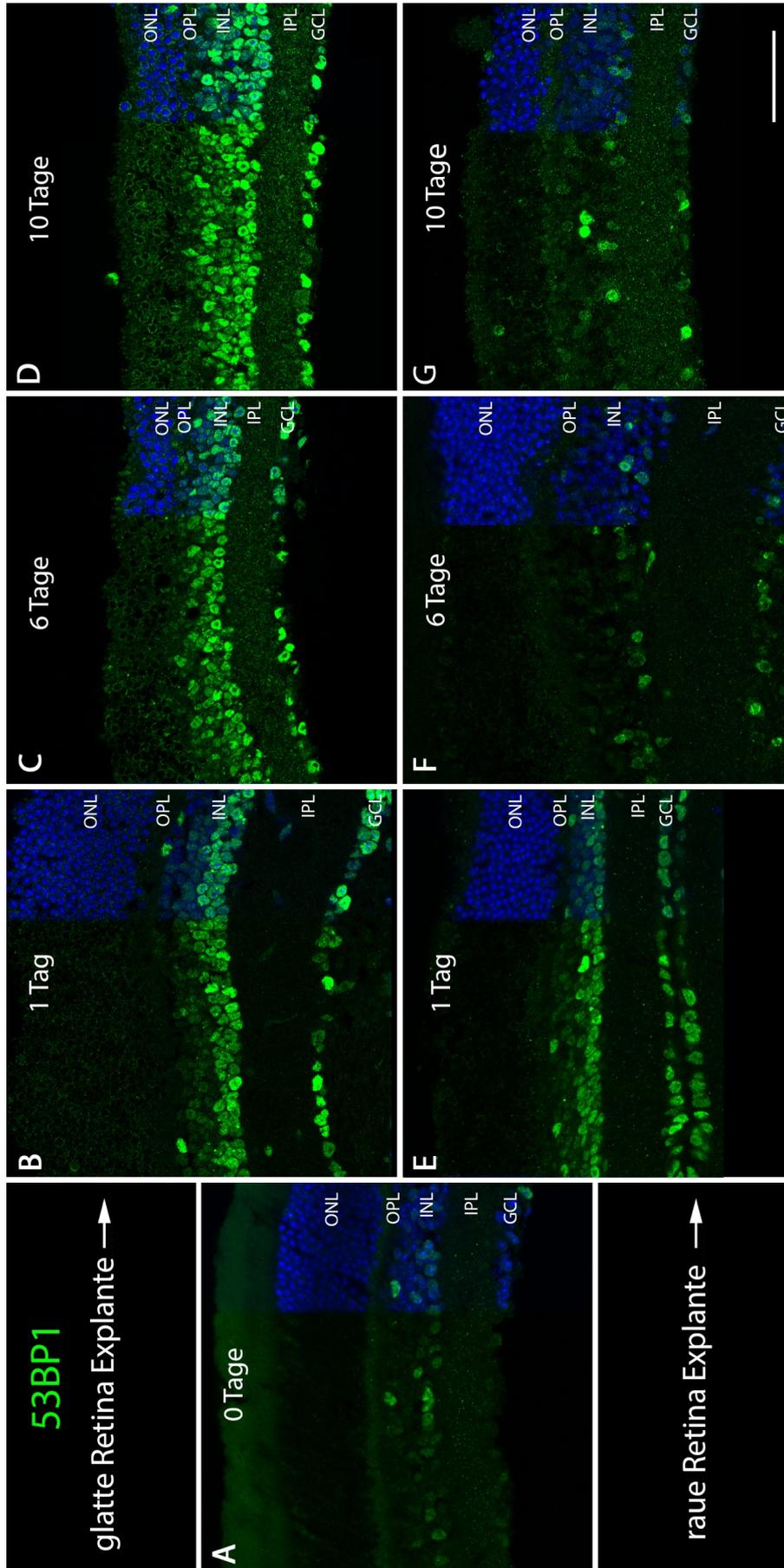


Abbildung 18: Nachweis von 53BP1, ein im NHEJ Reparaturweg vorkommendes Protein. (A) 0-Tage-Retina. (B-D) Retinakultur der glatten Explantate, nur anteilig gezeigt. (E-G) Retinakultur der rauhen Explantate, nur anteilig gezeigt. Bei den glatten Explantaten waren deutlich mehr Foki als bei den rauhen Explantaten nachzuweisen. ONL/ INL: äußere/ innere nukleare Schicht, OPL/ IPL: äußere/ innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht. Maßstab in (G) gilt für (A-G): 50 µm

3.3.3 Ku80

Ku80 ist Teil des NHEJ-Reparaturweges von DNA-Doppelstrangbrüchen. Zu weiterführenden Aussagen zum theoretischen Hintergrund wird auf den Unterabschnitt 2.1.10 verwiesen.

In Abbildung 19B-D sind die Tage 1 bis 4 der glatten Explantate gezeigt. Der Fokus liegt hierbei auf der Translokation der Ku80-Foki von der OPL in die ONL, die in den ersten Tagen der Retinakultur beobachtet wurde. Bei der 0-Tage-Retina bildeten viele kleine immunpositive Foki ein Band in der OPL (Abb. 19A). Nach 1 Tag in Kultur scheint eine Umverteilung der KU80-immunpositiven Foki in die ONL stattgefunden zu haben (Abb. 19B). Außerdem war eine deutliche Vergrößerung der Foki vorhanden. Nach 2 Tagen erreichte die Translokalisierung ihren Höhepunkt (Abb. 19C). In der ONL waren eine Vielzahl an Foki zu beobachten. Im Vergleich zum vorherigen Stadium waren die Foki leicht verkleinert. Nach 4 Tagen nahm die Anzahl an Foki in der ONL wieder ab und auch in der OPL kam es zu einer Reduktion (Abb. 19D). Die Größe der Foki blieb konstant.

In Abbildung 19E-G sind die Tage 1, 4 und 6 der rauen Explantate dargestellt. Wie bei der 0-Tage-Retina waren bei den rauen Explantaten nach 1 Tag in Kultur die Ku80-immunpositiven Foki lediglich in der OPL sichtbar (Abb. 19B). Es war jedoch eine leichte Vergrößerung der Foki feststellbar. Erst nach 4 Tagen in Kultur wurde die Umverteilung der Foki in die ONL sichtbar (Abb. 19C). Ihre Größe blieb konstant. Nach 6 Tagen traten sie in der ONL und OPL deutlich reduziert auf (Abb. 19D).

Betrachtet man die glatten und rauen Explantate im Vergleich, wird deutlich, dass bei den rauen Explantaten die Foki erst später von der OPL in die ONL umverteilt wurden.

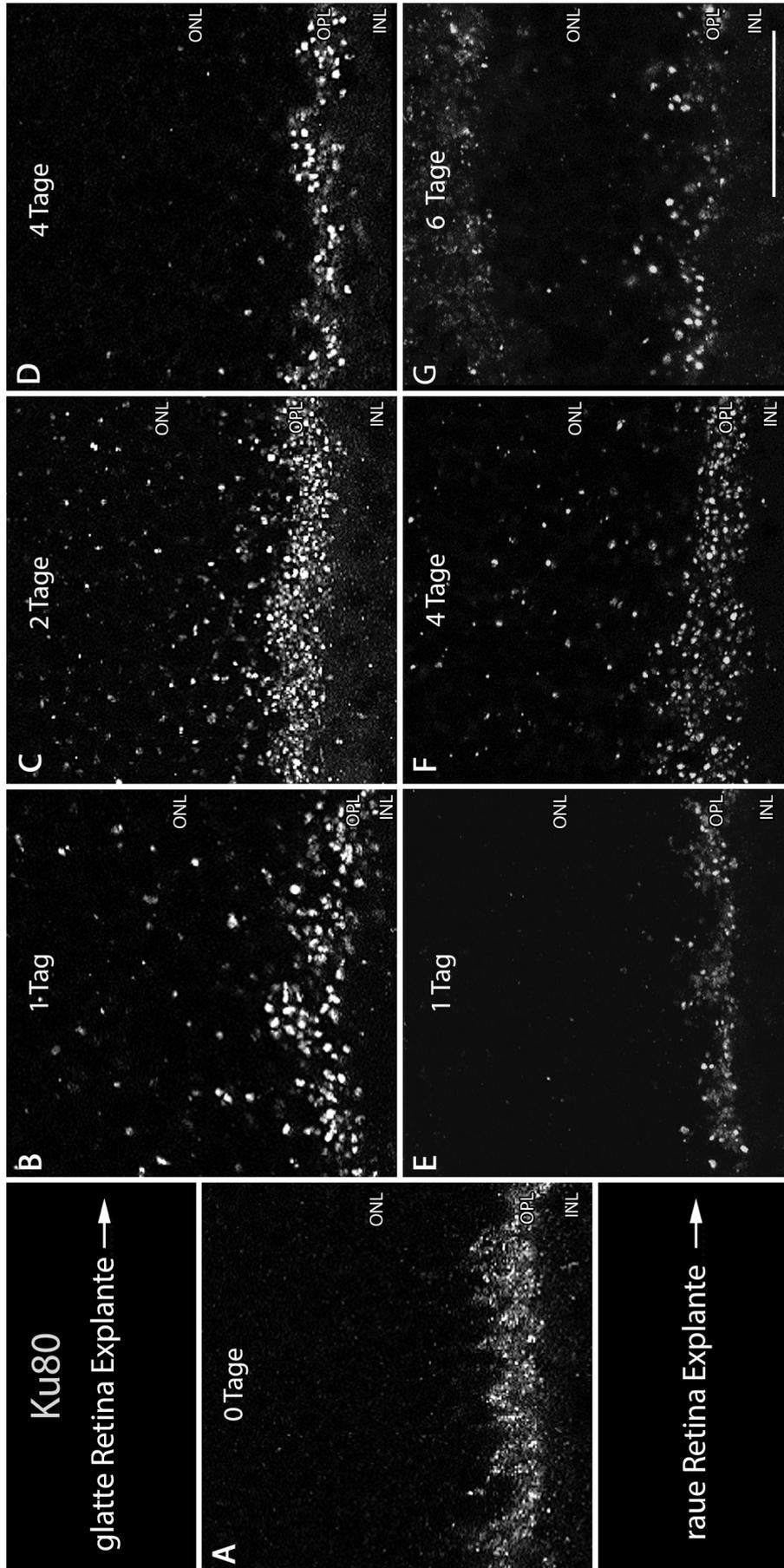


Abbildung 19: Translokalisierung von Ku80 von der OPL in die ONL. Foki zeigen die Aktivität von Ku80 nach Doppelstrangbrüchen. (A) 0-Tage-Retina. (B-D) Retinakultur der glatten Explantate, nur anteilig gezeigt. (E-G) Retinakultur der rauhen Explantate, nur anteilig gezeigt. ONL: äußere nukleare Schicht, OPL: äußere plexiforme Schicht, INL: innere nukleare Schicht. Maßstab in G gilt für A-G: 30µm.

3.3.4 CtIP

Das *C-terminal binding interacting protein* (CtIP) ist eine Endonuklease und fördert den HDR- sowie alternativ den MMEJ-Reparaturweg von DNA-Doppelstrangbrüchen (Makharashvili & Paull 2015). Weiterführender theoretischer Hintergrund wird in dem Unterabschnitt 2.1.10 dargelegt.

In Abbildung 20 ist die Färbung von CtIP in den glatten und rauen Explantaten abgebildet. Bei der 0-Tage-Retina waren ausschließlich außerhalb der ONL CtIP-positive Fluoreszenzen vorhanden (Abb. 20A). Diese waren in den Innensegmenten der Photorezeptoren und in den Fortsätzen der Bipolarzellen lokalisiert. Die Innensegmente der Photorezeptoren waren bei jedem Stadium stark CtIP-immunpositiv. Bei den glatten Präparaten waren die Innensegmente nach 1 Tag in Kultur deutlich verkürzt (Abb. 20B). Die Perikarien der Photorezeptoren und die der Bipolarzellen waren CtIP-positiv. Die rundliche Form der Perikarien der Bipolarzellen war gut sichtbar. Dies war auch nach 2 und 4 Tagen der Fall (nicht abgebildet). Nach 6 Tagen nahmen einige Perikarien der Bipolarzellen und Photorezeptoren eine weniger rundliche Form an, was auf deformierte Zellkerne schließen ließ (Abb. 20C). Nach 10 Tagen wurde die Färbung der Perikarien der Zellen der ONL und INL diffuser (Abb. 20D). Die Innensegmente waren nach 10 Tagen bei den glatten Retina-Explantaten allerdings kaum noch zu erkennen.

Bei den rauen Explantaten waren die Perikarien nach 1 Tag ebenfalls rundlich (Abb. 20E), die Innensegmente leicht verkürzt. Nach 6 Tagen konnten nur noch wenige rundliche Perikarien bei den Bipolarzellen beobachtet werden (Abb. 20F). Die Perikarien der Photorezeptoren waren deformiert und nur gering immunpositiv. Nach 10 Tagen war ihre ursprüngliche Morphologie in der ONL und INL nicht mehr vorzufinden (Abb. 20G).

Bei der Gegenüberstellung der beiden Phänotypen wird deutlich sichtbar, dass bei den glatten Explantaten die allgemeine Morphologie der Perikarien erhalten blieb, bei den rauen ging sie dagegen innerhalb der ersten Woche verloren.

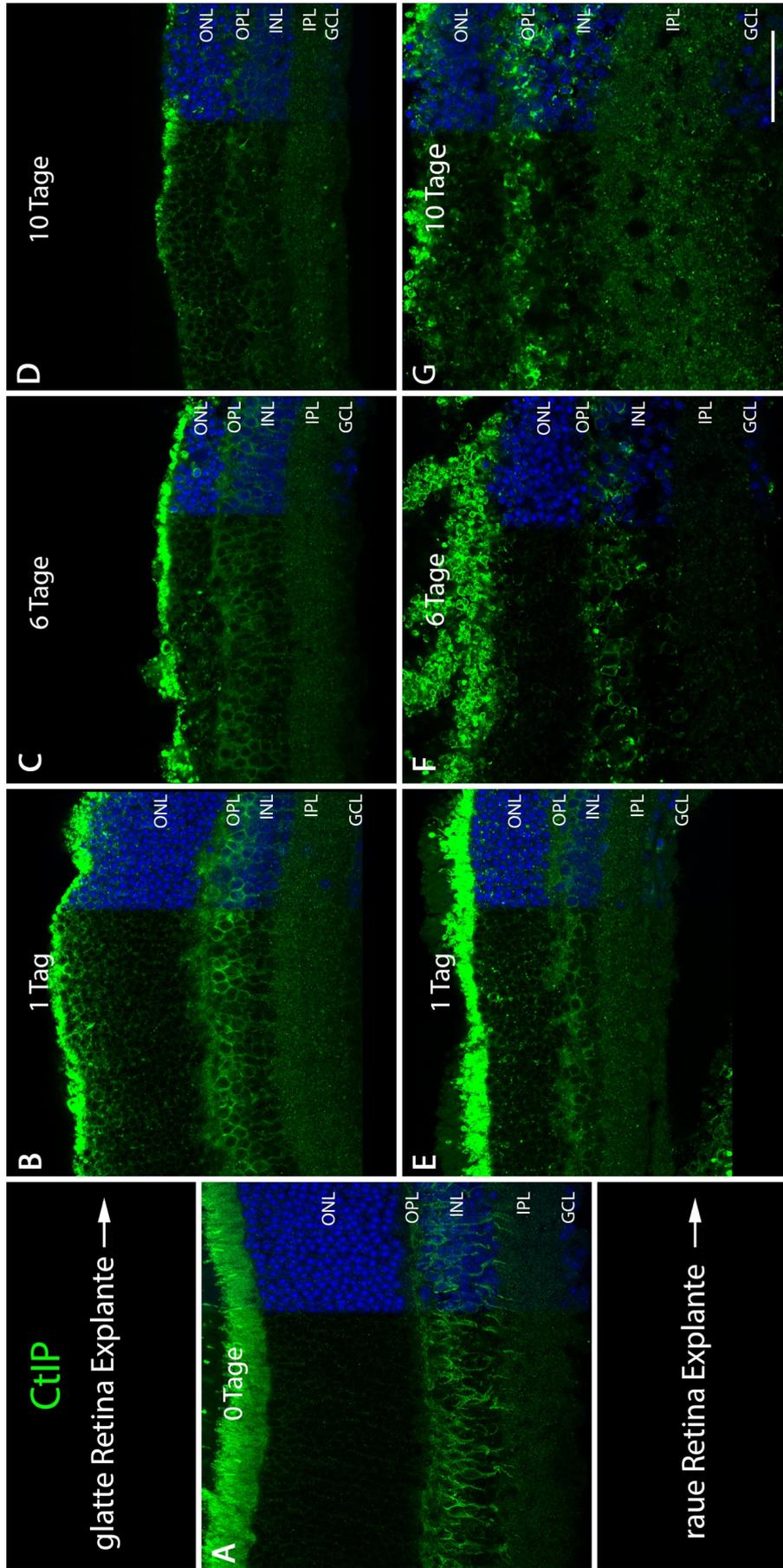


Abbildung 20: Nachweis von CtIP, welches HDR bzw. MMEJ fördert. (A) 0-Tage-Retina. (B-D) Retinakultur der glatten Explantate, nur anteilig gezeigt. (E-G) Retinakultur der rauhen Explantate, nur anteilig gezeigt. ONL/ INL: äußere/ innere nukleare Schicht, OPL/ IPL: äußere/ innere plexiforme Schicht, GCL: Ganglienzellschicht. Maßstab in (G) gilt für (A-G): 50µm

4 Diskussion

4.1 Ursachen verschiedener Phänotypen der organotypischen Retinakultur

Anhand der durchgeführten Immunfärbungen konnten im Zuge dieser Arbeit ein glatter von einem rauen Phänotyp unterschieden werden. Im Folgenden sollen die Ursachen der zwei verschiedenen Phänotypen näher untersucht werden. Generell wurden alle Explantate stets gleichbehandelt. Folgende mögliche Auslöser für das Auftreten der zwei verschiedenen Phänotypen konnten bisher ausgeschlossen werden. Bei jeder Präparation wurden mehrere Augen nacheinander präpariert. Hierbei traten beide Phänotypen auf. Dadurch konnten Ursachen ausgeschlossen werden, mit denen alle Explantate in Kontakt kamen, wie beispielsweise das Medium oder der Inkubator. Darüber hinaus traten beide Phänotypen bereits nach 1 Tag in Kultur auf. Dadurch konnte der Verdacht auf Kontamination beim Mediumwechsel, der alle zwei Tage erfolgte, während der Kultivierung ebenfalls verworfen werden. Es wurden außerdem tierspezifische Faktoren überprüft. Es stellte sich heraus, dass das Geschlecht der Tiere keinen Einfluss auf das Vorkommen der beiden Phänotypen hatte. Es liegt daher der Schluss nahe, dass die Ursache sehr spezifisch sein muss und schon vor Beginn der Kultivierung vorlag.

Hinsichtlich der Präparation wurde die Auswirkung des Abschneidens der *Ora serrata* und das Verletzen der Linse überprüft. Bekannt ist, dass die Linse den *Lens epithelium-derived growth factor* (LEDGF) ausschüttet, ein Überlebens- und Wachstumsfaktor, welcher antiapoptotisch auf die Photorezeptoren wirkt (Ahuja et al. 2001). Möglicherweise führt eine Verletzung der Linse während der Präparation dazu, dass protektive Signale ausbleiben. Eine Positivkontrolle für die rauen Explantate, bei der die Linse während der Präparation bewusst verletzt wird, um die Ausschüttung von LEDGF zu provozieren, konnte im Rahmen der Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. In weiteren Untersuchungen wäre auch zu prüfen, ob auch degenerative Botenstoffe ausgeschüttet werden, die ursächlich für den rauen Phänotyp sind. Weiterhin wurde kontrolliert, ob die proximale oder distale Axotomie des optischen Nervs Auswirkungen haben könnte. Untersuchungen an Retinakulturen nach Durchtrennung des Sehnervs haben gezeigt, dass sich die Axotomie nicht nur degenerativ auf die Ganglienzellen, sondern auch bis in die ONL auswirkt und hier zum Zelltod der Photorezeptoren und zur Aktivierung der Mikroglia führt (Engelsberg et al. 2004). Bei der Präparation wurde angestrebt die Papille zu erhalten. Die Präparation wurde im Hinblick auf die zuvor

genannten Aspekte auf verschiedene Arten durchgeführt, so wurde z. B. eine Verletzung der Linse vermieden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte dennoch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Art der Präparation und dem Auftreten der beiden Phänotypen gefunden werden. Weitere Versuchsansätze dafür sind oben beschrieben.

4.2 Morphologische Veränderungen der retinalen Neurone und Gliazellen während der Retinakultur

Die morphologischen Veränderungen, die in den glatten organotypischen Retinakulturen beobachtet wurden, sind vergleichbar mit degenerativen Prozessen, die auch *in vivo* auftreten. Dazu zählen beispielsweise Netzhauterkrankungen oder durch ein Trauma verursachte Reaktionen, wobei die Degeneration in 4 verschiedene Phasen eingeteilt wird (Cuenca et al. 2014). Diese konnten auch bei den glatten Explantaten beobachtet werden. Am ersten Tag der Kultivierung ließen sich noch keine morphologischen Veränderungen und keine Aktivierung der Gliazellen nachweisen. Dies entspricht der Phase 1 der Degeneration, in der noch keine sichtbaren molekularen Veränderungen vorkommen und die Retina morphologisch unverändert erscheint. Genauso sieht es morphologisch in der Retinakultur bei der Maus aus. Dennoch ist davon auszugehen, dass die Bedingungen der Retinakultur Stress auf die Zellen in der Phase 1 ausübten. Verdickte Müllerzellfortsätze traten erstmals an Tag 2 auf und leiten damit den Beginn der Phase 2 ein. Das in dieser Phase für Netzhauterkrankungen beschriebene verstärkte Absterben der Photorezeptoren trat jedoch erst an Tag 4 und 6 der Retinakultur in Erscheinung. Weiterhin war die in dieser Phase durch Cuenca *et al.* beschriebene Verkürzung der Innensegmente in der AIF-Immunfärbung sowie die Abnahme und Veränderung einiger Synapsen anhand der CtBP2-Immunfärbung in den hier vorliegenden Explantaten nachzuweisen. Anhand der DAPI-Immunfärbung konnten einige pyknotische Zellkerne ausgemacht werden. Ab Tag 8 kam es zu einer deutlichen Reduzierung der Retinadicke durch starken Verlust der Photorezeptoren, was zeigt, dass die Phase 3 der Degeneration erreicht wurde. Außerdem war eine verstärkte Gliose, d. h. eine Zunahme der GFAP-immunreaktiven Fortsätze der Müllerzellen, zu beobachten. Zum vollständigen Verlust der Innensegmente der Photorezeptoren kam es an Tag 10. Das weiterhin intakte Dendritennetzwerk in der ONL und die ovalen bis rundlichen Zellkörper in der INL zeigten, dass sich das Äußere der Bipolarzellen nicht stark verändert hat, wie dies in Phase 3 durch Cuenca *et al.* beschrieben wurde. Daraus lässt sich schließen, dass die Tage 8 und 10 in Kultur den Beginn der Phase 3 zeigen. Die Phase 4, in welcher sämtliche Photorezeptoren zu Grunde gehen, wurde in den 10

Diskussion

Tagen der Retinakultur nicht erreicht. Dazu müsste die Retina sehr wahrscheinlich noch deutlich länger in Kultur gehalten werden, was nicht Teil dieser Arbeit war.

Die gleichmäßige Degeneration der Zellkerne der Photorezeptoren ist u. a. durch den Verlust zirkulierender Systemfaktoren (retinale und choroidale Blutversorgung) zu erklären (Fernandez-Bueno et al. 2012). Außerdem ist bekannt, dass sich das Fehlen des retinalen Pigmentepithels und die Axotomie der Ganglienzellen bei der Kultivierung der Retina degenerativ auswirken (Kaempff et al. 2008). Die Kultivierung humaner Retina-Explantate hat gezeigt, dass durch diese Faktoren u. a. eine Reduzierung der Dicke der ONL sowie eine Verkürzung der Außensegmente der Photorezeptoren hervorgerufen wird (Fernandez-Bueno et al. 2012). Weiterhin entsprechen der fehlende Augeninnendruck und die mangelnde Lichtstimulation nicht der *in-vivo*-Situation und können negative Effekte auf das Retinagewebe haben. Hinzu kommt, dass es während der Präparation zu Beschädigungen in der Retina kommen kann, wie dem teilweisen oder kompletten Verlust der Außensegmente. Die Erneuerungsdauer eines Photorezeptoraußensegments eines Primaten beträgt 10 Tage (Strauss 2005). Durch den Verlust der Außensegmente kommt es zur Speicherung des Rhodopsins in den anderen Zellorganellen des Photorezeptors, was zu seiner Apoptose führt (Bakondi et al. 2015). Ein längerer Erhalt der Neurone könnte durch Veränderungen bezüglich des Drucks im Brutschrank, der Lichtstimulation oder der Kultivierung mit RPE erreicht werden.

Anhand der Doppelfärbung PKC α +CtBP2 konnte nachgewiesen werden, dass bei den glatten Explantaten die generelle Strukturierung und Schichtung der Retina während der gesamten Kulturdauer unverändert blieb und nah an der *in-vivo*-Situation lag. Das Sprouting der Bipolarzellen und die plastischen Veränderungen der Ribbon Synapsen können als Beweis dafür angesehen werden, dass die verbleibenden Neurone lebensfähig und gesund waren. Die Immunfärbung der Ribbon-Synapsen mittels CtBP2 zeigte, dass die Kontakte zwischen Bipolarzellen und den Photorezeptoren weiterhin vorhanden waren. Das Auftreten der Gliose bei älteren Kulturstadien könnte helfen, das Überleben der Neurone zu unterstützen und vor Umwelteinflüssen zu schützen. Sie kann den Untergang der Neurone jedoch nicht beliebig hinauszögern.

Die rauen Explantate zeigten im Gegensatz zu den glatten Explantaten starke morphologische Veränderungen. Die Bipolarzellen wiesen bereits am ersten Tag der Kultivierung eine atypische Zytoarchitektur auf. Dies wurde in Form von deformierten Zellkörpern mit unregelmäßiger Anordnung, nicht durchgängig verfolgbaren,

perlschnurartigen Axonen und klumpigen Dendriten sichtbar. Im rauen Phänotyp konnten die Merkmale der 4 verschiedenen Phasen der von Cuenca *et al.* beschriebenen Degeneration nicht gefunden werden. Daher lässt sich eine entsprechende Einteilung anhand der Phasen der Degeneration beim rauen Phänotyp nicht vornehmen. Der Verlust der Photorezeptorzellkerne in der ONL war zwar geringer als bei den glatten Explantaten, viele Zellkerne waren jedoch deformiert und hyperplastisch. Es kann davon ausgegangen werden, dass die retinalen Zellen dennoch lebensfähig waren, da auch hier Aussprossungen der Dendriten der Bipolarzellen in die ONL, das sog. Sprouting, zu erkennen war. Im Vergleich zu den glatten Explantaten konnte keine Gliose und nur eine langsam fortschreitende Apoptose nachgewiesen werden. Da die Gliose auch neurodegenerative Folgen haben kann (Bringmann *et al.* 2006), führt das Ausbleiben der Apoptose bei den rauen Explantaten möglicherweise zu neuroprotektiven Effekten.

4.3 Zelleigene DNA-Reparaturwege in der Retinakultur

Für die Gentherapie zur Behandlung degenerativer Erkrankungen der Retina, wie Retinitis pigmentosa, sollen zelleigene DNA-Reparaturmechanismen genutzt werden, um die defekte Gensequenz auszutauschen. Zu diesem Zweck wurden die während der Retinakultur auftretenden DNA-Doppelstrangbrüche und die zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen *Non homologous end joining* (NHEJ) durch 53BP1 und Ku80 und *homology directed repair* (HDR) durch CtIP untersucht.

Der immunhistochemische Nachweis von γ H2AX wurde genutzt, um die während der Retinakultur auftretenden DNA-Doppelstrangbrüche zu markieren. Es handelt sich hierbei um eine sensitive Methode, auch *DNA-Damage detection* genannt, bei der jeder γ H2AX-Fokus einen einzelnen DNA-Doppelstrangbruch markiert (Shaposhnikov *et al.* 2011). Nachdem der Doppelstrangbruch repariert wurde, wird γ H2AX dephosphoryliert, d. h. nach der Reparatur lösen sich die γ H2AX-Foki wieder auf (Kuo & Yang 2008). Ineffiziente DNA-Reparaturen führen zu keiner Auflösung der Foki (Chowdhury *et al.* 2005). Daher stellt die γ H2AX-Immunfärbung eine gute Methode dar, um die Rate und Effizienz der DNA-Reparatur beurteilen zu können (Huang *et al.* 2004). Die Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen in der ONL nahm mit der Dauer der Kultur zu. Die aufgetretenen DNA-Schäden können als Folge der Kultivierung der Retina angesehen werden.

Die Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche durch NHEJ in der murinen Retinakultur wurde durch Immunfärbung von 53BP1 nachgewiesen. Während des NHEJ verbindet 53BP1 die Enden des DNA-Doppelstrangbruchs miteinander und erleichtert so ihre Ligation (Chapman et al. 2012). Insbesondere bei den älteren Stadien der Retinakultur, ab Tag 6 der glatten Explantate wurde deutlich, dass in der ONL lediglich der Grenzsaum der Zellkerne der Photorezeptoren, also das Euchromatin, 53BP1-positive Foki zeigte. Das sich im Chromozenter befindende Heterochromatin wurde nicht angefärbt. Die 53BP1-Immunfärbung korrelierte also nicht mit den durch γ H2AX gezeigten DNA-Doppelstrangbrüchen, welche in den höheren Kulturstadien gleichmäßig innerhalb der ONL verteilt waren. Die Photorezeptoren nachaktiver Tiere besitzen eine invertierte Chromatin-Anordnung. Das Heterochromatin ist in der Mitte des Zellkerns lokalisiert, wodurch die Streuung des Lichtes reduziert wird (Solovei et al. 2009). Die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ist jedoch bei dicht gepacktem Heterochromatin nicht möglich (Petersen-Jones & Meek 2014). Frohns und Kollegen (2014) stellten fest, dass Mäuse ein vermindertes Kap1-Level besitzen und somit die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen gestört ist (Frohns et al. 2014). Kap1 ist für die Organisation des Chromatins zuständig. Dass die 53BP1-Foki in der ONL lediglich im Euchromatin der Zellkerne der Photorezeptoren zu beobachten waren, verdeutlicht die Unfähigkeit der adulten murinen Stäbchen, 53BP1-Foki im Heterochromatin zu bilden und bestätigt die Ergebnisse von Frohns. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die DNA-Reparaturkapazität beim Menschen nicht beeinträchtigt ist, da die Zellkerne der Photorezeptoren des Menschen eine andere Chromatinstruktur besitzen (Yanik et al. 2016). Hierbei ist das Heterochromatin in der Peripherie und das Euchromatin im Zentrum des Kerns lokalisiert. Um hier ein mit dem Menschen vergleichbares Modell zu schaffen, müssten tagaktive Tiere untersucht werden, die die gleiche Chromatinstruktur wie der Mensch aufweisen. Eine weitere Variante stellen Mäuse dar, denen durch einen Gentransfer der Lamin-B-Rezeptor hinzugefügt wurde. Die Abwesenheit des Lamin-B-Rezeptors ist für die fehlende Verankerung des Heterochromatins an der Zellwand und damit die invertierte Chromatinstruktur verantwortlich (Solovei et al. 2013).

Die 53BP1-Immunfärbung in der INL der Stadien bis 6 Tage deckt sich ebenfalls mit den Ergebnissen von Frohns (Frohns et al. 2014). In der INL werden nur die basalen Schichten angefärbt, da 53BP1 hier zellspezifisch unter anderem in bestimmten Amakrin- und Bipolarzellen sowie GS-positiven-Müllerzellen exprimiert wird (Frohns et al. 2014). Bei den glatten Explantaten konnte nach 6 Tagen eine Zunahme der 53BP1-positiven Färbung in den apikalen Schichten der INL beobachtet werden. Diese ist möglicherweise durch die gliotischen Veränderungen und dem Hypertrophieren der Fortsätze der Müllerzellen zu erklären.

Die Reparaturaktivität von DNA-Doppelstrangbrüchen durch HDR wurde anhand des Antikörpernachweises von CtIP überprüft. Während des HDR-Reparaturweges leitet CtIP die Resektion der beiden Bruchenden des DNA-Doppelstrangs ein (Reczek et al. 2013). Für HDR müssen die Schwesterchromatiden als Template dienen. Daher kann HDR nur während der G2-Phase und S-Phase des Zellzyklus erfolgen. Insofern ist dies bei postmitotischen Zellen wie den Photorezeptoren nicht der vorherrschende DNA-Reparaturweg, da sie sich in der G0-Phase befinden. Die Expression von CtIP konnte bei den glatten und rauen Phänotypen in den Innensegmenten und in den Perikarien der Zellen der ONL, jedoch nicht im Chromozenter lokalisiertes Heterochromatin der Photorezeptoren beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass die mit CtIP assoziierte Reparatur durch HDR ebenfalls nicht im Heterochromatin stattfindet. Frohns stellte fest, dass adulte Mäuse im Vergleich zu postnatalen Mäusen ein verringertes CtIP-Level aufweisen (Frohns et al. 2014).

Der Nachweis von Ku80 korreliert ebenfalls mit den Erkenntnissen, dass die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen im Heterochromatin gestört ist. Als Teil des NHEJ-Reparaturweges, stabilisiert Ku80 die DNA-Enden und ermöglicht so die Ligation der Bruchenden. Bei der Untersuchung der hier vorliegenden murinen Retina-Explantate konnten keine Ku80-Foki im Heterochromatin der Photorezeptoren beobachtet werden. Die Chromozenter färben sich mit DAPI stark an. Bemerkenswert war jedoch die Umverteilung der Ku80-Foki über die Dauer der Retinakultur. Bei der Retina, die sich nicht in Kultur befand (0-Tage-Retina, Kontrolle), waren lediglich Ku80-positive Foki in der plexiformen Schicht zu beobachten. Bei den glatten Explantaten kam es nach 1 Tag in Kultur zu einer Umverteilung einiger Ku80-Foki in die ONL. Nach 2 Tagen in Kultur war das Maximum an Ku80-Foki in der ONL erreicht. Nach 4 Tagen nahmen die Foki in der ONL sowie in der OPL wieder ab. Bei den rauen Explantaten kam es erst nach 4 Tagen zur Umverteilung, die nach 6 Tagen wieder abnahm. Dieses Muster erweckt den Anschein, dass die plexiforme Schicht eine Art Reservoir für Ku80 darstellt, welches bei degenerativen Prozessen in die OPL ausgeschüttet wird. Bei den glatten Explantaten scheint das Reservoir nach 4 Tagen erschöpft zu sein, bei den rauen nach 6 Tagen. In den glatten Explantaten kam es zur Delokalisation von Ku80 in die ONL und anschließender Abnahme der Foki, bevor eine erhöhte Apoptoseaktivität bei den Photorezeptoren beobachtet wurde (ab Tag 6). Die von Wagner durch qPCR nachgewiesene kaum erhöhte Ku80-Expression während der Retinakultur könnte ein Beweis dafür sein, dass es lediglich zu einer Umverteilung, jedoch nicht zu einer Zunahme des Ku80-Levels kommt (Wagner 2015). Hierbei gilt jedoch zu beachten, dass

mit qPCR das mRNA-Level und nicht die Protein-Menge gemessen wird. Die beobachtete Delokalisation deutet auf die Aktivität von Ku80 im Reparatur-Prozess von DNA-Doppelstrangbrüchen hin.

Generell gilt es zu bedenken, dass über die Immunhistochemie keine quantitative Aussage über die untersuchten DNA-Reparaturwege getroffen werden kann. Hierfür müssten Analysen mittels Durchflusszytometrie oder qPCR durchgeführt werden.

4.4 Apoptose-Nachweis

Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Phänotypen der Retina-Explantate wurde durch den Apoptose-Nachweis mittels TUNEL-Färbung sichtbar. Bei den glatten Explantaten konnte in den ersten Stadien bis Tag 4 der Kultur mithilfe dieser Methode keine Apoptose nachgewiesen werden. Ab 4 Tagen kam es zu einer kontinuierlichen Zunahme der TUNEL-Färbung von der ONL in die INL und parallel zum fortschreitendem Zelltod. Diese Steigerung der TUNEL-positiven Zellkerne geht bei den glatten Explantaten mit der Zunahme der γ H2AX-Immunfärbung und somit der Zunahme der DNA-Doppelstrangbrüche einher. Auch die sichtbare Reduzierung in der Retinadicke passt zu diesen Ergebnissen. Entsprechende Beobachtungen wurden ebenfalls in anderen murinen Retinakulturen beschrieben (Ferrer-Martin et al. 2014; Reidel et al. 2006).

Bei den rauen und glatten Explantaten konnte ein Voranschreiten der durch TUNEL markierten Apoptose von apikal nach basal in der Retina beobachtet werden. Bei den rauen Explantaten war jedoch bereits zu Beginn der Retinakultur ein großer Anteil der Zellkerne in der ONL TUNEL-positiv. Die starke TUNEL-Färbung war widersprüchlich zu dem Erhalt der Zellkernreihen und damit der wenig veränderten Schichtdicke in der Retina. Die Aussagekraft der TUNEL-Färbung wird durch einige Faktoren limitiert. So ist nicht klar, wie viele DNA-Doppelstrangbrüche benötigt werden, damit ein positives TUNEL-Signal ausgelöst wird (Elmore 2007). Weiterhin kann bei der TUNEL-Färbung nicht zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden (Schaper et al. 1999). Es ist auch möglich, dass der TUNEL-Assay fälschlicherweise Zellen anfärbt, die sich in DNA-Reparatur befinden (Schaper et al. 1999).

Die Zellkerne der rauen Explantate wiesen im Laufe der Kultur eine veränderte Morphologie auf. Unwiderlegbar lassen sich apoptotische Zellen anhand von morphologischen Kriterien durch die Transmissionselektronenmikroskopie identifizieren.

Diskussion

Eine Zelle befindet sich in Apoptose, wenn hierbei Blasen an der Zelloberfläche, verdunkeltes, dichtes Zytoplasma, große Vakuolen, desorganisiertes Zytoplasma und nukleare Fragmentierung beobachtet werden können (Watanabe et al. 2012). Außerdem kommt es zu einer Vergrößerung der Distanz zu den benachbarten Zellen. Die Zellmembran ist noch bis zum späten Stadium der Apoptose intakt, daher können TUNEL-positive Kerne zum Zeitpunkt der Markierung ein intaktes Zytoplasma aufweisen (Watanabe et al. 2012). Der Zerfall in kleinere Partikel geschieht erst im letzten Stadium der Apoptose. Anhand der DAPI-Immunfärbung konnten nach 6 Tagen in Kultur bei den glatten Explantaten einige deformierte Zellkerne beobachtet werden. Bei den rauen Explantaten waren mehr deformierte Zellkerne und einige hyperplastische Zellkerne vorhanden. Zusätzlich konnte bei der DAPI-Immunfärbung bei den rauen Explantaten desorganisiertes Zytoplasma beobachtet werden. Weitere Erkenntnisse könnten mit der Methode der Elektronenmikroskopie gewonnen werden. Hierbei können jedoch nur kleine Bereiche untersucht werden, hohe Kosten und ein großer Zeitaufwand wären nötig.

Denkbar wäre die Hypothese, dass es bei den rauen Explantaten zur Fragmentierung der DNA kommt, die Reparatur- oder Apoptoseprozesse jedoch gestört sind und die Apoptose in ihrer finalen Form nicht zu Ende gebracht wird. Eine Degradation der DNA ließe sich durch die DNA-Laddering-Technik nachweisen, bei der im Falle einer Degradation beim Durchführen einer Gelelektrophorese ein charakteristisches Stufenmuster erkennbar wäre (Saadat et al. 2015). Die Fragmentierung der DNA findet allerdings erst im späteren Stadium der Apoptose statt, daher ließen sich mit dieser Methode apoptotische Zellen nicht final ausschließen. Auch eine Unterscheidung zur Nekrose wäre nicht möglich, da nekrotische Zellen ebenfalls DNA-Fragmente entwickeln können (Elmore 2007). Weiterhin könnte die Untersuchung apoptotischer Regulatorproteine, wie Bax oder Bak, mittels Immunfärbung Aufschluss darüber bringen, ob und an welcher Stelle der Apoptoseweg zum Erliegen kommt. Um eine definitive Aussage treffen zu können, ist eine Kombination verschiedener Nachweisverfahren nötig.

Zusätzlich zu dem Apoptose-Nachweis durch den TUNEL-Assay wurde die Caspasen-unabhängige Apoptose durch Immunfärbung gegen AIF nachgewiesen. Die Translokation von AIF aus den Photorezeptor-Mitochondrien in den Zellkern führt zur Kondensation des Chromatins und zur Fragmentierung der DNA. Die Ergebnisse der AIF-Färbung zeigen jedoch keine Verschiebung der Fluoreszenz in den Zellkern und sind somit widersprüchlich zu den Ergebnissen der TUNEL-Färbung und dem

fortschreitenden Zellkernverlust. Sanges et al. konnten in einem Retinitis-Pigmentosa-Mausmodell die Aktivierung von AIF und Caspase 12 *in vivo* und *in vitro* und eine Kolo-kalisation mit TUNEL-positiven Photorezeptoren zeigen (Sanges et al. 2006). Bei Wildtyp-Tieren, bei denen durch Nitrosomethyl-Urea massive Apoptose hervorgerufen wurde, konnte jedoch keine Lokalisation von AIF und Caspase 12 im Zellkern beobachtet werden. Als eine mögliche Ursache für die nicht erfolgte Translokation nennt Sanges, dass bei einem fortgeschrittenen apoptotischen Zustand AIF möglicherweise bereits degradiert wurde (Sanges et al. 2006). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Translokation von AIF aus den Mitochondrien in den Zellkern in weniger als 15 Minuten stattfindet und in kürzester Zeit zum Zelltod führt (Landshamer et al. 2008). Der Zeitpunkt der Analyse ist demnach ausschlaggebend. Außerdem können vermutlich zu geringe Mengen von AIF im Zellkern nicht erfasst werden. Denkbar ist, dass die TUNEL-positiven Zellkerne eine DNA-Fragmentierung durch Nekrose zeigen, welche durch die Bedingungen der Retinakultur verursacht wurde, und daher keine pro-apoptotischen Faktoren nachweisbar sind (Krysko et al. 2008). Um zu überprüfen, ob in den Photorezeptoren auch keine Caspasen-abhängige Apoptose stattfindet, müsste ein Antikörpernachweis gegen Caspasen oder Cytochrom C, einem Auslöser der Caspasen-Kaskade, durchgeführt werden.

4.5 Schlussfolgerungen

Ziel dieser Arbeit war es, durch morphologische Charakterisierung zu eruieren, ob sich die Retinakultur als intermediäres Modell zwischen Zellkultur und *in-vivo*-Experimenten für die Etablierung der Gentherapie eignet. Auch wenn das Kultivieren der Retina zum Absterben einiger Zellen führt, überwiegen die Vorteile der direkten Zugänglichkeit der Photorezeptoren durch das *ex-vivo*-System. Substanzen können direkt in das Kulturmedium gegeben werden und sowohl apikal als auch basal der Retina appliziert werden. Es ermöglicht die Simulation subretinaler Injektionen, die voraussichtlich in der Gentherapie Anwendung finden werden (Reidel et al. 2006). Des Weiteren wird durch die Retinakultur eine Reduktion der Menge an Tierversuchen und Materialien möglich.

Die Kultivierung der adulten murinen Retina wurde bisher nur begrenzt erforscht. Vergleiche zwischen adulten und juvenilen murinen Retinakulturen haben jedoch belegt, dass adulte Kulturen eine reduzierte Plastizität und somit einen geringeren Erhalt der Zytoarchitektur zeigen (Ferrer-Martin et al. 2014).

Diskussion

Es gilt es zu berücksichtigen, dass die statistische Aussagekraft dieser Arbeit durch die geringe Anzahl an Versuchstieren limitiert ist. Ferner ist zu bedenken, dass die Ergebnisse der Untersuchungen an nachtaktiven Mäusen aufgrund ihrer invertierten Chromatinanordnung in den Stäbchenphotorezeptoren und der damit einhergehenden Störung der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur nur bedingt auf den Menschen übertragbar sind.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Nutzung der glatten Retinakultur bis zum 6. Tag für gentherapeutische Studien eignen würde. Bis zu diesem Tag ist noch über die Hälfte der Kerne der Photorezeptoren erhalten und die morphologischen Veränderungen sind gering. Im Anschluss daran kommt es offensichtlich zu einer stärkeren Degeneration. Transduktionen bei adulten organotypischen Retinakulturen mittels AAV-Vektoren zeigten nach 6 Tagen ein GFP-Signal in Photorezeptoren und Müllerzellen (Yanik et al. 2016). Aus diesem Grund lässt sich annehmen, dass der Zeitraum von 6 Tagen ausreichend wäre, um die Methoden der Gentherapie zu testen.

Des Weiteren konnte dargelegt werden, dass die Nutzung der rauen Retinakultur nicht sinnvoll ist, da die Zytoarchitektur von der *in-vivo*-Situation und anderen bisher beschriebenen Retinakulturen abweicht.

5 Zusammenfassung

Um mutationsbedingte degenerative Netzhauterkrankungen wie Retinitis pigmentosa therapieren zu können, stellt die Methode der Gentherapie eine vielversprechende Option dar. Hierbei sollen zelleigene DNA-Reparaturmechanismen genutzt werden, um die mutierte Gensequenz durch ein exogenes korrektes DNA-Konstrukt auszutauschen. In dieser Arbeit wurde die adulte organotypische Retinakultur von C57Bl6-Wildtypmäusen charakterisiert, um beurteilen zu können, ob diese sich als intermediäres Modell zwischen Zellkultur und *in-vivo*-Experimenten eignet, um die Methodik der Gentherapie erforschen zu können. Hierfür wurden Retinaexplantate präpariert und anschließend im Brutschrank bis zu 10 Tage kultiviert. Nach Entnahme erfolgte die Fixation und Einbettung im Gefriermedium und die Herstellung von Kryostatschnitten. Die Charakterisierung erfolgte anhand von Immunfluoreszenzfärbungen der Proteine der retinalen Neurone (PKC α +CtBP2), Gliazellen (GFAP+ GS), DNA-Schadens- und Reparaturproteine (γ H2AX, 53BP1, Ku80, CtIP) sowie durch Apoptosenachweis mittels TUNEL-Assay und Immunfärbung von AIF. Im Laufe der Arbeit konnten zwei morphologisch unterschiedliche Phänotypen differenziert werden, die als glatte und raue Explantate benannt wurden. Die Ursache für das Auftreten konnte nicht abschließend geklärt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Morphologie der glatten Explantate über die gesamte Dauer der Kultur im Allgemeinen erhalten blieb, wohingegen die rauen Explantate Veränderungen aufwiesen. Bei den rauen Explantaten blieb eine Gliose aus, ferner fiel der apoptotische Nachweis mittels TUNEL-Assay stark positiv aus und war widersprüchlich zu dem nicht entsprechend schnell fortschreitenden Zelltod. Bei den glatten Explantaten kam es nach 4 Tagen zu leichten gliotischen Veränderungen, was mit den Phasen der Degeneration in der Retina bei degenerativen Netzhauterkrankungen übereinstimmte und als kulturbedingte Erscheinung angesehen werden kann. Der Zellkernverlust der Photorezeptoren war langsam fortschreitend, ebenfalls erkennbar am TUNEL-Nachweis. Bei beiden Phänotypen kam es zu einer Zunahme der DNA-Doppelstrangbrüche. Nachgewiesene DNA-Reparaturproteine zeigten, dass bedingt durch die invertierte Chromatinstruktur der Stäbchenphotorezeptoren bei den nachtaktiven Mäusen keine Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche im Heterochromatin erfolgte. Eine Umverteilung von Ku80 aus der OPL in die ONL hat bei beiden Phänotypen stattgefunden und bekräftigt die Bedeutung von Ku80 im Reparaturprozess von DNA-Doppelstrangbrüchen. Die Arbeit hat gezeigt, dass bei den glatten Explantaten bis zum 6. Tag in Kultur nur wenige Veränderungen auftraten. Daher eignen sich die glatten Explantate im Gegensatz zu den rauen, um die Methoden der Gentherapie zu untersuchen.

6 Summary

To be able to treat mutation-induced degenerative retinal diseases, such as retinitis pigmentosa, gene therapy counts as a promising option. Cellular DNA repair mechanisms are supposed to be used to exchange the mutated gene sequence through an exogenous correct DNA construct. In this work, the adult organotypic retina culture of C57Bl6 wildtype mice was characterized to determine whether it is suitable as an intermediate model between cell culture and *in vivo* experiments to study the methods of genome editing. For this purpose, retina explants were dissected and then cultured for up to ten days. After removal, explants were fixed and embedded into freezing medium and cryostat sections were produced. Characterization was carried out by immunofluorescence staining of the proteins of retinal neurons (PKC α +CtBP2), glia cells (GFAP+ GS), DNA damage and repair proteins (γ H2AX, 53BP1, Ku80, CtIP) and by apoptosis detection via TUNEL assay and immunostaining of AIF. During this work two morphological different phenotypes, which were titled as smooth and rough explants, were differentiated. The cause of the occurrence could not be conclusively clarified. The results showed that the morphology of the smooth explants was generally maintained throughout the duration of the culture, while the rough explants showed variations. In the case of the rough explants, a gliosis failed, and the apoptotic detection by TUNEL assay was strongly positive, which was contradictory to the not corresponding strong progressive cell death. In the case of the smooth explants, light gliotic changes occurred after four days, which corresponded to the phases of degeneration in the retina and could be regarded as a culture-conditioned phenomenon. The loss of the photoreceptor nuclei was slowly progressing also shown by TUNEL assay. In both phenotypes, DNA double-strand fractures increased. Detected DNA repair proteins showed that due to the inverted chromatin structure of rods of the nocturnal mice, no repair of double strand breaks in the heterochromatin occurs. A redistribution of Ku80 from the OPL to the ONL in both phenotypes has taken place and confirms the importance of Ku80 to the DNA repair process of double strand breaks. This work has shown that in the case of the smooth explants, only a few changes occurred until the sixth day in culture. Therefore, the smooth explants, unlike the rough ones, would be suitable to study the methods of gene therapy.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines humanen und eines Mausauges	3
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines synaptischen Ribbons.	6
Abbildung 3: Degenerative Vorgänge in der Retina.	11
Abbildung 4: Zelleigene Reparaturwege nach einem Doppelstrangbruch in der DNA. 16	
Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Laser-Scanning-Mikroskops.	22
Abbildung 6: Anzahl an Kernen pro Fläche in der ONL in Abhängigkeit von der Anzahl an Kernreihen in der ONL	23
Abbildung 7: glatte Retina-Explantate.	33
Abbildung 8: raue Retina-Explantate.....	34
Abbildung 9: Dicke der glatten Retina-Präparate.	37
Abbildung 10: Dicke der rauen Retina-Explantate.	38
Abbildung 11: Anzahl an Kernen in der ONL.	39
Abbildung 12: Morphologie der Zellkerne der glatten und rauen Phänotypen im Vergleich.	40
Abbildung 13: GFAP und GS-Färbung in glatten Retina-Explantaten.....	42
Abbildung 14: GFAP und GS-Färbung in rauen Retina-Explantaten.	43
Abbildung 15: Nachweis des Apoptosestatus mittels TUNEL-Assay.	45
Abbildung 16: Nachweis des Apoptosestatus mittels AIF.	47
Abbildung 17: Markierung von DNA Doppelstrangbrüchen durch γ H2AX.....	50
Abbildung 18: Nachweis von 35BP1	52
Abbildung 19: Translokalisierung von Ku80 von der OPL in die ONL.....	54

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Lösungen	27
Tabelle 2: verwendete Chemikalien	27
Tabelle 3: verwendete Primärantikörper	28
Tabelle 4: verwendete Sekundärantikörper.....	28
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien.....	29
Tabelle 6: verwendete Geräte	29
Tabelle 7: verwendete Software	30
Tabelle 8: Häufigkeit der beiden Phänotypen.	31

Literaturverzeichnis

- Acharya, R., Ng, Y.E. & Suri, J.S., 2008. Image Modeling of the Human Eye.
- Ahuja, P. et al., 2001. Lens epithelium-derived growth factor (LEDGF) delays photoreceptor degeneration in explants of rd/rd mouse retina. *Neuroreport*, 12(13), pp.2951–2955.
- Alnemri, E.S. et al., 1996. Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature. *Cell*, 3(2), pp.125–126.
- Aparicio, T., Baer, R. & Gautier, J., 2014. DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. *DNA Repair*, 19, pp.169–175.
- Baehr, W. et al., 2003. The retinoid cycle and retina disease. *Vision Research*, 43(28), pp.2957–2958.
- Bakondi, B. et al., 2015. In Vivo CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter-3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Molecular Therapy*, 24(September), pp.556–563.
- Barhoum, R. et al., 2008. Functional and structural modifications during retinal degeneration in the rd10 mouse. *Neuroscience*, 155(3), pp.698–713.
- Belecky-Adams, T.L. et al., 2013. Reactive Muller Glia as Potential Retinal Progenitors. *Neural Stem Cells - New Perspectives*, pp.73–117.
- Bonner, W.M. et al., 2011. gH2AX and cancer. *Cancer*, 8(12), pp.957–967.
- Bothmer, A., Robbiani, D. & Virgilio, M. Di, 2011. Regulation of DNA end joining, resection, and immunoglobulin class switch recombination by 53BP1. *Molecular cell*, 42(3), pp.319–329.
- Boujrad, H. et al., 2007. AIF-mediated programmed necrosis: A highly regulated way to die. *Cell Cycle*, 6(21), pp.2612–2619.
- Boya, P. et al., 2016. Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging. *Progress in Retinal and Eye Research*.
- Bringmann, A., Iandiev, I., et al., 2009. Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. *Progress in Retinal and Eye Research*, 28(6), pp.423–451.
- Bringmann, A. et al., 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25(4), pp.397–424.
- Bringmann, A., Pannicke, T., et al., 2009. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochemistry International*, 54(3–4), pp.143–160.
- Bringmann, A., Reichenbach, A. & Wiedemann, P., 2004. Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Research*, 36(5), pp.241–249.
- Caffé, A.R. et al., 2001. Mouse retina explants after long-term culture in serum free

- medium. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 22(4), pp.263–273.
- Calkins, D.J. & Sterling, P., 1999. Evidence that circuits for spatial and color vision segregate at the first retinal synapse. *Neuron*, 24(2), pp.313–321.
- Campbell, M. & Humphries, P., 2013. The Blood-Retina Barrier. In C. Y. Cheng, ed. *Biology and Regulation of Blood-Tissue Barriers*. New York, NY: Springer New York, pp. 70–84.
- Carson, M.J. et al., 2006. CNS immune privilege: Hiding in plain sight. *Immunological Reviews*, 213(1), pp.48–65.
- Chadderton, N. et al., 2009. Improved retinal function in a mouse model of dominant retinitis pigmentosa following AAV-delivered gene therapy. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(4), pp.593–599.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R.G. & Boulton, S.J., 2012. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Molecular Cell*, 47(4), pp.497–510.
- Charteris, D.G. et al., 2007. Intraretinal and periretinal pathology in anterior proliferative vitreoretinopathy. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 245(1), pp.93–100.
- Chen, P. et al., 2005. Inactivation of CtIP Leads to Early Embryonic Lethality Mediated by G 1 Restraint and to Tumorigenesis by Haploid Insufficiency. *Molecular and Cellular Biology*, 25(9), pp.3535–3542.
- Chowdhury, D. et al., 2005. gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Molecular cell*, 20(5), pp.801–809.
- Claxton, N.N.S., Fellers, T.J. & Davidson, M.W., 2006. Laser scanning confocal microscopy. , (21), pp.1–37. Online verfügbar unter: <http://www.biomedicas.unam.mx/wp-content/pdf/unidad-de-microscopia/intro-to-laser-scanning-confocal-microscopy.pdf?x21431>, zuletzt geprüft am 22.05.2017.
- Cuenca, N. et al., 2014. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, 43, pp.17–75.
- Cuenca, N. et al., 2005. Early changes in synaptic connectivity following progressive photoreceptor degeneration in RCS rats. *European Journal of Neuroscience*, 22(5), pp.1057–1072.
- Davalos, D. et al., 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience*, 8(6), pp.752–8.
- Davis, A. & Chen, D., 2013. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining. *Translational Cancer Research*, 2(3), pp.130–43.
- Dimitrova, N. et al., 2008. 53BP1 promotes non-homologous end joining of telomeres by increasing chromatin mobility. *Nature*, 456(7221), pp.524–528.

- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.*, 454(1), pp.42–54.
- Engelsberg, K. et al., 2004. Apoptotic cell death and microglial cell responses in cultured rat retina. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, 242(3), pp.229–39.
- Fariss, R.N., Li, Z.Y. & Milam, A.H., 2000. Abnormalities in rod photoreceptors, amacrine cells, and horizontal cells in human retinas with retinitis pigmentosa. TL - 129. *American journal of ophthalmology*, 129 VN-(2), pp.215–223.
- Feigenspan, A., Bormann, J. & Wässle, H., 1993. Organotypic slice culture of the mammalian retina. *Visual Neuroscience*, 10(2), pp.203–217.
- Fernandez-Bueno, I. et al., 2012. Time course modifications in organotypic culture of human neuroretina. *Experimental Eye Research*, 104, pp.26–38.
- Ferrari, S. et al., 2011. Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Current genomics*, 12(4), pp.238–49.
- Ferrer-Martin, R.M. et al., 2014. Microglial cells in organotypic cultures of developing and adult mouse retina and their relationship with cell death. *Experimental eye research*, 121, pp.42–57.
- Fischer, A.J. & Bongini, R., 2010. Turning Müller glia into neural progenitors in the retina. *Molecular Neurobiology*, 42(3), pp.199–209.
- Franze, K. et al., 2007. Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(20), pp.8287–8292.
- Frohns, A. et al., 2014. Inefficient double-strand break repair in murine rod photoreceptors with inverted heterochromatin organization. *Current Biology*, 24(10), pp.1080–1090.
- Galluzzi, L. et al., 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*, 16(1), pp.3–11.
- Garcia-Valenzuela, E., Sharma, S.C. & Piña, A.L., 2005. Multilayered retinal microglial response to optic nerve transection in rats. *Molecular Vision*, 11(August 2004), pp.225–31.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y. & Ben-Sasson, S.A., 1992. Identification of Programmed Cell Death In Situ via Specific Labeling of Nuclear DNA Fragmentation. *Journal of Cell Biology*, 119(3), pp.493–501.
- Germer, A. et al., 1997. Modification of glutamine synthetase expression by mammalian Muller (glial) cells in retinal organ cultures. *NeuroReport*, 8(14), pp.3067–3072.
- Von Gersdorff, H. et al., 1998. Submillisecond kinetics of glutamate release from a sensory synapse. *Neuron*, 21(5), pp.1177–1188.
- Gorovits, R. et al., 1997. Glutamine synthetase protects against neuronal degeneration

- in injured retinal tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), pp.7024–9.
- Greferath, U., Ulrike, G.R.E.R.T. & Wassle, H., 1990. Rod Bipolar Cells in the Mammalian Retina show Protein Kinase C-Like Immunoreactivity. *The Journal of comparative Neurology*, 442, pp.433–442.
- Grimm, D., 2009. Small silencing RNAs: State-of-the-art. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(9), pp.672–703.
- Guadagni, V. et al., 2015. Pharmacological approaches to retinitis pigmentosa: A laboratory perspective. *Progress in Retinal and Eye Research*, 48, pp.62–81.
- Hamel, C., 2006. Retinitis pigmentosa. *Orphanet journal of rare diseases*, 1, p.40.
- Hartong, D.T. et al., 2006. Retinitis pigmentosa. *The Lancet*, pp.1795–1809.
- Haverkamp, S., 2005. The Primordial, Blue-Cone Color System of the Mouse Retina. *Journal of Neuroscience*, 25(22), pp.5438–5445.
- Heidelberger, R., Thoreson, W.B. & Witkovsky, P., 2005. Synaptic transmission at retinal ribbon synapses. *Progress in Retinal and Eye Research*, 24, pp.682–720.
- Hernández, M. et al., 2010. Altered expression of retinal molecular markers in the canine RPE65 model of leber congenital amaurosis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(12), pp.6793–6802.
- Hjelmeland, L.M. & Harvey, A.K., 1988. gliosis of the mammalian retina: Migration and proliferation of retinal glia. *Progress in Retinal Research*, 7(C), pp.259–281.
- Hofmann, L. & Palczewski, K., 2015. Advances in understanding the molecular basis of the first steps in color vision. *Progress in Retinal and Eye Research*, 49, pp.46–66.
- Hoon, M. et al., 2014. Functional architecture of the retina: Development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 42, pp.44–84.
- Huang, X. et al., 2004. Assessment of histone H2AX phosphorylation induced by DNA topoisomerase I and II inhibitors topotecan and mitoxantrone and by the DNA cross-linking agent cisplatin. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 58(2), pp.99–110.
- Huen, M.S.Y. & Chen, J., 2010. Assembly of checkpoint and repair machineries at DNA damage sites. *Trends Biochem Sci*, 100(2), pp.130–134.
- Jacobs, G.H., Williams, G.A. & Fenwick, J.A., 2004. Influence of cone pigment coexpression on spectral sensitivity and color vision in the mouse. *Vision Research*, 44(14), pp.1615–1622.
- Jeon, C.J., Strettoi, E. & Masland, R.H., 1998. The major cell populations of the mouse retina. *J Neurosci*, 18(21), pp.8936–8946.
- Jonas, R.A. et al., 2012. The spider effect: Morphological and orienting classification of microglia in response to stimuli in vivo. *PLoS ONE*, 7(2).

- Jones, B.W. et al., 2012. Retinal remodeling. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 56(4), pp.289–306.
- Jones, B.W. et al., 2003. Retinal remodeling triggered by photoreceptor degenerations. *Journal of Comparative Neurology*, 464(1), pp.1–16.
- Jones, B.W. & Marc, R.E., 2005. Retinal remodeling during retinal degeneration. *Experimental Eye Research*, 81(2), pp.123–137.
- Kaempf, S. et al., 2008. Novel organotypic culture model of adult mammalian neurosensory retina in co-culture with retinal pigment epithelium. *Journal of Neuroscience Methods*, 173(1), pp.47–58.
- Karlstetter, M. et al., 2014. Retinal microglia: Just bystander or target for therapy? *Progress in Retinal and Eye Research*, 45, pp.30–57.
- Kettenmann, H. et al., 2011. Physiology of microglia. *Physiological reviews*, 91(2), pp.461–553.
- Kim, J.H. et al., 2006. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *Journal of biochemistry and molecular biology*, 39(4), pp.339–345.
- Kolb, H., 1999. Glial cells of the Retina. , (1), pp.1–11. Online verfügbar unter <http://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/glial-cells-of-the-retina/>, zuletzt geprüft am 22.05.2017.
- Kolb, H., 2007. Gross Anatomy of the Eye. *Webvision*.
- Kolb, H., 2003. How the Retina Works » American Scientist. *American Scientist*, 91, pp.28–34.
- Kolb, H., 2005. Simple Anatomy of the Retina by Helga Kolb. *Webvision*.
- Krysko, D. V. et al., 2008. Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3), pp.205–221.
- Kuo, L.J. & Yang, L.-X., 2008. gamma-H2AX - A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *In Vivo*, 22(3), pp.305–309.
- Kuznetsov, A. V., 2013. Protein transport in the connecting cilium of a photoreceptor cell: Modeling the effects of bidirectional protein transitions between the diffusion-driven and motor-driven kinetic states. *Computers in Biology and Medicine*, 43(6), pp.758–764.
- Labin, A.M. & Ribak, E.N., 2010. Retinal glial cells enhance human vision acuity. *Physical Review Letters*, 104(15), pp.1–4.
- Lamarque, B.J., Orazio, N.I. & Weitzman, M.D., 2010. The MRN complex in Double-Strand Break Repair and Telomere Maintenance Brandon. *FEBS Letters*, 584(17), pp.3682–3695.
- Landshamer, S. et al., 2008. Bid-induced release of AIF from mitochondria causes immediate neuronal cell death. *Cell death and differentiation*, 15(10), pp.1553–

1563.

- Lenzi, D. & Von Gersdorff, H., 2001. Structure suggests function: The case for synaptic ribbons as exocytotic nanomachines. *BioEssays*, 23(9), pp.831–840.
- Li, P. et al., 1997. Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade. *Cell*, 91(4), pp.479–489.
- Lieber, M.R., 2010. The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), pp.181–211.
- Llobet, A., Beaumont, V. & Lagnado, L., 2003. Real-time measurement of exocytosis and endocytosis using interference of light. *Neuron*, 40(6), pp.1075–1086.
- Lyubarsky, A.L. et al., 1999. UV- and Midwave-Sensitive Cone-Driven Retinal Responses of the Mouse: A Possible Phenotype for Coexpression of Cone Photopigments. *The Journal of Neuroscience*, 19(1), pp.442–455.
- Maguire, A.M. et al., 2008. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine*, 358(21), pp.2240–8.
- Magupalli, V.G. et al., 2008. Multiple RIBEYE-RIBEYE interactions create a dynamic scaffold for the formation of synaptic ribbons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(32), pp.7954–7967.
- Makharashvili, N. & Paull, T.T., 2015. CtIP: A DNA damage response protein at the intersection of DNA metabolism. *DNA Repair*, 32, pp.75–81.
- Marc, R.E. et al., 2003. Neural remodeling in retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 22(5), pp.607–655.
- Marc, R.E. et al., 2007. Neural reprogramming in retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(7), pp.3364–3371.
- Martinez-Navarrete, G. et al., 2011. Retinal degeneration in two lines of transgenic S334ter rats. *Experimental Eye Research*, 92(3), pp.227–237.
- Masland, R.H., 2001. Neuronal diversity in the retina. *Current Opinion in Neurobiology*, 11(4), pp.431–436.
- Masland, R.H., 2012. The Neuronal Organization of the Retina. *Neuron*, 76(2), pp.266–280.
- Mennerick, S. & Matthews, G., 1996. Ultrafast exocytosis elicited by calcium current in synaptic terminals of retinal bipolar neurons. *Neuron*, 17(6), pp.1241–1249.
- Milam, A.H., Li, Z.Y. & Fariss, R.N., 1998. Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. TL - 17. *Progress in retinal and eye research*, 17 VN-r(2), pp.175–205.
- Mizushima, N. et al., 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), pp.1069–75.
- Moynahan, M.E. & Jasin, M., 2010. Mitotic homologous recombination maintains

- genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 100(2), pp.130–134.
- Murakami, Y. et al., 2013. Photoreceptor cell death and rescue in retinal detachment and degenerations. *Progress in Retinal and Eye Research*, 37, pp.114–140.
- Panier, S. & Boulton, S.J., 2014. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(1), pp.7–18.
- Pardo, B., Gómez-González, B. & Aguilera, A., 2009. DNA double-strand break repair: How to fix a broken relationship. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(6), pp.1039–1056.
- Paull, T.T. et al., 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Current Biology*, 10(15), pp.886–895.
- Pekny, M., Wilhelmsson, U. & Pekna, M., 2014. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neuroscience Letters*, 565, pp.30–38.
- Peter, M.E. & Krammer, P.H., 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death & Differentiation*, 10(1), pp.26–35.
- Petersen-Jones, S. & Meek, K., 2014. DNA damage: Offing KAP to stay focused in the dark. *Current Biology*, 24(10), pp.R392–R394.
- Pingoud, A. & Wende, W., 2011. Generation of Novel Nucleases with Extended Specificity by Rational and Combinatorial Strategies. *ChemBioChem*, 12(10), pp.1495–1500.
- Provis, J.M. et al., 2013. Adaptation of the central retina for high acuity vision: Cones, the fovea and the a vascular zone. *Progress in Retinal and Eye Research*, 35, pp.63–81.
- Purves, D. et al., 2008. *Neuroscience* 3rd ed.,
- Rappold, I. et al., 2001. Tumor suppressor p53 binding protein 1 (53bp1) is involved in DNA damage signaling pathways. *The Journal of Cell Biology*, 153(3), pp.613–620.
- Rauen, T. & Wießner, M., 2000. Fine tuning of glutamate uptake and degradation in glial cells: Common transcriptional regulation of GLAST1 and GS. *Neurochemistry International*, 37(2–3), pp.179–189.
- Reczek, C.R. et al., 2013. The interaction between CtIP and BRCA1 is not essential for resection-mediated DNA repair or tumor suppression. *Journal of Cell Biology*, 201(5), pp.693–707.
- Reidel, B. et al., 2006. Photoreceptor vitality in organotypic cultures of mature vertebrate retinas validated by light-dependent molecular movements. *Vision Research*, 46(27), pp.4464–4471.
- Saadat, Y.R. et al., 2015. An update to DNA ladder assay for apoptosis detection. *BioImpacts*, 1(5), pp.25–29.

- Sampath, A.P. & Rieke, F., 2004. Selective Transmission of Single Photon Responses by Saturation at the Rod-to-Rod Bipolar Synapse. *Neuron*, 41, pp.431–443.
- Sanges, D. et al., 2006. Apoptosis in retinal degeneration involves cross-talk between apoptosis-inducing factor (AIF) and caspase-12 and is blocked by calpain inhibitors. *PNAS*.
- Schaper, J., Elsässer, A. & Kostin, S., 1999. The Role of Cell Death in Heart Failure. *Circulation Research*, 85(9), pp.867–869.
- Schmitt, A. & Wolfrum, U., 2001. Identification of novel molecular components of the photoreceptor connecting cilium by immunoscreens. *Experimental eye research*, 73(6), pp.837–849.
- Schmitz, F., 2009. The making of synaptic ribbons: how they are built and what they do. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 15(6), pp.611–24.
- Schweichel, J. & Merker, H.J., 1973. Morphology of Various Types of Cell Death in Prenatal Tissues. *Teratology*, 7(3), pp.253–266.
- Sejnowski, T.J. & Yodkowski, M.L., 1982. A freeze-fracture study of the skate electroreceptor. *Journal of Neurocytology*.
- Shaposhnikov, S., Thomsen, P.D. & Collins, A.R., 2011. DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo. *Methods*, 682(November 2014), pp.115–132.
- Shu, X. et al., 2006. RPGR Mutation Analysis and Disease: An Update. *Human Mutation*.
- Singer, J.H. & Diamond, J.S., 2003. Sustained Ca²⁺ entry elicits transient postsynaptic currents at a retinal ribbon synapse. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23(34), pp.10923–10933.
- Slijkerman, R.W.N. et al., 2015. The pros and cons of vertebrate animal models for functional and therapeutic research on inherited retinal dystrophies. *Progress in Retinal and Eye Research*, 48, pp.137–159.
- Solomon, S.G. & Lennie, P., 2007. The machinery of colour vision. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(4), pp.276–86.
- Solovei, I. et al., 2013. LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell*, 152(3), pp.584–598.
- Solovei, I. et al., 2009. Nuclear Architecture of Rod Photoreceptor Cells Adapts to Vision in Mammalian Evolution. *Cell*, 137(2), pp.356–368.
- Sterling, P. & Matthews, G., 2005. Structure and function of ribbon synapses. *Trends in Neurosciences*, 28(1), pp.20–29.
- Stieger, K. & Lorenz, B., 2010. Gene therapy for vision loss -- recent developments. *Discovery medicine*, 10(54), pp.425–33.
- Stracker, T.H. & Petrini, J.H.J., 2011. The MRE11 complex: starting from the ends.

- Nature reviews. Molecular cell biology*, 12(2), pp.90–103.
- Strauss, O., 2005. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiological Reviews*, 85, pp.845–881.
- Strettoi, E. et al., 2002. Morphological and functional abnormalities in the inner retina of the rd/rd mouse. *J Neurosci*, 22(13), pp.5492–5504.
- Surace, E.M. & Auricchio, A., 2008. Versatility of AAV vectors for retinal gene transfer. *Vision Research*, 48(3), pp.353–359.
- Szel, A. et al., 1992. Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology*, 325(3), pp.327–342.
- Tom Dieck, S. et al., 2005. Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: Physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex. *Journal of Cell Biology*, 168(5), pp.825–836.
- Tom Dieck, S. & Brandstätter, J.H., 2006. Ribbon synapses of the retina. *Cell and Tissue Research*, 326(2), pp.339–346.
- Vandenabeele, P. et al., 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(10), pp.700–714.
- Vecino, E. et al., 2016. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 51, pp.1–40.
- Veleri, S. et al., 2015. Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models. *Disease Models and Mechanisms*, 8(2), pp.109–129.
- Wagner, F., 2015. Analyse der Expression von DNA damage response und DNA Reparaturgenen sowie pro- und antiapoptotischen Genen in organotypischen Retinakulturen.
- Walker, J.R., Corpina, R.A. & Goldberg, J., 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412(6847), pp.607–614.
- Wang, H. et al., 2013. The Interaction of CtIP and Nbs1 Connects CDK and ATM to Regulate HR-Mediated Double-Strand Break Repair. *PLoS Genetics*, 9(2), pp.25–27.
- Wassle, H. et al., 2009. Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. *J Neurosci*, 29(1), pp.106–117.
- Watanabe, M. et al., 2012. Pros and Cons of Apoptosis Assay for Use in the Study of Cells, Tissues and Organs. *Microscopy and Microanalysis*.
- Wolfrum, U. & Schmitt, A., 2000. Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 46(2), pp.95–107.
- Yanik, M. et al., 2016. In vivo genome editing as a potential treatment strategy for

- inherited retinal dystrophies. *Progress in Retinal and Eye Research*.
- Young, R.W., 1976. Visual cells and the concept of renewal. *Investigative Ophthalmology*, 15(9), pp.700–725.
- Yuan, J., Adamski, R. & Chen, J., 2010. Focus on histone variant H2AX: To be or not to be. *FEBS Letters*, 584(17), pp.3717–3724.
- Zenisek, D. et al., 2002. A membrane marker leave synaptic vesicles in milliseconds after exocytosis in retinal bipolar cells. *Neuron*, 35(6), pp.1085–1097.
- Zenisek, D., Steyer, J. a & Almers, W., 2000. Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature*, 406(6798), pp.849–854.
- Zhang, X., Cheng, M. & Chintala, S.K., 2004. Kainic acid-mediated upregulation of matrix metalloproteinase-9 promotes retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(7), pp.2374–2383.
- Zimmermann, M. & De Lange, T., 2014. 53BP1: Pro choice in DNA repair. *Trends in Cell Biology*, 24(2), pp.108–117.

Erklärung zur Dissertation

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

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger für die Überlassung des Themas, die großartige Betreuung des gesamten Arbeitsprozesses und vor allem für die immer offene Bürotür.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Birgit Lorenz, Direktorin der Augenklinik der Universität Gießen, für die Möglichkeit, die Arbeit in der Augenklinik durchzuführen und die wissenschaftliche Unterstützung.

Dr. Brigitte Müller danke ich herzlichst für die hervorragende Betreuung, Einarbeitung in die Arbeitsmethodik und die harmonische Zusammenarbeit sowie ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Außerdem danke ich Brigitte und Bärbel Fühler für das aufwendige Anfertigen meiner Retina-Explantate.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Labors für molekulare Ophthalmologie für die liebevolle Aufnahme in ein angenehmes Arbeitsumfeld und das unermüdliche Erklären und Beantworten meiner Fragen.

Wilhelm Rheinhard danke ich für die herzliche Hilfe, das immer offene Ohr für Fragen und die fachliche Diskussionsbereitschaft.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für den enormen Rückhalt und die unendliche Herzlichkeit, von der ich fortwährend Energie tanken konnte. Danke dass ihr immer an mich geglaubt habt und mich in allem unterstützt habt. Euch sei diese Arbeit gewidmet.