

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Anatomische Grundlagen.....	1
1.1.1	Aufbau der Netzhaut	2
1.1.2	Photorezeptoren.....	3
1.1.2.1	<i>Connecting cilium</i>	4
1.1.2.2	Photorezeptorsynapse	4
1.1.2.3	Invertierte Chromatinstruktur	6
1.1.3	Bipolarzellen	7
1.1.3.1	Stäbchenbipolarzellen	9
1.1.3.2	Zapfenbipolarzellen	9
1.1.4	Gliazellen der Netzhaut	10
1.1.4.1	Müllerzellen und Astrozyten	10
1.1.4.2	Mikroglia	11
1.2	Retinitis pigmentosa.....	11
1.2.1	X-chromosomale Retinitis pigmentosa	12
1.3	Retinitis pigmentosa <i>GTPase regulator</i>-Gen.....	14
1.4	Tiermodelle.....	15
1.4.1	<i>rd9</i> -Maus	15
1.4.2	<i>Rpgr</i> -KI-Maus	16
1.5	Degenerationsvorgänge der Netzhaut.....	18
1.5.1	Die Netzhaut: ein postmitotisches Gewebe.....	19
1.5.2	<i>Sprouting</i>	20
1.5.3	Gliose	20
1.5.4	Apoptose.....	21
1.6	Gentherapie	22
1.6.1	Arten der Gentherapie	22

1.6.2	DNA-Doppelstrangbruchreparatur	23
1.7	Zielsetzung	26
2	Material und Methoden	27
2.1	Versuchstiere	27
2.2	Organotypische Retinakultur	27
2.2.1	Präparation der Mäuseretinae	27
2.2.2	Inkubation.....	30
2.2.3	Aufbereitung der organotypischen Retinakultur für die Herstellung von Gefrierschnitten	30
2.2.4	Herstellung von Gefrierschnitten	31
2.3	Färbungen.....	32
2.3.1	Immunfluoreszenz-Färbungen	32
2.3.1.1	Antigen-Retrieval.....	33
2.3.1.2	Verdünnungsreihen.....	34
2.3.2	TUNEL-Assay.....	34
2.4	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	35
2.4.1	Kernreihenählung	36
2.4.2	Bildbearbeitung.....	38
2.5	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	38
2.5.1	Chemikalien, Lösungen, Puffer und Medien	38
2.5.2	Antikörper	40
2.5.3	Verbrauchsmaterialien, Geräte und Software	44
3	Ergebnisse.....	46
3.1	Strukturelle und zytologische Veränderungen der Netzhäute von 3 und 9 Monate alten <i>Rpgr</i>-KI-Mäusen während der Retinakultur	46
3.1.1	Kernreihenählung	46

3.1.2	TUNEL-Assay.....	49
3.1.3	Doppelfärbung von PKC α und CtBP2 zur Darstellung der Stäbchenbipolarzellen und Photorezeptorsynapsen.....	52
3.1.4	Doppelfärbung von GFAP und Glutamin-Synthetase zur Darstellung der Müllerzellen	56
3.1.5	Einzelfärbung von Iba1 zur Darstellung der Mikroglia	60
3.1.6	Einzelfärbung von CD44 zur Darstellung der Extrazellulärmatrix.....	62
3.2	Nachweis von DNA-Schadenserkennungs- und Reparaturproteinen in Netzhäuten aus Retinakulturen von 3 und 9 Monate alten <i>Rpgr</i>-KI-Mäusen	65
3.2.1	Anfärbung von γ H2AX und pATM zur Darstellung von DNA-Doppelstrangbruchdetektoren	65
3.2.1.1	Einzelfärbung von γ H2AX	65
3.2.1.2	Einzelfärbung von pATM	69
3.2.2	Einzelfärbung von 53bp1	72
3.2.3	Anfärbung von DNA-PKcs und Ku80 als Schlüsselproteine des NHEJ	75
3.2.3.1	Einzelfärbung von DNA-PKcs	75
3.2.3.2	Anfärbung von Ku80	78
3.2.4	Einzelfärbung von CtIP als Schlüsselprotein des HDR	84
4	Diskussion	87
4.1	Gegenüberstellung der organotypischen Retinakultur von 3 und 9 Monate alten <i>Rpgr</i>-KI-Mäusen	87
4.1.1	Degeneration der Photorezeptoren	87
4.1.2	Veränderungen der retinalen Neurone und Glia	91
4.1.3	DNA-Schadenserkennungs- und Reparaturproteine	95
4.2	Methodische Limitierungen	100
4.3	Schlussfolgerungen für zukünftige Therapiekonzepte.....	101
5	Zusammenfassung	103

6 Summary	104
7 Anhang.....	105
7.1 Abkürzungsverzeichnis	105
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	109
7.3 Tabellenverzeichnis.....	110
7.4 Ergänzende Abbildungen.....	111
8 Literaturverzeichnis	114
Publikationsverzeichnis	127
Ehrenwörtliche Erklärung.....	128
Danksagung	129
Lebenslauf	131