

Genexpressionsstudien zur Etablierung der adulten murinen organotypischen Retinakultur als Modell für gentherapeutische Ansätze

Gene expression studies on organotypic cultures of adult mouse retina:
A model system for gene therapeutic approaches

Inauguraldissertation

zur Erlangung
des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

vorgelegt von

Franziska Wagner, M. Sc.

angefertigt in der

AG Experimentelle Ophthalmologie, Fachbereich Medizin

vorgelegt am Fachbereich Biologie und Chemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Gießen, Juli 2019

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Experimentelle Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Fachbereichs 11 – Medizin der Justus-Liebig-Universität in der Zeit von Dezember 2015 bis Juli 2019 unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Knut Stieger angefertigt.

Erstgutachter:

Prof. Dr. Reinhard Dammann

Institut für Genetik

Fachbereich 08, Biologie und Chemie

Justus-Liebig-Universität Gießen

Heinrich-Buff-Ring 58-62

35392 Gießen

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

AG Experimentelle Ophthalmologie

Fachbereich 11, Medizin

Justus-Liebig-Universität Gießen

Friedrichstr. 18

35392 Gießen

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten 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.

Gießen, den _____

Franziska Wagner

“The ability of a cell to sense these broken ends, to direct them towards each other, and then to unite them so that the union of the two DNA strands is correctly oriented, is a particularly revealing example of the sensitivity of cells to all that is going on within them.

They make wise decisions and act on them.”

Barbara McClintock

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
I Einleitung	
1. Anatomie des Wirbeltierauges	1
1.1 Allgemeiner Aufbau	1
1.2 Die Netzhaut	2
1.3 Photorezeptoren	3
1.4 Gliazellen.....	4
2. Netzhautdegenerationen	5
2.1 Neurodegenerative Vorgänge in der Netzhaut	5
2.2 Retinitis pigmentosa	7
3. Therapiemöglichkeiten	9
3.1 Genadditionstherapie.....	9
3.2 Gen-Stillegung (<i>gene silencing</i>) Therapie	10
3.3 Genome Editing	10
3.4 Hochspezifische Nukleasen	12
4. DNA-Doppelstrangbruchreparaturmechanismen	13
4.1 Non-homologous end joining (NHEJ)	14
4.2 Microhomology-mediated end joining (MMEJ)	15
4.3 Homology-directed repair (HDR).....	15
5. DNA-Reparaturaktivität.....	17
5.1 Reparaturaktivität in postmitotischen Zellen.....	17
5.2 Reparaturaktivität in der Retina nachtaktiver Tiere.....	17
5.3 Veränderung der Reparaturaktivität.....	18
6. Die Mausmodelle.....	19
6.1 Die <i>Rpgr</i> Maus	19
6.2 Die <i>Lbr2</i> Maus.....	20
7. Organotypische Retinakultur.....	21
8. Zielsetzung	23
II Material & Methoden	
1. Materialien	25
1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	25
1.2 Geräte	26
1.3 Puffer und Medien.....	27
1.4 Kits.....	28
1.5 Primer	29
1.6 Enzyme.....	30
1.7 Größenstandards	30
2. Methoden.....	31
2.1 Die organotypische Retinakultur.....	31
2.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	32
2.3 RNA-Isolation.....	33
2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	33
2.5 Qualitätskontrolle der RNA.....	33

2.6	Polymerase Kettenreaktion	33
2.7	Agarosegelelektrophorese und DNA-Färbung.....	36
2.8	Semi-quantitative Analyse mit Fiji.....	37
2.9	Proteinanalytik.....	37
2.10	Lasermikrodissektion	39
2.11	Übersicht der verwendeten Proben und Methoden.....	42
III Ergebnisse		
1.	Genexpression in der organotypischen Retinakultur.....	45
1.1	RNA-Gehalt der Retinaproben	45
1.2	Integrität der Gesamt-RNA	46
1.3	Reproduzierbarkeit der qPCR Daten	46
1.4	Expressionslevel definierter Gene in der organotypischen Retinakultur von Wildtypmäusen.....	46
2.	DNA-Reparaturproteine in der organotypischen Retinakultur	50
2.1	<i>Non-homologous end joining</i> (NHEJ) in der Retinakultur	50
2.2	<i>Homology-directed repair</i> (HDR) in der Retinakultur	51
3.	NHEJ und HDR in murinen Organen.....	53
3.1	NHEJ.....	53
3.2	HDR	54
4.	DNA-Reparatur in mitotischen Zellkultursystemen	56
4.1	Murine Muskelfaserzellen.....	56
4.2	Humane Zellkultursysteme	57
5.	Genexpression im <i>Rpgr</i> Mausmodell.....	59
5.1	Rhodopsin-Expression und Glia-Marker	59
5.2	NHEJ.....	60
5.3	HDR	62
6.	Genexpression im <i>Lbr2</i> Mausmodell	64
6.1	Charakterisierung der Retina der <i>Lbr2</i> Maus.....	64
6.2	DNA-Reparatur in der Retina der <i>Lbr2</i> Maus	65
7.	Vergleich der Mauslinien.....	68
8.	Genexpression von DNA-Reparaturproteinen in der ONL.....	70
8.1	Entwicklung des LMD Protokolls	70
8.2	Validierung der Zellschicht-spezifischen Marker	70
8.3	Relative Genexpression in einzelnen retinalen Schichten.....	71
9.	Vergleich: Gesamte Retina vs. ONL.....	77
10.	Das Ku80 Protein.....	78
IV Diskussion		
1.	Die organotypische Retinakultur	81
2.	DNA-Reparaturmechanismen in der postmitotischen Retina	84
2.1	MMEJ als alternativer Reparaturweg.....	84
2.2	DNA-DSB-Reparatur im <i>Rpgr</i> Mausmodell.....	85
2.3	Chromatinstruktur der adulten Stäbchen Photorezeptoren von Mäusen	86
2.4	DNA-Reparatur in verschiedenen murinen Organen	87
3.	Zelltypspezifische Analyse der Expression	89
4.	Ku80 in der murinen Retina	91

5. Ausblick.....	92
V Zusammenfassung.....	96
VI Abstract.....	98
VII Anhang	
1. Abkürzungen.....	98
2. Literaturverzeichnis.....	101
3. Publikationen und Präsentationen.....	109
4. Danksagung.....	110

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anatomie eines Human- und eines Mauseuges	1
Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Photorezeptors.	3
Abbildung 3: Die vier Phasen der neurodegenerativen Vorgänge in der Netzhaut.....	6
Abbildung 4: Die Hauptsplice-Varianten des RPGR.....	8
Abbildung 5: <i>Ex vivo</i> und <i>in vivo</i> Genome Editing in der Retina.....	11
Abbildung 6: Hochspezifische Endonukleasen, die derzeit in Verwendung sind.....	12
Abbildung 7: Die drei Hauptmechanismen der DNA Doppelstrangbruch Reparatur	13
Abbildung 8: Proteine der zwei DNA-Reparaturmechanismen HDR und NHEJ	16
Abbildung 9: Chromatinstruktur einer Wildtyp (Wt) und einer <i>Lbr2</i> Maus in der ONL.....	20
Abbildung 10: Die organotypische Retinakultur als intermediäres System.....	21
Abbildung 11: Dauer der organotypischen Retinakultur und Analysezeitpunkte.....	31
Abbildung 12: Semi-quantitative Analyse der Genexpression von humanen Zellen.....	37
Abbildung 13: Ablauf der praktischen Vorgänge zur Durchführung der Lasermikrodissektion	40
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Lasermikrodissektion.....	41
Abbildung 15: Proben, die zur Analyse verwendet wurden.....	42
Abbildung 16: Zusammenfassung und Workflow der verwendeten Methoden.....	43
Abbildung 17: Sinkender Gesamt-RNA-Gehalt der organotypischen Retinakultur.....	45
Abbildung 18: Lineare Quantifizierung der qPCR Ergebnisse durch Regressionsanalyse.....	47
Abbildung 19: Verminderte Rhodopsinexpression (Wt Mäuse).....	48
Abbildung 20: Zunehmende Expression der Gliazellen-spezifischen Gene (Wt Mäuse).....	49
Abbildung 21: Quantifizierung von NHEJ in der organotypischen Retinakultur (Wt Mäuse).....	51
Abbildung 22: Quantifizierung von HDR in der organotypischen Retinakultur (Wt Mäuse).....	52
Abbildung 23: NHEJ in murinen Geweben von Wildtyp-Tieren.....	54
Abbildung 24: HDR in murinen Geweben von Wildtyp-Tieren.....	55
Abbildung 25: DNA-Reparatur in mitotischen C2C12 Zellen.....	56
Abbildung 26: DNA-Reparatur in mitotischen humanen Zellen.....	57
Abbildung 27: Verminderte Rhodopsinexpression in der organotypischen Retinakultur (<i>Rpgr</i>).....	59
Abbildung 28: Zunehmende Expression der Gliazellen-spezifischen Gene (<i>Rpgr</i>).....	60
Abbildung 29: Quantifizierung von NHEJ in der organotypischen Retinakultur (<i>Rpgr</i> Mäuse).....	61
Abbildung 30: Quantifizierung von HDR in der organotypischen Retinakultur (<i>Rpgr</i> Mäuse).....	62
Abbildung 31: Verminderte Rhodopsinexpression in der organotyp. Retinakultur (<i>Lbr2</i> Mäusen).....	64
Abbildung 32: Zunehmende Expression der Gliazellen-spezifischen Gene (<i>Lbr2</i>).....	65
Abbildung 33: Quantifizierung von NHEJ in der organotyp. Retinakultur von <i>Lbr2</i> Mäusen.....	66
Abbildung 34: Quantifizierung von HDR in der organotyp. Retinakultur von <i>Lbr2</i> Mäusen.....	67
Abbildung 35: Zusammenfassung der Genexpressionsstudien von DNA Reparaturgenen in der gesamten Retina von Wt-, <i>Rpgr</i> - und <i>Lbr2</i> -Mäusen.....	68
Abbildung 36: Kryoschnitte der Retina vor und nach Laserablation.....	70
Abbildung 37: Marker Gene für LMD.....	71
Abbildung 38: Zunehmende <i>53bp1</i> Expression in der ONL.....	72
Abbildung 39: <i>Ku80</i> in einzelnen retinalen Schichten.....	73

Abbildung 40: <i>DNA-PKcs</i> in einzelnen retinalen Schichten.....	74
Abbildung 41: <i>CtIP</i> in einzelnen retinalen Schichten.....	75
Abbildung 42: <i>Rad50</i> in einzelnen retinalen Schichten.....	75
Abbildung 43: <i>Bra1</i> in einzelnen retinalen Schichten.....	76
Abbildung 44: Expression der DNA Reparaturgene von <i>Rpgr</i> Mäusen in der gesamten Retina vergleichen mit der ONL.....	77
Abbildung 45: Western Blot mit Ku80 Antikörper.....	78
Abbildung 46: Isoformen der mRNA nach PCR über Gesamtlänge des Ku80 Gens.....	79

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien und Verbrauchslösungen.....	25
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	26
Tabelle 3: Geräte.....	26
Tabelle 4: Puffer und Medien.....	27
Tabelle 5: Kits.....	28
Tabelle 6: Primer.....	29
Tabelle 7: Enzyme.....	30
Tabelle 8: Größenstandards.....	30
Tabelle 9: Zusammensetzung des SDS-Gels.....	38
Tabelle 10: Primärantikörper.....	39
Tabelle 11: Sekundärantikörper.....	39
Tabelle 12: Färbeprotokoll für Hämatoxylin Färbung vor Lasermikrodissektion.....	41
Tabelle 13: Parameter für LMD.....	41
Tabelle 14: Zusammenfassung der Expression von NHEJ und HDR in murinen Geweben.....	87

I Einleitung

1. Anatomie des Wirbeltierauges

Das Auge ist ein lichtempfindliches und hoch spezialisiertes Sinnesorgan. Es dient der Aufnahme von optischen Reizen, die dort in sinnesphysiologische elektrische Signale umgewandelt werden.

1.1 Allgemeiner Aufbau

Alle Wirbeltiere besitzen Linsenaugen, die sich durch ihren dioptrischen Apparat unterscheiden (Abbildung 1 A). Daher unterteilt man das Auge funktionell in den vorderen physikalisch-optischen Teil (dioptrischen Apparat) und in den hinteren rezeptiven Bereich (Netzhaut). Vergleicht man den Aufbau des menschlichen Auges mit dem der Maus, so liegt der wesentliche Unterschied in der deutlich größeren Linse des Mauseuges relativ zur Größe des humanen Auges (Veleri et al., 2015).

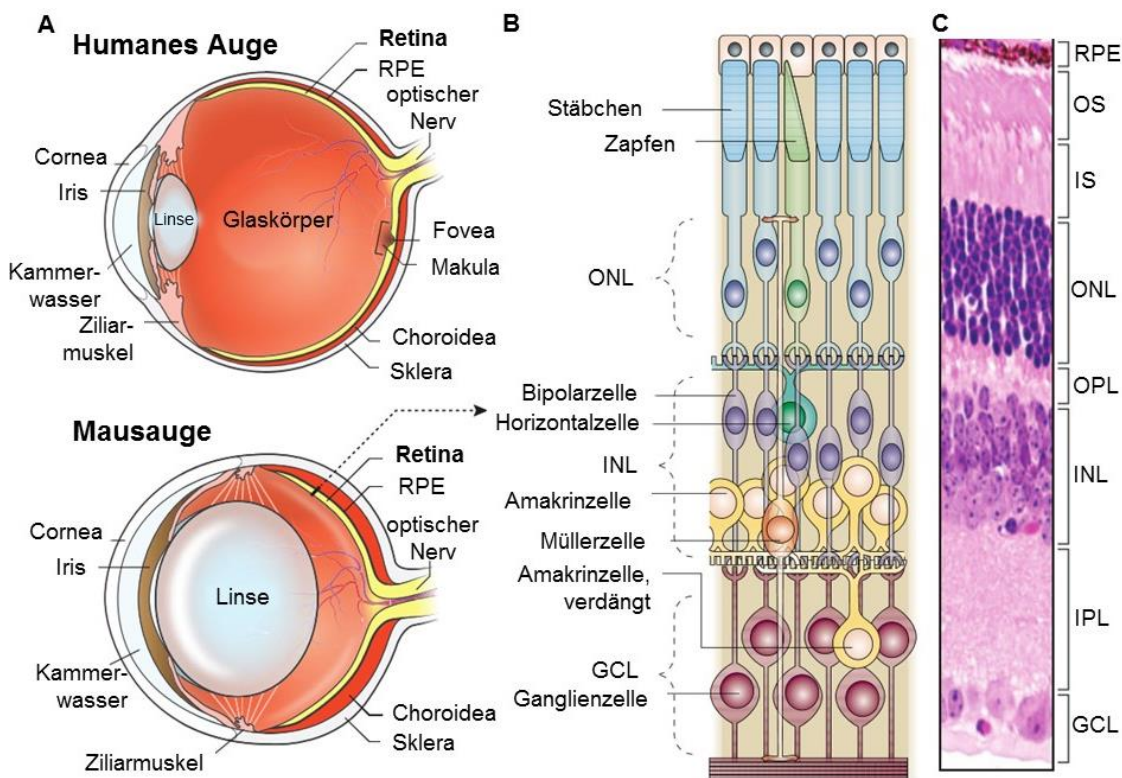


Abbildung 1: A: Anatomie eines Human- und eines Mauseuges. Schematischer Querschnitt. B: Die Hauptzelltypen der Retina von Vertebraten. C: Die retinalen Schichten. Färbung eines Retina-Schnitts einer Maus mit Hämatoxylin und Eosin. RPE: retinales Pigmentepithel. OS: Außensegment (outer segments). IS: Innensegment. ONL: äußere Körnerschicht (outer nuclear layer). OPL: äußere plexiforme Schicht (outer plexiform layer). INL: innere nukleäre Schicht (inner nuclear layer). IPL: innere plexiforme Schicht (inner plexiform layer). GCL: Ganglienzellschicht (ganglion cell layer) (verändert nach Dyer und Cepko, 2001; Veleri et al., 2015).

1.2 Die Netzhaut

Die Netzhaut (Retina), die sich an der hinteren Innenseite des Auges befindet, ist eine lichtempfindliche hochkomplexe Struktur aus Nervengewebe. Während der Embryonalentwicklung entsteht sie durch Ausstülpungen des Zwischenhirns (Diencephalon). Sie ist verantwortlich für die Umwandlung des einfallenden Lichtes in Nervenimpulse. Dies stellt den ersten Schritt des visuellen Prozesses dar (Lamb et al., 2007). Die Retina von Vertebraten besteht aus sieben Hauptzelltypen, die von multipotenten Vorläuferzellen produziert werden und in verschiedenen Schichten organisiert sind (Abbildung 1 B, C; Dyer und Cepko, 2001).

Die äußere Körnerschicht (*outer nuclear layer*, ONL) umfasst die Zellkörper der Photorezeptoren, die sich mit den Innensegmenten (*inner segment*, IS) und den Außensegmenten (*outer segment*, OS) bis hin zur Pigmentepithelschicht (RPE) ausweiten. Das RPE stellt aufgrund des schwarz gefärbten Melanins eine Barriere für das eintreffende Licht dar (Strauss, 2005). Es wird durch die Bruch-Membran von der Aderhaut (Choroidea) getrennt und ist Teil der Blut-Retina-Schranke (Campbell et al., 2013). Zudem versorgt das RPE die Photorezeptoren mit Retinal (Baehr et al., 2003). Die innere Körnerschicht (*inner nuclear layer*, INL) umfasst die Amakrin-, Bipolar-, Müller- und Horizontalzellen, während Ganglienzellen zu der Ganglienzellschicht (*ganglion cell layer*, GCL) zählen. Die Ganglienzellen bilden mit ihren Axonen den Sehnerv und leiten die gesammelten Informationen an das Gehirn weiter. Äußere und innere plexiforme Schicht (*outer / inner plexiform layer*, OPL und IPL) umfassen die synaptischen Regionen, in der die Axone der Photorezeptoren an ihrem Ende synaptische Schwellungen ausbilden (Kolb, 2003).

Das durch den Glaskörper in das Auge einfallende Licht muss zunächst die zuvor beschriebenen Schichten durchdringen, bis es auf die vor dem RPE liegenden Photorezeptoren trifft. Es existieren zwei Typen von Photorezeptoren, die Stäbchen und die Zapfen. Sie befinden sich zwischen Pigmentzellen, unterscheiden sich in Form und Funktion und sind für die Phototransduktion verantwortlich.

1.2.1 Der Vergleich: Humane vs. murine Netzhaut

Vergleicht man die Netzhaut von Mensch und Maus miteinander, so fallen durchaus Unterschiede auf. Der größte Unterschied liegt in der Größe der Netzhäute. Die Netzhaut des Menschen verfügt über eine Fläche von $\sim 1.094 \text{ mm}^2$, wohingegen die der Maus lediglich $15,6 \text{ mm}^2$ umfasst (Jeon et al., 1998; Kolb, 2003). Weiterhin besitzt die Retina des Menschen eine Region, in der ausschließlich Zapfen existieren ($\sim 161.900/\text{mm}^2$) (Veleri et al., 2015). Diese Region bezeichnet man als *Fovea centralis* und ist der Bereich des schärfsten Sehens. Die umgebende Region, die sogenannte Makula, besitzt ebenfalls eine höhere Dichte an Zapfen, verglichen mit der peripheren Retina. Im Unterschied dazu fehlen sowohl Fovea als auch Makula bei der murinen Retina.

Die relative Anzahl von Stäbchen und Zapfen in der Retina variiert bei verschiedenen Tierarten und ist zu einem gewissen Maß damit korreliert, ob die Spezies tag- oder nachtaktive

ist. Die humane Retina besitzt etwa 105 Millionen Stäbchen und 6 Millionen Zapfen. Die Maus als nachtaktives Tier hat eine stäbchendominierte Retina (6,4 Millionen) mit lediglich 180.000 Zapfen (Jeon et al., 1998).

Des Weiteren wurden bisher drei Subtypen von Zapfen in der humanen Retina identifiziert. Diese Unterteilung basiert auf dem Opsin, welches sie beinhalten, und dessen maximale Spektralsensitivität. Es existieren L- (*long*, 564 nm), M- (*medium*, 533 nm) and S- (*short*, 437 nm) Zapfen (Nathans et al., 1986). Mäuse hingegen sind sogenannte Dichromaten und verfügen lediglich über M- und S-zapfen. Die M-Zapfen der Maus sind auf Licht mittlerer Wellenlänge (509-512 nm) sensibel und die S-Zapfen UV-sensitiv (350 nm) (Jacobs et al., 2004).

1.3 Photorezeptoren

Die Photorezeptoren, welche aus funktionellen und morphologischen Kompartimenten aufgebaut sind, zählen zu den spezialisiertesten und komplexesten Zellen des Nervensystems (Reidel et al., 2006). Das einfallende Licht wird über die Konformationsänderung des Sehpigments Rhodopsin und intrazelluläre Signalketten in Rezeptorpotenziale umgesetzt, die zuerst im komplexen retinalen Netzwerk verarbeitet und dann an den Sehnerv (*Nervus opticus*) weitergeleitet werden. Die Stäbchen sind für das Hell-Dunkel-Sehen verantwortlich. Die Zapfen ermöglichen das hochauflösende Tages- und Farbsehen. Dazu besitzen Menschen drei verschiedene Zapfentypen, wie zuvor beschrieben, weshalb sie zu den Trichromaten zählen. In den Zapfen sind jeweils unterschiedliche Opsinmoleküle mit den Absorptionsmaxima für Rot, Grün und Blau enthalten.

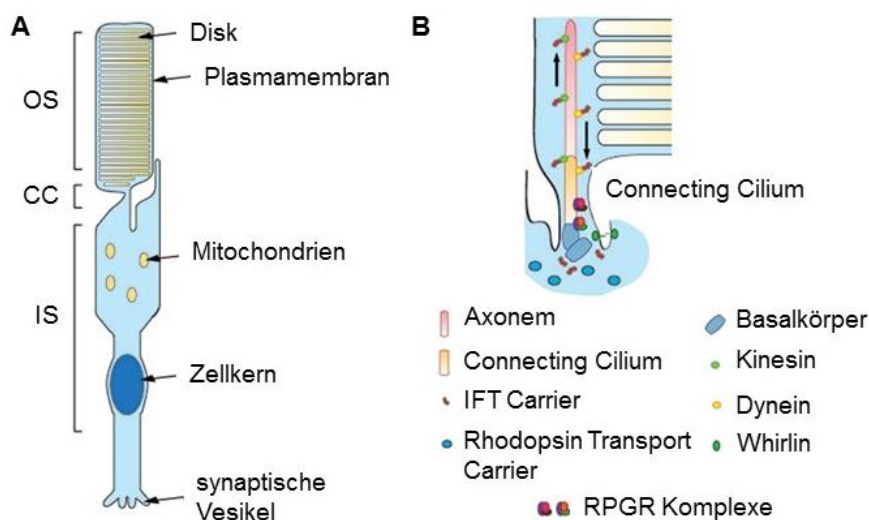


Abbildung 2: **A:** Schematischer Aufbau eines Photorezeptors. OS: Außensegment (*outer segment*). CC: Connecting Cilium. IS: Innensegment. **B:** Aufrechterhaltung und Fortbestand des Photorezeptors durch das Connecting Cilium. Membranbausteine werden über intrazelluläre Transportproteine („Carrier“) durch das CC an das OS des Photorezeptors befördert (verändert nach Megaw et al., 2015)

Weiterhin sind die Photorezeptoren aus einem Außensegment und einem Innensegment aufgebaut, die über ein sogenanntes *Connecting Cilium* (CC) miteinander verbunden sind (Abbildung 2 A, Megaw et al., 2015). Das CC dient der Aufgliederung des photosensitiven Pigments Rhodopsin in die sogenannten „Disks“, die das äußere Segment füllen. Membranbausteine werden über intrazelluläre Transportproteine durch das CC an das Außensegment des Photorezeptors befördert (Abbildung 2 B). Zudem können toxische Produkte, die bei der Phototransduktion entstehen, ausgeschleust werden. Somit ist das CC für den Fortbestand des Photorezeptors essentiell (Maerker et al., 2008). Nahezu 10% der Disks am distalen Ende werden täglich abgestoßen und durch das RPE phagozytiert. Gleichzeitig werden neue Disks am proximalen Ende hinzugefügt, sodass das OS etwa alle 10 bis 15 Tage vollständig erneuert wird (Veleri et al., 2015).

1.4 Gliazellen

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Säugetierretina sind die Gliazellen. Es existieren drei Typen von Gliazellen sowohl in der Retina der Maus als auch des Menschen, welche sich in der Morphologie und ihrem Ursprung voneinander unterscheiden. Den überwiegenden Anteil machen die Müllerzellen mit etwa 90% aus, gefolgt von den Astrozyten und den Mikroglia (Vecino et al., 2016).

Müllerzellen sind radial orientierte Zellen, die die Retina von dem inneren Rand bis hin zum distalen Ende der ONL durchziehen, während sich ihre Zellkörper in der INL befinden. Sie sind die letzten Zellen der Retina, die postmitotisch werden (Cepko, 1993). Diese Makroglia sind dicht gepackt und bilden dadurch eine anatomische und funktionelle Verbindung zwischen retinalen Neuronen und den Kompartimenten, mit denen sie Moleküle austauschen müssen. Weiterhin sind die Müllerzellen in der strukturellen Organisation der Blut-Retina-Schranke involviert (Reichenbach and Robinson, 1995).

Zu den Makroglia zählen ebenfalls die Astrozyten, die ihren Namen aufgrund ihrer sternförmigen Morphologie erhielten. Man geht davon aus, dass sie vom optischen Nerv in die Retina migrieren, da sie nicht vom embryonischen Epithel der Retina abstammen (Stone and Dreher, 1987). Die Astrozyten spielen ebenfalls eine Rolle bei der Blut-Retina-Schranke und umwickeln die Axone der Ganglienzellen.

Der dritte Typ der Gliazellen, die Mikroglia, ist ubiquitär in der humanen Retina vorzufinden, wohingegen sie sich bei der Maus in den plexiformen Schichten befinden (Karlstetter et al., 2014; Kolb, 2003). Mikroglia helfen zum einen dabei die Retina in ihrer Vollständigkeit aufrecht zu erhalten und können zum anderen als Konsequenz einer Immunreaktion Phagozytoseaktivität aufweisen (Thanos et al., 1994)

2. Netzhautdegenerationen

Retinale neurodegenerative Erkrankungen wie altersbedingte Makuladegeneration (AMD), diabetische Retinopathie und erbliche Netzhautdystrophien weisen auf zellulärem und molekularem Level ähnliche grundlegende Veränderungen auf, was in allen Fällen zu morphologischen und funktionellen Beeinträchtigungen der Retina führt (Cuenca et al., 2014). Zu den morphologischen Veränderungen zählen unter anderem die Verkürzung der inneren und äußeren Segmente der Photorezeptoren, sowie der Verlust der synaptischen Verbindungen zu nachgeschalteten Neuronen.

Erbliche Netzhautdystrophien umfassen eine Gruppe von Erkrankungen, bei denen Stäbchen und Zapfen in der Netzhaut absterben und dadurch zu einem Sehverlust bei betroffenen Patienten führen. Sie können, je nachdem welche Zellart zuerst untergeht, unterteilt werden in Stäbchen-Zapfen Dystrophien (Retinitis pigmentosa, RP), Zapfen-Stäbchen Dystrophien oder reine Zapfendystrophien. Mutationen in über 200 verschiedenen Genen können für eine Netzhautdystrophie verantwortlich sein. Es gibt eine Vielzahl an Mutationen mit jeweils nur wenig betroffenen Personen, allerdings sind sie zusammengenommen mit weltweit über 3 Mio. Patienten recht häufig (Daiger et al., 2007).

2.1 Neurodegenerative Vorgänge in der Netzhaut

Neurodegenerative Vorgänge in der Netzhaut lassen sich in vier Phasen einteilen, in denen es zu deutlichen Umbauvorgängen kommt und dadurch die typische Struktur verloren geht (Jones and Marc, 2005). In der frühen ersten Phase scheinen die Morphologie und Funktion der Retina normal (siehe Abbildung 3). Bedingt durch zellulären Stress können Photorezeptoren jedoch eine Kaskade von Vorgängen auslösen, die zu molekularen Veränderungen und damit zum Zelltod am Ende der Phase führen können. Diese frühe Phase ist für Gentherapien am besten geeignet (Cuenca et al., 2014).

Zellulärer Stress und die Aktivierung von Apoptosewegen führt zu progressivem Verlust der Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren in der zweiten Phase der Neurodegeneration der Netzhaut. Einer der frühesten histologischen Indikatoren für die Pathologie in dieser Phase ist die Delokalisation von Rhodopsin in Stäbchen und Transducin in Zapfen (Roof et al., 1994). Zusätzlich können reaktive Veränderungen von Gliazellen (Gliose) beobachtet werden, welches durch eine verstärkte Expression von GFAP deutlich wird. Es kommt zur Verdickung der Müllerzellen und Verlängerung ihrer Fortsätze. Weiterhin können pyknotische Zellkerne beobachtet werden. Diese Zellkerne besitzen verdichtetes Chromatin und ein geschrumpftes Äußeres (Charteris et al., 2007).

Während der dritten Phase kommt es zur Degeneration und Zelltod der Zapfen, die Gliose der Müllerzellen nimmt zu und aktivierte Mikroglia entwickeln eine amöbenartige Form. Die Retina ist in ihrem Durchmesser deutlich reduziert. Astrocyten, RPE-Zellen und Müllerzellen proliferieren und dehnen sich bis hin zur INL aus (Bringmann and Wiedemann, 2009). Ein weiterer häufiger Fund ist die Translokation von Zellkörpern zu anderen retinalen

Schichten, wie zum Beispiel der Müllerzelle außerhalb der ONL (Marc et al., 2007). Es werden neue Blutgefäße als Reaktion auf verfallende Blutgefäße und einen Mangel an Sauerstoff gebildet.

Klinische Untersuchungen zeigen, dass in Phase vier die Sehkraft vollständig fehlt, welches auf den Verlust sämtlicher Photorezeptoren zurückzuführen ist. Zudem ist eine globale Umgestaltung der retinalen Verschaltungen charakteristisch für diese Phase (Jones and Marc, 2005). RPE Zellen wandern in die Retina ein, begleitet von choroidalen Gefäßen, wodurch die Blut-Retina-Schranke zerfällt (Villegas-Pérez et al., 1998).

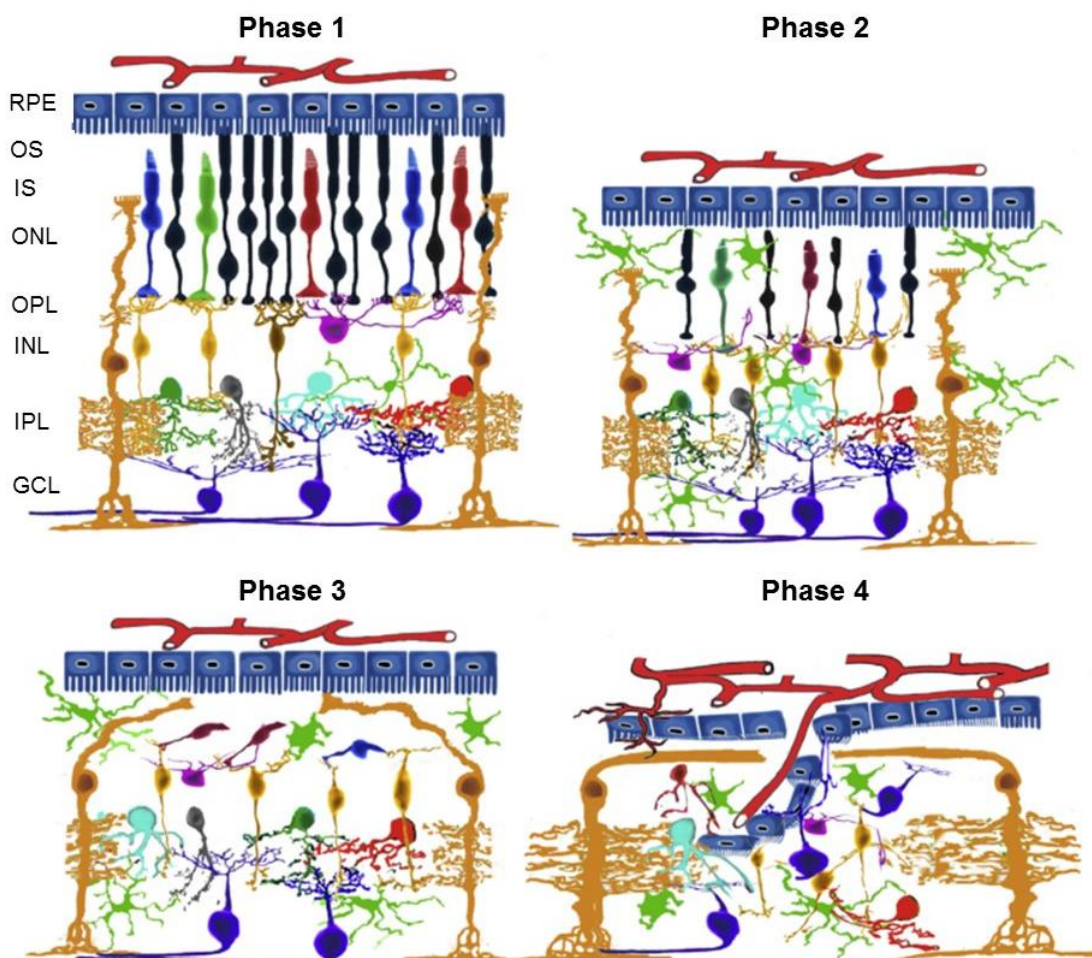


Abbildung 3: Die vier Phasen der neurodegenerativen Vorgänge in der Netzhaut. Phase 1: Keine signifikanten Veränderungen von Morphologie und Funktion. Phase 2: Verlust der IS und OS der Photorezeptoren, sowie reaktive Veränderungen von Gliazellen. Phase 3: Zelltod der Zapfen, zunehmende Gliose und deutliche Reduktion des Durchmessers der Retina. Phase 4: Verlust sämtlicher Photorezeptoren, sowie Einwanderung von RPE-Zellen und Blutgefäßen. RPE: retinales Pigmentepithel. OS: Außensegment (*outer segments*). IS: Innensegment. ONL: äußere Körnerschicht (*outer nuclear layer*). OPL: äußere plexiforme Schicht (*outer plexiform layer*). INL: innere nukleäre Schicht (*inner nuclear layer*). IPL: innere plexiforme Schicht (*inner plexiform layer*). GCL: Ganglienzellschicht (*ganglion cell layer*) (verändert nach Cuenca et al., 2014).

Das Wissen über die exakte Phase der retinalen Neurodegeneration während einer Erkrankung ist bei der Wahl der Therapie entscheidend. Der therapeutische Ansatz muss basierend auf den anatomischen Strukturen ausgewählt werden. Sind weiterhin funktionstüchtige Zellen in der Retina vorhanden, ist der Erfolg einer Therapie deutlich höher als in weit fortgeschrittenen Stadien der Degeneration. Für jegliche Art der Therapie gilt: je früher begonnen wird, desto besser der Erfolg (Cuenca et al., 2014).

2.2 Retinitis pigmentosa

Retinitis pigmentosa (RP) beschreibt eine Gruppe von heterogenen Netzhauterkrankungen, von der weltweit etwa drei Millionen Menschen betroffen sind. Sie entsteht durch die Degeneration der Photorezeptoren in der Netzhaut. Patienten entwickeln typischerweise zunächst Schwierigkeiten bei der Dunkeladaptation und nachfolgend Nachtblindheit. Außerdem kann es bereits in jungen Jahren zur Einschränkung des Gesichtsfeldes bis hin zum sogenannten Tunnelblick führen. Dies ist dadurch zu erklären, dass es primär zum Absterben der peripher lokalisierten Stäbchen kommt, die für das Hell-Dunkel-Sehen verantwortlich sind (Ferrari et al., 2011). In den meisten Fällen sind zunächst die Stäbchen betroffen bevor es zur Schädigung der Zapfen kommt. Im fortgeschrittenen Stadium führt die Erkrankung deshalb zum Verlust des zentralen Gesichtsfeldes und somit zur vollständigen Erblindung. Verantwortlich für das Auftreten dieser Krankheiten sind spontane oder vererbte Mutationen. Es handelt sich um ein stark variables Krankheitsbild. Manche Patienten erblinden bereits im Kindesalter, andere wiederum bleiben bis zum mittleren Erwachsenenalter symptomlos (Hartong et al., 2006). Retinitis Pigmentosa wird zu 30 bis 40 % autosomal-dominant, zu 50 bis 60 % autosomal-rezessiv und zu 5 bis 15 % X-chromosomal vererbt.

2.2.1 XLRP

Einige Gene sind überproportional häufig von Mutationen betroffen, darunter findet sich auch das *RPGR* (*Retinitis Pigmentosa GTPase regulator*) Gen, welches auf dem X-Chromosom lokalisiert ist und bei mutationsbedingtem Funktionsverlust des Genproduktes zu X-chromosomaler RP (XLRP) führt. XLRP wird in bis zu 80% der Fälle durch eine Mutation im *RPGR* Gen verursacht (Guadagni et al., 2015). Diese Form ist durch einen besonders frühen Beginn und schwerwiegenden Verlauf bei männlichen Patienten gekennzeichnet. Die meisten weiblichen Trägerinnen bleiben dagegen symptomlos.

2.2.2 RPGR

Das *RPGR* Protein ist ein wichtiges ciliäres Protein. In der Netzhaut ist es vorwiegend im Connecting Cilium der Photorezeptoren lokalisiert und reguliert die Zusammensetzung des äußeren Segments (Rao et al., 2016). Das *RPGR* Gen, lokalisiert auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms, wurde ursprünglich mit 19 Exonen beschrieben und umfasst 172 Kilobasen (Meindl et al., 1996). Es wird jedoch umfangreich alternativ gespliced. Die beiden Hauptformen sind das sogenannte *RPGR^{ex1-19}* und *RPGR^{ORF15}* (siehe Abb. 4). Das ubiquitär exprimierte

RPGR^{ex1-19} kodiert für 815 Aminosäuren, die andere HauptsplICEvariante dagegen für 1152 Aminosäuren (Vervoort et al., 2000). Die *RPGR^{ORF15}* Variante enthält zusätzlich zu den Exons 1-14, die ebenfalls bei der *RPGR^{ex1-19}* Variante enthalten sind, ein terminales Exon, welches für 567 Aminosäuren kodiert. Dieser sogenannte *open reading frame 15* (ORF15) ist netzhautspezifisch, wird in hohem Maße in den Photorezeptoren exprimiert und ist häufig von Mutationen betroffen („*mutational hot spot*“). Der Grund für dieses komplexe Expressionsprofil von *RPGR* ist bislang noch nicht aufgeklärt (Hong and Li, 2002). ORF15 ist eine purinreiche Region, die für Glycin (G) und Glutaminsäure (E) Reste codieren. Zudem ist diese Region sehr repetitiv, was möglicherweise die Ursache für die Häufigkeit der Mutationen ist. Sie ist meist von *frame-shift* oder *nonsense* Variationen betroffen, die zu einem vorzeitigen Stop-Codon führen. Dadurch kommt es bei der DNA-Replikation zum vorzeitigen Abbruch oder Mismatch, wodurch ein unvollständiges und/oder ein Protein mit veränderter Faltung entsteht, das seine Funktion nur noch eingeschränkt ausüben kann (Vervoort et al., 2000).

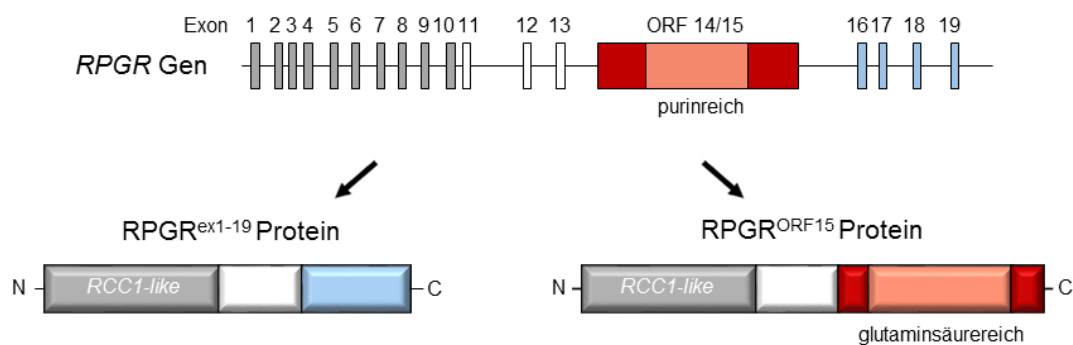


Abbildung 4: Die HauptsplICE-Varianten des *RPGR*. Alternatives Splicen führt zu zwei Gruppen von *RPGR* Transkripten und damit Protein Isoformen. *RPGR^{ex1-19}* enthält die Exons 1-13 und 16-19. *RPGR^{ORF15}* umfasst die Exons 1-13 und ein großes alternativ gesplICTes ORF 14/15. Grau: Exons, die für die RCC1-like (engl. *Regulator of Chromosome Condensation 1*) Domäne codieren. Weiß: übriger Teil der Exons, die in beiden Protein Isoformen vorkommen. Blau: *RPGR^{ex1-19}* spezifische C-terminale Domäne. Hellrot/Dunkelrot: *RPGR^{ORF15}* spezifische C-terminale Domäne. Hellrot: alternativ gesplICTe Region des ORF14/15, codierend für glutaminsäurereiche Region (verändert nach Wright et al., 2011).

3. Therapiemöglichkeiten

Generell ist die Retina ein exzellentes Angriffsziel für Gentherapieansätze, da die leichte Zugänglichkeit nicht- oder minimal-invasive Eingriffe zulässt, der Effekt der Behandlung einfach überwacht werden kann und die Blut-Retina-Schranke die Immunantwort limitiert (Martinez-Fernandez De La Camara et al., 2018). Die Art der Therapie retinaler Veränderungen hängt von der jeweiligen Form der erblichen Erkrankung ab. Klassische Gentherapieansätze bieten bisher zwei wirksame Methoden: zum einen die Wiederherstellung der Funktion eines fehlenden Gens durch transgene Expression und zum anderen RNA-Interferenz, welche die Expression von defekten Genen unterdrückt (Kay, 2011). Jedoch unterliegen diese Technologien Anwendungsgrenzen für eine große Zahl von Erkrankungen.

3.1 Genadditionstherapie

Rezessive Erkrankungen, bei denen das mutierte Genprodukt nicht existiert oder auf die Zelle keinen toxischen Effekt ausübt, können mit sogenannter Genadditionstherapie behandelt werden. In diesem Fall wird in die betroffenen Zellen eine cDNA Kopie, die für ein funktionelles Protein kodiert, mittels eines Vektors eingebracht. Für den Gentransfer haben sich adeno-assoziierte virale Vektoren (AAV) bewährt. Sie sind die am besten charakterisierten viralen Vektoren in der Ophthalmologie. Diese Vektoren ermöglichen einen effizienten Transfer der Expressionskassetten und lösen gleichzeitig keine signifikanten Immunreaktionen aus. Zudem integrieren sie ihr Genom nicht in das der Zielzelle.

Klinische Erfolge konnten 2008 bei Patienten mit dem Befund der Leberschen kongenitalen Amaurose (LCA) Typ 2 nachgewiesen werden. Dies ist eine degenerative Netzhauterkrankung, die durch eine Genmutation im *RPE65* Gen in den retinalen Pigmentepithelzellen verursacht wird (Maguire et al., 2008; Stieger und Lorenz, 2010). Bei dieser *in vivo* Gentherapie wird mittels eines AAV2-Vektors über subretinale Injektion die cDNA des *RPE65* in die Zielzellen eingebracht. Im Dezember 2017 ließ die FDA diese Therapie zu, die seither unter dem Namen Luxturna (Voretigen neparvovec) in den USA auf dem Markt ist. In Europa wurde die Zulassung im November 2018 bekanntgegeben.

Auch in Bezug auf eine *RPGR* Gentherapie gab es bereits einige Versuche, *RPGR* in die Zielzellen eines Organismus einzubringen. So berichteten beispielsweise Beltran und Kollegen 2012, dass sie mit Hilfe eines rekombinanten AAV2/5 Vektors humanes *RPGR* in die Zielzellen des Organismus, hier eines Hundes, einbringen konnten (Beltran et al., 2012). Jedoch konnten toxische Effekte in Mäusen festgestellt werden (Deng et al., 2015). Grund dafür könnten mehrere Mutationen in der purinreichen Region innerhalb des ORF15 sein. Damit zeigt sich, dass die Klonierung des *RPGR* zum Erhalt eines Proteins mit ganzer Länge für die Gentherapie eine Herausforderung darstellt. Eine Lösung dieses Problems könnte die Codon-Optimierung darstellen, durch die bereits Erfolge im Mausmodell gezeigt werden konnten (Beltran et al., 2017; Fischer et al., 2017). Aktuell gibt es drei klinische Studien, die

die Gentherapie von XRLP, ausgelöst durch Mutationen im *RPGR* Gen, testen (NCT03116113, NCT03252847, NCT03316560).

3.2 Gen-Stillegung (*gene silencing*) Therapie

Liegt eine dominante Form der Erkrankung vor, bei der das Genprodukt eine toxische Überfunktion oder einen negativen Effekt auf die Zelle aufweist, ist das Einbringen einer korrekten cDNA Kopie nicht ausreichend. In diesem Falle ist eine Stillegung des Gens (engl. *gene silencing therapy*) notwendig, bei der die Expression des mutierten Gens herunter reguliert wird. Dies kann durch die sogenannte *small interfering RNA* (siRNA) Technologie auf RNA-Ebene oder durch Stillegung von Promotoren auf DNA-Ebene erzielt werden. Jedoch hat auch diese Strategie ihre Nachteile, wie zum Beispiel *off target* Effekte und die Beschränkung auf Krankheiten, bei denen ein Knockdown des Gens nützlich ist (Grimm, 2009). Zu dieser Strategie liegen bisher keine klinischen Studien bezüglich Therapien der Netzhaut vor.

3.3 Genome Editing

Die sogenannte therapeutische Genom-Editierung (engl. *genome editing*) basierend auf programmierbaren Nukleasen, wie zum Beispiel CRISPR-Cas9, bietet die Möglichkeit, die Grenzen der klassischen Gentherapie zu umgehen und krankheitsauslösende Mutationen im Genom zu korrigieren oder gar zu entfernen. Durch Genome Editing wird eine zielgerichtete und präzise Manipulation des humanen Genoms ermöglicht, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Es können zum Einen Mutationen, die zu Krankheiten führen, korrigiert werden. Zum Anderen besteht die Möglichkeit der Addition von therapeutischen Genen an eine spezifische Stelle im Genom, oder das Entfernen von schädlichen Genen bzw. Genomsequenzen. Die zu therapierenden Krankheiten sind vielfältig und die Zielzellen Teil von verschiedensten Organen, wie der Lunge, der Leber, des Herzens oder des Auges.

Eine Möglichkeit sowohl rezessive als auch dominante Krankheiten zu therapieren, ist die Nutzung der zelleigenen homologievermittelten Reparatur (engl. *homology directed repair*, HDR) über homologe Rekombination am spezifischen Genort. Dieser Reparaturmechanismus dient in der Zelle der genetischen Rekombination während der Meiose und der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (engl. *doublestrand break*, DSB) vor der Mitose. Somit kann homologe Rekombination genutzt werden um Gene zu entfernen, einzuführen oder auszutauschen (Fonfara et al., 2012). Der genaue Mechanismus wird im nachfolgenden Kapitel behandelt.

Um diesen Mechanismus zum Austausch mutierter gegen intakte Gensequenzen nutzen zu können, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllt werden. Zum einen muss die intakte Gensequenz, die in den flankierenden Bereichen der mutierten Sequenz homolog ist, in die Zelle eingebracht werden. Zum anderen muss in unmittelbarer Nähe zur mutierten Sequenz ein DSB initiiert werden, damit die homologe Rekombination gezielt in Gang gebracht werden kann (Gabsalilow et al., 2013). Außerdem ist es von Bedeutung, dass die nötigen DNA-Reparaturproteine in der Zelle vorhanden sind und dieser Reparaturweg dadurch aktiv ist.

3.3.1 *Ex vivo* und *in vivo* Genome Editing der Retina

Grundsätzlich kann man weiterhin zwischen Genome Editing *ex vivo* und *in vivo* unterscheiden (Abbildung 5). Die *ex vivo* Strategie basiert auf dem Konzept, Hautbiopsien zu pluripotenten Stammzellen (iPSCs) zu reprogrammieren. Durch einen Gentransfer werden in diesen Zellen die Mutationen korrigiert, die Zellen zu Photorezeptoren oder RPE-Zellen differenziert und in die Retina reimplantiert. Mit Hilfe dieser Strategie können die Zellen im Vorhinein für ein erfolgreiches Genome Editing auf leichte Weise behandelt, gescreent und selektiert werden.

Im Gegensatz dazu werden bei der *in vivo* Methode Mutationen direkt in Körperzellen, z.B. retinalen Zellen, in situ behandelt. Als Trägersubstanz werden, wie bei der Genadditionstherapie, Viren genutzt (Yanik et al., 2017a). Diese Strategie wird zurzeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Stieger zur Therapie von XLRP verfolgt. Durch subretinale oder intravitreale Injektion wird die Vektorsuspension zu den Zielzellen befördert. Zielzellen sind in der Retina meist Zellen des RPE oder Photorezeptoren. Die Vektorsuspension beinhaltet die Endonuklease, ein Template und modifizierende Agenzien. Nachdem die Reparatur stattgefunden hat, degradieren Nuklease und Template schließlich, sodass in den Zellen nichts zurückgelassen wird.

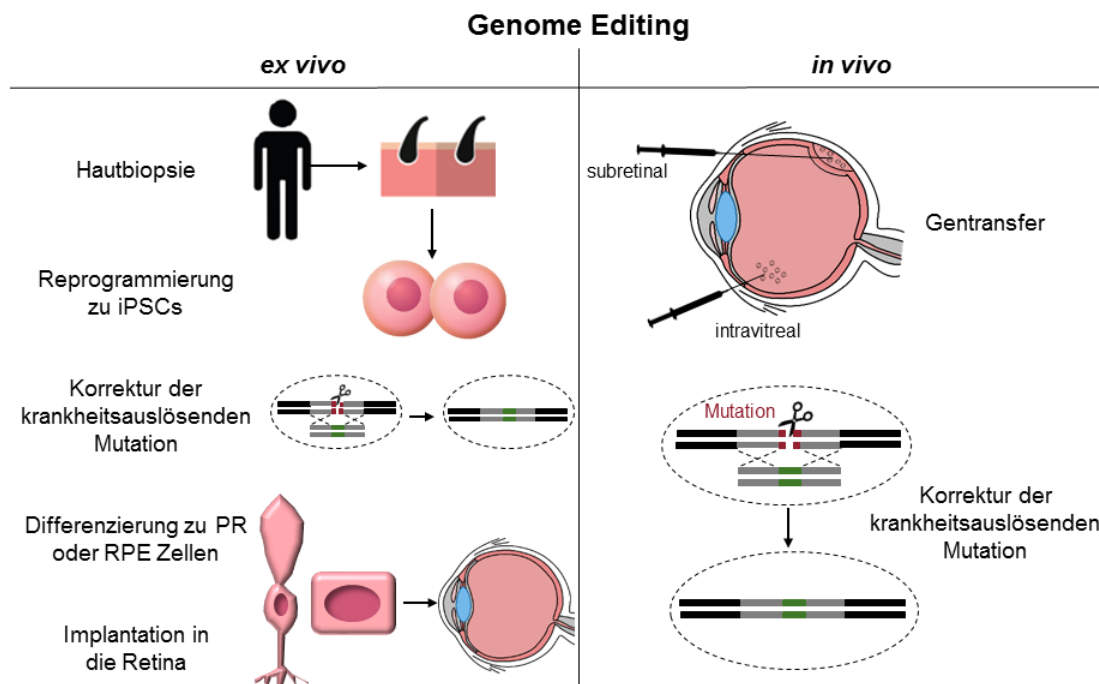


Abbildung 5: *Ex vivo* und *in vivo* Genome Editing in der Retina. iPSCs: Induzierte pluripotente Stammzellen. PR: Photorezeptoren. RPE: Retinales Pigmentepithel.

3.4 Hochspezifische Nukleasen

Inzwischen werden mehrere verschiedene hochspezifische Nukleasen, sogenannte „Genscheren“, genutzt, um gezielte therapeutische DSB der DNA durchzuführen. Diese hochspezifischen Nukleasen erkennen eine bestimmte DNA-Sequenz mit Hilfe ihrer DNA-Bindedomäne und führen den DSB in der Sequenz oder in unmittelbarer Nähe ein. Zu den hochspezifischen Nukleasen zählen z.B. heterodimere Zinkfinger-Nukleasen (ZFN), TAL-Effektor-Nukleasen (TALENs) und RNA vermittelte Nukleasen, wie CRISPR (*clustered regulatory interspaced short palindromic repeat*) / Cas9 (siehe Abbildung 6; Pingoud und Wende, 2011). Besonders letzteres sorgt seit einigen Jahren für große Erwartungen, da mit diesem System relativ einfach an jeder Stelle im Genom gezielte DSBs induziert werden können (Ran et al., 2013).

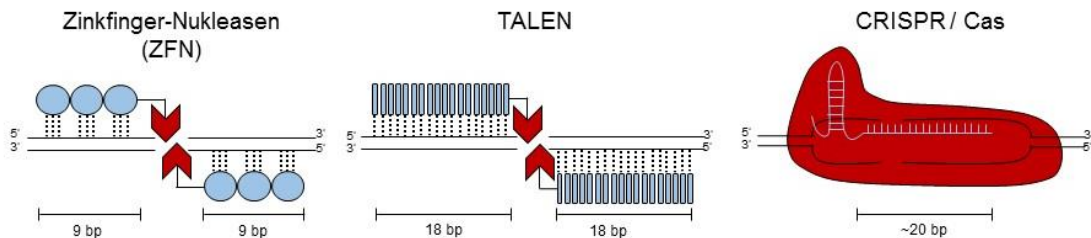


Abbildung 6: Hochspezifische Endonukleasen, die derzeit in Verwendung sind. Schematische Zeichnung der DNA-Bindedomänen (blau) und DNA-Schneideproteine (rot). Die Länge der DNA-Erkennungssequenz ist jeweils darunter abgebildet. TALEN: TAL-Effektor-Nuklease. CRISPR: *Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat*.

4. DNA-Doppelstrangbruchreparaturmechanismen

Die effiziente Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen ist für die genomische Integrität eines Organismus essentiell. Deshalb haben Organismen komplexe Signalwege entwickelt, um auf Schädigungen der DNA reagieren zu können und damit die genomische Stabilität zu sichern. Grundsätzlich kann man die DNA-Doppelstrangbruchreparatur in drei Hauptsignalwege einteilen: *Homology-directed repair* (HDR), *Non-homologous end joining* (NHEJ) und *Microhomology-mediated end joining* (MMEJ) (Abbildung 7). NHEJ tritt während des gesamten Zellzyklus auf, wohingegen HDR hauptsächlich während der späten S- und G2-Phase stattfindet, wenn die Schwesterchromatiden als Template dienen können (Langerak and Russell, 2011). Prinzipiell können alle Wege für eine Veränderung der DNA im Rahmen einer therapeutischen Genom-Editierung genutzt werden.

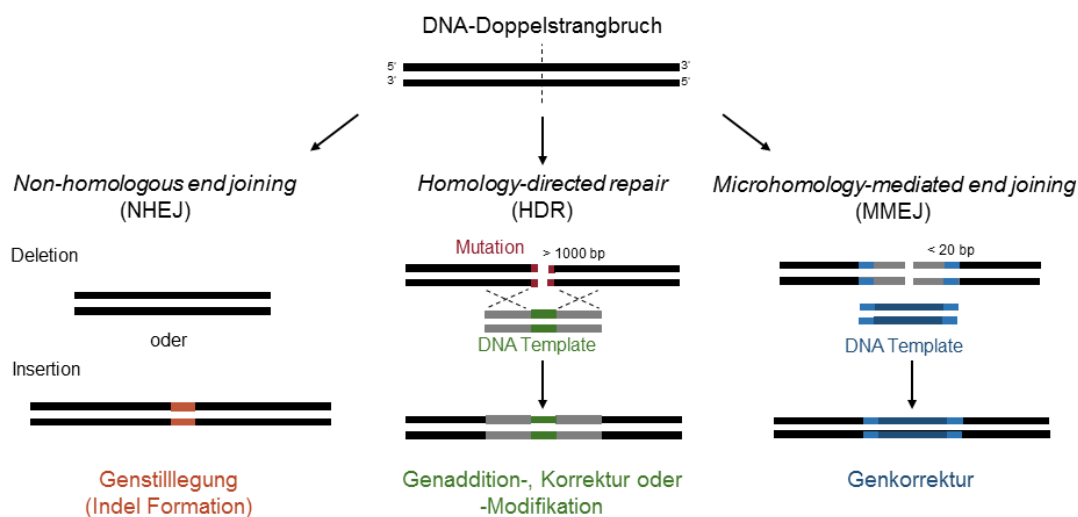


Abbildung 7: Die drei Hauptmechanismen der DNA-Doppelstrangbruchreparatur von eukaryotischen Zellen zur genterapeutischen Nutzung. Jeder Reparaturweg ist schematisch, mit dem dazugehörigen Resultat der Reparatur, dargestellt. Indel: Insertion/Deletion.

Ein DSB kann in der Zelle zum Beispiel direkt, durch ionisierende Strahlung, oder indirekt, durch chemische Modifikationen der DNA und damit Entstehung von Replikationsgabeln, auftreten. Der Einsatz hochspezifischer Nukleasen, die gezielte DSB in die DNA einfügen, könnte eine mögliche Therapie von genetisch bedingten Erkrankungen, wie XLRP, sein. Der DSB wird als erstes von ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) erkannt und gebunden (Abbildung 8). Diese Proteine sind Serin/Threonin-Kinasen, die für eine schnelle Phosphorylierung von H2AX, welches man dann als γ H2AX bezeichnet, sorgen. H2AX gehört zu der Familie der Histone H2A und ist damit einer von fünf Typen, die die eukaryotische DNA im Chromatin organisieren. In phosphorylierter Form kann es als Marker für DSB genutzt werden. γ H2AX spielt eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Checkpoint- und anderen Reparaturfaktoren zu DSB, wie zum Beispiel MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) (Yuan et al., 2010).

Durch die Bindung von MDC1, welches ein Mediatorprotein ist, wird die E3 Ubiquitin-Protein Ligase RNF8 aktiviert, die wiederum die Ubiquitinylierung von H2AX bewirkt. Dieser Effekt wird durch RNF168 zusätzlich verstärkt (Brandsma and Gent, 2012; Morales et al., 2006). In Folge dessen kommt es zur Rekrutierung von 53BP1 (*transformation related protein 53 binding protein 1*) und RAP80 (*receptor-associated protein 80*). RAP80 wiederum bindet BRCA1 (*breast cancer 1*), was entweder zu MMEJ oder HDR führt. 53BP1 dagegen ist für die Bindung von Faktoren verantwortlich, die NHEJ einleiten, und kann mit der DNA-Bindedomäne von p53 interagieren (Ginjala et al., 2011; Ward et al., 2003).

4.1 Non-homologous end joining (NHEJ)

Non-homologous end joining ist für die schnelle Reparatur von DSB verantwortlich. Es ist somit eine Art „Notfall-Reaktionsmaschinerie“ für schädliche Effekte von DSBs (Li et al., 2018). Dabei werden die Enden des DSB direkt miteinander ligiert, was zu kleinen Insertionen, Deletionen und Substitution führen kann (Chapman et al., 2012). Es beginnt mit der Bindung des Ku70/Ku80-Heterodimers an dem Abschnitt der DNA, der zuvor von anderen Proteinen markiert wurde. Ku, so die Bezeichnung des Heterodimers, besitzt eine starke Affinität zu DNA-Enden und stabilisiert diese. Der Heterodimer bildet einen asymmetrischen Ring, der doppelsträngige DNA umschließen kann, unabhängig von der DNA-Sequenz, da es mit dem DNA-Rückgrat interagiert. Ku70/Ku80 rekrutieren wiederum die DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*), die zusammen einen großen Komplex bilden (DNA-PK). Durch Autophosphorylierung der DNA-PKcs wird die DNA-Endprozessierung reguliert, das Enzym inaktiviert und die Dissoziation von der DNA eingeleitet (Neal and Meek, 2011). Im weiteren Verlauf werden WRN (*Werner syndrome ATP-dependent helicase*) und die Nuklease Artemis phosphoryliert und dadurch aktiviert (Shrivastav et al. 2008). Sie prozessieren die DNA-Enden. Nachdem dieser Vorgang abgeschlossen ist, können fehlende Nucleotide durch die Polymerasen λ und μ eingefügt werden (Schipler and Iliakis, 2013). Anschließend folgt der finale Schritt, die Ligation der DNA-Enden des DSB. Für die Ligation sind die DNA Ligase 4, XRCC4 (*X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4*) und XLF (auch Nhej1, *nonhomologous end-joining factor 1*) verantwortlich.

NHEJ kann für eine therapeutische Genom-Editierung bevorzugt bei autosomal dominanten Erbgängen zum Einsatz kommen (Bakondi et al., 2015). Bei nur einem mutierten Allel oder einer Mutationen außerhalb des kodierenden Bereichs, kann es sinnvoll sein, Gene auszuschalten. Durch das Einführen eines DSB und die Reparatur durch NHEJ kommt es durch die zuvor beschriebenen Insertionen und Deletionen zur Änderung des Leserahmens. Dies führt wiederum zum vorzeitigen Abbruch der Transkription, das kodierte Protein kann nicht hergestellt werden und übt dadurch keinen toxischen Effekt auf die Zelle aus.

Die Nutzung von NHEJ zur Zerstörung von Leserahmen aufgrund der Bildung von Insertionen und Deletionen im Bereich des Doppelstrangbruches wurde an der Netzhaut von Mäusen nach AAV vermitteltem Gentransfer *in vivo* bereits gezeigt (Yu et al., 2016). Darüber

hinaus wurde die Veränderung des Genoms im Bereich des *MERTK* Gens bei RCS Ratten *in vivo* durch Homologie-unabhängige gezielte Integration (HITI) gezeigt (Suzuki et al., 2016). Beides eignet sich jedoch nicht um Mutationen innerhalb von Exons zu korrigieren, da hier keine Veränderung des Leserahmens toleriert werden kann. Daher muss hier nach dem gezielten Doppelstrangbruch die Homologie-vermittelte Reparatur entweder durch HDR oder MMEJ durchgeführt werden.

4.2 Microhomology-mediated end joining (MMEJ)

Der alternative Reparaturweg zum klassischen Weg des NHEJ ist *Microhomology-mediated end joining*, der auf mikrohomologen Bereichen beruht und immer in Deletionen resultiert. Dieser Weg konkurriert mit HDR, tritt ebenfalls verstärkt während der S Phase des Zellzyklus auf und ist im Gegensatz zu dem klassischen NHEJ Ku- und Ligase 4-unabhängig (Deng et al., 2014). Der genaue molekulare Mechanismus ist bislang nicht aufgeklärt. Man geht jedoch davon aus, dass er sich in mindestens fünf Schritte gliedert. Es beginnt mit der Resektion der Enden des DSBs, dann folgt das Annealing der mikrohomologen Bereiche (5 – 25 bp) (McVey and Lee, 2008), die Überhänge werden entfernt, die entstandenen Lücken im DNA-Strang gefüllt und schließlich die Enden miteinander ligiert (Wang and Xu, 2017). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mre11 und CtIP (*CtBP-interacting protein*) wichtige Proteine des MMEJ Mechanismus sind. Die Ligation der Enden erfolgt schließlich durch die DNA Ligase 1 oder Ligase 3 (Truong et al., 2013).

Wie zuvor beschrieben, entstehen durch MMEJ Deletionen in der DNA. Jedoch wurde jüngst eine Strategie entwickelt, bei der MMEJ genutzt wird, um das Genom fehlerfrei zu korrigieren. Bei dem sogenannten MhAX (*microhomology assisted excision*) können transgene Expressionskassetten mit Hilfe der Mikrohomologien in das Zielgenom eingebaut werden (Kim et al., 2018). Somit könnte auch MMEJ als Therapiestrategie für XLRP genutzt werden.

4.3 Homology-directed repair (HDR)

Im Gegensatz zu NHEJ und MMEJ ist *Homology-directed repair* ein nahezu fehlerfreier Prozess, da es ein Template für die akkurate Reparatur nutzt. Nachdem der DSB durch die vorge-schalteten Proteine erkannt wurde, wird der MRN Komplex, bestehend aus MRE11, RAD50 und NBS1, rekrutiert. Er erzeugt gemeinsam mit Exo1 (*exonuclease 1*), DNA2 (*DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease 2*) und CtIP einzelsträngige DNA 3'-Überhänge, die für die erfolgreiche Reparatur von entscheidender Bedeutung sind (Schipler and Iliakis, 2013). Es werden Homologe zu den Überhängen gesucht, die als Template für die Reparatur genutzt werden. Diese Prozessierung wird unter anderem auch von BRCA1 kontrolliert. Anschließend rekrutieren BLM (*Bloom syndrome, RecQ helicase-like*) und Exo1 das RPA1 (*replication protein A1*), welches die Einzelstränge bindet, dadurch stabilisiert und die Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindert (Mimitou and Symington, 2009). RPA1 wird daraufhin von RAD51 verdrängt, welches nach homologen Bereichen sucht und durch Interaktion mit BRCA2 die

DNA-Anlagerung begünstigt. Die Ligation der DNA-Enden erfolgt schließlich durch die DNA Ligase 1 (Holthausen et al., 2010; Yan et al., 2011).

HDR ist besonders für die Therapie von autosomal rezessiven Erbgängen geeignet, da die Mutationen mit Hilfe der vorliegenden Template DNA korrigiert werden können (Yanik et al., 2017b). Durch die präzise Manipulation der DNA-Sequenz, die durch HDR ermöglicht wird, bietet dieser Reparaturweg großes Potential auch für angrenzende Forschungsfelder, wie beispielsweise die Herstellung genetisch veränderter Tiere und Krebstherapien (Li et al., 2018).

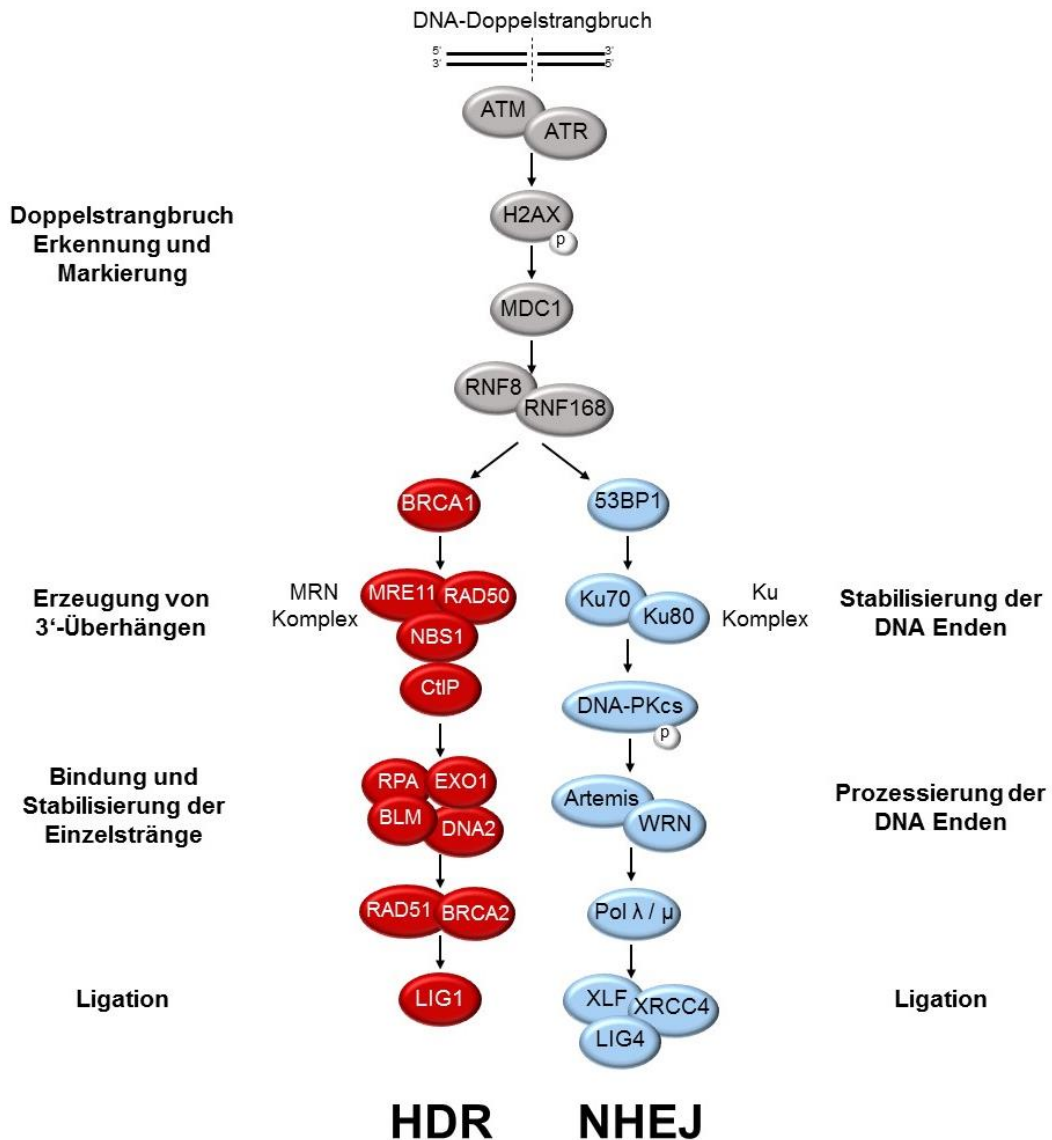


Abbildung 8: Proteine der zwei DNA-Reparaturmechanismen *Homology directed repair* (HDR, rot) und *Non-homologous end joining* (NHEJ, blau). Nach Auftreten eines DSB binden zunächst Proteine, die den DSB erkennen und markieren (grau). Anschließend findet die Entscheidung statt, welcher Reparaturweg eingeleitet wird.

5. DNA-Reparaturaktivität

Die Aktivität der verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen ist davon abhängig, in welchem Zustand sich eine Zelle befindet. Im menschlichen Körper eines Erwachsenen gibt es mitotische Zellen, jedoch ist der Großteil der Zellen nicht mehr teilungsaktiv. Für die Nutzung der zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen für gentherapeutische Strategien ist es deshalb von Bedeutung zu berücksichtigen, in welchem Zustand sich die jeweilige Zelle befindet. Die Retina besteht aus postmitotischen Zellen. Die beiden Hauptsignalwege der DNA-Doppelstrangreparatur HDR und NHEJ treten grundsätzlich in Konkurrenz zueinander auf, jedoch unterscheiden sie sich in ihrem Auftreten innerhalb des Zellzyklus. Während NHEJ hauptsächlich während der G1 und G0 Phase des Zellzyklus auftritt, kommt es zu HDR während der G2 und S Phase, wenn die Schwesterchromatiden als Template dienen können (Brandsma and Gent, 2012; Iyama and Wilson, 2013). Mao und Kollegen berichteten 2008, dass 75% der DSB durch NHEJ repariert werden und lediglich die verbleibenden 25% durch HDR (Mao et al., 2008).

Da die meisten Studien die Häufigkeit von DNA-Reparaturproteinen in mitotischen Zellen untersuchen, sind bisher nur wenige Informationen über das Vorhandensein, die Funktionalität und Aktivität dieser Proteine in postmitotischen Zellen bekannt. Dies gilt auch für die Photorezeptoren, sowohl in der murinen als auch in der humanen Retina.

5.1 Reparaturaktivität in postmitotischen Zellen

Es konnte bereits die Existenz einiger HDR Faktoren, wie zum Beispiel MRE11, in postmitotischen Zellen nachgewiesen werden (Schneider et al., 2012). NHEJ ist der vorherrschende Reparaturmechanismus von Doppelstrangbrüchen in postmitotischen Zellen, jedoch spielt er auch in der Embryonalentwicklung eine entscheidende Rolle. In einer Studie, bei der die Entwicklung der Retina von Mäusen untersucht wurde, konnte gezeigt werden, dass es durch Inhibition eines zentralen Reparaturproteins von NHEJ zum Absterben von Neuronen der Retina kommt (Baleriola et al., 2010).

5.2 Reparaturaktivität in der Retina nachtaktiver Tiere

Die Aktivität der DNA-Reparatur in Photorezeptoren wurde bisher nur in wenigen Studien getestet. So beschrieben Frohns et al. einen Reparaturdefekt in Stäbchen von Mäusen. Es besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen der nukleären Architektur innerhalb der Stäbchen und der DNA-Reparaturaktivität (Frohns et al., 2014). Die Stäbchen der Mäuse und anderer nachtaktiver Tiere haben eine einzigartige, invertierte Chromatinstruktur mit einem großen Chromozentrum in der Mitte der Kerne (Solovei et al., 2009). Verantwortlich für diese Struktur ist unter anderem das Fehlen des Lamin B Rezeptors (LBR) und der Proteine Lamin A/C (Solovei et al., 2013). Wird die Expression des LBR in Stäbchen durch *knock-in* einer Expressionskassette wiederhergestellt, weisen die Kerne zu einem bestimmten prozentualen Anteil eine konventionelle Chromatinstruktur auf.

5.3 Veränderung der Reparaturaktivität

Viele Studien weisen darauf hin, dass die Effizienz von HDR durch die Inhibition von NHEJ direkt gesteigert werden kann. Dazu kamen beispielsweise kleine Moleküle zum Einsatz, die die Expression oder die Enzymaktivität von Schlüssel Proteinen des NHEJ Wegs inhibieren. So kann zum Beispiel Scr7 an die DNA-Bindedomäne der Ligase IV, das finale Protein im NHEJ Weg, binden und ihre Aktivität verhindern (Srivastava et al., 2012). Es wurden noch zwei weitere kleine Moleküle, NU7441 und KU-0060648, als NHEJ Inhibitoren getestet. Sie unterbinden die Kinase-Aktivität der DNA-PKcs (Robert et al., 2015). Zusätzlich wurden noch andere Strategien verfolgt, um die Rate von NHEJ zu reduzieren und dadurch HDR zu favorisieren. Dazu zählen Gen-Stillegungen, proteolytische Degradation (Chu et al., 2015), Gen *knock-out* (Zhu et al., 2015) und der Einsatz von siRNA, um die Expression von Ku70/Ku80 zu inhibieren (Li et al., 2018).

6. Die Mausmodelle

Für die biomedizinische Forschung ist die Untersuchung neuer therapeutischer Strategien am Tiermodell nach wie vor unverzichtbar, um zu prädikativen Daten für die Anwendung am Menschen zu gelangen. Dabei ist die Auswahl einer aussagekräftigen Tierspezies von großer Bedeutung. So ist beispielsweise die Struktur und Funktion der meisten Gene beim Mensch und Säuger zueinander homolog, was darin resultiert, dass die genetischen Erkrankungen des Menschen auch beim Tier auftreten (Wolfe, 2009). Die Auswahl der Tierspezies als geeignetes Tiermodell für die vorliegende Studie erfolgt auf Grundlage der Ähnlichkeiten zwischen der jeweiligen Tierspezies und dem Menschen hinsichtlich verschiedener Aspekte. Dazu zählen die morphologische und physiologische Eignung des Tieres als Krankheitsmodell, sowie technische Aspekte, bezogen auf die Haltungsbedingungen und die Länge der Generationszyklen (Stieger et al., 2009).

Grundsätzlich soll stets nach dem 3R-Prinzip von Russell und Burch von 1959 gearbeitet werden (Russell and Burch, 1959). Es bezieht sich auf Maßnahmen zur Reduzierung der Versuchszahlen und die Belastungen der Versuchstiere. So stehen die 3R für *Replacement* (Ersetzen), *Reduction* (Verringerung) und *Refinement* (Optimierung).

Die Maus ist ein kleines Säugetier, das bevorzugt als Tiermodell benutzt wird, da sie relativ einfach und kostengünstig zu halten ist und durch die geringe Länge ihrer Reproduktionszyklen eine große Zahl an Nachkommen in kurzer Zeit produziert. Zudem wurden schon einige genetische Variationen gefunden, die zu retinalen Erkrankungen führen und weitere transgene Mäuse können relativ einfach für Untersuchungen hergestellt werden (Veleri et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt drei verschiedene Mausmodelle genutzt, die im Nachfolgenden beschrieben werden. Adulte Mäuse der Linie C57Bl6 dienten als Wildtyp-Modell.

6.1 Die *Rpgr* Maus

Die *Rpgr conditional knockout* Maus (B6J.Sv129-*Rpgr*^{tm1Stü}) stellt ein Modellsystem für XLRP dar, wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Stieger etabliert (Schlegel et al., 2018) und wird im Folgenden als *Rpgr* Maus bezeichnet. Sie enthält eine pathologische Punktmutation im *mutational hotspot* Exon ORF15 des *Rpgr* Gens, die beim Menschen zur Ausbildung von XLRP führt. Durch die Mutation kommt es zum *frameshift* im Leserahmen des Gens und die zu Glutamin/Glycin(GE)-reiche Aminosäuresequenz im N-Terminus des Proteins wird zu einer Arginin/Lysin(RK)-reichen Sequenz. Es zeigt sich eine progressive Degeneration der Netzhaut der Maus, mit frühen Veränderungen der äußeren Retina. Die morphologischen und funktionellen Veränderungen erreichen nach etwa neun Monaten signifikante Level. Aufgrund des degenerativen Phänotyps und der eingefügten I-SceI-Schnittstelle eignet sich dieses Mausmodell bestens für Studien zur Erprobung der Effizienz von Endonukleasen und zur Charakterisierung der Effizienz von therapeutischen Applikationen an retinalen Neuronen *in vivo*.

6.2 Die *Lbr2* Maus

Weiterhin wurde die *Lbr2* Knock-in Maus (B6-Tg(pNRL-Lbr2)¹) genutzt, die im Folgenden stets als *Lbr2* Maus bezeichnet wird. Dieses Mausmodell wurde entwickelt, um die invertierte nukleäre Architektur in den Stäbchen der Mäuse rückgängig zu machen. Diese Chromatinstruktur ist für nachtaktive Tiere charakteristisch. Dafür wurde die Expression des Lamin B Rezeptors (LBR) in Stäbchen durch Knock-in einer Expressionskassette wiederhergestellt, was in 30-50% der Stäbchenphotorezeptoren zur Etablierung der konventionellen Chromatinstruktur führte (Solovei et al., 2013, Abbildung 9). Dadurch soll eine Annäherung an die Chromatinstruktur des Menschen erreicht und die Ergebnisse besser übertragbar gemacht werden.

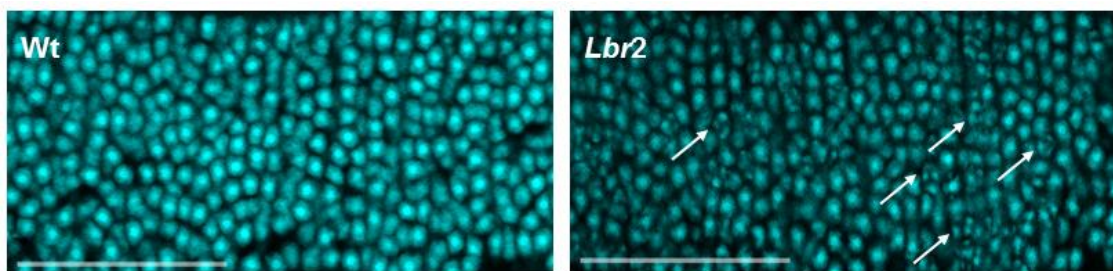


Abbildung 9: Chromatinstruktur einer Wildtyp (Wt) und einer *Lbr2* Maus in der ONL. Die Stäbchen Photorezeptoren der Wt zeigen eine invertierte Chromatinstruktur, wohingegen 30-50% der Nuklei der *Lbr2* Maus eine konventionelle nukleäre Architektur aufweisen (mit Pfeil markiert). Maßstabsbalken 50µm.

7. Organotypische Retinakultur

Die Retina von Vertebraten stellt im Allgemeinen ein exzellentes Modell zur Untersuchung von biochemischen Prozessen, Mechanismen der Entwicklung und Funktionen von neuronalem Gewebe unter normalen und pathologischen Bedingungen dar. Jedoch weisen *in vivo* Studien technische Schwierigkeiten und dadurch Einschränkungen auf. Bei primären Zellkulturen geht die komplexe Struktur des Gewebes verloren, sodass sie nur für grundlegende Studien genutzt werden können. Außerdem sind Zellen in Kultur mitotisch und somit weit von der *in vivo* Situation entfernt. Deshalb wurden Methoden entwickelt um die Retina *in vitro* zu kultivieren.

Die organotypische Retinakultur stellt ein *in vitro* System dar, das physiologisch nah an der *in vivo* Situation ist, da die Zellen postmitotisch sind und neuronale Interaktionen der verschiedenen hochspezialisierten Zelltypen und –Schichten erhalten bleiben (Gancharova et al., 2013; Gustmann and Dünker, 2010). Außerdem erlaubt sie experimentelle Manipulationen unter kontrollierbaren biochemischen Konditionen. Somit ist diese Technik ein effizientes intermediäres Modellsystem zwischen der Zellkultur *in vitro* und dem Tiermodell *in vivo* (Müller et al., 2017, Abbildung 10).

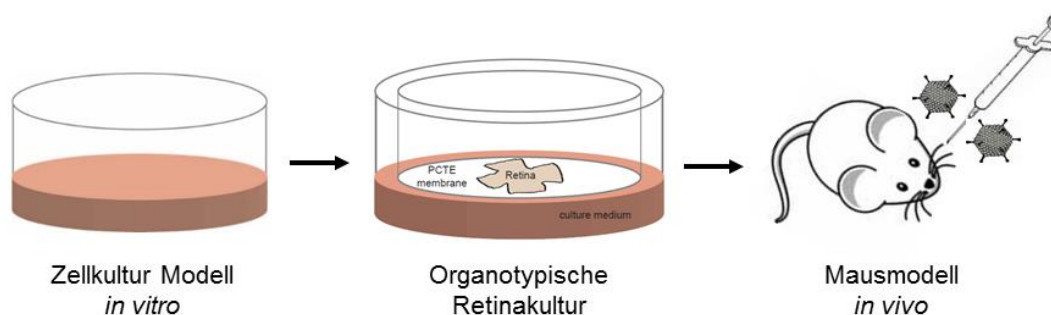


Abbildung 10: Die organotypische Retinakultur als intermediäres System zwischen Zellkultur *in vitro* und dem Mausmodell *in vivo*. Die isolierte Mausretina wird auf einer speziellen Membran in Kontakt mit Kulturmedium inkubiert.

Forscher haben verschiedene Formen der organotypischen Retinakultur in den letzten Jahrzehnten entwickelt, um das große Feld der neurobiologischen Prozesse zu untersuchen. Dazu zählen die retinale Entwicklung, die Regeneration des zentralen Nervensystems, der Zelltod, elektro-physiologische Aktivität und genetische Modifikationen. Einhergehend mit der variierenden Zielsetzung der Untersuchungen hat sich auch eine Vielfalt an Methoden entwickelt (Bull et al., 2011). Grundsätzlich lässt sich jedoch festhalten, dass zur Herstellung der organotypischen Retinakultur embryonale oder adulte Retinae verschiedener Spezies isoliert und das Gewebeexplantat auf einer Membran kultiviert wird, die in Kontakt zu einem Nährmedium steht.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Stieger wird ausschließlich mit adulten Netzhäuten (≥ 12 Wochen) gearbeitet, da sie sich von der generellen Genexpression, wozu im speziellen auch

DNA-Reparaturgene gehören, von neonatalen Netzhäuten unterscheiden. Während der ersten drei Wochen nach der Geburt finden unter Kontrolle verschiedener Wachstumsfaktoren viele terminale Differenzierungen der retinalen Neurone statt. Da eine Therapie per therapeutischem Genome Editing in der Klinik an ausdifferenzierten Netzhäuten stattfinden wird, sollte auch die Therapieentwicklung an geeigneten, sprich adulten, Netzhäuten getestet werden (Yanik et al 2017a).

8. Zielsetzung

Aufgrund der zuvor beschriebenen Tatsachen sind die Ziele dieser Arbeit die Charakterisierung der organotypischen Retinakultur, hinsichtlich ihrer Genexpression verschiedener DNA-Reparaturgene. Im Fokus der Untersuchung stehen je drei Gene des NHEJ und HDR Reparaturmechanismus. Diese Charakterisierung soll eine spätere Nutzung des Modells für gentherapeutische Ansätze ermöglichen. Dazu sollten Wt, *Rpgr* und *Lbr2* Mäuse genutzt und die Expression, auch hinsichtlich *Rhodopsin* und Gliamarkern, verglichen werden. Dabei soll im Speziellen die Expression in der ONL bestimmt werden, da sich dort die Zellkerne der PR befinden, die die Zielzellen einer Gentherapie von XRLP darstellen.

II Material und Methoden

1. Materialien

1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Chemikalien und Verbrauchslösungen. Alphabetische Auflistung mit Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
Accutase	PAN Biotech, Aidenbach
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose LE	Genaxxon, Ulm
AGFA Entwicklerlösung	Röntgen-Bender
AGFA Fixierer (Röntgenfilme)	Heiland
β Mercaptoethanol (β ME)	Roth, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, St. Louis
DMEM	PAN Biotech, Aidenbach
Dimethylsulfoxid (DMSO)	New England Biolab, Frankfurt am Main
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Hohenbrunn
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Chicago
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Applichem, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech, Aidenbach
GelRed	Biotium, Fremont
Hämalaun sauer nach Mayer	Waldeck GmbH, Münster
Hanks' Balanced Saline Solution (HBSS)	Thermo Fisher, Dreieich
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Hohenbrunn
LC Green	Biochem, Salt Lake City
Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Promega, Mannheim
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Sympatec, Clausthal-Zellerfeld
Methanol	Merck, Hohenbrunn
Penicillin	PAN Biotech, Aidenbach
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Sodium dodecyl Sulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Serva DNA Stain G	Serva, Heidelberg
Streptomycin	PAN Biotech, Aidenbach

Tris Base	Roth, Karlsruhe
Tween20	Roth, Karlsruhe

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien. Alphabetische Auflistung mit Hersteller.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Polycarbonatmembran, Porengröße 0.4 μm , 30 mm Durchmesser	Laboglob.com GmbH, Gottmadingen
Membrane Slides, PEN-Membrane 2.0 μm	Leica, Wetzlar
Multiply μ Strip Pro 8-strip low profile	Sarstedt, Newton
6 Well Multiwell Platte	Greiner, Kremsmünster
Precellys Lysing Kit CK14	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Tissue Freezing Medium	Reichert Jung, Unterschleißheim/München
Tissue-Tek $\text{\textcircled{R}}$ Cryomold	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen

1.2 Geräte

Tabelle 3: Geräte. Alphabetische Auflistung mit Hersteller.

Gerät	Hersteller
Autoklav DX-65	Systec GmbH, Linden
BioDocAnalyzer	Biometra, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Wesslingen-Berzdorf
Trans-Blot Turbo Transfer System	BioRad, Rüdigheim
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Eismaschine	Scotsman, Berlin
Elektrophorese Powersupply	Biometra, Göttingen
Gelkammer Whatman	Biometra, Göttingen
Kryotom CM1850UV	Leica, Wetzlar
Lasermikrodissektionssystem LMD6000	Leica, Wetzlar
Magnetrührer	IKA, Staufen
Mastercycler ep realplex	Eppendorf, Schönebuch/Basel
NanoDrop	ThermoFisher Scientific, Waltham
PCR Cycler T Professional Basic Gradient	Biometra, Göttingen
pH Meter	Mettler-Toledo GmbH
Precellys Homogenisator	Peqlab, Erlangen
QIAxcel System	Qiagen, Hilden
Sterilbank	Invitrogen, Karlsruhe

Thermoblock	Biometra, Göttingen
Vortexer	VWR, Darmstadt
Waage	Ohaus, Zürich
Zentrifuge 1-15 PK	Sigma, München
Zentrifuge 4K15	Sigma, München
Zentrifuge Micro 200	Hettich, Tuttlingen

1.3 Puffer und Medien

Alle für diese Arbeit verwendeten Puffer und Medien sind in Tabelle 4, unter Angabe ihrer Zusammensetzung, aufgeführt. Für alle Puffer und Medien wurde Reinstwasser verwendet, das über ein Reinstwassersystem (Satorius AG) gewonnen wurde.

Tabelle 4: Puffer und Medien. Alphabetische Auflistung und Zusammensetzungen.

Puffer und Medien	Zusammensetzung
Blockierlösung	5 % Milchpulver 1x TBS
Blotting-Puffer	10 % Transfer-Puffer 10 % Methanol
DMEM (++)	DMEM 1% Penicillin / Streptomycin 2 % L-Glutamin
DMEM (+++)	DMEM 2% L-Glutamin 1% Penicillin / Streptomycin 10% FKS
DMEM (4+)	50% DMEM 25 % FKS 25 % HBSS 100 µg/mL Penicillin / Streptomycin 2 mM L-Glutamin
HBSS 1x	10x HBSS von Thermo Fisher mit ddH ₂ O auf 1x verdünnen, pH 7.4 einstellen
Phosphate-buffered saline (PBS) 10x	1.37 M NaCl 27 mM KCl

	18 mM KH ₂ PO ₄ 100 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7.4
SDS-Laufpuffer 10x	25 mM Tris-Base 1.92 mM Glycin 0,1% SDS
TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE) 10x	1 M Tris-Base 820 mM H ₃ BO ₃ 10 mM EDTA
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) 10x	1.5 M NaCl 30 mM KCl 250 mM Tris pH 7.4
Transfer-Puffer 5x	250mM Tris 2 M Glycin

1.4 Kits

Tabelle 5: Kits. Alphabetische Auflistung mit Verwendung und Hersteller.

Kit	Verwendung	Hersteller
iScript cDNA Synthesis Kit	cDNA Synthese	Bio-Rad, München
Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit	Protein Konzentrationsbestimmung	Thermo Scientific, Waltham
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Aufreinigung von DNA nach Agarosegel oder PCR	Macherey-Nagel, Düren
PrimeScript™ RT Master Mix	cDNA Synthese	Takara, Saint-Germain-en-Laye
RNeasy® Micro Kit	RNA-Isolation (Retina, LMD Proben)	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	RNA-Isolation (weitere Gewebe, Zellen)	Qiagen, Hilden

1.5 Primer

Tabelle 6: Primer. Auflistung unter Angabe der Primernummer, ihrer Sequenz und Produktgröße. Fwd: *forward*. rev: *reverse*. h: human. m: Maus.

Primer	Name	Sequenz	Produktlänge
1929	GAPDH fwd (h)	5'-ATGGGGAAGGTGAAGGTCGG-3'	162 bp
1930	GAPDH rev (h)	5'-GCCATGGGTGGAATCATATTGG-3'	
2189	Gapdh fwd (m)	5'-GGTCGGTGTGAACGGATTTGG-3'	199 bp
2190	Gapdh rev (m)	5'-CCCGTTGATGACAAGCTTCCC-3'	
3035	Rhodopsin fwd (m)	5'-GAAGACCACACCCATGATAG-3'	208 bp
3036	Rhodopsin rev (m)	5'-ATTACACCACCACCTTCTACA-3'	
3043	Aif1 fwd (m)	5'-GATGTATGAGGAGAAAAACAAAGAACAC-3'	177 bp
3044	Aif1 rev (m)	5'-TTATTTAGTCTGACTCTGGCTCACG-3'	
3047	Gfap fwd (m)	5'-GCTGGACCAGCTTACGGCCAACAGT-3'	169 bp
3048	Gfap rev (m)	5'-AGCCAGGGTGGCTTCATCTG-3'	
3128	Ku80 fwd (m)	5'-GCAGCAAAGGATGATGAGGC-3'	156 bp
3129	Ku80 rev (m)	5'-CTCATAGGCGTCCTTAATGTAAGG-3'	
3132	KU80 fwd (h)	5'-GTGGAGACACAGCAGCTGTATTTG-3'	184 bp
3133	KU80 rev (h)	5'-CCTGCTGGGAATTTCTTGAGATT-3'	
3368	Rad50 fwd (m)	5'-GAGTGTCAATAGAGACATACAGCGC-3'	195 bp
3369	Rad50 rev (m)	5'-TCTACTCCCTGCAGCTTAGCTG-3'	
3374	DNA-PKcs fwd (m)	5'-CTTCATGTACGTGGAGCTCATTG-3'	197 bp
3375	DNA-PKcs rev (m)	5'-GAGGGAAGCTGTCTATCTGTACCA-3'	
3380	53bp1 fwd (m)	5'-CTGGGCAAAGACATTTCTCTG-3'	197 bp
3381	53bp1 rev (m)	5'-CCTTGCTCCAAGGACAGAATG-3'	
3382	18 S RNA fwd (m)	5'-GACACGGACAGGATTGACAGATT-3'	206 bp
3383	18 S RNA rev (m)	5'-TCAATCTCGGGTGGCTGAA-3'	
3436	Brca1 fwd (m)	5'-CTGCCGTCCAAATTC AAGAAGT-3'	223 bp
3437	Brca1 rev (m)	5'-CTTGTGCTTCCCTGTAGGCT-3'	
3438	CtIP fwd (m)	5'-GTGTGATCGCTGTGCAGTAAC-3'	189 bp
3439	CtIP rev (m)	5'-GCTACTTGATCCTGTTGACCATT-3'	
3494	53BP1 fwd (h)	5'-CTCCAGACGCACAAAGAAAATCC-3'	173 bp
3495	53BP1 rev (h)	5'-ACCTGACTGATGGAACCACAT-3'	
3500	RAD50 fwd (h)	5'-TACTGGAGATTTCCCTCCTGG-3'	228 bp
3501	RAD50 rev (h)	5'-AGACTGACCTTTTACCATGC-3'	
3811	Ku80 ORF fwd (m)	5'-ATGGCGTGGTCCGGTAATAAGGC-3'	2199 bp

3812	Ku80 ORF rev (m)	5'-CTATATCATGTCCAGTAAATCAT-3'	
3985	Chx10 fwd (m)	5'-GGAGCTGGAGAAAGCATTCAATGA-3'	181 bp
3986	Chx10 rev (m)	5'-GAGACCATACTCAGCCATGACGCT-3'	
4118	BRCA1 fwd (h)	5'-GCAAATACAAACACCCAGGATCC-3'	194 bp
4119	BRCA1 rev (h)	5'-CACCCAGATGCTGCTTCACCTAA-3'	

1.6 Enzyme

Tabelle 7: Enzyme. Alphabetische Auflistung mit Hersteller.

Enzym	Hersteller
DNase I	Fermentas, St. Leon-Rot
GoTaq Polymerase	Promega, Mannheim
PrimeScript RTase	Takara, Saint-Germain-en-Laye

1.7 Größenstandards

Tabelle 8: Größenstandards. Alphabetische Auflistung mit zugehörigem Hersteller.

Maker	Hersteller
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
QIAxcell RNA ruler 200 – 6000 nt	Qiagen, Hilden
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham

2. Methoden

2.1 Die organotypische Retinakultur

Die organotypische Retinakultur der adulten Mausretina stellt eine etablierte Methode im Labor der molekularen Ophthalmologie der Augenklinik in Gießen dar (Müller, 2019).

2.1.1 Versuchstiere

Die Augen wurden adulten Mäusen, die drei oder neun Monate alt waren, entnommen. Zur Verfügung standen Mäuse von drei verschiedenen Linien: Wildtyp (C57Bl6), *Rpgr* (B6J.SV129-Rpgr^{tm1slic}) und *Lbr2* (B6-Tg(pNRL-Lbr2)1) Mäuse. Die Versuchstiere wurden bei Beleuchtungsverhältnissen von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit gehalten.

2.1.2 Präparation der Netzhaut

Aus tierschutzrechtlichen Gründen wurde die zervikale Dislokation der Tiere entsprechend den Richtlinien der GV-SOLAS (Gesellschaft für Tierversuchskunde) und die nachfolgende Augenentnahme von Bärbel Fühler durchgeführt.

Die anschließende Präparation erfolgte unter dem OP-Stereomikroskop und wurde von Franziska Wagner durchgeführt. Zunächst wurde das Auge, nach der Entnahme, zwei Mal in HBSS gespült, um eventuell vorhandene Haare oder Blut zu entfernen. Die weitere Präparation erfolgte in dem Deckel einer kleinen Petrischale, der mit DMEM++- (CO₂-gesättigt) gefüllt war. Das Auge der Maus wurde vorsichtig mit einer spitzen Kanüle (Durchmesser 0,4 mm) auf Höhe der *Ora serrata* angestochen und mit einer Irisschere ringförmig aufgeschnitten. Dadurch konnte der vordere Teil des Augapfels (Cornea, Linse und Glaskörper) entfernt und die Retina zugänglich gemacht werden. Als nächstes wurde die Retina an vier diametral gegenüberliegenden Stellen radial eingeschnitten, um sie anschließend flach auf einer Membran ausbreiten zu können. Dazu wurde die Retina zunächst von dem retinalen Pigmentepithel und der Sklera gelöst. Nach dem Ausbreiten auf der Polycarbonatmembran entstand die charakteristische Kleeblattstruktur. Die Retina wurde mit den Photorezeptoren nach unten platziert und zunächst mit DMEM++- und nach etwa 2 bis 4 Stunden mit DMEM4+ versorgt. Dazu wird die Vertiefung der Kulturplatte mit 1 ml Medium gefüllt, sodass es in Kontakt mit der Membran steht. Die Kultivierung der Explantate erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ für eine Dauer von bis zu 8 Tagen. Ein Mediumwechsel fand alle 2 Tage statt (Abbildung 11).

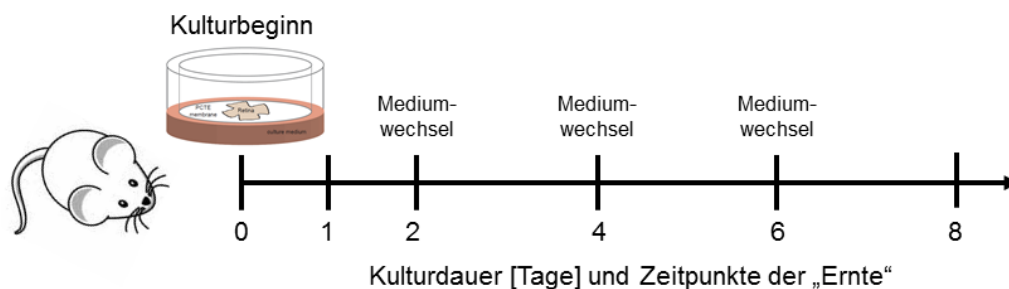


Abbildung 11: Dauer der organotypischen Retinakultur und Analysezeitpunkte.

2.1.3 Ernte und Lyse der Retinakultur

Zum Ernten der Retinakulturen wurde das Medium abgesaugt, etwa 1 ml HBSS Puffer zum Waschen darauf gegeben und ein weiteres Mal gewechselt. Wichtig dabei war, dass man die Retinae vorsichtig freischwemmt und sie sich von der Membran lösen. Um eine ausreichende Menge an RNA isolieren zu können, wurden für die Lyse und alle darauffolgenden Schritte jeweils drei Retinae verwendet. Nun konnte man die drei Retinae mit einer sterilen Pinzette in ein gewogenes Precellys-Röhrchen, das mit 350 µl RLT Puffer (aus RNeasy Micro Kit, + 10 µl βME/ml RLT-Puffer) gefüllt war, überführen und erneut wiegen. Das Gewicht der Retinae wurde dokumentiert. Es folgte die Homogenisierung in der Precellys für 30 s bei 5500 rpm und ein Zentrifugationsschritt für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit. Der Überstand, das Lysat, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Isolation der RNA bei -80°C aufbewahrt.

2.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zelllinien HEK293 und C2C12 wurden mit Medium (DMEM+++, siehe Tabelle 4) in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für die Passagierung von Zellen wurden diese von der Zellkulturplatte gelöst, in entsprechendem Medium verdünnt und auf eine oder mehrere neue Schalen überführt.

2.2.1 Weitere Zellen

Für diese Arbeit wurde außerdem RNA von weiteren Zellen genutzt, die jedoch von Alex Garanto PhD (Nijmegen, Niederlande) isoliert wurde. Bei diesen Zellen handelt es sich um humane embryonische Nieren Zellen (HEK293T), Fibroblasten (FIB), immortalisierte RPE Zellen (htert), induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) und Photorezeptor-ähnliche iPS (iPS-PPC).

2.2.1 Ernte und Lyse der Zellen

Für die Ernte der C2C12 Zellen musste zunächst das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Accutase bei 37°C für etwa 10 min inkubiert werden. Danach lösten sich die Zellen von der Platte. HEK293 Zellen konnten direkt mit DMEM vorsichtig von der Platte gespült werden. Die Zellen wurden anschließend mit DMEM verdünnt, 500 µl der Zellsuspension in ein kleines Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei 280xg und 4°C zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet in 350 µl RLT Puffer (aus RNeasy Mini Kit, +βME) gelöst und in ein Precellys Röhrchen überführt (30 s bei 5500 rpm). Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit. Der Überstand, das Zelllysat, wird in ein RNase freies Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C bis zur RNA-Isolation gelagert.

2.3 RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den Retinae sowie der LMD Proben wurde mit dem RNeasy Micro Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers vorgenommen und die Elution erfolgte in 15 µl RNase freiem Wasser. Die Isolation der RNA aus anderen Mausgeweben und Zellen einer Zellkultur erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen, wobei die RNA in 30 µl RNase freiem Wasser eluiert wurde. Bei jeder RNA-Isolation wurde ein DNase I Verdau direkt auf der Säule vorgenommen (DNase I Set, Qiagen), um Kontaminationen mit genomischer DNA zu verhindern. Dabei wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration der RNA wurde eine photometrische Messung vorgenommen. Dazu wurden 10 µl einer 1:10 Verdünnung der RNA-Lösung mit RNase freiem Wasser hergestellt, in die Messküvette pipettiert und die Absorption bei 260 nm mit dem BioPhotometer von Eppendorf gemessen. Das Verhältnis der Absorption von 260 nm und 280 nm ist zusätzlich ein Maß für die Reinheit der RNA. Liegt dieser Wert über 2,0 wird die RNA im Allgemeinen als „rein“ bezeichnet. Die Konzentration der Proben der Lasermikrodissektion wurden aufgrund der geringen RNA Konzentrationen mit dem NanoDrop (ThermoFisher Scientific) bestimmt.

2.5 Qualitätskontrolle der RNA

Für den Einsatz der RNA in der darauffolgenden qPCR spielt nicht nur die Konzentration, sondern auch die Qualität der RNA eine entscheidende Rolle. Die Kontrolle der Qualität wurde mit dem QIAxcel RNA System von Qiagen überprüft. Dies ist ein automatisiertes Elektrophorese System, das auf einer Kapillarelektrophorese basiert. Es beinhaltet eine Reihe von Licht emittierenden Dioden und mikro-optischen Kollektoren die mit Kapillaren der QIAxcel Gel-Patronen verbunden sind. Fragmente, die durch die Gelmatrix wandern, werden detektiert und über einen Photomultiplier für die Interpretation der Daten zu der entsprechenden ScreenGel Software übermittelt. Dort werden die einzelnen Bestandteile der RNA dargestellt, die sich aus der rRNA (5S, 18S und 28S Untereinheiten), mRNA, etc. zusammensetzt. Die Integrität der RNA ist gesichert, wenn eindeutige Banden auf Höhe der 18S und 28S rRNA-Untereinheiten zu erkennen sind, da die rRNA mit bis zu 70% den größten Anteil in einer Zelle ausmacht. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.6 Polymerase Kettenreaktion

2.6.1 cDNA Synthese

Die Synthese der *complementary DNA* (cDNA) aus der zuvor isolierten Gesamt-RNA beruht auf dem Prinzip der Reversen Transkriptase (RT)-PCR. Dazu ist eine RNA abhängige DNA Polymerase (Reverse Transkriptase) nötig. Diese Reaktion wurde mit dem Kit PrimeScript™ RT Master Mix von Takara nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde stets eine definierte Menge RNA zur Umschreibung eingesetzt. Die cDNA wurde anschließend bei -20°C aufbewahrt.

2.6.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Die *Polymerase Chain Reaction*, zu Deutsch Polymerase-Kettenreaktion, ist eine Methode um DNA *in vitro* zu vervielfältigen. Man kann den Ablauf in drei Phasen teilen. Es beginnt mit der Denaturierungs-Phase, währenddessen die doppelsträngige DNA in Einzelstränge getrennt wird. Dem folgt die Annealing-Phase. Dabei lagern sich die beiden Primer, die in *forward*- und *reverse*-Richtung gewählt werden, an ihre komplementären Sequenzen in der Ausgangs-DNA an. Anschließend folgt die Elongations-Phase. Während dieser Phase nutzt die thermostabile DNA-Polymerase die angelagerten Primer als Startpunkt und baut die vorhandenen dNTPs komplementär zur Ausgangs-DNA ein. Diese drei Phasen werden in mehreren aufeinander folgenden Zyklen wiederholt. Abhängig von dem jeweiligen Gen wurden hier 30, 35 oder 40 Zyklen genutzt. Zur Anfertigung dieser Arbeit wurde die GoTaq-Polymerase von Promega verwendet. Das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase liegt bei 72 bis 75°C und ihre Syntheserate bei etwa 1000 bp pro Minute.

2.6.3 Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Die quantitative PCR (qPCR) ist eine hochsensitive Methode, die eine Quantifizierung der Transkripte erlaubt. Im Gegensatz zu einer Standard-PCR wird zusätzlich ein Fluoreszenzfarbstoff zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben, um die Amplifikation bereits während der Reaktion verfolgen zu können. In dieser Arbeit wurde der Farbstoff LC Green von Biochem verwendet. Dieser verhält sich ähnlich wie SYBR Green, soll jedoch für eine höhere Auflösung der Schmelzkurve sorgen. Beide Farbstoffe können in doppelsträngige DNA interkalieren und dadurch ihr Absorptionsspektrum verändern. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals ist proportional zur Menge des vorhandenen PCR-Produkts. Überschreitet das Fluoreszenzsignal der Produkte die Hintergrundfluoreszenz, so ist der sogenannte Ct-Wert (*Cycle threshold*) erreicht. Je kleiner der Ct-Wert ist, desto größer die vorhandene Menge an DNA, ausgehend von einer stabilen Effizienz der PCR. Bei der Durchführung der qPCRs wurde stets nach den *MIQE-Guidelines* (Bustin et al., 2009) gearbeitet.

Standard PCR-Ansatz (10 µL):

1 µl	cDNA
0,4 µl	forward Primer [10 mM]
0,4 µl	reverse Primer [10 mM]
1,6 µl	dNTPs [1,25 mM]
2 µl	5x GoTaq Flexi Buffer (farblos)
1 µl	GoTaq-Polymerase
1,2 µl	MgCl ₂ [25 mM]
0,8 µl	LC Green
2,5 µl	ddH ₂ O

Standard qPCR Programm:

Denaturierung	95°C	1 min	} x 35 (40)
Annealing	X °C	30 s	
Elongation	72°C	30 s	
	95°C	30 s	
	60°C	15 s	
	95°C	15 s	

Am Ende der Reaktion wurde eine Schmelzkurve von 55-95°C mit einer Erhöhung von 0,5°C pro 30 s aufgenommen. Die PCR-Produkte werden je nach Größe unterschiedlich schnell aufgeschmolzen, die Fluoreszenzmoleküle freigesetzt und es folgt eine Abnahme der Fluoreszenz. Mit dieser Methode kann man feststellen, ob bei der PCR-Reaktion tatsächlich nur ein Produkt amplifiziert wurde.

2.6.4 Primerdesign

Alle Primerpaare wurden mit dem Programm Vektor NTI designt und die Gensequenz zuvor über NCBI (National Center für Biotechnology Information) ermittelt. Für das Design der Primer wurden folgende Kriterien, entsprechend der *MIQE-Guidelines*, angewandt: eine Produktgröße von 140 bp bis 230 bp und ein GC-Gehalt von etwa 50%. Außerdem wurden Exon-übergreifende Bereiche ausgewählt, um die Amplifikation von genomischer DNA auszuschließen.

2.6.5 Primeroptimierung

Der erste Schritt zur erfolgreichen Durchführung einer qPCR ist die Optimierung der PCR Protokolle für jedes einzelne Primerpaar. Der Standard qPCR Ansatz besteht aus ddH₂O, Puffer, MgCl₂, dNTP-Mix, forward Primer, reverse Primer, Taq-Polymerase, LC Green und der cDNA. Die genaue Zusammensetzung ist im Teil „Material und Methoden“ festgehalten. Die Primer wurden so gewählt, dass sie eine Sequenz amplifizieren, die mindestens innerhalb zweier Exons liegt. Damit soll sichergestellt werden, dass keine genomische DNA, sondern nur cDNA, die auf die mRNA zurückgeht, vervielfältigt wird. Genomische DNA besitzt im Gegensatz zur mRNA zwischen den Exons nicht kodierende Abschnitte, die Introns, sodass sich die Länge der PCR-Produkte verändern oder mehrere Produkte entstehen würden.

Mit jedem Primerpaar wurde ein Temperaturgradient mit dem Standard qPCR Ansatz und cDNA der Mausretina von Tag 0 durchgeführt, um die optimale Annealing-Temperatur zu bestimmen. Dabei ist es entscheidend, dass möglichst keine Primerdimere und nur das gewünschte Produkt entstehen. Unter Einbeziehung der Ct-Werte, der Schmelzkurvenanalyse und des Agarosegels konnte eine Annealing-Temperatur ausgewählt werden. Da die Produkte aller Gene mit den ausgewählten Primern sehr klein sind (162 bp bis 228 bp) war für die einzelnen Schritte der qPCR (Denaturierung, Annealing, Elongation) eine Dauer von 30 Sekunden ausreichend.

2.6.6 Auswahl der Referenzgene

Als Referenzgene bezeichnet man Gene, die eine Schlüsselrolle in biologischen Signalwegen spielen, ubiquitär exprimiert werden und ein ähnliches Expressionslevel für alle Proben aufweisen. Sie werden als interne Kontrolle benötigt, um eine Standardisierung und Quantifizierung der Messwerte vornehmen zu können. In dieser Arbeit wurde Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*Gapdh*) als Referenzgen ausgewählt. GAPDH ist ein weit verbreitetes Enzym, das bei der Energiegewinnung durch die Glykolyse eine wichtige Rolle spielt. Das hier ausgewählte Gen wurde zuvor in der Literatur während der Entwicklung der Retina als stabil beschrieben (Rocha-Martins et al., 2012). Zusätzlich zu *Gapdh* wurde für die Analyse der Lasermikrodissektions-Ergebnisse *18S RNA* als Referenzgen genutzt.

2.6.7 2(- $\Delta\Delta\text{Ct}$)-Methode

Um eine relative Quantifizierung der qPCR Daten vornehmen zu können, wurde aus den Ct-Werten der $2^{-\Delta\text{Ct}}$ -Wert berechnet. Dabei wird die Expression eines Zielgens auf die Expression eines nicht regulierten, konstant exprimierten Referenzgens bezogen. Aus den Delta-Ct-Werten der beiden Gruppen wird anschließend der Delta-Delta-Ct-Wert gebildet und dies wiederum in die Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ eingesetzt, um den Expressionsunterschied der beiden Gruppen zu ermitteln. Die Berechnung dieses Wertes ist im Folgenden dargestellt:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} - \Delta\text{Ct Kontrolle}$$

$$\text{Ratio} = 2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$$

2.7 Agarosegelelektrophorese und DNA-Färbung

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese kann die Größe und Menge von DNA bestimmt werden. Agarose, ein Polysaccharid, kann nach Erhitzen Polymere bilden, sodass ein Gel mit definierter Porengröße entsteht. Die Größe der Poren ist abhängig von der eingesetzten Konzentration an Agarose. Die Methode kann Moleküle von einer Größe zwischen 150 und 20.000 bp auftrennen. Dazu musste zunächst die Gellösung angesetzt werden. Diese besteht aus 2 % Agarose (w/v), die in TBE-Puffer gelöst wird. Um die Agarose zu lösen, wurde das Gemisch kurz aufgeköcht. Zur Anfärbung der DNA wurde Ethidiumbromid, GelRed oder SERVA DNA Stain G verwendet. Diese Farbstoffe wurden direkt zu dem Gel pipettiert. Die Gellösung wurde dann in entsprechende Gelschritten gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nachdem das Gel fest geworden war, konnte der Kamm gezogen werden. Die Proben wurden mit DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen geladen. Als Laufpuffer diente hier ebenfalls TBE. Der verwendete Marker war Gene Ruler 100bp Plus von Fermentas. Im Anschluss wurden die Gele unter UV-Licht betrachtet und über ein Geldokumentationssystem digitalisiert.

2.8 Semi-quantitative Analyse mit Fiji

Um eine semi-quantitative Bestimmung der Genexpression nach einer PCR durchführen zu können, wurde die Schwarzfärbung des Gels nach Ethidiumbromid-Färbung mit Hilfe des Programms Fiji quantifiziert (Abbildung 12). Die Intensität der Banden wurde gemessen und das Verhältnis der Zielgene und des *House-Keeping* Gens (*GAPDH*) gebildet, um mögliche initiale Variationen in der Probenkonzentration auszuschließen und als Kontrolle der Effizienz der Reaktion. Anschließend wurde noch eine Normalisierung der Zellkultursysteme mit der humanen Retina vorgenommen.

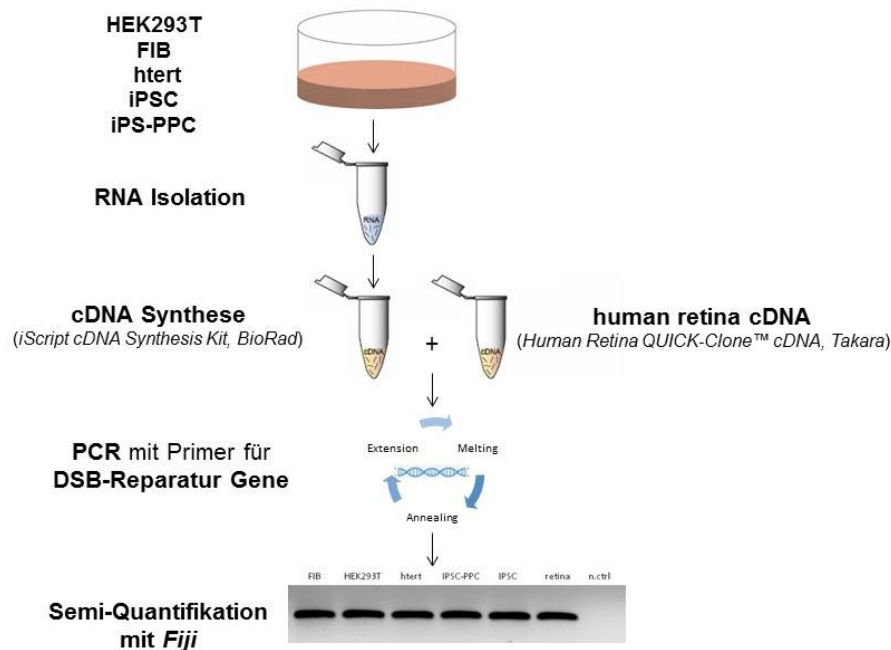


Abbildung 12: Semi-quantitative Analyse der Genexpression von humanen Zellen. HEK293T: humane embryonische Nierenzellen. FIB: Fibroblasten. htert: Immortalisierte RPE Zellen iPSC: Induzierte pluripotente Stammzellen. iPS-PPC: Photorezeptor-ähnliche iPS.

2.9 Proteinanalytik

2.9.1 Proteinisolation

Zur Isolation von Proteinen aus Geweben, wurde etwa 100 mg Gewebe eingewogen und in der Precellys homogenisiert.

2.9.2 Bradford Assay

Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgte nach der Methode von Bradford et al., 1976. Das Prinzip beruht auf der Bindung zwischen unpolaren Proteinseitenketten und dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue, wobei sich nach Komplexbildung das Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 470 nm auf 595 nm verschiebt (Bradford, 1976). Hierzu wurde das Pierce™ Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit von Thermo Scientific verwendet.

2.9.3 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen anhand ihrer Größe erfolgte nach der Methode von Lämmli, 1970. Die denaturierten Proteine wandern dabei in einem elektrischen Feld durch eine Matrix aus Polyacrylamid. Durch den Zusatz von SDS in Puffer und Gelmatrix wird die Auftrennung der Proteine unabhängig von der Eigenladung der Proteine gewährleistet, sondern ausschließlich aufgrund der Länge ihrer Aminosäureketten (Laemmli, 1970). Das Gel bestand aus einem Trenngel mit pH 8.8 und einem darüber liegenden Sammelgel mit pH 6.8 (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Zusammensetzung des SDS-Gels.

Sammelgel (4%)	Trenngel (10%)
30% Acrylamid (1:29)	30% Acrylamid (1:29)
1.5 M Tris/HCl pH 6.8	1.5 M Tris/HCl pH 8.8
20% SDS	20% SDS
10% APS	10% APS
TEMED	TEMED
H ₂ O	H ₂ O

Durch Zugabe von TEMED und des Katalysators APS begann die Polymerisation des Gels, weshalb diese unmittelbar vor dem Gießen der Gele stattfand. Das Trenngel wurde mit Ethanol überschichtet, um eine glatte Gelkante zu erzeugen. In das Sammelgel wurde der Gelkamm gesteckt. Die Gelkammer wurde mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt und die Proben konnten geladen werden. Dazu wurden Proben vieler muriner Organe lysiert. Für die Herstellung der Lysate wurden verschiedene Lysis-Puffer auf ihre Effektivität getestet. Dazu zählen RIPA-Puffer, ein SDS Lysis Buffer (SLB) nach Britton et al. 2013 und ein kommerziell erhältlicher Puffer (5x Luciferase Assays Lysis Buffer von Promega). Das Gel befand sich für 10 min in einem Spannungsfeld von 35 mA und 100 V und anschließend für 55 min bei 200 V. Anschließend folgte die Weiterverwendung für den Western Blot.

2.9.4 Western Blot

Die qualitative Analyse spezifischer Proteine in einem Zelllysate setzt neben der Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen, einen anschließenden Transfer der Proteine auf die Oberfläche von Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen voraus. Daran schließt sich wiederum ein Antikörper-gekoppeltes Nachweisverfahren verschiedener Proteinkomponenten an. Für den Proteintransfer aus SDS-Gelen wurde in dieser Arbeit das Semi-Dry-Blot-Verfahren und Nitrocellulose-Membranen genutzt. Zusätzlich wurden vier dünne und zwei dicke Filterpapiere benötigt. Diese wurden gemeinsam mit dem SDS-Gel und der Membran in Transfer-Puffer getränkt, in den Blotter eingelegt und ein Spannungsfeld von 200 mA und 25V für 45 min angelegt.

Im Anschluss wurde die Membran für mindestens eine Stunde gegen die Anheftung weiterer Proteine an die Membran blockiert. Dazu wurde in dieser Arbeit eine 5-prozentige Milchpulverlösung verwendet. Daran schloss sich ein kurzer Waschschrift mit 1x TBS an, um die Blockierlösung zu entfernen.

In einem nächsten Schritt erfolgte die Inkubation mit dem 1. Antikörper über Nacht bei 4°C. Der Erstantikörper bindet ein spezifisches Epitop im Zielprotein. Die Antikörper wurden zuvor entsprechend den Angaben in Tabelle 10 verdünnt. Nach der Inkubation schloss sich ein Waschschrift an. Dazu wurde die Membran drei Mal für 10 Minuten mit 1x TBS gewaschen.

Tabelle 10: Primärantikörper.

Antikörper	Verdünnung	Wirt	Hersteller
GAPDH	1 : 20.000 in 1x TBS, 5% BSA, 0,1% Tween20	Kaninchen	Cell Signaling, Leiden
Ku80	1 : 1.000 in 1x TBS, 0,1% Tween20	Kaninchen	Cell Signaling, Leiden

Der Sekundärantikörper dient der Detektion des Zielproteins, bindet an den Fc-Teils des Erstantikörpers und ist an ein Reporterprotein gekoppelt. Die Inkubationszeit betrug etwa eine Stunde und fand bei Raumtemperatur statt. Auch dieser Antikörper wurde zuvor verdünnt (siehe Tabelle 11). Nun schloss sich wieder ein Waschschrift an. Dazu wurde die Membran erneut drei Mal für 10 min mit 1x TBS gewaschen.

Tabelle 11: Sekundärantikörper.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Alexa Fluor 488 Donkey anti-rabbit IgG	1 : 100.000 in 1x TBS	Thermo Fisher

Es folgte die Detektion mittels Elektrochemilumineszenz (ECL)-Lösung. Diese wurde nach Herstellerangaben verwendet, ein Film in einer Dunkelkammer auf die Membran aufgelegt, dieser in Entwickler-Lösung und abschließend in Fixier-Lösung geschwenkt.

2.10 Lasermikrodissektion

Die Lasermikrodissektion (LMD) stellt eine relativ schnelle und präzise Methode zur Isolation von spezifischen Zellen aus komplexen heterogenen Geweben für eine folgende Analyse der RNA, DNA oder Proteine dar. In dieser Arbeit wurde die Methode genutzt, um einzelne Schichten der Retina ausschneiden, die RNA isolieren und die Expression messen zu können (Abbildung 13). Dieser Arbeitsablauf wurde für die Anwendung an der Netzhaut eigenständig etabliert.

2.10.1 Einfrieren der Gewebe

Das Gewebe wurde für die LMD nicht fixiert. Kultivierte Retinae oder ganze Augenbecher (ohne Linse und Cornea) wurden in ein mit Gefriermedium gefülltes Cryomold überführt. Die genaue Platzierung erfolgte mittels Binokular-Mikroskop möglichst mittig. Die Retina wurde dann in einer mit flüssigem Stickstoff gekühlten Kammer eingefroren. Die Präparate wurden bis zur Verwendung gut verpackt (Parafilm und Alufolie) bei -80°C gelagert.

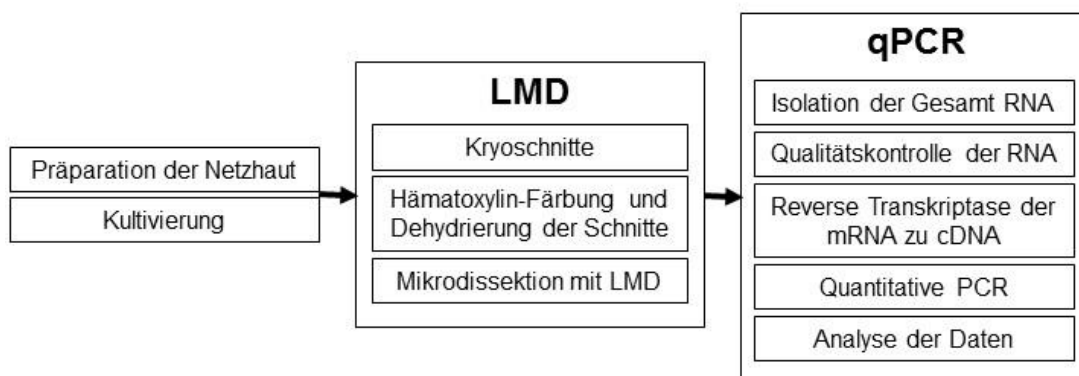


Abbildung 13: Ablauf der praktischen Vorgänge zur Durchführung der Lasermikrodissektion. LMD: Lasermikrodissektion.

2.10.2 Kryoschnitte

Die gefrorenen Gewebestücke wurden in einem Behälter mit flüssigem Stickstoff zum Kryostat transportiert. Zum Anfertigen von $8\ \mu\text{m}$ Schnitten bei -18°C wurde das Gefriermikrotom Leica CM1850UV genutzt. Es wurden so viele Schnitte wie möglich auf einem Objektträger (Leica Membrane Slides) platziert. Diese speziellen Objektträger sind mit einer $2,0\ \mu\text{m}$ dünnen Schicht aus Polyethylenphthalat (PEN) überzogen, die das spätere Ausschneiden am Mikroskop ermöglichte.

2.10.3 Hämatoxylin Färbung

Um die einzelnen Schichten der Retina besser unterscheiden zu können, wurde eine Hämatoxylin Färbung angewandt und die Schnitte anschließend dehydriert (siehe Tabelle 12). Bei Hämatoxylin handelt es sich um einen Naturfarbstoff, der die Zellkerne blau anfärbt. Damit es nicht zur Degradation der RNA kommt, ist es wichtig, möglichst zügig zu arbeiten. Deshalb wurde jeweils nur mit einem Objektträger nacheinander gearbeitet. Die Objektträger wurden vollständig luftgetrocknet, bevor mit der Dissektion am Mikroskop begonnen wurde, um die volle Leistung beim Ausschneiden zu erzielen.

2.10.4 Lasermikrodissektion

Für die Lasermikrodissektion wurde das computergesteuerte Lasermikrodissektionssystem LMD6000 (Leica Microsystems, Wetzlar) genutzt. Hierbei handelt es sich um ein automatisiertes aufrechtes Digitalmikroskop, welches über einen motorisierten Objektisch verfügt und an einen UV-Diodenlaser (Emissionswellenlänge $355\ \text{nm}$) gekoppelt ist. Weiterhin ist eine analoge Kamera angebracht, die der Visualisierung dient. Zur Vorbereitung der LMD

wurden alle metallischen und abnehmbaren Teile des LMD6000 mit einem Flächen-Desinfektionsmittel gereinigt. Zur Steuerung des Mikroskops diente die LMD6000-Software (Version 6.6.3.3564, Leica Microsystems, Wetzlar). Mit Hilfe dieser Software ließen sich Lichtintensität, Objektive, Lasereigenschaften, Objektträger- und Cap-Positionen vollautomatisch ansteuern. In Tabelle 13 sind die gewählten Einstellungen festgehalten. Bei Bedarf kann die Energie des Lasers erhöht werden.

Tabelle 12: Färbeprotokoll für Hämatoxylin Färbung vor Lasermikrodissektion.

Flüssigkeit	Dauer
Hämalaun (40:60)	40 s
ddH ₂ O (Bad 1)	2 s
ddH ₂ O (Bad 2)	2 s
70% Ethanol (Bad 1)	2 s
70% Ethanol (Bad 2)	2 s
96% Ethanol (Bad 1)	2 s
96% Ethanol (Bad 2)	2 s
100% Ethanol (Bad 1)	2 s
100% Ethanol (Bad 2)	2 s
100% Ethanol (Bad 3)	Transport zum Mikroskop

Unter dem Objektträgerhalter, abgetrennt durch ein Blech, befindet sich die Halterung für die Reaktionsgefäße, in denen die ausgeschnittenen Gewebestücke gesammelt werden (Abb. 11). Dazu wurden spezielle 0,5 ml Tubes (Nr. 04.100.0100; Nerbe Plus, Winsen) mit dem Deckel eingespannt, die zum Auffangen des Gewebes dienen. Zusätzlich wurden 30 µl RLT Puffer (+βME) hinein pipettiert. Mit Hilfe des 10x Objektivs wurde die geeignete Stelle im Präparat gesucht und per Computermaus von Hand markiert. Das Gewebestück fiel nach Laserablation durch Schwerkraft in den Deckel des Reaktionsgefäßes (Abbildung 14).

Tabelle 13: Parameter für LMD.

Parameter	Wert
Energie	35
Apertur	12
Geschwindigkeit	15
Proben Balance	0
Stromstärke Kopf	6

Wurde genügend Gewebematerial gesammelt (etwa 40 Stücke), konnte das Gefäß vorsichtig aus der Halterung genommen werden. Es wurden zusätzlich 270 µl RLT Puffer in das Tube pipettiert, der Deckel vorsichtig geschlossen und für 15 s gevortext. Anschließend

wurde die Probe direkt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, um die Qualität der RNA zu wahren, und bis zur RNA-Isolation bei -80°C gelagert. Vor Beginn der RNA-Isolation wurden $50\ \mu\text{l}$ RLT Puffer ($+\beta\text{ME}$) frisch zur Probe dazu pipettiert und die Probe erneut für mindestens 10 s gevortext und kurz abzentrifugiert.

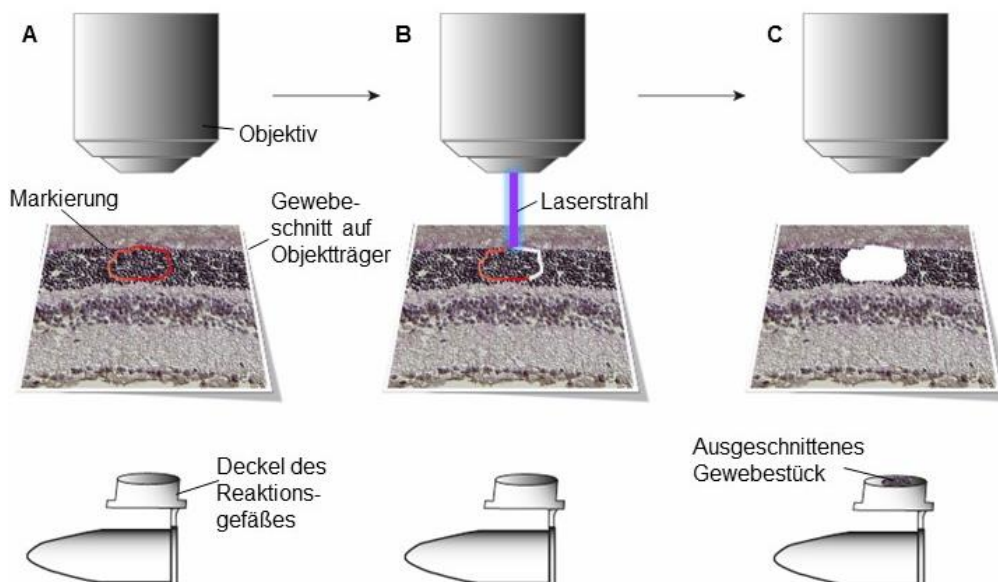


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Lasermikrodissektion. **A:** Querschnitt des Gewebes wird unter Objektiv platziert. Manuelle Markierung (rot) des Bereichs, der ausgeschnitten werden soll. **B:** Laserablation entlang des markierten Bereichs. **C:** Durch die Schwerkraft fällt das Gewebestück in den Deckel des darunter platzierten Reaktionsgefäßes.

2.11 Übersicht der verwendeten Proben und Methoden

In den folgenden Abbildungen wurden zur Übersicht alle verwendeten Proben (Abbildung 15) und der Workflow (Abbildung 16) zusammengefasst.

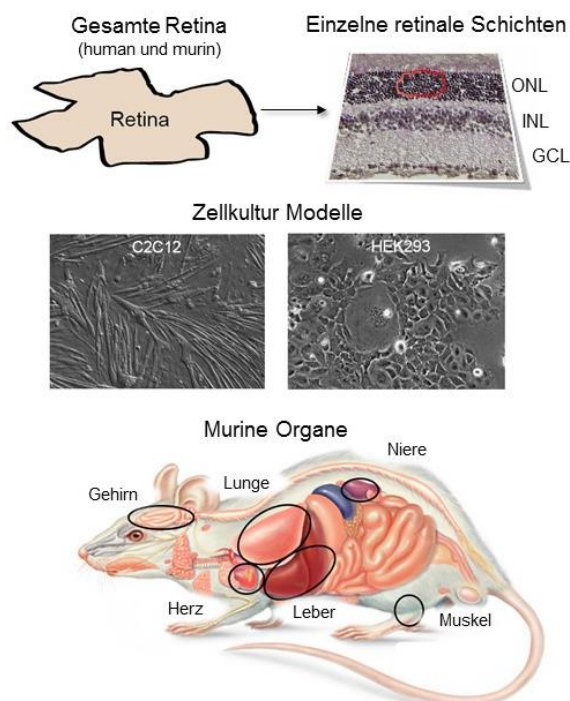


Abbildung 15: Proben, die zur Analyse verwendet wurden. ONL: äußere Körnerschicht (*outer nuclear layer*). INL: innere nukleäre Schicht (*inner nuclear layer*). GCL: Ganglienzellschicht (*ganglion cell layer*).

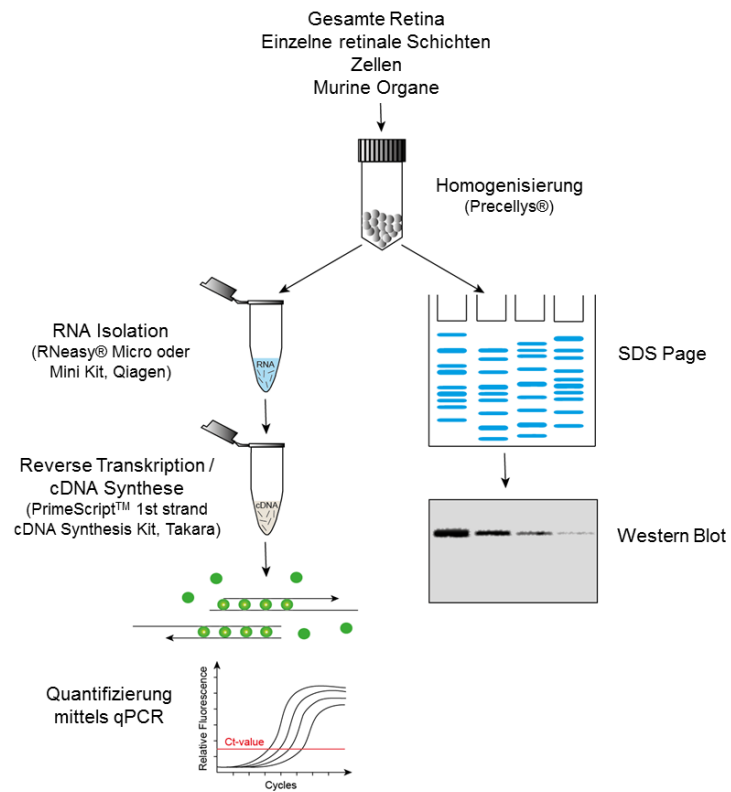


Abbildung 16: Zusammenfassung und Workflow der verwendeten Methoden.

III Ergebnisse

1. Genexpression in der organotypischen Retinakultur

Die organotypische Retinakultur birgt das Potential eines intermediären Modells zwischen dem Zellsystem *in vitro* und dem Tiermodell *in vivo*, da die retinalen Schichten intakt bleiben und so die interzellularen Interaktionen unter definierten Bedingungen ausgewertet werden können. Im Folgenden wurde die Transkription spezifischer Gene in der organotypischen Retinakultur von adulten Mäusen mit Hilfe der quantitativen PCR gemessen, um die Retinakultur näher zu charakterisieren.

1.1 RNA-Gehalt der Retinaprobe

Um die Transkriptionslevel verschiedener Gene messen zu können, musste zunächst RNA aus dem Gewebe isoliert werden. Mit Hilfe eines Photometers konnte der Gesamt-RNA-Gehalt einer Probe gemessen werden. Anzumerken ist, dass für eine Probe jeweils drei Retinae vereint wurden. Es wird deutlich, dass es zu einer drastischen Abnahme des Gesamt-RNA-Gehalts in der Netzhaut kommt, sobald sie in Kultur genommen wird (Abbildung 17A). Bei frisch entnommenen Retinae (Tag 0) liegt der Gehalt noch bei $18,83 \pm 2,34$ ng pro mg Gewebe, bereits nach einem Tag in Kultur sinkt der Gehalt statistisch signifikant ($p \leq 0,001$) auf $4,00 \pm 1,00$ ng pro mg Gewebe ab, bleibt dann jedoch bis zu Tag acht weitestgehend stabil.

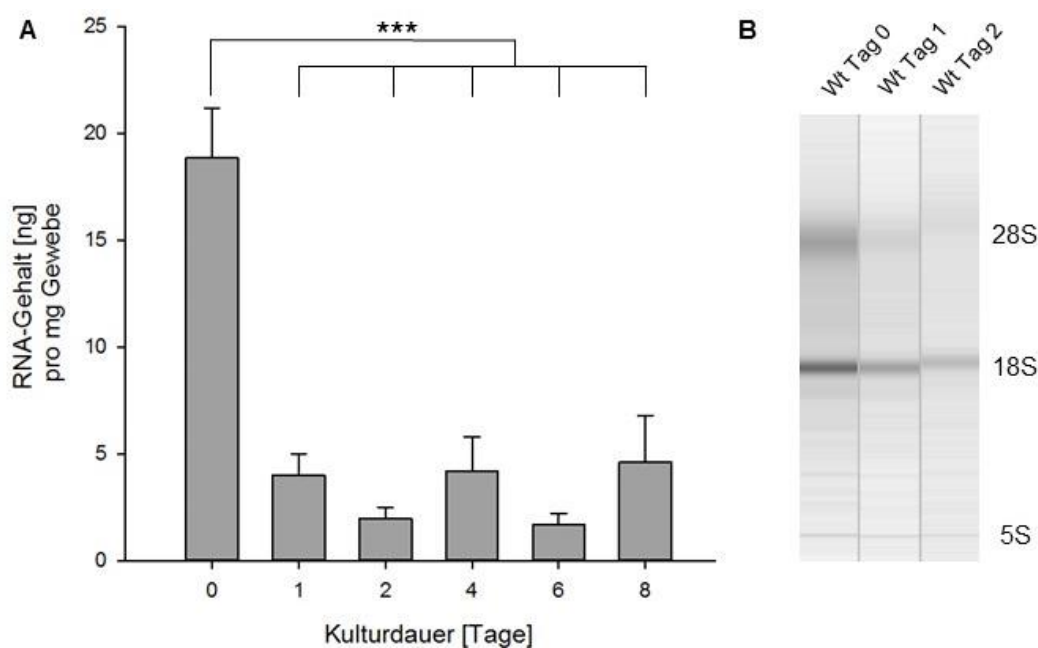


Abbildung 17 A: Sinkender Gesamt-RNA-Gehalt der organotypischen Retinakultur über den Zeitraum von acht Tagen. Die Abnahme ist im Vergleich zu frisch isolierten Retinae (Tag 0) signifikant ($*** p < 0,001$). Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=5$, pro Zeitpunkt) und dazugehöriger SEM (verändert nach Müller, Wagner et al., 2017). **B:** Beispiel einer RNA-Qualitätskontrolle mittels Qiaxcel. RNA, gewonnen aus Retinae von Wt Tieren vor oder nach der Kultur. Die drei Banden stellen die ribosomalen Untereinheiten 5S, 18S und 28S dar.

1.2 Integrität der Gesamt-RNA

Die gewonnene Gesamt-RNA der frischen und kultivierten Retinae wurde vor der Nutzung für die qPCR auf ihre Integrität getestet und quantifiziert. Dazu kam das automatisierte Elektrophoresesystem QIAxcel zum Einsatz. Das Elektropherogramm der Gesamt-RNA aus der Integritätsmessung wies bei allen verwendeten Proben drei signifikant erhöhte Ausschläge der 5S-, 18S- und 28S-rRNA auf (Abbildung 17B).

1.3 Reproduzierbarkeit der qPCR Daten

Um mit den Werten, die bei der qPCR gemessen werden, eine quantitative Aussage über das Expressionslevel der Zielgene treffen zu können, ist es von großer Bedeutung die Reproduzierbarkeit der Daten zu belegen. Dazu muss die Auswahl eines geeigneten Referenzgens getroffen und eine hohe Effizienz der Methode gezeigt werden.

Die Quantifizierung der Zielgene im Rahmen der qPCR kann absolut oder relativ erfolgen. Die absolute Quantifizierung ist in vielen Fällen nicht zielführend, da so die Anzahl der Startkopien des Zielgens in der cDNA einer bestimmten Probe ermittelt wird. Dies kann jedoch zuvor durch viele Faktoren verfälscht werden. Um daher ein Maß für die Kopienzahl pro Zelle zu erhalten, muss man das Zielgen in Bezug zu einem Referenz-Gen, welches als endogene Kontrolle dient, setzen. Damit erfolgt eine relative Quantifizierung. In dieser Arbeit wurde *Gapdh* verwendet, dessen Expression in der Retina als stabil beschrieben wurde (Rocha-Martins et. al. 2012).

Ein Weg, um zu zeigen, dass der genutzte qPCR-Ansatz optimiert ist, kann mit der Generierung einer Standardkurve durch eine Verdünnungsreihe der cDNA erzielt werden. Dazu wird die Menge der cDNA logarithmisch zu den jeweiligen Ct-Werten in einer Grafik dargestellt. Aus der Gleichung der linearen Regressionsgeraden ergibt sich schließlich der Wert R^2 , der eine Aussage darüber zulässt, ob der qPCR-Ansatz optimiert ist. Im Idealfall entstehen durch die Verdünnungsreihe Amplifikationskurven, die alle den gleichen Abstand zueinander haben. Im Folgenden ist die lineare Quantifizierung am Beispiel von *Rhodopsin* dargestellt (Abbildung 18). Wie in der Abbildung zu erkennen ist, besitzen alle Kurven den gleichen Abstand zueinander. Der Wert R^2 gibt an, wie gut die experimentellen Daten zu der Regressionsgeraden passen, das heißt, wie linear sie sind. Dieser Wert sollte für eine qPCR möglichst bei $\geq 0,980$ liegen. Besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den gemessenen Ct-Werten, verkleinert sich R^2 . Nach Regressionsanalyse der hier vorliegenden experimentellen Daten zeigt sich ein R^2 -Wert von 0,998, was für optimale Bedingungen der qPCR spricht.

1.4 Expressionslevel definierter Gene in der organotypischen Retinakultur von Wildtypmäusen

Als Vorbereitung einer Gentherapie an der Netzhaut soll die Strategie zunächst an der organotypischen Retinakultur getestet werden. Dazu wurden Retinae von Wildtypmäusen bis zu acht Tage in Kultur genommen, die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Im Folgenden wurden verschiedene Gene ausgewählt und Unterschiede in der Transkriptmenge

zwischen Proben unterschiedlicher Kulturdauer bestimmt. Dazu wurde die Methode der quantitativen PCR genutzt. Bei der Berechnung der Transkriptionsunterschiede wurde das Gen *Gapdh* zur Normalisierung verwendet.

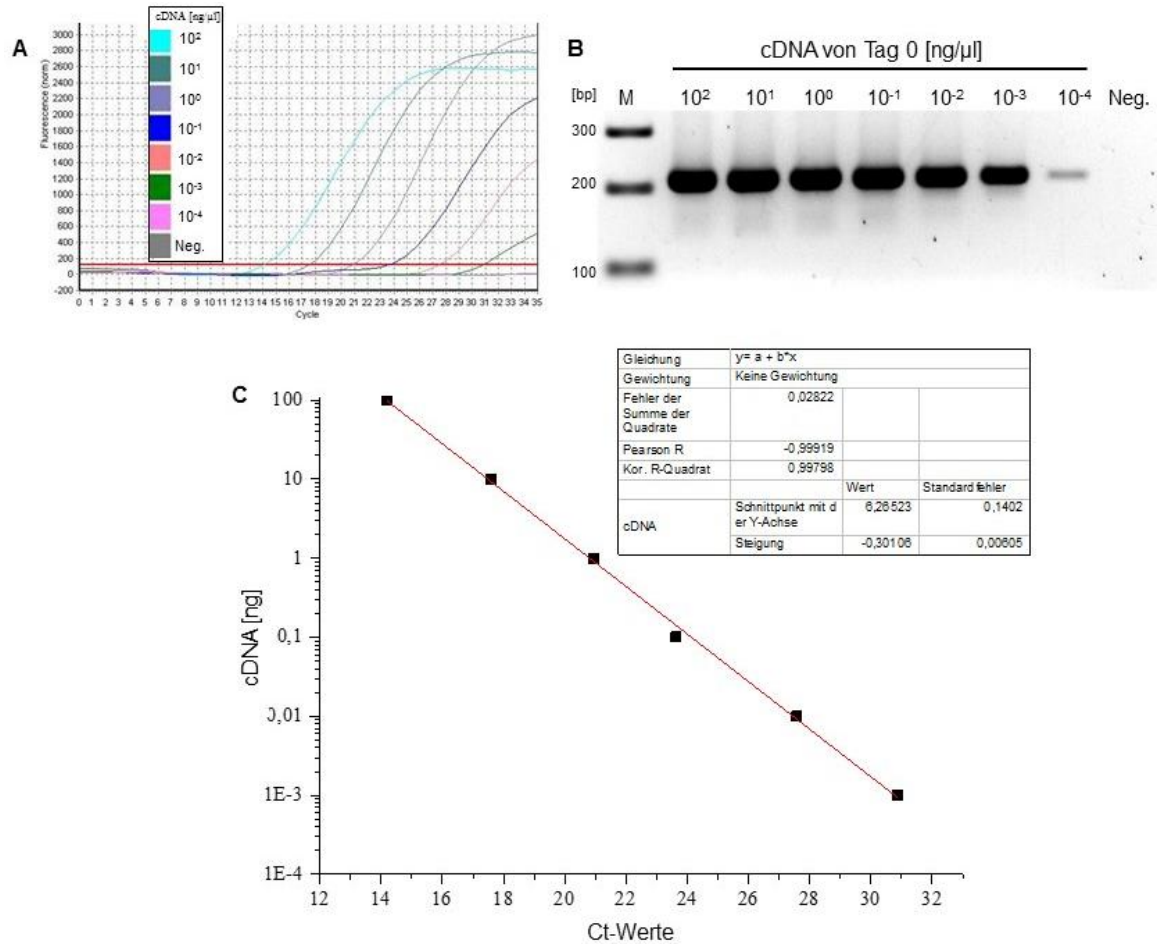


Abbildung 18: Lineare Quantifizierung der qPCR Ergebnisse durch Regressionsanalyse am Beispiel von *Rhodopsin*. **A:** Darstellung der Amplifikationskurven der 10-fachen Verdünnungsreihe der cDNA der Mausretina von Tag 0 während der quantitativen PCR (qPCR). Neg.: Negativkontrolle, Standardansatz ohne cDNA. **B:** Agarosegel nach qPCR. 8 μ l der Probe aufgetragen. M: Marker, GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder von Fermentas. Erwartete Produktgröße von *Rhodopsin*: 208 bp. **C:** Regressionsanalyse.

1.4.1 Rhodopsinexpression

Rhodopsin ist das am häufigsten vorkommende Protein in der Netzhaut. Es ist das Sehpigment der Stäbchen-Photorezeptoren, die mit etwa 97% den Großteil der Photorezeptoren der Maus ausmachen und das Hell-Dunkel-Sehen ermöglichen. Da wiederum etwa 80% der Neuronen in der Mausretina Photorezeptoren sind, erlangt das Rhodopsin eine bedeutende Größe in der Gesamtheit der Genexpression in der Retina (Jeon et al., 1998). Die Analyse der Expression von *Rhodopsin* zeigt bereits nach einem Tag in Kultur eine deutliche und statistisch signifikante ($p < 0,5$) Abnahme ($-5,35 \pm 1,36$), im Vergleich zu frisch isolierter Retina

(Tag 0, $1,00 \pm 0,18$), die sich bis Tag acht auf einen Wert von $-38,80 \pm 26,71$ verstärkt (Abbildung 19).

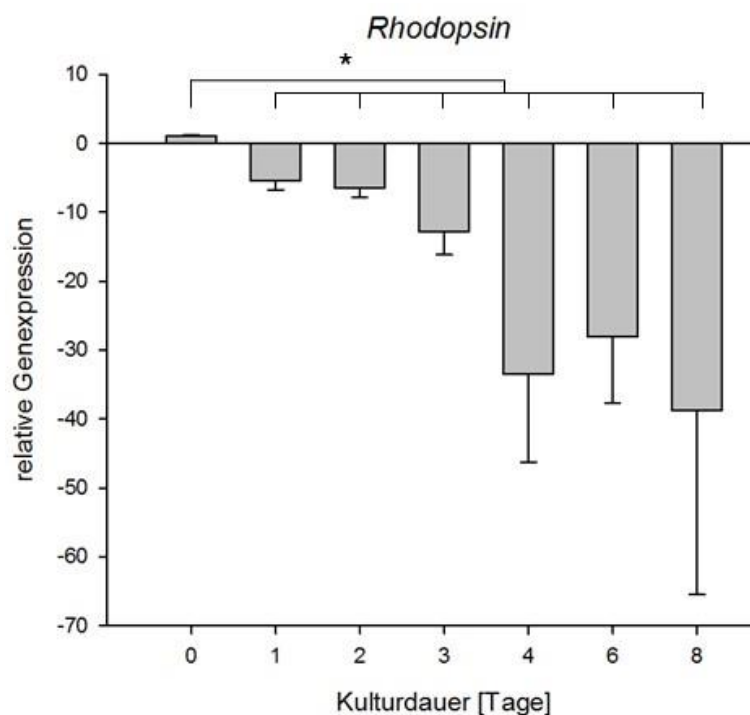


Abbildung 19: Verminderte Rhodopsinexpression in der organotypischen Retinakultur von Wildtypmäusen. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *Gapdh*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=3$) und dazugehöriger SEM. * $p < 0,05$ (t-Test) (verändert nach Müller, Wagner et al., 2017).

1.4.2 Expression von Genen der retinalen Gliazellen

Zur Analyse der Situation der Gliazellen in der organotypischen Retinakultur wurde die Expression der Gene *Aif1* und *Gfap* gemessen. Das Gen *Aif1* (*Allograft inflammatory factor 1*, auch *Iba1*) kodiert für ein spezifisches Protein der Mikrogliazellen, auch bekannt als *Iba1*, das in Folge von Verletzungen der Nerven verstärkt exprimiert wird (Imai and Kohsaka, 2002). Zusätzlich wurde die Expression von *Gfap* (*Glial fibrillary acidic protein*) gemessen, welches spezifisch in Astroglia exprimiert wird und ebenfalls als Reaktion auf Verletzungen an Expression zunimmt (Lewis and Fisher, 2003).

Diese beiden Gene unterscheiden sich deutlich in der Stärke ihrer Expression (Abbildung 20). *Aif1* erfährt ab Tag 2 der Kultur eine Zunahme, die ihr Maximum an Tag 4 mit einem signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg von $13,76 \pm 4,96$ erreicht und an Tag 8 erneut auf $1,77 \pm 0,64$ absinkt. Dagegen erhöht sich die Genexpression bei *Gfap* an Tag 2 auf $14,36 \pm 4,33$ bis hin zu einem Maximum von $100,56 \pm 18,47$ an Tag 4, welches ebenfalls eine signifikante ($p < 0,05$) Zunahme darstellt. Auch an Tag 8 ist die *Gfap* Expression weiterhin hoch. Damit zeigt *Gfap* im Vergleich zu *Aif1* an Tag 4 eine fast 10-fach stärkere Expression und an Tag 8 sogar fast 100-fach stärker.

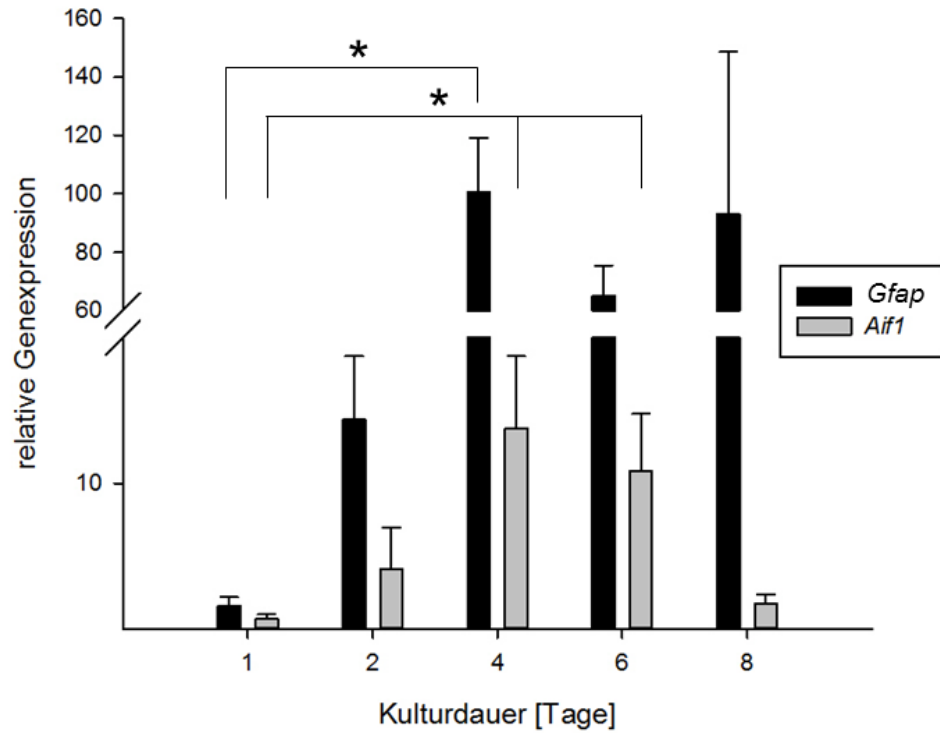


Abbildung 20: Zunehmende Genexpression der Gliazellen-spezifischen Gene *Aif1* und *Gfap* in der organotypischen Retinakultur von Wildtypmäusen. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *Gapdh*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=3$) und dazugehöriger SEM. * $p < 0,05$ (ANOVA) (verändert nach Müller, Wagner et al., 2017).

2. DNA-Reparaturproteine in der organotypischen Retinakultur

Erbliche Netzhautdegenerationen sind eine Gruppe von Erkrankungen, die durch Mutationen in über 200 Genen ausgelöst werden können. Die Nutzung der zelleigenen DNA-Reparaturmechanismen stellt eine vielversprechende Therapiemöglichkeit dar. Allerdings ist das Wissen über diese Prozesse in postmitotischen, stark differenzierten und speziellen Neuronen der Netzhaut limitiert.

2.1 *Non-homologous end joining* (NHEJ) in der Retinakultur

Als Bestandteile und Schlüsselproteine des Signalwegs NHEJ wurden drei Gene ausgewählt, deren Transkription im Weiteren näher untersucht wurde. Diese drei Gene sind *53bp1* (auch *Trp53bp1*), *Ku80* (auch *Xrcc5*) und *DNA-PKcs* (auch *Prkdc*). Das Protein 53BP1 ist unter anderem an der Entscheidung, welcher Reparaturweg eingegangen wird, beteiligt und begünstigt NHEJ. Das Protein Ku80 wiederum bindet gemeinsam mit Ku70 an DNA-Doppelstrangbrüche und stabilisiert diese. Anschließend wird unter anderem DNA-PKcs rekrutiert, das die Reparatur des DSB vorantreibt.

Die Messung der Transkription mittels qPCR zeigt eine Abnahme für *53bp1* über die Dauer der organotypischen Retinakultur von acht Tagen, verglichen mit frisch entnommenen Retinae. Lediglich an Tag 1 der Kultur ist eine relative Genexpression von $3,30 \pm 0,49$ messbar, was einen signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg, im Vergleich zu Tag 0 ($1,00 \pm 0,09$), darstellt (Abbildung 21A). An den darauffolgenden Tagen ist eine Abnahme der Expression messbar die an Tag 6 ($-0,72 \pm 0,73$) und Tag 8 ($-0,88 \pm 1,02$), verglichen mit Tag 1, signifikant ($p < 0,05$) ist.

Dagegen zeigt das Gen *Ku80* eine stabile Expression über die Dauer der Kultur von acht Tagen. Die Daten der qPCR zeigen eine Transkription, die zwischen einem Minimum von $1,98 \pm 0,56$ an Tag 8 und einem Maximum von $2,90 \pm 1,80$ an Tag 4 liegt, ohne dass sich die Tage signifikant voneinander unterscheiden (Abbildung 21B).

Wie in Abbildung 21C deutlich wird, unterliegt die Expression des Gens *DNA-PKcs* größeren Schwankungen. Bis zu Tag 4 der organotypischen Retinakultur unterscheidet sich die Expression von kultivierten kaum zu frisch entnommenen Retinae, jedoch sinkt sie an Tag 6 auf einen Wert von $-0,11 \pm 0,89$ und steigt an Tag 8 wiederum auf ein Maximum von $3,11 \pm 3,08$ an. Es ist zusätzlich zu beachten, dass die zugehörigen Standardabweichungen größer sind als bei anderen Genen und die Expressionsunterschiede an den jeweiligen Tagen nicht signifikant sind.

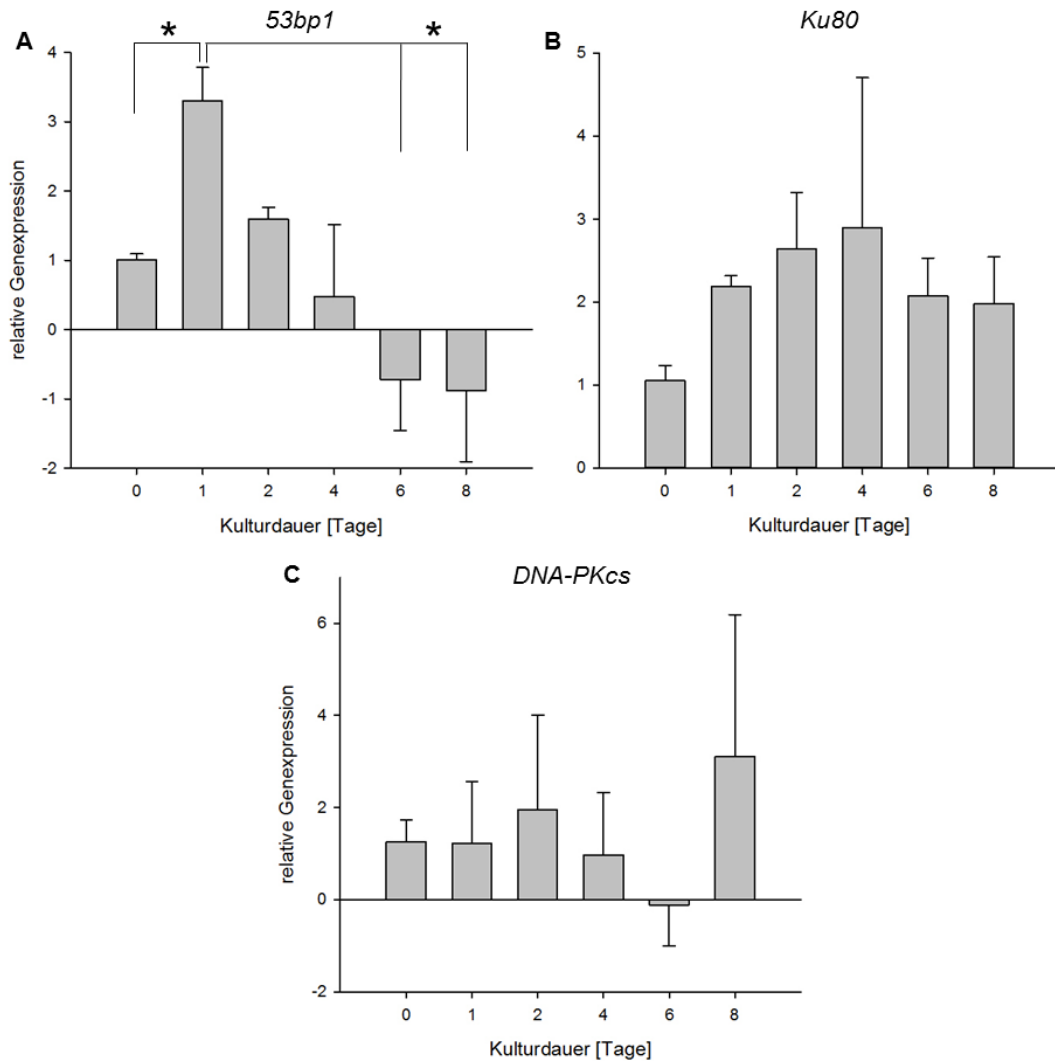


Abbildung 21: Quantifizierung von NHEJ in der organotypischen Retinakultur von Wildtypmäusen. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *Gapdh*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=3$) und dazugehöriger SEM. * $p < 0,05$ (ANOVA).

2.2 Homology-directed repair (HDR) in der Retinakultur

Für den Reparaturweg durch HDR wurden ebenfalls drei Gene ausgewählt und die Transkription durch qPCR bestimmt. Diese drei Gene sind *Rad50*, *Brca1* und *CtIP* (auch *Rbbp8*). *Rad50* kodiert für ein Protein, welches neben zwei anderen Proteinen Bestandteil des MRN-Komplexes ist. Dieser Komplex bindet zügig an DNA-DSB und erzeugt einzelsträngige DNA 3'-Überhänge (Lamarche et al., 2010). An dieser Erzeugung ist ebenfalls das Protein CtIP beteiligt. BRCA1 kontrolliert zusätzlich diese Prozessierung.

Betrachtet man die Ergebnisse für *CtIP*, so lässt sich eine konstante Zunahme der Transkription in der Retinakultur, verglichen mit Tag 0, beobachten (Abbildung 22A). Diese Zunahme ist an allen Tagen signifikant. Von Tag 0 ($1,00 \pm 0,21$) auf Tag 1 erhöht sich die Expression mit statistischer Signifikanz ($p < 0,01$) auf einen Wert von $2,84 \pm 0,42$, steigt an Tag 2

($4,71 \pm 1,36$) weiter an, sinkt an Tag 4 ($2,85 \pm 0,84$) wieder etwas ab und erlangt schließlich an Tag 6 eine Expression von $3,92 \pm 0,59$. Für dieses Gen wurde die Transkription bis Tag 6 der Retinakultur bestimmt.

Das Transkriptionslevel von *Rad50* in der organotypischen Retinakultur von Wt Mäusen liegt zwischen Werten von $1,99 \pm 0,43$ an Tag 2 und $-0,11 \pm 1,20$ an Tag 6 und unterscheidet sich damit kaum und ohne statistische Signifikanz von der Situation frisch entnommener Retinae (Abbildung 22B).

Die Transkription von *Brca1* wurde lediglich in dem Zeitraum von Tag 0 bis Tag 4 bestimmt (Abbildung 22C). Die Ergebnisse weisen auf eine Abnahme der Transkriptionsrate während der Retinakultur hin, jedoch ohne statistische Signifikanz. An Tag 1 der Kultur war ein Maximum von $1,42 \pm 0,20$ messbar, an Tag 4 nur noch ein Wert von $-2,05 \pm 0,00$.

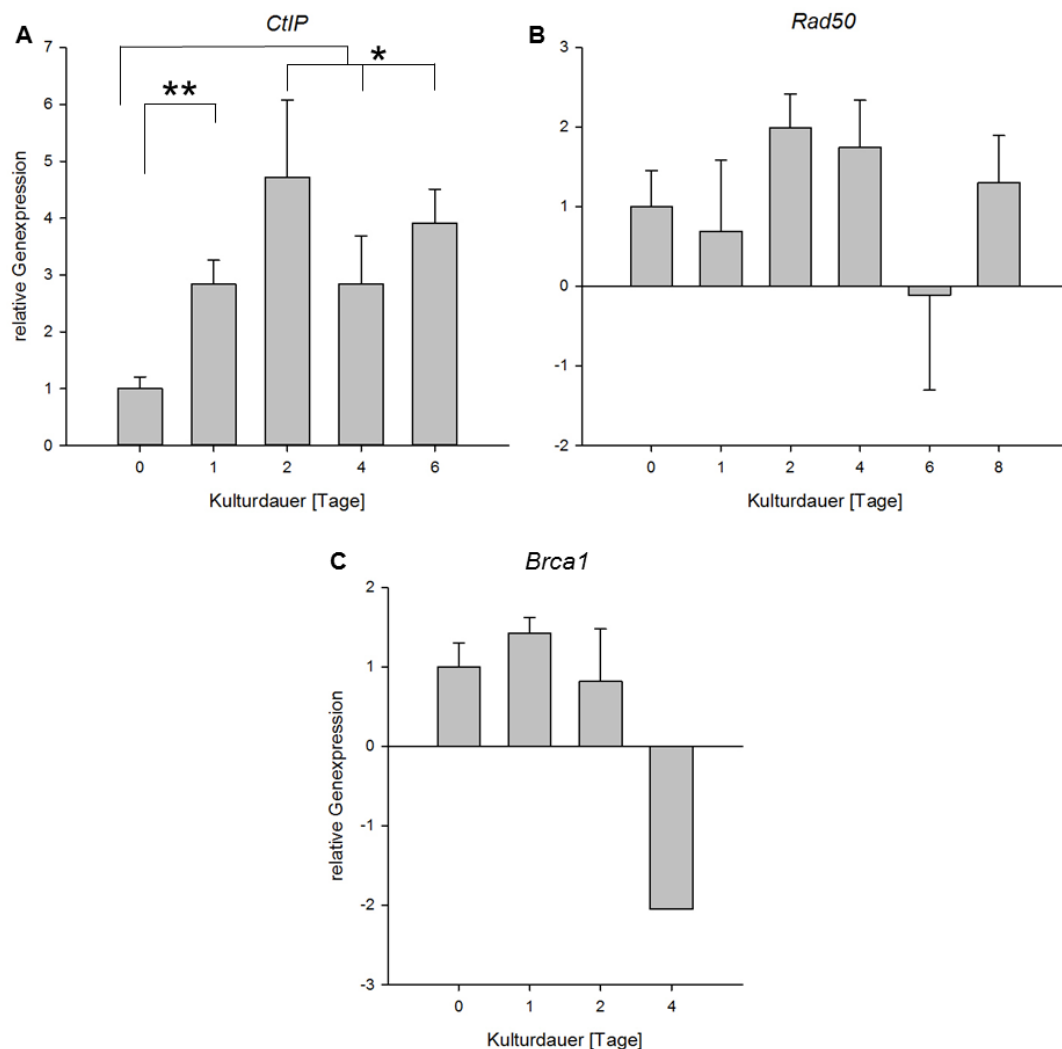


Abbildung 22: Quantifizierung von HDR in der organotypischen Retinakultur von Wildtypmäusen. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *Gapdh*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (n=3) und dazugehöriger SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (ANOVA).

3. NHEJ und HDR in murinen Organen

Um die Stärke der Expression der verschiedenen Gene der DNA-DSB-Reparaturwege in der Retina in größerem Zusammenhang einordnen zu können, wurde auch RNA aus anderen murinen Organen gewonnen. So wurde ein anschließender Vergleich mit der Retina ermöglicht. Dazu wurde RNA aus Gehirn, Leber, Lunge, Niere, Herz, Hoden und Muskeln von Wt Mäusen isoliert. Es wurden etwa 100 mg Gewebe abgewogen, mittels RNeasy lysis lysiert und anschließend mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen die Gesamt-RNA isoliert. Nach reverser Transkriptase PCR konnte die cDNA für qPCR Experimente eingesetzt werden.

3.1 NHEJ

Auch für diese Untersuchungen wurde die Expression von *Ku80*, *DNA-PKcs* und *53bp1*, zentraler Gene im NHEJ Reparaturweg, mittels qPCR bestimmt. Zur Auswertung der Daten wurden alle Gewebe auf die Messwerte der Retina normiert, sodass die Retina dem Wert 1 entspricht. Es wird deutlich, dass es durchaus große Unterschiede zwischen den Organen gibt. Während in Hoden und Lunge die relative Expression der drei Gene für den NHEJ Reparaturweg deutlich höher ist, als in der Retina, ist dagegen die relative Expression im Muskel bei allen drei Genen niedriger.

Betrachtet man die Daten weiter im Detail, so lässt sich festhalten, dass *53BP1* im Hoden die höchste relative Expression zeigt, mit einem Wert von $20,74 \pm 3,74$, gefolgt von der Lunge ($5,74 \pm 1,08$) (Abbildung 23A). Im Muskel wurde der niedrigste Wert mit $18,02 \pm 0,42$ gemessen. Damit unterscheiden sich diese drei Gewebe in der Expression von *53bp1* signifikant ($p < 0,05$) von der Retina. Bezogen auf dieses Gen unterscheiden sich Niere, Gehirn, Leber und Herz nur geringfügig von der Retina.

Die Expression von *Ku80* ist ebenfalls im Hoden ($17,95 \pm 3,19$) und in der Lunge ($13,82 \pm 2,34$) signifikant höher ($p < 0,05$) als in der Retina (Abbildung 23B). Alle weiteren Gewebe unterscheiden sich nur wenig in der Expression.

Für das Gen *DNA-PKcs* konnte die höchste relative Expression in der Lunge ($13,38 \pm 0,28$) und im Hoden ($7,10 \pm 1,04$) gemessen werden (Abbildung 23C). Diese Gewebe unterscheiden sich mit hoher Signifikanz ($p < 0,001$) von der Retina. Dies trifft auch auf den Muskel ($-6,31 \pm 1,06$) zu, der jedoch eine deutlich niedriger Expression von *DNA-PKcs* aufweist. Weiterhin zeigen auch Leber ($-1,30 \pm 0,15$) und Herz ($-1,68 \pm 0,56$) eine signifikant niedrigere ($p < 0,05$) Expression des Gens, verglichen mit der Retina.

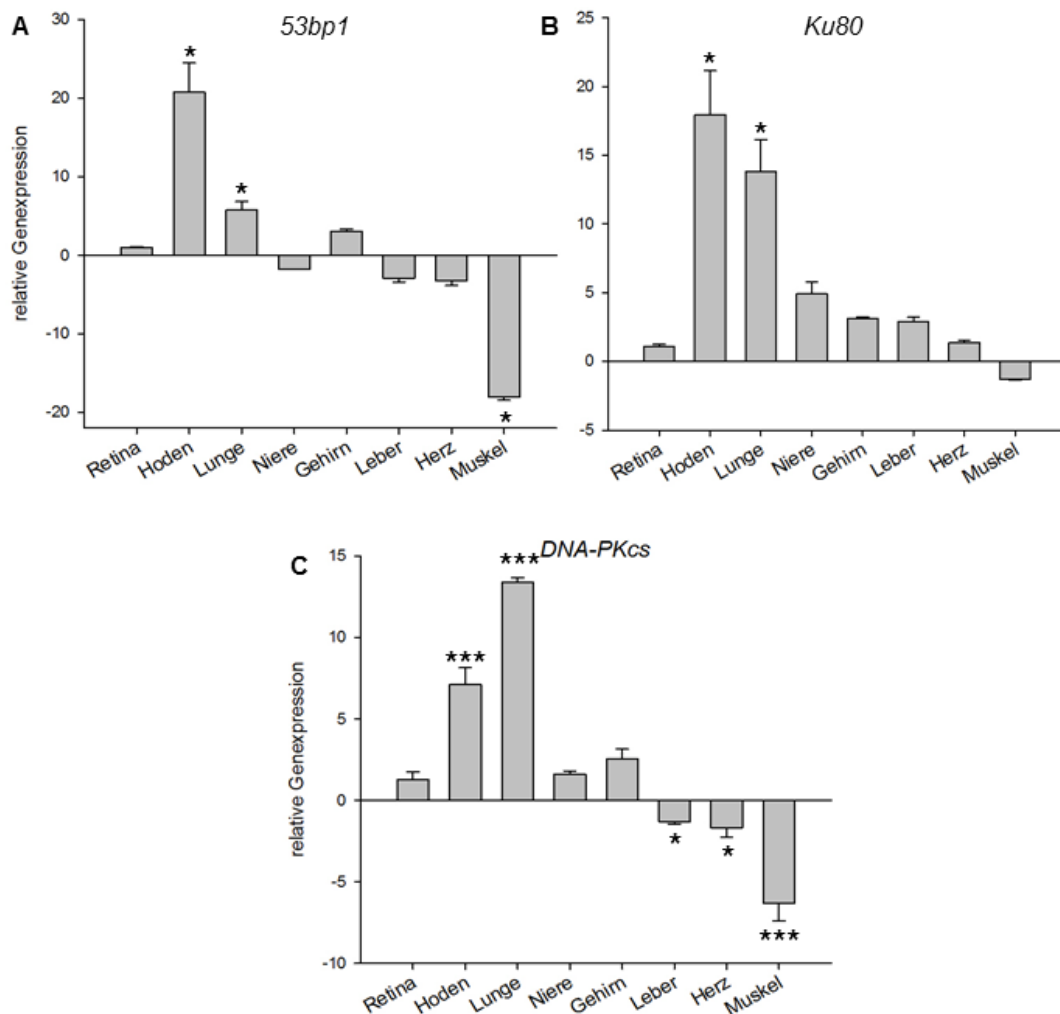


Abbildung 23: NHEJ in murinen Geweben von Wildtyp-Tieren. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *Gapdh*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=3$) und dazugehöriger SEM. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ (ANOVA).

3.2 HDR

Auch die Aktivität des HDR Reparaturwegs sollte in den murinen Geweben bestimmt werden. Dazu wurden ebenfalls die Expression der Gene *Rad50*, *Brcal* und *CtIP* mittels qPCR gemessen. Es wurde genau vorgegangen wie für den NHEJ Reparaturweg bereits beschrieben. So zeigte sich auch bei den Genen für HDR, genau wie für die Gene von NHEJ, dass Hoden und Lunge die höchste Expression und der Muskel die niedrigste Expression, verglichen mit der Retina, aufweisen.

Bei näherer Betrachtung der Datenlänge findet man eine signifikant hohe ($p < 0,05$) Expression von *CtIP* im Hoden ($98,59 \pm 6,21$) und eine ebenfalls erhöhte Expression in der Lunge ($31,11 \pm 2,54$) (Abbildung 24A). Die anderen Gewebe unterscheiden sich lediglich in geringem Maß und ohne statistische Signifikanz von der Expression dieses Gens von der Retina.

Bei dem Gen *Rad50* ist die Expression in Lunge ($58,87 \pm 12,17$) und Hoden ($30,41 \pm 3,89$) ebenfalls signifikant ($p < 0,01$) höher als in der Retina (Abbildung 24B). Alle weiteren Gewebe unterscheiden sich nur wenig in der Expression.

Die Retina unterscheidet sich am häufigsten in der Expression von *Brca1* von den anderen Geweben (Abbildung 24C). Hier zeigt sich für Muskel ($-146,60 \pm 28,52$), Herz ($-19,63 \pm 2,97$), Leber ($-13,62 \pm 4,58$), Gehirn ($-6,28 \pm 1,43$) und Niere ($-6,90 \pm 1,93$) eine niedrigere Expression, die statistisch signifikant ($p < 0,01$) ist. Zudem zeigt der Hoden ($28,15 \pm 2,66$) erneut eine signifikant ($p < 0,01$) höhere Expression dieses Gens, als die Retina.

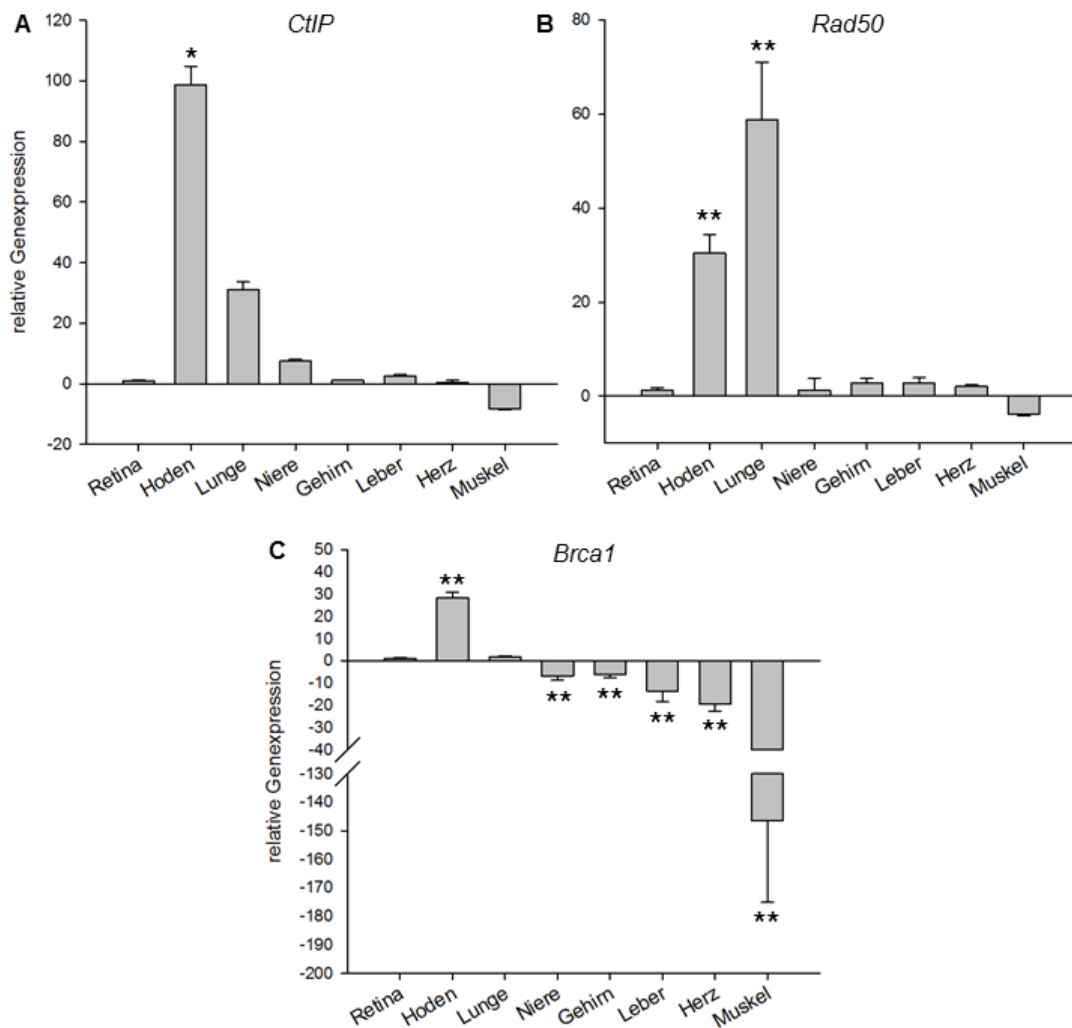


Abbildung 24: HDR in murinen Geweben von Wildtyp-Tieren. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *Gapdh*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=3$) und dazugehöriger SEM. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ (ANOVA).

4. DNA-Reparatur in mitotischen Zellkultursystemen

Der Großteil der Untersuchungen zum Vorhandensein von NHEJ- oder HDR-Faktoren fand bei vergangenen Studien im Zellkultursystem statt. Diese Zellen sind mitotisch und damit möglicherweise weit von der tatsächlichen Situation *in vivo* entfernt. Um dies zu überprüfen, wurde die Transkription der zuvor beschriebenen Gene im Zellkultursystem getestet.

4.1 Murine Muskelfaserzellen

An dieser Stelle wurden C2C12 Zellen genutzt, eine murine Muskelfaserzelllinie, die sich durch rasche Proliferation auszeichnet. Betrachtet man die Transkriptionsrate der Gene für die DNA-Reparaturproteine in den C2C12 Zellen, so fällt auf, dass alle untersuchten Gene für den HDR Reparaturweg statistisch signifikant ($p < 0,05$) höher exprimiert werden, als in der murinen Retina (Abbildung 25). Die höchste Expression findet sich bei dem Gen *CtIP* ($12,42 \pm 0,50$), gefolgt von *Rad50* ($8,53 \pm 0,87$) und *Bra1* ($5,84 \pm 0,86$). Bei den Genen für den NHEJ Reparaturweg sieht die Situation anders aus. Die C2C12 Zellen unterscheiden sich in der Expression von *Ku80* ($1,05 \pm 1,18$) nicht von der Retina, wohingegen *53bp1* ($-5,31 \pm 0,86$) und *DNA-PKcs* ($-4,16 \pm 0,47$) in den C2C12 Zellen geringer exprimiert werden.

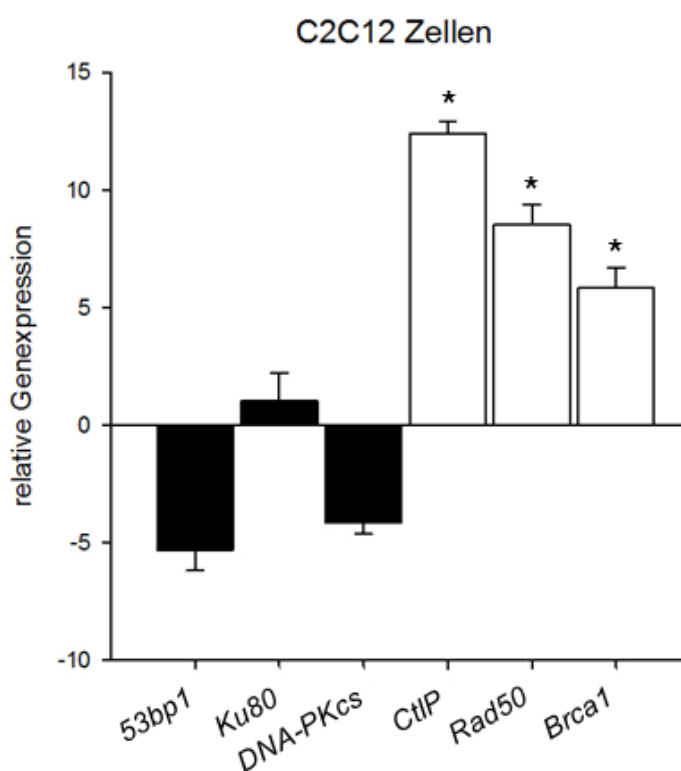


Abbildung 25: DNA-Reparatur in mitotischen C2C12 Zellen. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *Gapdh*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=3$) und dazugehöriger SEM. * $p < 0,05$ (t-test). Schwarz: NHEJ Gene. Weiß: HDR Gene.

4.2 Humane Zellkultursysteme

Ziel der gesamten Untersuchungen ist es, eine Therapie von Netzhautdystrophien zu entwickeln, die zunächst an der Maus getestet wird, jedoch schließlich ihre Anwendung im humanen Auge findet. Dazu wurden ebenfalls verschiedene humane Zellen genutzt und die Expression spezifischer DNA-Reparaturgene semiquantitativ bestimmt. Nach PCR mit 30 Zyklen wurden die DNA-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen und die Schwarzfärbung nach Ethidiumbromidfärbung mittels des Programms Fiji quantifiziert. Die reduzierte Anzahl an Zyklen sollte sicherstellen, dass sich die Amplifikation in der exponentiellen Phase befindet.

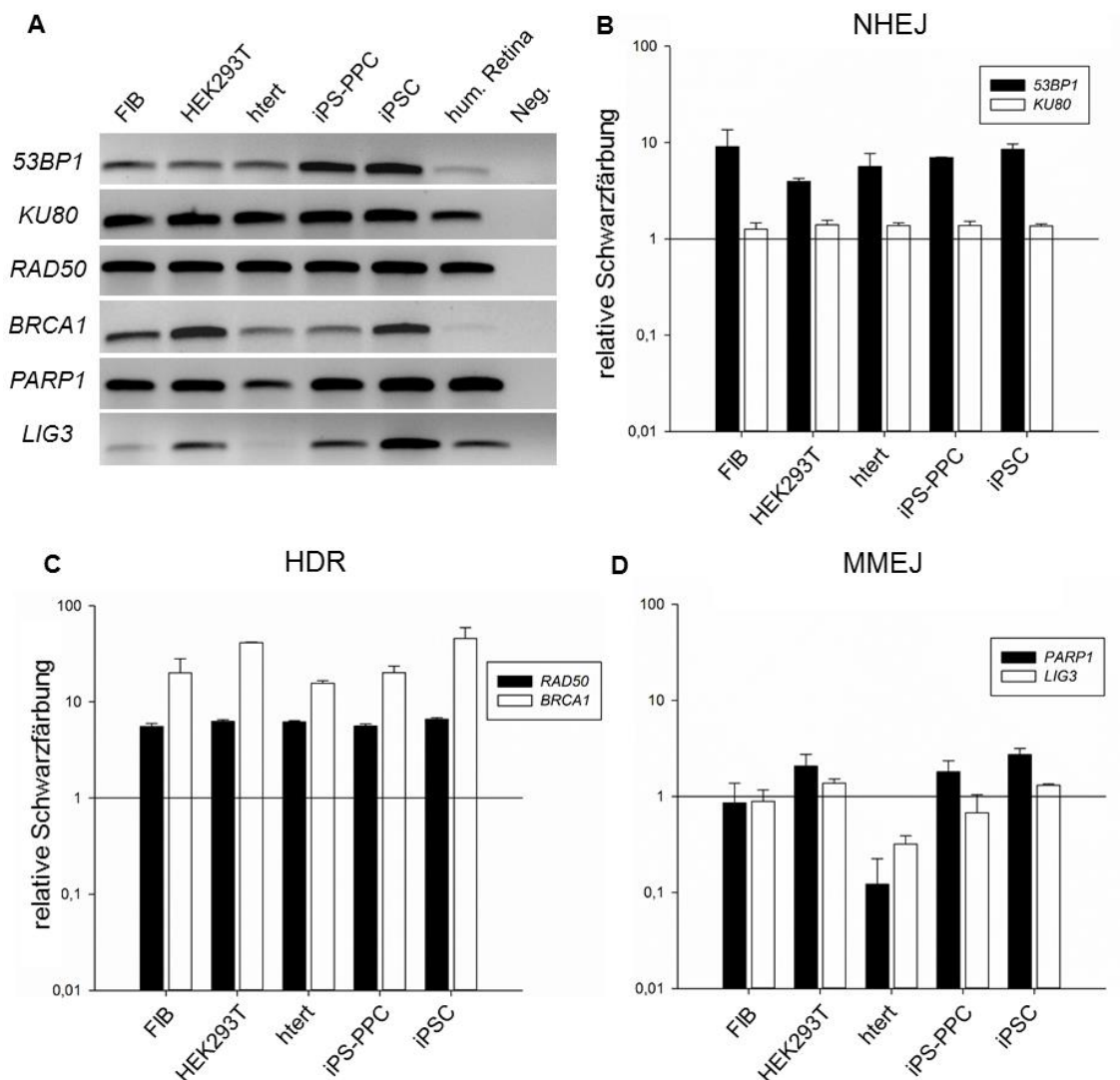


Abbildung 26: DNA-Reparatur in mitotischen humanen Zellen. **A:** Agarose Gelbilder nach PCR mit humanen Primern. Neg.: Negativkontrolle. **B-D:** Darstellung der Genexpression nach semiquantitativer Analyse mittels Fiji, bezogen auf das Referenzgen *GAPDH*. Normalisiert auf humane Retina. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=2$) und dazugehöriger SEM. Keine statistische Auswertung aufgrund geringer Stichprobenanzahl.

Hierzu wurden jeweils zwei Gene pro DNA-Reparaturweg untersucht, inklusive MMEJ. Für die Untersuchungen wurden folgende Zellen genutzt: humane embryonische Nieren Zellen (HEK293T), Fibroblasten (FIB), immortalisierte RPE Zellen (htert), induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC) und Photorezeptor-ähnliche iPS (iPS-PPC). Die Ergebnisse wurde auf die Expression humaner Retina (Human Retina QUICK-Clone™ cDNA, Takara) normalisiert, die somit dem Wert 1 entspricht.

Betrachtet man die Ergebnisse für den NHEJ Reparaturweg, so zeigt sich, dass *KU80* in allen untersuchten mitotischen humanen Zellen genauso stark transkribiert wird, wie in der postmitotischen humanen Retina. Die Transkriptionsraten von *53BP1* sind dagegen in allen mitotischen Zellen höher, als in der Retina. So findet man die höchste Rate bei den Fibroblasten ($9,07 \pm 4,53$), gefolgt von den iPSC ($8,47 \pm 1,22$) und iPS-PPC ($7,01 \pm 0,01$).

Die Gene der HDR Reparaturfaktoren sind dagegen in allen mitotischen Zellen deutlich höher exprimiert, als in der Retina. *RAD50* liegt hier bei Werten zwischen $5,57 \pm 0,31$ für die iPS-PPC und $6,58 \pm 0,28$ für die iPSC. *BRCA1* erreicht sogar deutlich höhere Werte. Diese liegen bei einem Maximum von $45,66 \pm 13,46$ für die iPSC, gefolgt von den HEK293T Zellen ($41,24 \pm 0,63$).

Für den MMEJ Reparaturweg ist es sogar der Fall, dass die Transkriptionsrate der Gene in manchen mitotischen Zellen deutlich niedriger ist, als in der postmitotischen Retina. *PARP1* wird in FIB ($0,86 \pm 0,51$), aber am deutlichsten in htert Zellen ($0,12 \pm 0,10$) wesentlich geringer exprimiert, als in der Retina. Dagegen ist es in HEK293T ($2,07 \pm 0,68$), iPS-PPC ($1,81 \pm 0,55$) und iPSC ($2,73 \pm 0,43$) geringfügig stärker exprimiert. Für *LIG3* zeigt sich ein ähnliches Bild. Dieses Gen ist ebenfalls in FIB ($0,89 \pm 0,28$), htert ($0,32 \pm 0,07$) und iPS-PPC ($0,67 \pm 0,37$) niedriger exprimiert und lediglich HEK293T ($1,38 \pm 0,14$) und iPSC ($1,31 \pm 0,04$) zeigen eine geringfügig höhere Expression.

5. Genexpression im *Rpgr* Mausmodell

Im weiteren Verlauf wurde die Expression der Gene für die DNA-Reparaturproteine ebenfalls im *Rpgr* Mausmodell getestet. Dieses Mausmodell soll in künftigen Studien als Krankheitsmodell für die X-chromosomale Retinitis Pigmentosa dienen, um mögliche Therapien daran zu testen. Deshalb ist es wichtig, die Expression der entsprechenden Gene vor Anwendung der Therapie zu überprüfen und die Mauslinie weiter zu charakterisieren. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Altersstufen der Tiere untersucht: drei und neun Monate alte Tiere, da die Auswirkungen der Mutation dieser Tiere ab einem Alter von neun Monaten signifikante Level erreicht.

5.1 Rhodopsin-Expression und Glia-Marker

Zunächst wurden die frisch entnommenen und kultivierten Retinae auf die Expression der Rhodopsin- und Glia-spezifischen Gene untersucht, um den allgemeinen Zustand der Retinae zu charakterisieren.

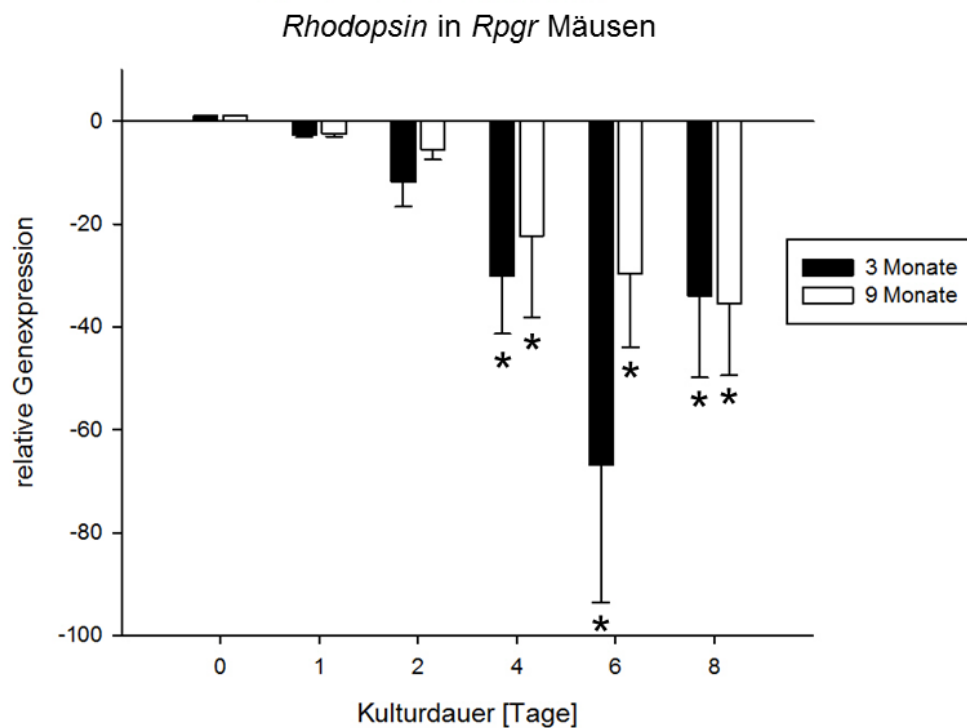


Abbildung 27: Verminderte Rhodopsinexpression in der organotypischen Retinakultur von *Rpgr* Mäusen. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *Gapdh*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=3$) und dazugehöriger SEM. * $p < 0,05$ (Dunnnett's Method).

Dabei ist erneut eine starke Abnahme der Expression des *Rhodopsin*-Gens, ab dem Zeitpunkt der Kultivierung, erkennbar, ähnlich wie bei den *Wt* Mäusen bereits beschrieben (Abbildung 27). Dies trifft sowohl auf die 3 Monate alten, als auch auf die neun Monate alten *Rpgr* Mäuse zu. Bei den jüngeren Tieren ist ab Tag 4 ($-30,03 \pm 11,33$) der Kultur eine statistisch signifikante Abnahme im Vergleich zu frisch entnommenen Retinae ($1,00 \pm 0,02$) erkennbar,

die auch an Tag 6 ($-66,75 \pm 26,73$) und Tag 8 ($-33,90 \pm 15,99$) signifikant bleibt. Ein ähnliches Bild zeigt sich für die neun Monate alten Tiere, bei denen die Expression an Tag 4 bei $-22,29 \pm 15,80$ liegt, an Tag 6 auf $-29,71 \pm 14,29$ absinkt und ihr Minimum an Tag 8 ($-35,49 \pm 13,88$) erreicht. Diese Abnahme ist ebenfalls statistisch signifikant.

Die Messungen der Transkription des Mikroglia Markers *Aif1* zeigt zunächst einen Anstieg der Expression über die Dauer der Kultur, der bei den 3 Monate alten *Rpgr* Tieren bereits an Tag 2 ($45,56 \pm 18,33$) und bei den neun Monate alten Tieren an Tag 4 ($49,24 \pm 42,13$) sein Maximum findet und anschließend auf Werte von $4,49 \pm 2,45$ und $7,15 \pm 4,95$ an Tag 8 wieder abfällt (Abbildung 28A).

Ein statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg in der Expression des Makroglia Markers *Gfap* war bei 3 Monate alten *Rpgr* Tieren ab Tag 4 ($50,06 \pm 29,79$) der Kultur, im Vergleich zu frisch entnommenen Retinae, messbar (Abbildung 28B). Das Maximum wurde an Tag 8 ($54,42 \pm 27,40$) erreicht. Ein ähnlicher Trend war bei den neun Monate alten Tieren messbar, jedoch ohne statistische Signifikanzen. Hier erreichte die Expression ebenfalls das Maximum an Tag 8 ($43,54 \pm 18,89$).

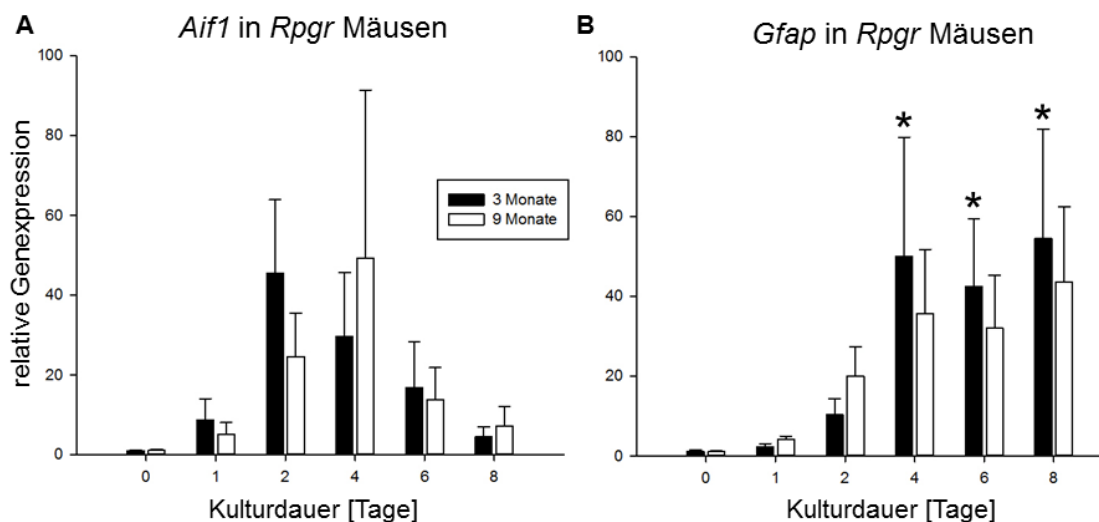


Abbildung 28: Zunehmende Genexpression der Gliazellen-spezifischen Gene *Aif1* (A) und *Gfap* (B) in der organotypischen Retinakultur von *Rpgr* Mäusen. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *Gapdh*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=3$) und dazugehöriger SEM. * $p < 0,05$ (Dunnett's Method).

5.2 NHEJ

Zur Messung von NHEJ wurden die gleichen drei Gene untersucht, wie bereits bei den *Wt* Mäusen beschrieben. Es wurden auch wieder zwei Altersgruppen unterschieden, drei und neun Monate alte *Rpgr* Tiere. Betrachtet man zunächst die Expression des Gens *53bp1* so fällt auf, dass sie an Tag 1 der Kultur zunächst ansteigt und dann stetig abnimmt (Abbildung 29A). So erreicht sie bei 3 Monate alten Tieren an Tag 1 ein Maximum von $1,86 \pm 0,20$ und

bei neun Monate alten Tieren von $2,66 \pm 0,09$. Ab Tag 4 der Kultur werden nur noch geringere Mengen an *53bp1* transkribiert, verglichen mit frisch isolierten Retinae.

Ku80 weist für beide Altersgruppen der *Rpgr* Mäuse und alle Kulturzeiträume eine stabile Expression auf, die sich zwischen $0,75 \pm 0,22$ und $1,97 \pm 0,39$ bewegt (Abbildung 29B) und damit kaum von der Situation in frisch entnommenen Retinae unterscheidet.

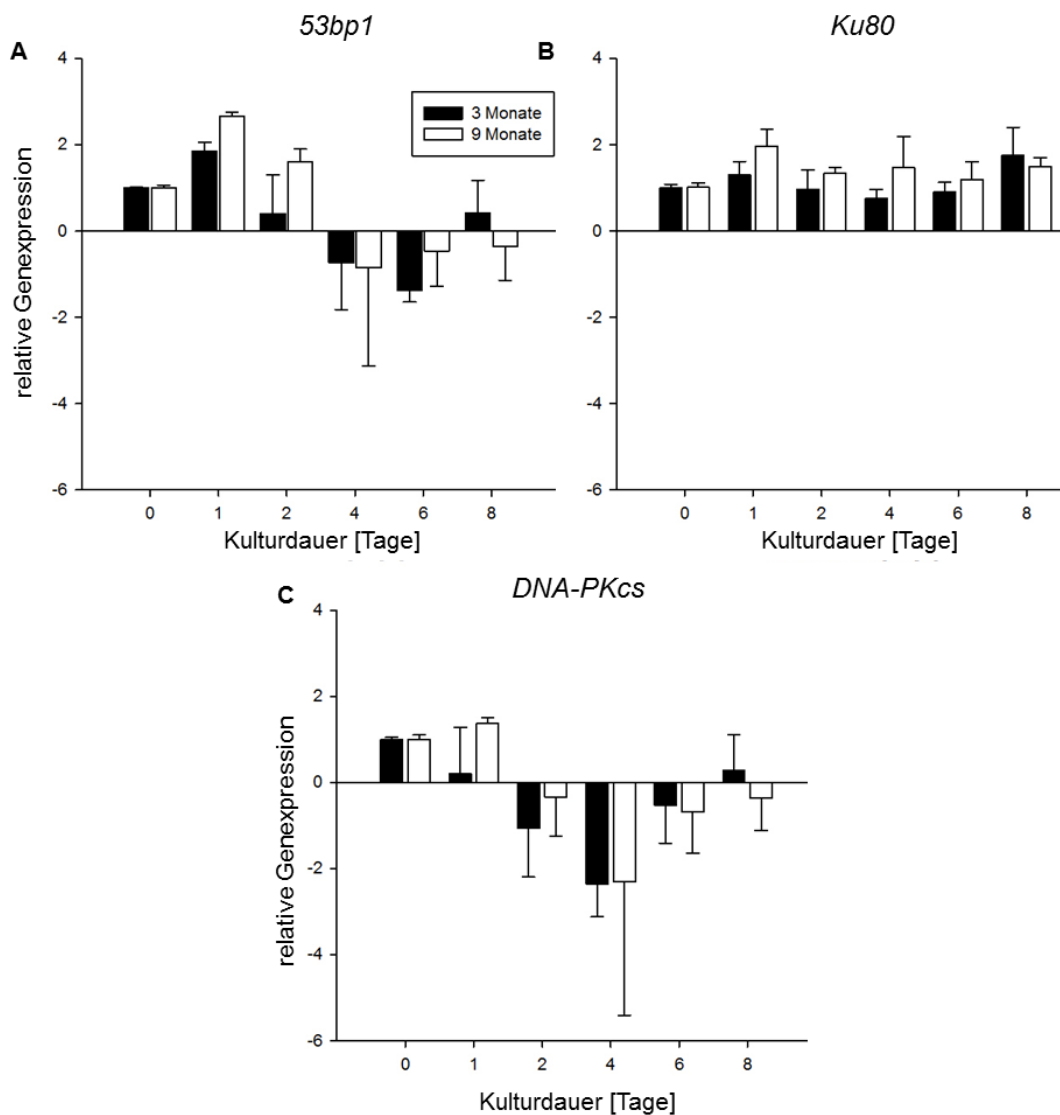


Abbildung 29: Quantifizierung von NHEJ in der organotypischen Retinakultur von *Rpgr* Mäusen. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *Gapdh*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=3$) und dazugehöriger SEM.

Die Expression von *DNA-PKcs* ist dagegen größeren Schwankungen unterlegen, was sowohl die einzelnen Messzeitpunkte, als auch die einzelnen Messzeitpunkte betrifft und damit die hohe Standardabweichung erklärt (Abbildung 29C). Für die drei Monate alten *Rpgr* Tiere war zu allen Kulturzeitpunkten eine geringe Transkription messbar, verglichen mit frisch isolierten Retinae, die ihr Minimum an Tag 4 fand ($-2,35 \pm 0,77$). Bei den neun Monate alten

Tieren war die Expression ab Tag 2 der Kultur niedriger, ebenfalls mit einem Minimum an Tag 4 ($-2,31 \pm 3,10$).

5.3 HDR

Auch für den HDR Reparaturweg wurden die gleichen drei Gene, wie bei den *Wt* Mäusen, untersucht. Für das Gen *CtIP* ist bei beiden untersuchten Altersgruppen der *Rpgr* Tiere ein Anstieg in der Expression über die Dauer der Kultur messbar. Bei den drei Monate alten Tieren ist bereits der Anstieg von frisch entnommenen Retinae ($1,00 \pm 0,13$) zu Tag 1 ($2,71 \pm 0,49$) der Kultur statistisch signifikant ($p < 0,05$) und findet sein Maximum an Tag 8 ($5,43 \pm 1,80$). Dies trifft auch auf die neun Monate alten Tiere zu, wobei der Anstieg an Tag 1 ($3,85 \pm 0,17$) hoch signifikant ($p < 0,001$) ist und das Maximum bereits an Tag 6 ($5,18 \pm 1,37$) erreicht ist.

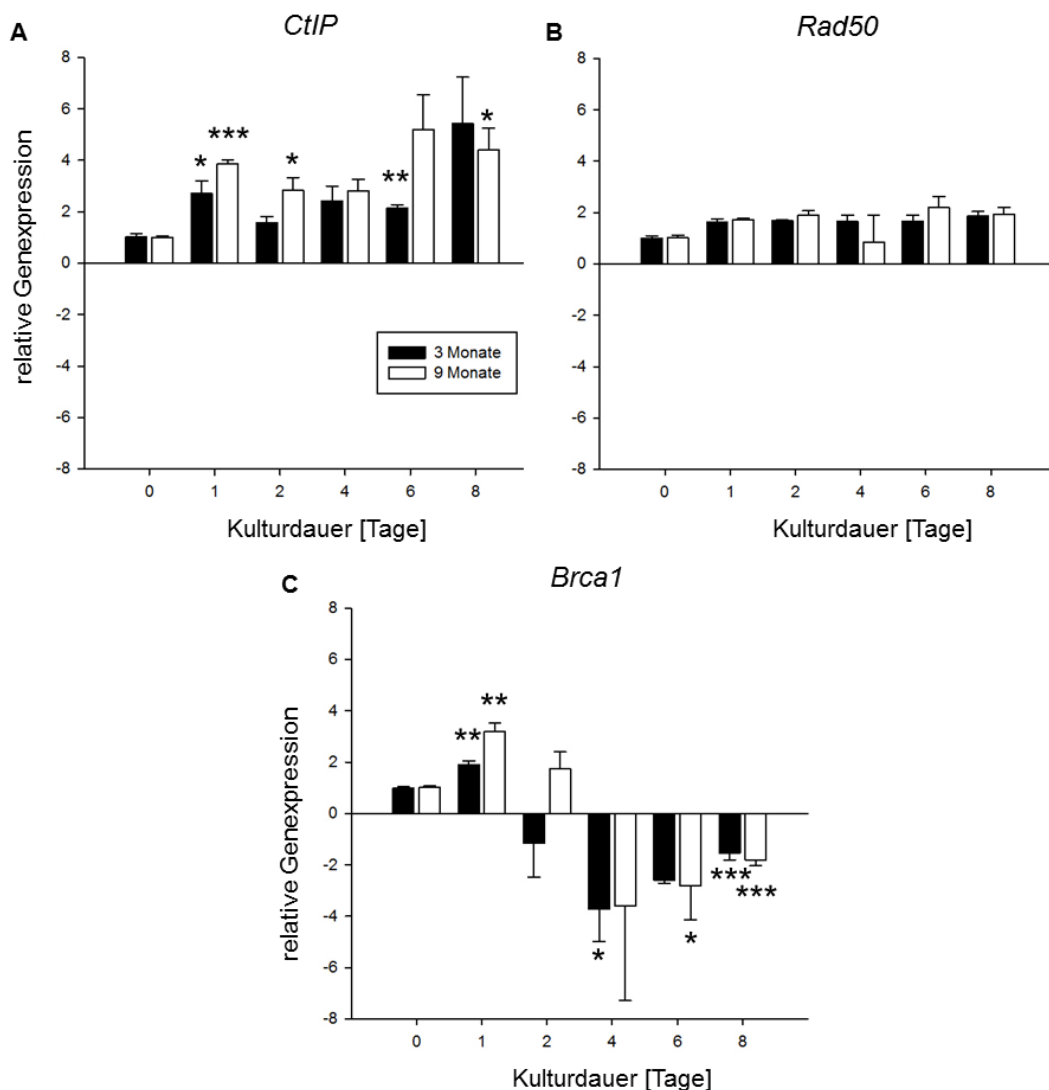


Abbildung 30: Quantifizierung von HDR in der organotypischen Retinakultur von *Rpgr* Mäusen. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *Gapdh*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=3$) und dazugehöriger SEM. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$ (ANOVA).

Die Expression des Gens *Rad50* bleibt über die Dauer der Kultur stabil und verändert sich nicht, im Vergleich zu frisch entnommenen Retinae. Das trifft sowohl auf die drei Monate alten, als auch auf die neun Monate alten Tiere zu.

Betrachtet man die Transkription des Gens *Bra1*, so fällt auf, dass es zunächst zu einem signifikanten ($p < 0,01$) Anstieg, im Vergleich zu Tag 0, kommt. Die Werte liegen an Tag 1 bei den jüngeren Tieren bei $1,89 \pm 0,04$ und bei den älteren Tieren bei $3,19 \pm 0,33$. Anschließend nimmt die Transkription jedoch wieder ab und findet ihr Minimum an Tag 4 ($-3,73 \pm 1,26$; $-3,60 \pm 3,69$). Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass die Expression sowohl für die untersuchten Gene des NHEJ Reparaturwegs, als auch der Gene von HDR, keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden unterschiedlichen hier untersuchten Altersgruppen aufweisen.

6. Genexpression im *Lbr2* Mausmodell

Da sich die Retina der nachtaktiven Maus durchaus nennenswert von der des Menschen unterscheidet, wurde nach einem Mausmodell gesucht, was der Situation im menschlichen Auge näher ist. So kam es zur Nutzung der *Lbr2* Maus. Diese Mauslinie verfügt in etwa 30-50% ihrer Stäbchenphotorezeptoren über die konventionelle und damit dem Menschen gleiche Chromatinstruktur

6.1 Charakterisierung der Retina der *Lbr2* Maus

Auch bei dieser Mauslinie wurde zunächst die organotypische Retinakultur auf Genexpressionsebene näher charakterisiert. Dazu wurde unter anderem die *Rhodopsin*-Expression über die Dauer der Kultur von acht Tagen bestimmt. Wie bereits bei den anderen beiden Mauslinien zeigt sich auch hier eine drastische und statistisch signifikante ($p < 0,05$) Abnahme der Expression, die ihr Minimum an Tag 6 ($-19,85 \pm 0,62$) findet und an Tag 8 bei $-13,68 \pm 3,85$ liegt.

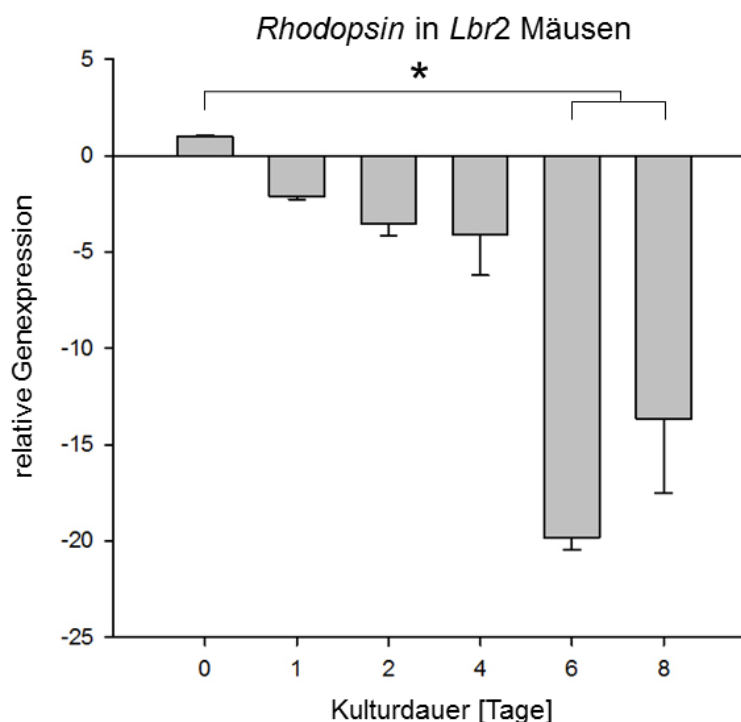


Abbildung 31: Verminderte Rhodopsinexpression in der organotypischen Retinakultur von *Lbr2* Mäusen. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *Gapdh*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=3$) und dazugehöriger SEM. * $p < 0,05$ (Dunnnett's Method).

Als nächstes wurde ebenfalls die Expression der Mikro- und Astroglia Marker *Aif1* und *Gfap* bestimmt. Hier zeigt sich ein anderes Bild, als bei der Wt Maus. Zunächst kommt es zu einem Anstieg in der Expression der Mikroglia, die ihr Maximum an Tag 6 ($11,25 \pm 8,33$) hat und an Tag 8 wieder auf $1,70 \pm 0,36$ absinkt. Die Expression von *Gfap* weist eine Zunahme

über die Dauer der Kultur, mit einem Maximum an Tag 8 ($6,27 \pm 2,19$), jedoch ohne statistische Signifikanz, auf.

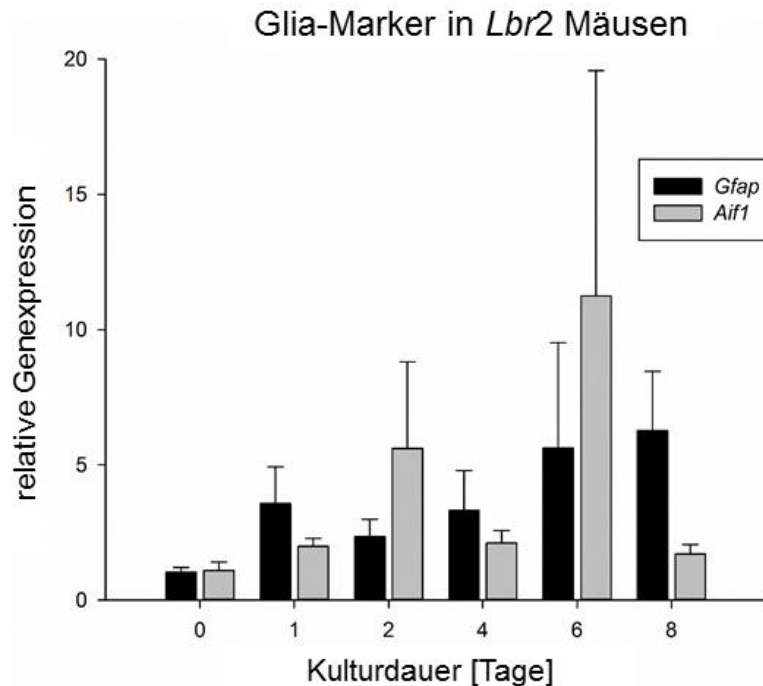


Abbildung 32: Zunehmende Genexpression der Gliazellen-spezifischen Gene *Aif1* und *Gfap* in der organotypischen Retinakultur von *Lbr2* Mäusen. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *Gapdh*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=3$) und dazugehöriger SEM.

6.2 DNA-Reparatur in der Retina der *Lbr2* Maus

Nun sollte auch die Expression der DNA-Reparatur spezifischen Gene untersucht werden. Betrachtet man zunächst die Ergebnisse für den NHEJ Reparaturweg, so fällt auf, dass alle drei Gene einen leichten Anstieg in der Expression über die Dauer der organotypischen Retinakultur aufweisen. Dieser Anstieg ist bei dem Gen *53bp1* von Tag 0 ($1,00 \pm 0,09$) zu Tag 1 ($2,66 \pm 0,24$) und Tag 2 ($3,05 \pm 0,54$) der Retinakultur statistisch signifikant und bleibt an den weiteren Tagen weitestgehend stabil.

Die Untersuchungen des Gens *Ku80* zeigen eine stabile Expression zwischen einem Minimum von $1,51 \pm 0,19$ an Tag 4 und einem Maximum von $2,06 \pm 0,10$ an Tag 1. Ähnlich sieht es für das Gen *DNA-PKcs* aus, wobei hier die Werte der Transkription zwischen $1,20 \pm 0,34$ an Tag 6 und $2,33 \pm 0,58$ an Tag 1 liegen und sich damit kaum von den frisch entnommenen Retinae unterscheiden.

Anschließend wurde auch die Expression der HDR spezifischen Gene untersucht. Hier zeigte sich für das Gen *CtIP* eine Zunahme der Expression über die Dauer der Kultur von 8 Tagen, die an Tag 1 ($3,80 \pm 0,68$) und Tag 6 ($3,62 \pm 0,40$) im Vergleich zu frisch entnommenen Retinae statistisch signifikant ist. An Tag 4 erreicht die Expression ihr Maximum mit einem Wert von $8,22 \pm 3,22$.

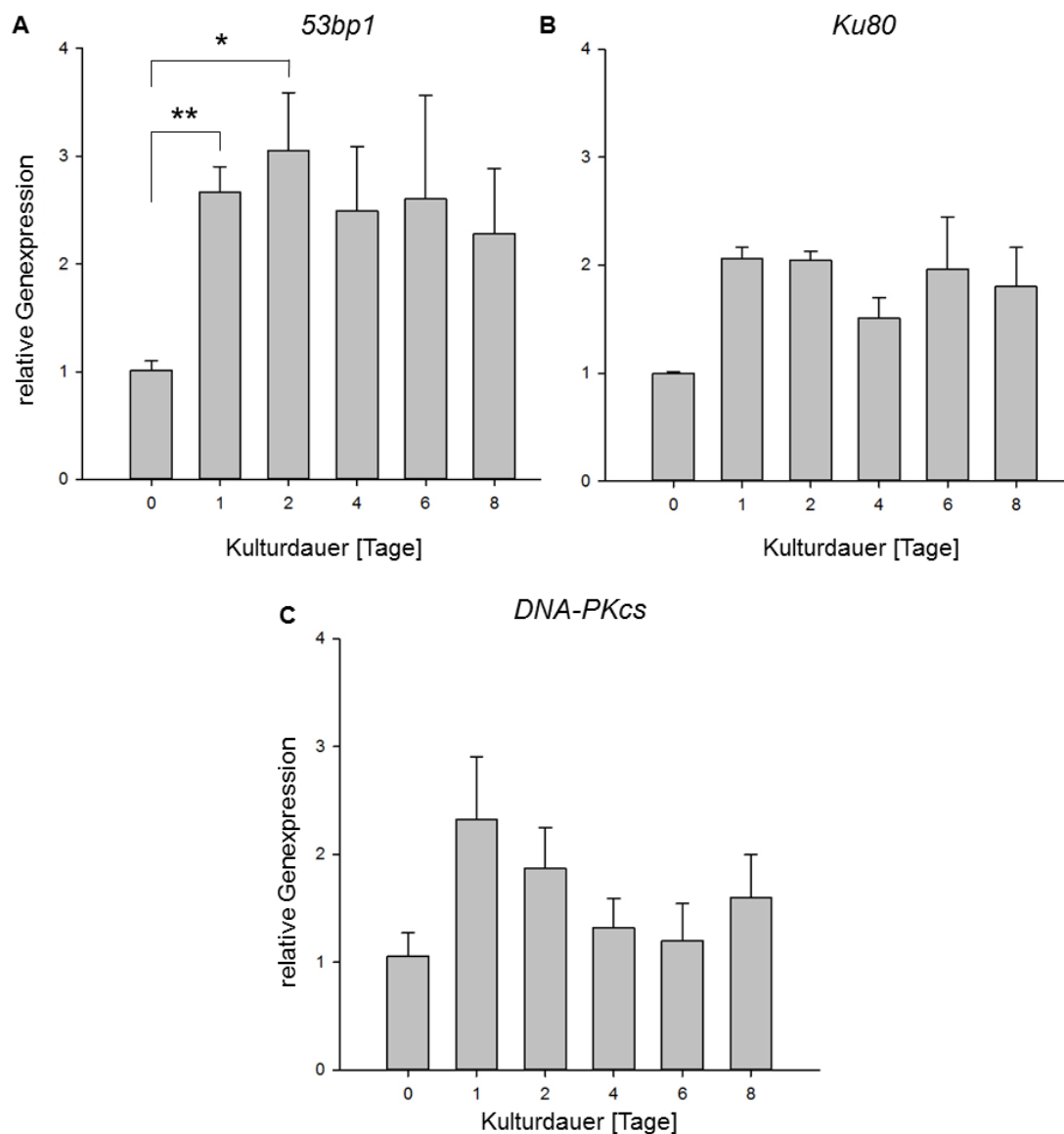


Abbildung 33: Quantifizierung von NHEJ in der organotypischen Retinakultur von *Lbr2* Mäusen. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *Gapdh*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=3$) und dazugehöriger SEM. ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$ (t-test).

Rad50 dagegen zeigt eine deutlich stabilere Expression, die ab Tag 1 der Kultur bei einem Wert von etwa 2 liegt. Dennoch ist die Expression des Gens an Tag 1 ($2,20 \pm 0,15$) und Tag 4 ($2,45 \pm 0,35$) statistisch signifikant ($p < 0,05$) höher als bei frisch isolierten Retinae.

Betrachtet man dagegen die Expression des Gens *Bra1* so zeigt sich zunächst eine signifikante ($p < 0,01$) Zunahme von Tag 0 ($1,00 \pm 0,11$) auf Tag 1 ($2,98 \pm 0,26$), die anschließend stetig abnimmt und ihr Minimum an Tag 6 ($-1,93 \pm 0,20$) erreicht.

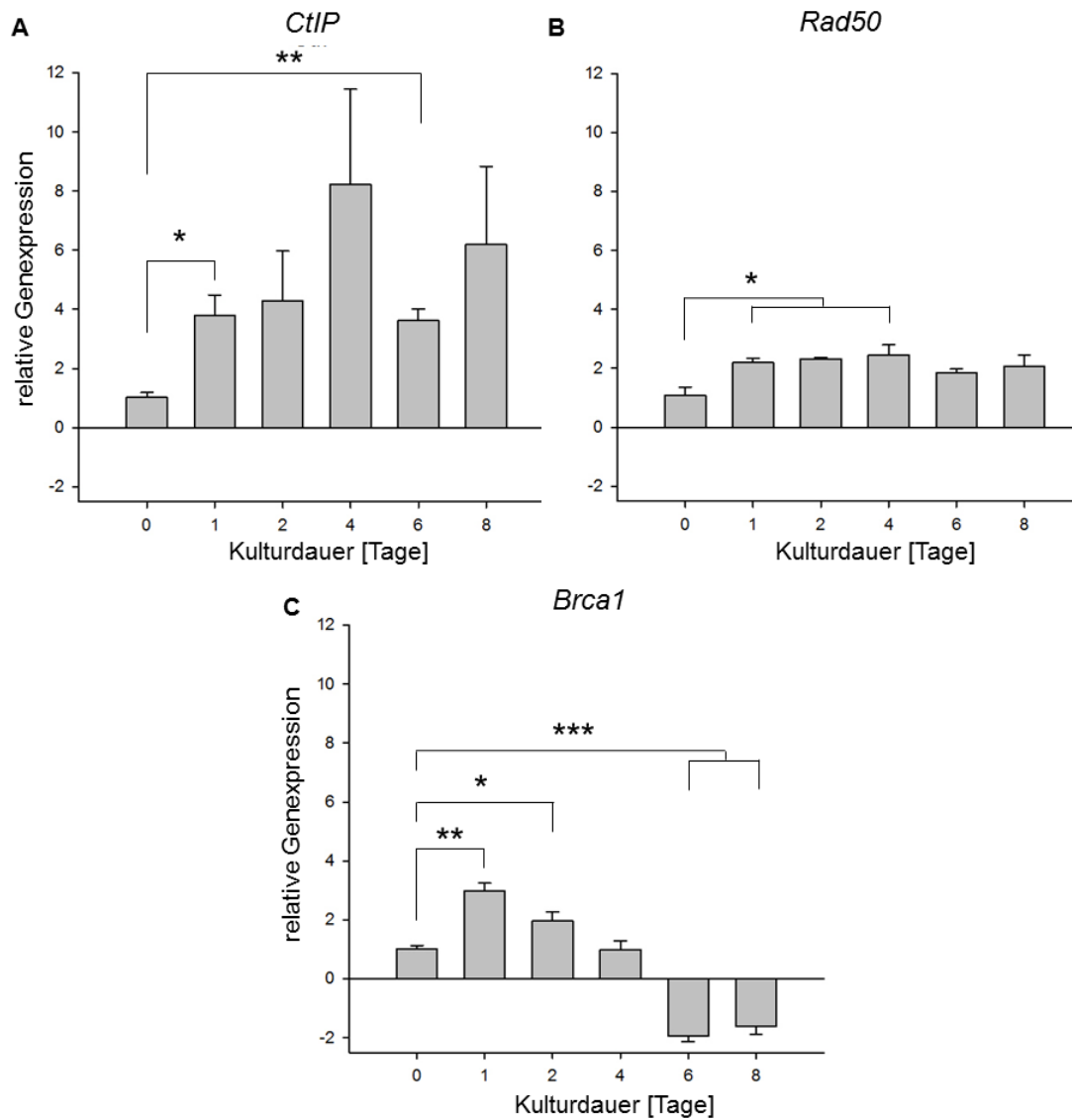


Abbildung 34: Quantifizierung von HDR in der organotypischen Retinakultur von *Lbr2* Mäusen. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *Gapdh*. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte (n=3) und dazugehöriger SEM. *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$ (t-test).

7. Vergleich der Mauslinien

Nach vorangegangener Einzelanalyse der Genexpression in den drei verschiedenen Mausmodellen, sollte nun ein direkter Vergleich der Mäuse untereinander stattfinden. Dazu wurden die zuvor dargestellten Ergebnisse in Heatmaps, die mit dem Programm Excel erstellt wurden, zusammengefasst. Dabei stellt Rot eine erhöhte, Grün eine niedrigere und Schwarz eine unveränderte Genexpression dar. So lässt sich einfach erkennen, bei welchen Genen es Gemeinsamkeiten oder Unterschiede in der Expression innerhalb der verschiedenen Mauslinien gibt. Dabei sollte hauptsächlich auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten der transgenen Mäuse zur Wt-Maus geachtet werden.

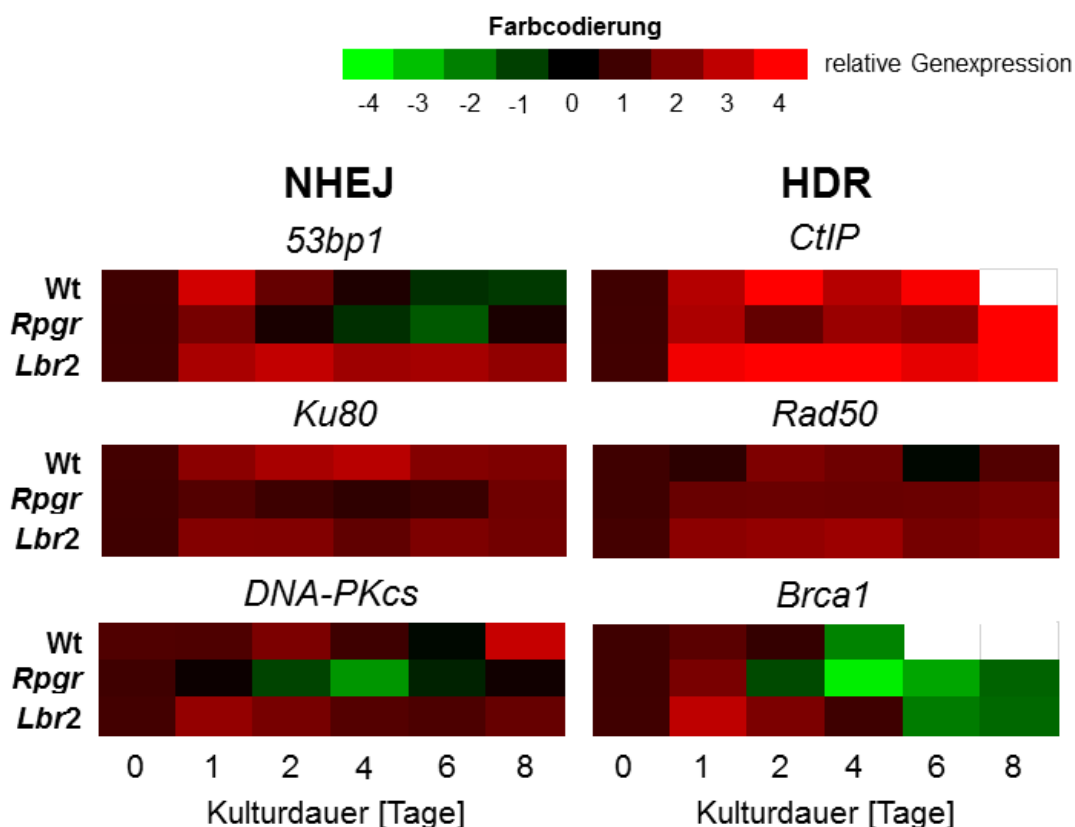


Abbildung 35: Zusammenfassung der Genexpressionsstudien von DNA-Reparaturgenen in der gesamten Retina von Wt-, *Rpgr*- und *Lbr2*-Mäusen. Die Genexpression wurde mittels qPCR bestimmt und auf *Gapdh* normalisiert. Die Farbcodierung zeigt an, ob die Expression höher (rot), gleich (schwarz) oder niedriger (grün) ist, verglichen mit frisch isolierten Retinae (Tag 0). Weiß: keine Messwerte.

Es wird deutlich, dass es bei den Genen *Ku80*, *CtIP*, *Rad50* und *Brca1* kaum Unterschiede zwischen den drei untersuchten Mauslinien gibt (Abbildung 35). Bei *Brca1* ist lediglich der Zeitpunkt, wann die Expression abnimmt, etwas verschoben. Das ist jedoch bei den beiden NHEJ Genen *53bp1* und *DNA-PKcs* anders. Hier unterscheidet sich jeweils eine Mauslinie in dem Expressionsmuster von der Wt-Maus. So kommt es bei der Wt und *Rpgr* Maus nach einer Kulturdauer von 4 bis 6 Tagen zu einer Abnahme der *53bp1* Expression, wohingegen

die Level in der *Lbr2* Maus bei einem stabilen Wert von etwa 2 bleiben. Bei den Expressionsstudien von *DNA-PKcs* fällt auf, dass es lediglich bei der *Rpgr* Maus zu einer Abnahme der Expression zwischen der Kulturdauer von 2 bis 6 Tagen kommt. Für die *Wt* und *Lbr2* Maus wurden stabilere Expressionslevel gemessen.

8. Genexpression von DNA-Reparaturproteinen in der ONL

Durch die Tatsache, dass eine Zellschicht-spezifische Lokalisationen von DNA-Reparaturproteinen bei immunhistochemischen Färbungen gefunden wurde und speziell die Kerne der Stäbchenphotorezeptoren bei der späteren Therapie als Zielzellen im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen, wurde nach einer Methode gesucht, um eine Expressionsanalyse der einzelnen retinalen Schichten zu ermöglichen. Die Lasermikrodissektion bietet die Möglichkeit diese Strategie zu verfolgen und wurde in dieser Arbeit zur Anwendung an der Retina optimiert. Dazu wurde ein Protokoll, welches bisher Anwendung an Lungengewebe findet, entsprechend modifiziert (AG Prof. Weißmann, ECCPS Gießen).

8.1 Entwicklung des LMD Protokolls

Nach mehreren Kontrollexperimenten zeigte sich eine Anzahl von 40 Gewebestücken pro Probe als geeignet, um eine ausreichende Menge RNA für die anschließende qPCR isolieren zu können. Dazu wurden Bereiche aus der ONL und der inneren Retina (INL, IPL und GCL) markiert und durch den Laser am Mikroskop ausgeschnitten (Abbildung 36).

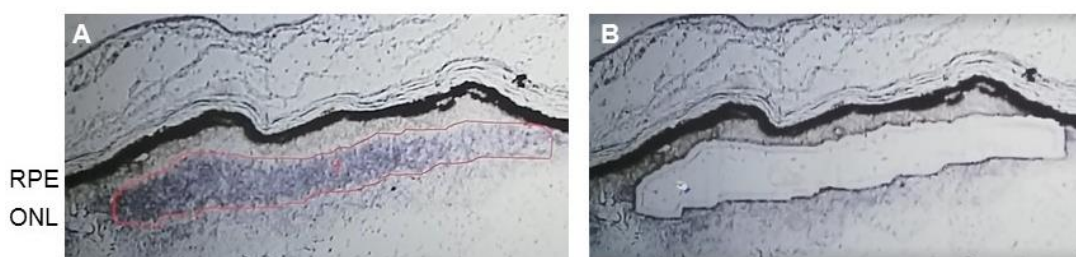


Abbildung 36: Kryoschnitte der Retina vor (A) und nach (B) Laserablation. Bei dieser Probe wurde zunächst ein Bereich der ONL ausgeschnitten. Rot: Manuelle Markierung des Bereichs, der ausgeschnitten werden soll. RPE: retinales Pigmentepithel. ONL: äußere Körnerschicht (*outer nuclear layer*).

8.2 Validierung der Zellschicht-spezifischen Marker

Um Kreuzkontaminationen der Proben der einzelnen retinalen Schichten bewerten und ausschließen zu können, wurde nach Genen gesucht, die spezifisch in der ONL und inneren Retina exprimiert werden. Für die ONL wurde Rhodopsin als geeignetes Gen identifiziert, da es mit statistischer Signifikanz ($p < 0,001$) in der ONL ($2,52 \pm 0,21$) höher exprimiert wird als in der inneren Retina ($0,02 \pm 0,01$, Abbildung 37).

Bei der inneren Retina wurden insgesamt drei verschiedene Gene in Betracht gezogen. Dazu zählt das Gen *PRKCA*, welches für die Protein Kinase C alpha ($PKC\alpha$) kodiert und in immunhistochemischen Färbungen als Marker für Stäbchen-Bipolar-Zellen gilt (Greferath et al., 1990). Weiterhin wurde das Gen *SCGN* in Erwägung gezogen, welches für das Protein Secretagoin kodiert. Dieses Calcium bindende Protein ist in dem Zytoplasma der Zapfen-Bipolar-Zellen lokalisiert (Puthussery et al., 2010). Als drittes wurde das Gen *Cbx10* als Marker für die innere Retina untersucht, da es bereits in einer anderen Arbeit Anwendung als

Marker für die INL fand (Hackler et al., 2012). Auch für diese Arbeit konnte *Chx10* als geeignetes Markergen für die innere Retina validiert werden, da es sich mit statistisch hoher Signifikanz ($p < 0,001$) von der Expression in der inneren Retina ($2,19 \pm 0,32$) von der ONL ($0,31 \pm 0,04$) unterscheidet.

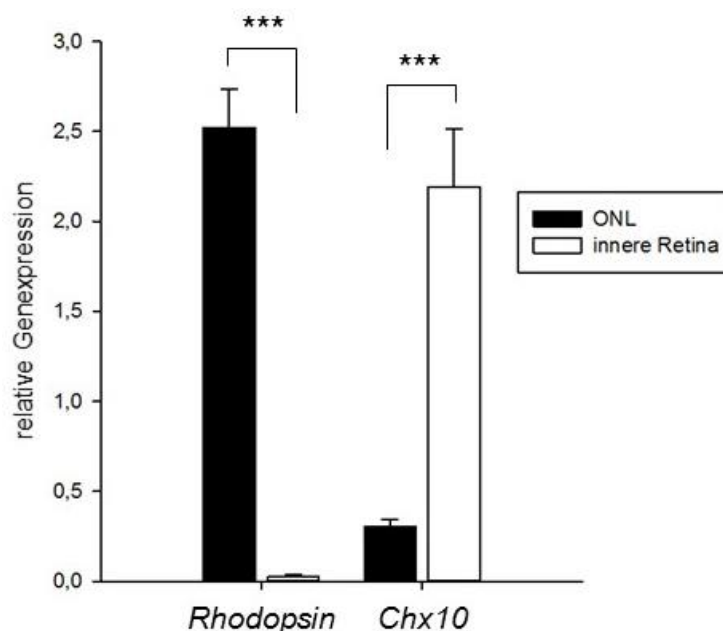


Abbildung 37: Marker Gene für LMD. Um Kreuzkontaminationen bewerten und ausschließen zu können, wurde die qPCR für Marker Gene etabliert, die präferiert in der ONL (*Rhodopsin*) und inneren Retina (*Chx10*) exprimiert werden. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *18S RNA*. Die Ergebnisse sind auf die Expression der gesamten Retina normalisiert. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=14$) und dazugehöriger SEM. *** $p < 0,001$ (t-test).

8.3 Relative Genexpression in einzelnen retinalen Schichten

Nachdem alle Proben auf Kreuzkontaminationen untersucht wurden und diese ausgeschlossen werden konnten, wurde die relative Expression der DNA-Reparaturgene in den einzelnen retinalen Schichten bestimmt. Dazu wurde weiterhin zwischen der ONL und inneren Retina (INL, IPL und GCL) unterschieden. Bei allen nachfolgenden Auswertungen wurden die Daten der qPCR der einzelnen retinalen Schichten auf die Expression in der gesamten frisch isolierten Retina (Tag 0) der jeweiligen Mauslinie normalisiert. Die Experimente wurden mit den Proben der drei Mauslinien (Wt, *Rpgr* und *Lbr2*) durchgeführt, jedoch konnte aufgrund von technischen Schwierigkeiten nicht jede qPCR ausgewertet werden. Zur Erstellung der nachfolgenden Abbildungen wurden jeweils 4 Proben pro Zeitpunkt, retinaler Schicht und Mauslinie verwendet. Liegt die Anzahl der Messwerte bei $n \leq 2$, so wurde dies in den Abbildungen markiert.

8.3.1 NHEJ

Zunächst wurden die Proben auf die Expression der NHEJ Reparaturgene untersucht. Die Ergebnisse für das Gen *53bp1* konnten bei der *Rpgr*- und *Lbr2*-Mauslinie bis Tag 4 der organotypischen Retinakulturen ausgewertet werden. Bei beiden Mauslinien zeigt sich eine zunehmende Genexpression in der ONL, wohingegen die Expression in der inneren Retina weitestgehend stabil und auf einem sehr niedrigen Level bleibt. So erreicht die Expression in der ONL bei der *Rpgr* Maus ein Maximum von $9,61 \pm 3,94$ an Tag 2 der Kultur und bewegt sich in der inneren Retina zwischen Werten von $0,78 \pm 0,08$ an Tag 0 und $1,51 \pm 0,33$ an Tag 4 (Abbildung 38A). Bei der *Lbr2* Maus liegt die maximale Expression in der ONL bei $12,94 \pm 2,05$ an Tag 4. In der inneren Retina erreicht die Expression einen maximalen Wert von $2,45 \pm 0,67$ an Tag 1 der Kultur und sinkt dann so weit ab, dass sie an Tag 4 nicht mehr detektierbar ist (Abbildung 38B).

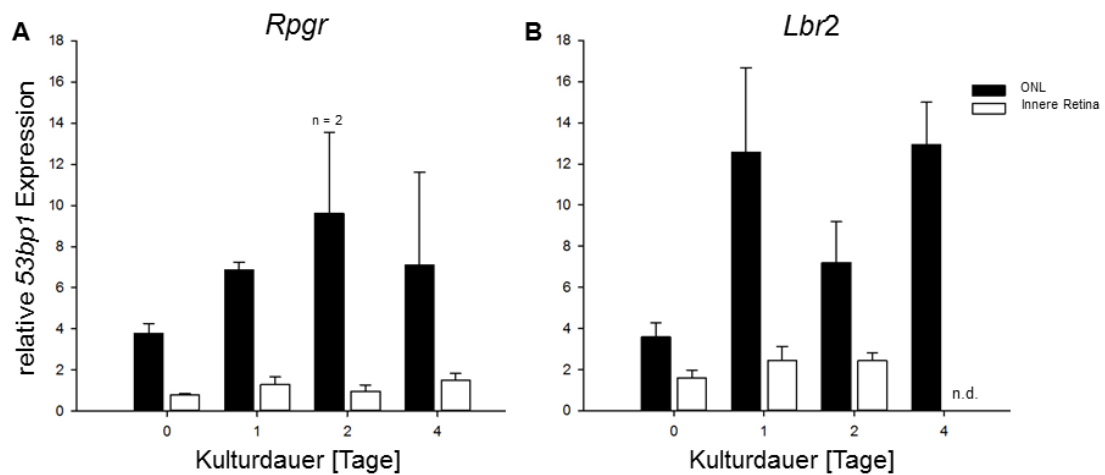


Abbildung 38: Zunehmende *53bp1* Expression in der ONL. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *18SRNA*. Die Ergebnisse sind auf die Expression der gesamten Retina (Tag 0) normalisiert. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n \leq 4$) und dazugehöriger SEM. Keine statistische Auswertung aufgrund geringer oder variierender Stichprobenanzahl. n.d.: nicht detektierbar.

Für das NHEJ Reparaturgen *Ku80* konnte eine Auswertung der Messwerte in allen drei Mauslinien bis Tag 6 der Retinakultur erfolgen. Hier zeigen sich deutliche Unterschiede im Expressionsmuster der einzelnen retinalen Schichten zwischen den drei verschiedenen Mauslinien. Betrachtet man zunächst die Ergebnisse der Wt Maus so fällt auf, dass auch hier eine Zunahme der Expression in der ONL über die Dauer der Kultur stattfindet, bei gleichbleibender Expression in der inneren Retina (Abbildung 39A). So steigt die *Ku80* Expression in der ONL von Tag 0 ($3,29 \pm 0,74$) bis Tag 2 ($9,35 \pm 2,70$) an und bleibt anschließend bis Tag 6 ($9,00 \pm 3,70$) stabil. In der inneren Retina liegen die Werte zwischen $1,87 \pm 0,56$ an Tag 1 und $2,76 \pm 1,12$ an Tag 4.

Bei der *Rpgr* Mauslinie konnte dagegen keine Zunahme der Expression in der ONL detektiert werden (Abbildung 39B). Hier liegen die Werte zwischen $0,79 \pm 0,12$ an Tag 4 und $2,35 \pm 1,35$ an Tag 2 und bleiben damit weitestgehend stabil. Auch in der inneren Retina ist

keine Veränderung in der Expression über die Dauer der Kultur erkennbar. Jedoch liegen die Werte auch hier wieder unter denen der ONL, mit einem Minimum an Tag 4 von $0,55 \pm 0,12$ und einem Maximum von $1,71 \pm 0,57$ an Tag 6.

Bei der *Lbr2* Mauslinie ist ebenfalls ein Anstieg der *Ku80* Expression in der ONL erkennbar, der jedoch nicht so stark ist, wie in der *Wt* Maus. Hier wird ein Maximum erst an Tag 6 mit einem Wert von $5,33 \pm 0,70$ erreicht (Abbildung 39C).

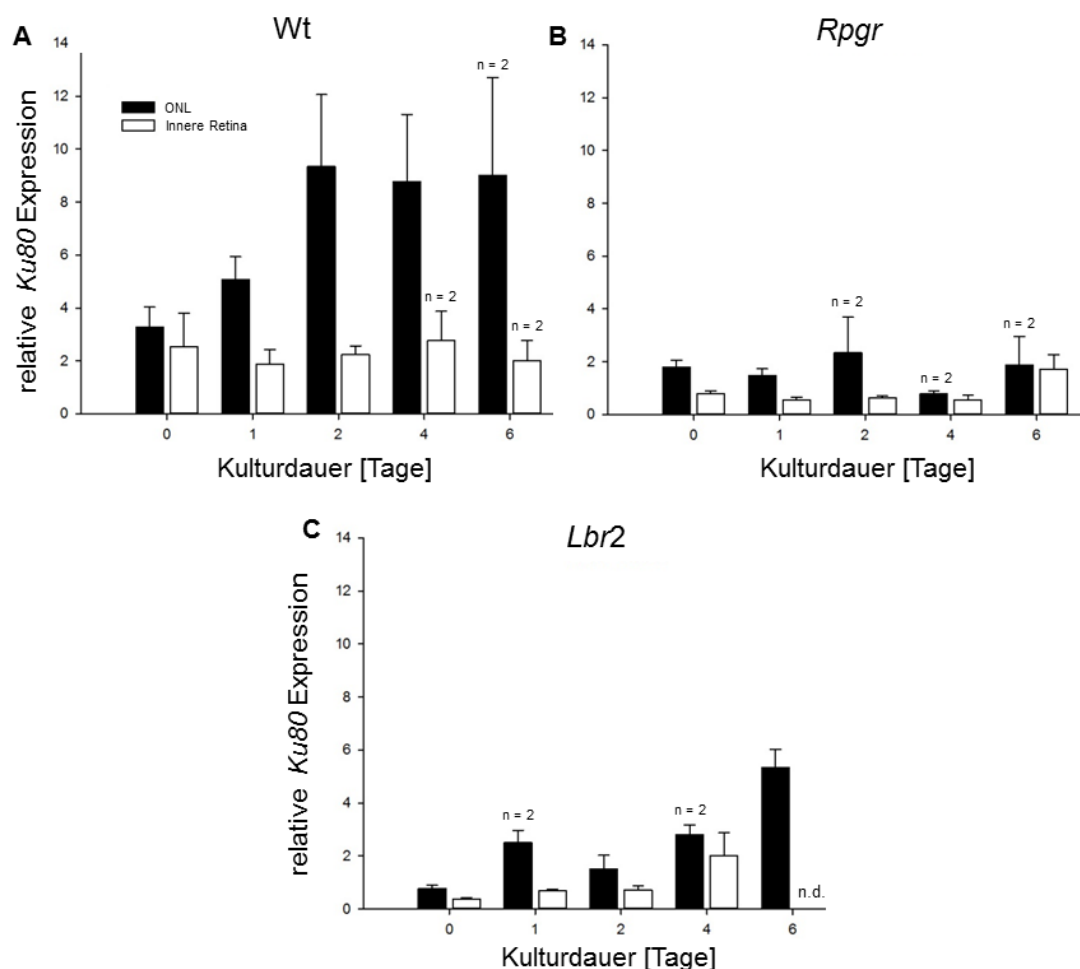


Abbildung 39: *Ku80* in einzelnen retinalen Schichten. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *18SRNA*. Die Ergebnisse sind auf die Expression der gesamten Retina normalisiert. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n \leq 4$) und dazugehöriger SEM. Keine statistische Auswertung aufgrund geringer oder variierender Stichprobenanzahl. n.d.: nicht detektierbar.

Zuletzt wurde die Expression des Gens *DNA-PKcs* des NHEJ Reparaturwegs untersucht. Hier konnten für die *Rpgr*- und *Lbr2*-Mauslinien eine Auswertung der Daten bis Tag 8 der Retinakultur vorgenommen werden. Die Expression von *DNA-PKcs* in der ONL der *Rpgr* Maus zeigt eine Abnahme über die Dauer der Kultur. Bei frisch entnommenen Retinae (Tag 0) war ein Wert von $1,59 \pm 0,45$ messbar, der bis Tag 4 der Kultur auf $0,17$ ($n=1$) absinkt und an den folgenden beiden Messpunkten auf ein Level absinkt, das nicht mehr detektierbar ist (Abbildung 40A). In der inneren Retina bleibt die Expression dagegen stabil.

Bei der *Lbr2* Maus kommt es zunächst zu einer Zunahme der Expression von *DNA-PKcs* in der ONL, von $2,39 \pm 0,45$ an Tag 0 zu $4,19 \pm 2,47$ an Tag 2, die jedoch ab Tag 4 auf nicht detektierbare Mengen an Transkripten absinkt (Abbildung 40B). Auch in der inneren Retina ist ab Tag 4 der Kultur kein *DNA-PKcs* Signal mehr messbar.

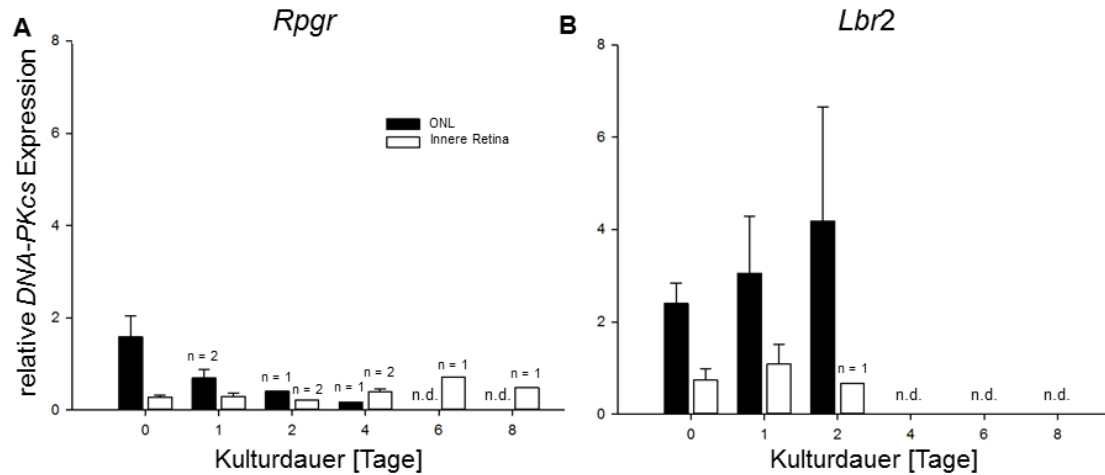


Abbildung 40: *DNA-PKcs* in einzelnen retinalen Schichten. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *18SRNA*. Die Ergebnisse sind auf die Expression der gesamten Retina normalisiert. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n \leq 4$) und dazugehöriger SEM. Keine statistische Auswertung aufgrund geringer oder variierender Stichprobenanzahl. n.d.: nicht detektierbar.

8.4 HDR

Des Weiteren wurden erneut die drei Gene für den HDR Reparaturweg auf ihre Expression in den einzelnen retinalen Schichten untersucht. Bei dem Gen *CtIP* konnten lediglich die Messungen in der *Rpgr* Maus ausgewertet werden und auch hier waren nur wenige Werte messbar, was sich deutlich in Abbildung 41 zeigt. Für die innere Retina konnte über die gesamte Dauer der Kultur keine Messwerte detektiert werden. Lediglich für die ONL konnten Werte an Tag 0 ($3,39 \pm 0,85$) und Tag 1 ($5,90$, $n=1$) gemessen werden, an den folgenden Tagen sinkt auch hier die Menge an Transkripten in nicht mehr messbare Bereiche.

Für das Gen *Rad50* konnten für die *Rpgr* und *Lbr2* Maus Daten ausgewertet werden. Bei der *Rpgr* Maus zeigt sich zunächst eine Zunahme von Tag 0 ($4,28 \pm 0,58$) zu Tag 1 ($5,57 \pm 0,45$), jedoch ist dann eine Abnahme auf $0,61 \pm 0,36$ an Tag 4 erkennbar, die anschließend bis in nicht mehr detektierbare Bereiche absinkt (Abbildung 42A). Auch für die innere Retina konnten lediglich Werte bis Tag 4 der Kultur bestimmt werden, danach sinkt die Expression weiter ab.

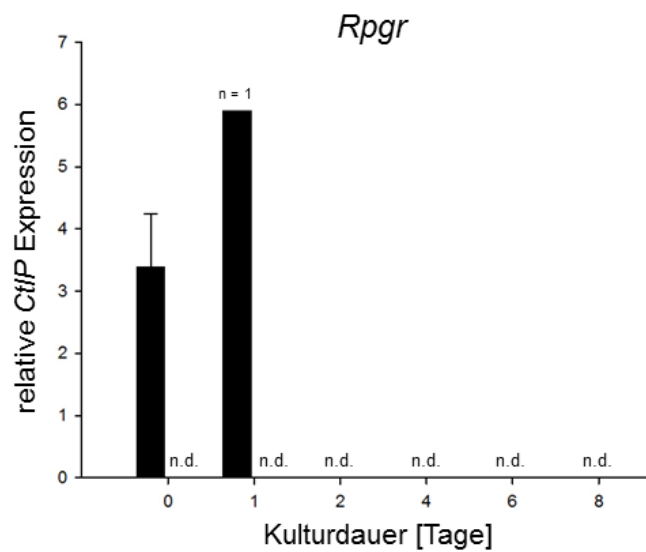


Abbildung 41: *CtIP* in einzelnen retinalen Schichten. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *18SRNA*. Die Ergebnisse sind auf die Expression der gesamten Retina normalisiert. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n=3$) und dazugehöriger SEM. Keine statistische Auswertung aufgrund geringer oder variierender Stichprobenanzahl. n.d.: nicht detektierbar.

Für die *Lbr2* Maus war lediglich eine Auswertung bis Tag 2 der Kultur möglich. Hier zeigt sich sowohl für die ONL, als auch für die innere Retina eine Zunahme in der Expression von *Rad50* (Abbildung 42B). In der ONL steigt die Expression von $3,22 \pm 0,95$ an Tag 0 auf $9,51$ an Tag 2 an. In der inneren Retina ist es eine Zunahme von $1,01 \pm 0,30$ auf $3,80 \pm 0,87$.

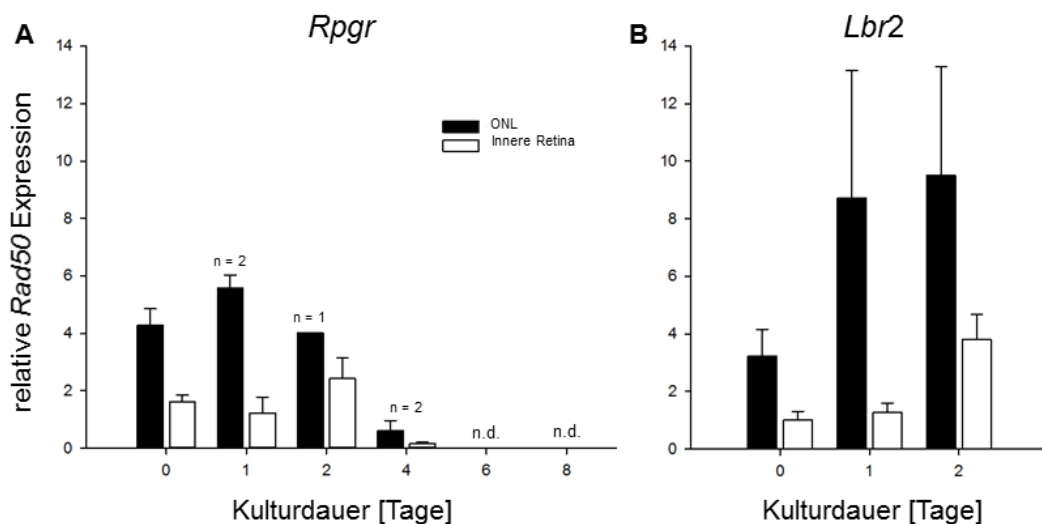


Abbildung 42: *Rad50* in einzelnen retinalen Schichten. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *18SRNA*. Die Ergebnisse sind auf die Expression der gesamten Retina normalisiert. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n \leq 4$) und dazugehöriger SEM. Keine statistische Auswertung aufgrund geringer oder variierender Stichprobenanzahl. n.d.: nicht detektierbar.

Schließlich wurde die Expression von *Brcal* in den einzelnen retinalen Schichten analysiert. Hier zeigt sich bei der *Rpgr* Maus in der ONL eine abnehmende Rate, von $5,16 \pm 1,54$ an Tag 0 auf 2,14 ($n=1$) an Tag 4, bis hin zu so geringen Werten an Tag 6 und 8, die in der qPCR nicht mehr detektierbar waren (Abbildung 43A). In der inneren Retina war lediglich bei frisch entnommenen Retina *Brcal* Expression messbar ($0,57 \pm 0,17$), bei den Kulturstadien war bis zu Tag 8 keine Expression, aufgrund der Detektionsgrenze, messbar. Verglichen damit zeigt sich eine ähnliche Expression in der *Lbr2* Maus. Auch hier war lediglich Expression des *Brcal* Gens in der inneren Retina von frisch entnommenen Retinae messbar ($0,29 \pm 0,05$) (Abbildung 43B). Dagegen ist die Expression in der ONL deutlich höher. Hier liegen die Werte an Tag 0 bei $8,74 \pm 2,28$, steigen an Tag 1 ($22,04 \pm 2,55$) weiter an und erreichen an Tag 2 schließlich einen Wert von $18,82 \pm 9,04$. An den darauffolgenden Kulturtagen ist keine Expression von *Brcal* in der ONL messbar.

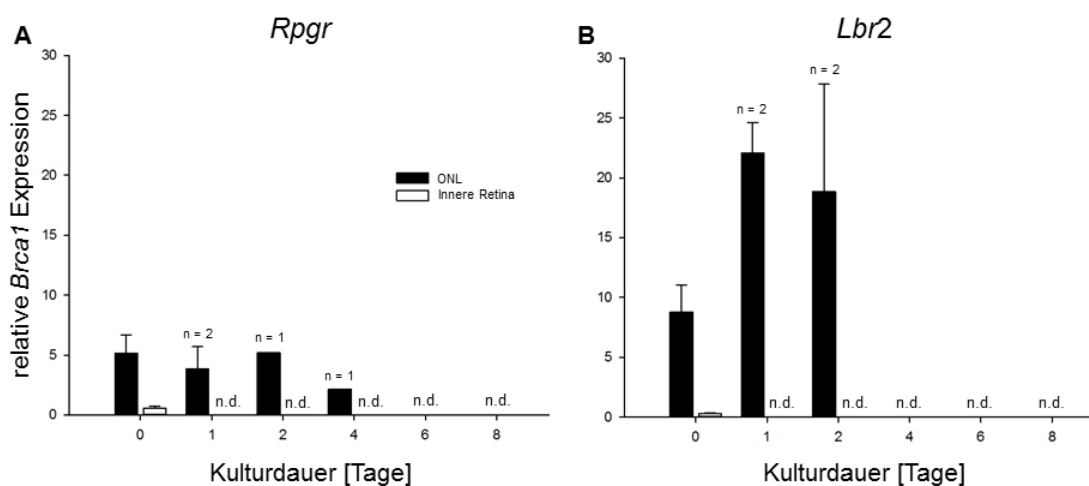


Abbildung 43: *Brcal* in einzelnen retinalen Schichten. Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf das Referenzgen *18SRNA*. Die Ergebnisse sind auf die Expression der gesamten Retina normalisiert. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n \leq 4$) und dazugehöriger SEM. Keine statistische Auswertung aufgrund geringer oder variierender Stichprobenanzahl. n.d.: nicht detektierbar.

9. Vergleich: Gesamte Retina vs. ONL

Um eine Analyse auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Expression der DNA-Reparaturgene in der gesamten Retina und der ONL durchführen zu können, wurden im Folgenden die Ergebnisse in einer Abbildung am Beispiel der *Rpgr* Maus zusammengestellt. Wichtig ist, dass Daten der beiden Graphen auf unterschiedlichen House Keeping Genen beruht. Für die Untersuchungen der gesamten Retina wurde *Gapdh* genutzt, für die einzelnen retinalen Schichten *18SRNA*.

Es fällt auf, dass einzelne Gene in der ONL deutlich höher exprimiert werden, verglichen mit der Gesamtretna. Dazu zählen die Gene *53bp1*, *CtIP*, *Rad50* und *Brca1*. Jedoch war bei diesen Genen ab einer gewissen Kulturdauer keine Expression mehr messbar. Erst durch die Einzelanalyse der Genexpression in der ONL wird deutlich, dass es deutliche Veränderungen über die Dauer der Kultur gibt. Dies macht diese Analyse so wichtig für die geplante Genome Editing Strategie in der Retina und im Speziellen in den Photorezeptoren, deren Kerne die ONL bilden.

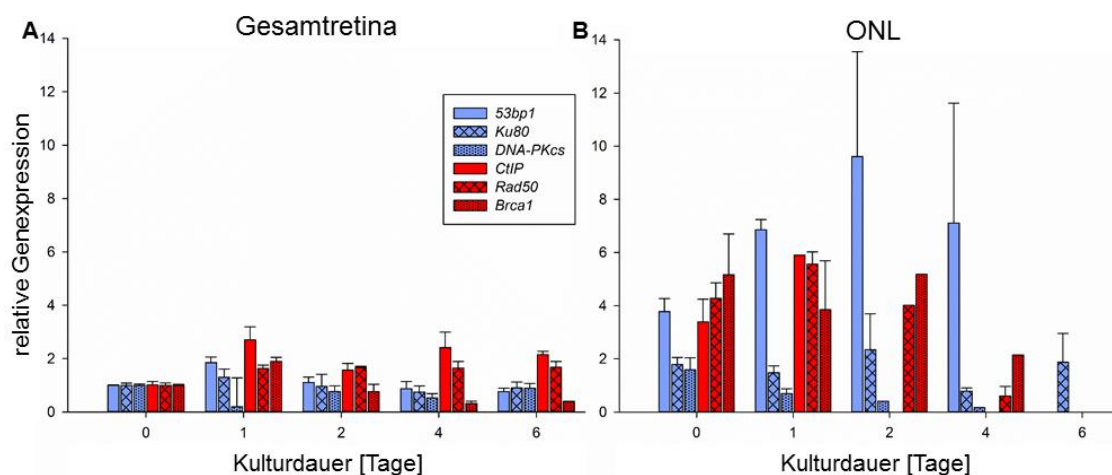


Abbildung 44: Expression der DNA-Reparaturgene von *Rpgr* Mäusen in der gesamten Retina (A) vergleichen mit der ONL (B). Darstellung der Genexpression nach relativer Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse, bezogen auf die Referenzgene *Gapdh* (Gesamtretna) und *18SRNA* (ONL). Alle Ergebnisse sind auf die Expression der gesamten Retina (Tag 0) normalisiert. Dargestellt sind die jeweiligen Mittelwerte ($n \leq 4$) und dazugehöriger SEM. Blau, Gene des NHEJ Reparaturwegs. Rot, Gene des HDR Reparaturwegs.

10. Das Ku80 Protein

Nachdem das zentrale Protein des NHEJ Reparaturwegs Ku80, auch Xrcc5 genannt, eine besondere und unerwartete Expression in den einzelnen retinalen Zellschichten zeigte, sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Protein-Ebene in der Immunhistochemie, wurden weiterführende Analysen angeschlossen. Im Folgenden sind die Ergebnisse zweier Western Blots dargestellt. GAPDH diente als Ladekontrolle. Die besten Ergebnisse wurden mit dem RIPA-Puffer (Abbildung 45A) und dem SLB (Abbildung 45B) erzielt. Die beiden Puffer unterscheiden sich maßgeblich in der SDS Konzentration. Beim RIPA-Puffer liegt diese bei 0,1%, beim SLB dagegen bei 4%.

Für den Western Blot mit RIPA-Puffer-isolierten Proben, beträgt die Menge des aufgetragenen Proteins 60 µg. Hier diente *E.coli* als Negativkontrolle. Bakterien exprimieren das Ku80 Protein nicht. Bei den Proben von Retina, Muskel und Hoden sind deutliche Banden erkennbar, bei der Lunge lässt sich eine Bande vermuten. Auffällig ist jedoch, dass die Banden auf unterschiedlicher Höhe liegen. Während Retina, Hoden und Lunge eine Bande knapp über 100 kDa aufweisen, liegt die Bande des Muskels bei 100 kDa.

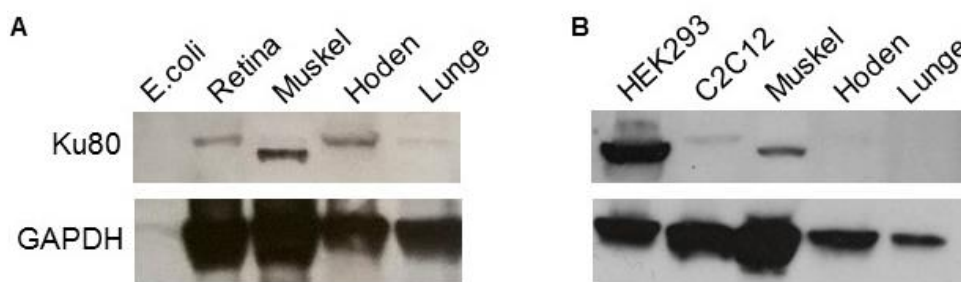


Abbildung 45: Western Blot mit Ku80 Antikörper. A: Lyse mit RIPA-Puffer. B: Lyse mit *SDS Lysis Buffer* nach Britton et al. 2016. GAPDH diente als Kontrolle.

Mit SLB wurden Proben von HEK293, C2C12-Zellen und murinen Organen wie Muskel, Hoden und Lunge isoliert. Hier zeigte sich für die C2C12-Zelle eine höhere und für HEK293 und dem Muskel eine niedrigere Bande, auf gleicher Höhe wie in dem Western Blot zuvor. Wie an der Ladekontrolle (GAPDH) deutlich wird, wurden unterschiedliche Mengen Protein geladen, weshalb vermutlich kein Signal bei Hoden und Lunge erreicht werden konnte. Aufgrund der hohen Menge SDS im Lysis Puffer war eine Protein Konzentrationsbestimmung im Vorfeld nicht möglich.

Um die verschiedenen Größen der Proteine erklären zu können, wurde im nächsten Schritt die mRNA auf Isoformen, aus Splicevarianten resultierend, untersucht. Dazu wurden Primer designst, die den gesamten ORF von *Ku80* umfassen. Die Sequenz stammte von der NCBI Datenbank (NM_009533.2, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/>). Das erwartete PCR Produkt sollte eine Größe von 2199 bp haben. Nach PCR mit cDNA verschiedener muriner Gewebe mit den entsprechenden *Ku80* Primern, entstanden bei manchen Geweben zwei PCR Produkte (Abbildung 46). Dies war beim Muskel, Retina, Herz und Gehirn der

Fall. Bei den anderen Geweben (Leber, Lunge, Niere, Hoden) und den C2C12 Zellen ist lediglich das kleinere Produkt entstanden. Beide Produkte haben, dem Gelbild nach zu urteilen, eine Größe zwischen 2000 bp und 2500 bp.

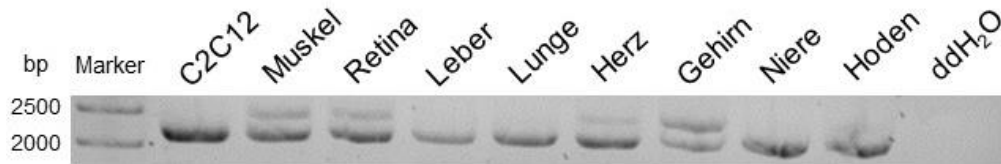


Abbildung 46: Isoformen der mRNA nach PCR über Gesamtlänge des *Ku80* Gens (Agarosegelbild). Für die PCR wurde cDNA von verschiedenen murinen Organen und von C2C12 Zellen eingesetzt. Ansatz mit ddH₂O diente als Negativkontrolle.

Die PCR wurde für die Retina wiederholt, die Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen, beide Banden ausgeschnitten, aufgereinigt (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up von Macherey-Nagel) und sequenziert. Die Sequenzierung ergab, dass das kleinere Produkt der Sequenz aus der Datenbank entspricht. Die Sequenzierung des größeren Produkts war leider nicht erfolgreich.

Inzwischen sind jedoch weitere Isoformen der mRNA auf NCBI beschrieben, die größer sind als Variante 1. Variante 2 (NM_001357519.1) entspricht einer Größe von 2849 bp und Variante 3 (NM_001357520.1) 2845 bp. Außerdem sind zwei verschiedene Isoformen des Ku80 Proteins beschrieben, die möglicherweise eine Erklärung für die unterschiedlichen Größen der Proteine im Western Blot darstellen. Isoform 1 (NP_033559.2) verfügt über eine Größe von 732 Aminosäuren, was einem theoretischen Gewicht von etwa 83,07 kDA (https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html) entspricht. Isoform 2 (NP_001344448 , NP_001344449.1) ist dagegen etwas kleiner, mit einer Größe von 713 Aminosäuren und etwa 81,2 kDA.

IV Diskussion

Erbliche Netzhautdegenerationen sind eine Gruppe von Erkrankungen, die durch Mutationen in über 200 Genen ausgelöst werden können. Im Rahmen des von der EU geförderten Projektes REGAIN (Retinal gene alteration in XLRP, ERC Starting Grant #311244) sollten Strategien entwickelt werden, wie XLRP *in vivo* per Genome Editing therapiert werden kann. Dazu sollen zelleigene Reparaturwege wie HDR genutzt werden, um die mutierte chromosomale DNA-Sequenz durch ein exogenes DNA-Template zu reparieren. Die Behandlung soll durch den Gentransfer von Endonuklease und DNA-Template durch Adeno-assoziierte Viren (AAV) oder Nanopartikel verwirklicht werden. Da eine solche Strategie noch nie in der Retina *in vivo* durchgeführt wurde, sind zahlreiche Parameter unbekannt, wie zum Beispiel das Auftreten von NHEJ oder HDR in der postmitotischen Retina, speziell in den Photorezeptoren. Um die Anwendung und das Potenzial des therapeutischen Genome Editings in der Netzhaut zu studieren und zu optimieren, bevor es *in vivo* an der Netzhaut der Maus getestet wird, kommen organotypische Retinakulturen zum Einsatz. Sie stellen ein intermediäres System zwischen mitotischen Zellen *in vitro* und der *in vivo* Situation dar, wobei innerhalb der ersten Woche in Kultur neurodegenerative Veränderungen noch relativ mild sind. Im Rahmen der Dissertation sollten die Genexpressionslevel zentraler DNA-Reparaturproteine in der organotypischen Retinakultur von adulten Mäusen untersucht werden, wobei der Fokus auf den Vorgängen in Photorezeptoren liegt, da sie die Zielzellen in späteren Therapieansätzen darstellen. Dazu wurden Netzhäute adulter Tiere bis zu acht Tage in Kultur genommen und nach Isolierung der RNA und ihrer Umschreibung in cDNA die Genexpression mittels quantitativer PCR untersucht. Da aufgrund immunhistochemischer Untersuchungen eine zelltypspezifische Differenzierung der Expressionslevel wahrscheinlich ist, sollte weiterhin die Expression der Gene in Photorezeptoren im Vergleich zu Zellen der inneren Netzhaut analysiert werden. Dafür wurden die Photorezeptorkerne mittels Lasermikrodissektion isoliert.

1. Die organotypische Retinakultur

Um die Anwendung genterapeutischer Strategien an der organotypischen Retinakultur von adulten Wildtypmäusen testen zu können, war eine nähere Charakterisierung der Retinakultur nötig. Dazu wurde in dieser Arbeit die Expression verschiedener Gene gemessen. Nach Kultivierung der Retinae über einen Zeitraum von bis zu acht Tagen wurde das Gewebe homogenisiert, die RNA isoliert, cDNA synthetisiert und schließlich die Expression mittels quantitativer PCR gemessen. Die $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode wurde genutzt, um die relative Genexpression zu bestimmen. *Gapdh* diente als Housekeeping-Gen.

Betrachtet man zunächst den Gesamt-RNA-Gehalt der Retinaprobe im Vergleich zu den einzelnen Kulturstadien lässt sich festhalten, dass der RNA-Gehalt rapide und statistisch signifikant ($p > 0,001$) abnimmt, sobald die Retinae in Kultur genommen wurden (Abbildung 17). Die Kulturbedingungen scheinen somit einen großen Einfluss auf den allgemeinen Zustand der Retina zu haben. Dies ist auch verständlich, bedenkt man, dass keine Versorgung

der Retinae mit Nährstoffen und Sauerstoff über das Blut stattfindet. Stattdessen inkubieren sie auf einer Polycarbonatmembran in Nährmedium, welches jeden zweiten Tag gewechselt wird und verbleiben in 5%iger CO₂- und mit Wasserdampf gesättigter Atmosphäre.

Außerdem ist zu beachten, dass etwa 80% aller Neuronen in der Mausretina Photorezeptoren sind, welche das Photopigment Rhodopsin produzieren (Jeon et al., 1998). Somit ist dieses Protein für den Großteil der Proteinsynthese, inklusive ribosomaler und tRNA, verantwortlich. Da die organotypische Retinakultur ohne RPE Zellen und funktionelle äußere Segmente präpariert wurde, ist eine Abnahme in der Rhodopsinproduktion und damit der generellen Proteinsynthese zu rechnen. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurde die Genexpression von *Rhodopsin* in der Retinakultur von adulten Wildtypmäusen, *Rpgr* und *Lbr2* Mäusen mittels qPCR bestimmt. Die Expression von *Rhodopsin*, zeigt eine starke Abnahme, sobald sich die Retina in Kultur befindet. Bereits ab Tag 1 der Retinae von Wt Mäusen in Kultur ist eine etwa 5-fache ($-5,35 \pm 1,36$) Abnahme der Expression zu erkennen, die sich bis Tag 8 auf einen Wert von $-38,80 \pm 26,71$ verstärkt (Abbildung 19) und damit die vorangegangene Hypothese bestätigt. Ähnliche Ergebnisse sind für die drei und neun Monate alten *Rpgr* und *Lbr2* Mäuse zu beobachten (Abbildungen 27 und 31), was die Hypothese zusätzlich bestätigt. Durch die Präparation der Netzhaut kann es, wie zuvor beschrieben, zum Verlust der Außensegmente der Photorezeptoren kommen. Außerdem wird das RPE nicht erhalten, welches *in vivo* eine schützende und versorgende Funktion für die Photorezeptoren hat, die in Kultur nicht mehr vorhanden ist (Strauss, 2005). Weitere mögliche Ursachen für die Abnahme der Expression könnten die fehlende Stimulation durch den physiologischen Reiz des Lichtes sein oder die Unterbrechung des visuellen Zyklus. Während der Phototransduktionskaskade wird durch Lichtabsorption 11-*cis*-Retinal zum all-*trans*-Retinal umgewandelt (Tang et al., 2013). Kommt es zum Verlust des RPE, kann die Regeneration zum 11-*cis*-Retinal nicht mehr stattfinden.

Weiterhin wurde die Expression von Glia-spezifischen Genen bestimmt. Es konnte eine erhöhte Expression der Gene *Aif1*, auch *Iba1* genannt, und *Gfap* in allen drei Mauslinien beobachtet werden (Abbildungen 20, 28 und 32), wobei *Gfap* stets eine deutlich stärkere Zunahme als *Iba1* zeigt. Eine Ausnahme stellt hier die *Lbr2* Maus dar, bei der *Iba1* einen stärkeren Anstieg der Expression zeigt. Die Zunahme der Expression von Glia-spezifischen Genen ist vermutlich auf eine Gliose in der organotypischen Retinakultur zurückzuführen. Diese Ergebnisse passen gut zu der immunhistochemischen Charakterisierung der organotypischen Retinakultur, die parallel von Kollegen in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. Dort konnten Müllerzellen verstärkt ab Tag 4 der Retinakultur durch die GFAP Färbung detektiert werden. Auch aktivierte Mikroglia, markiert durch *Iba1*, konnten ab Tag 4 vermehrt in der inneren Retina gefunden werden. Ebenso wurden von Mikroglia stammende Makrophagen in der ONL sichtbar (Müller et al., 2017). Dies kann als frühe und unspezifische Reaktion auf Schäden der Retina angesehen werden, welche zum Ziel hat, das Überleben der retinalen Neuronen zu unterstützen (Liberto et al., 2004).

Die Resultate aus der vorliegenden Arbeit zusammen mit den Untersuchungen aus Müller et al. 2017 weisen darauf hin, dass sich die Retina in Kultur innerhalb der ersten Woche in einem metabolisch aktiven und viablen Zustand befindet. Damit ist sie bis zum Tag 8 für präklinische gentherapeutische Anwendungen nutzbar. Die organotypische Retinakultur eignet sich somit als intermediäres Modell zwischen Zellkultur und Tierversuchen (Müller et al., 2017).

Bisher wurden hauptsächlich organotypische Retinakulturen von neonatalen Mausretinae genutzt und untersucht. Diese unterscheiden sich deutlich von adulten Retinae, da sie sich noch in der Differenzierung befinden. So wurde beispielsweise gezeigt, dass diese Retinakulturen ein fundamentales Problem haben. Die Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren entwickeln sich nicht korrekt (Ogilvie et al., 1999). Somit wurde durch die vorliegende Arbeit und weitere Arbeiten der AG von Prof. Stieger erstmals die Viabilität der adulten Retinakultur über einen Zeitraum von acht Tagen gezeigt.

Neben dem intermediären System stellt die organotypische Retinakultur von adulten Mäusen gleichzeitig ein reproduzierbares Degenerationsmodell der Retina im Zeitraffer dar. Sie weist charakteristische Veränderungen auf, die zuvor von Cuenca und Kollegen zusammengefasst und in vier Phasen eingeteilt wurden (vgl. Einleitung, Abschnitt 2.1; Cuenca et al., 2014). Dazu zählen beispielsweise, wie bereits beschrieben, die Aktivierung der Gliazellen und Verluste der Innen- und Außensegmente von Photorezeptoren über die Dauer der Kultur. Auch eine deutliche Abnahme im Durchmesser der Retina konnte im Rahmen der LMD Experimente beobachtet werden.

In künftigen Experimenten könnten als Ergänzung die Kulturbedingungen variiert und Supplemente hinzugegeben werden, um Apoptosemechanismen zu inhibieren und das Überleben der Photorezeptoren und retinalen Neurone zu fördern (Bringmann et al., 2006). Ebenso könnte versucht werden das RPE für die Kultivierung zu erhalten, um zusätzlich von der schützenden Funktion zu profitieren.

2. DNA-Reparaturmechanismen in der postmitotischen Retina

Die DNA-Reparaturmechanismen einer Zelle wurden bisher hauptsächlich in Zellkulturexperimenten untersucht. Jedoch ist das Wissen über das Vorhandensein und die Aktivität der DNA-Reparaturwege im Menschen und Tiermodell *in vivo* im Allgemeinen und in der postmitotischen Retina im Speziellen für eine erfolgreiche Genome Editing Therapie unerlässlich. So konnten bereits Müller und Kollegen zeigen, dass eine Kollokalisierung von 53BP1, einem wichtigen Protein des NHEJ Reparaturwegs, und γ H2AX, einem Marker für DNA-DBS, lediglich sehr selten auftritt (Müller et al., 2018). Dies wiederum deutet darauf hin, dass bei der Erkennung und Reparatur von DSB in der Retina möglicherweise andere Proteine oder Reparaturwege eine Rolle spielen.

Davon ausgehend, dass über die Dauer der Kultur mehr DSB auftreten, müssten auch die entsprechenden Reparaturmechanismen aktiviert und dadurch ein Anstieg der Expression der entsprechenden Gene messbar sein. Für den NHEJ Reparaturweg wurden in dieser Arbeit die Gene *53bp1*, *Ku80* und *DNA-PKcs* in der organotypischen Retinakultur von Wt, *Rpgr* und *Lbr2* Mäusen untersucht. Um mögliche Aktivität des HDR Reparaturwegs zu überprüfen, wurde die Expression der Gene *CtIP*, *Rad50* und *Bra1* analysiert.

Bei Betrachtung der Ergebnisse fällt auf den ersten Blick die Expression von *CtIP* ins Auge, die in allen drei Mauslinien den stärksten und statistisch signifikanten Anstieg in der Expression zeigt (Abbildungen 22A, 30A und 34A). *Rad50*, auch ein Gen des HDR Reparaturwegs, zeigt ebenfalls einen etwa 2-fachen Anstieg der Expression in allen untersuchten Mauslinien, vergleicht man frisch isolierte Retinae mit kultivierten (Abbildungen 22B, 30B und 34B). *Bra1* dagegen weist zunächst einen Anstieg der Expression auf, die jedoch ab einer gewissen Kulturdauer wieder abnimmt und schließlich niedriger ist, als in frisch isolierten Retinae (Abbildungen 22C, 30C und 34C). Dieses Ergebnis würde also nicht eindeutig für HDR als aktiven Reparaturweg in der adulten Retina sprechen.

Ein ebenso undeutliches Ergebnis ist für die Gene des NHEJ Reparaturwegs erlangt worden. Für das Gen *Ku80* ist zwar ein stabiler Anstieg in der Expression über die Dauer der Kultur in allen drei Mauslinien messbar, der bis zu zwei- bzw. dreifach, verglichen mit frisch isolierten Retinae, ist (Abbildungen 21B, 29B, 33B), dies ist jedoch bei den anderen beiden untersuchten NHEJ Genen anders. Auch die zuvor beschriebenen Erkenntnisse von Müller et al. sprechen gegen NHEJ als Reparaturweg in der adulten Mausretina und passen damit gut zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Gleichzeitig geben diese Ergebnisse wahrscheinlich einen Hinweis auf den vorliegenden DNA-Reparaturdefekt in den Stäbchen Photorezeptoren von Mäusen, der bereits in einer anderen Arbeit beschrieben wurde (Frohns et al., 2014).

2.1 MMEJ als alternativer Reparaturweg

Obwohl die genauen Mechanismen nach wie vor ungeklärt sind, konnte von anderen Gruppen gezeigt werden, dass CtIP über den HDR Reparaturweg hinaus auch bei MMEJ eine entscheidende Rolle spielt. MMEJ stellt einen alternativen Reparaturweg zum klassischen

NHEJ dar, der über mikrohomologe Bereiche funktioniert. CtIP ist, genau wie bei HDR, für die initiiierende Modifikation der DNA-Enden verantwortlich (Makharashvili et al., 2014; Wang et al., 2014). Auch Rad50, als Bestandteil des MRN-Komplexes, könnte für MMEJ von wichtiger Bedeutung sein. Hinweise darauf ergaben ebenfalls einige vorangegangene Studien in Hefen (Ma et al., 2003; Zhang and Paull, 2005). Ob BRCA1 jedoch an dem Prozess beteiligt ist oder nicht, wird bisher sehr unterschiedlich berichtet. So gibt es Studien in DT40 B Zellen, die zeigen, dass MMEJ nicht von BRCA1 beeinflusst wird (Yun and Hiom, 2009). Auch eine andere Studie in humanen Zellen zeigt, dass die Reduktion von BRCA1 die Rate von HDR reduziert und gleichzeitig MMEJ fördert (Ahrabi et al., 2016). Im Gegensatz dazu konnte eine andere Gruppe zeigen, dass CtIP und BRCA1 MMEJ an Telomeren fördern (Badie et al., 2015). Somit ist es offensichtlich, dass andere Systeme und Nachweismethoden benötigt werden, um die genauen zugrunde liegenden Mechanismen von MMEJ aufklären zu können.

Es besteht also die Möglichkeit, dass der vorherrschende Reparaturweg in der adulten Mausretina, sowie der humanen Retina, MMEJ ist. Die humane Retina zeigte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls höhere Expression von MMEJ spezifischen Genen, verglichen mit anderen Zelltypen aus mitotischen Zellkultursystemen (Abbildung 26D). Dies könnte ein weiterer Hinweis für MMEJ als aktiver Reparaturweg sein. Um diese These zu bestätigen sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. Es könnten beispielsweise MMEJ Assays durchgeführt werden (McVey and Lee, 2008). Zudem ist zu bedenken, dass die Studien dieser Arbeit, *Ku80* ausgenommen, ausschließlich die Genexpressionsebene betrachten und damit keine Aussage über das Vorhandensein oder die Aktivität der Proteine getroffen werden können. Jedoch wurden in der Arbeitsgruppe parallel immunhistochemische Arbeiten vorgenommen, die das Vorhandensein einiger DNA-Reparaturproteine in der Retina bestätigen (Laucke, 2017; Müller et al., 2018)

2.2 DNA-DSB-Reparatur im *Rpgr* Mausmodell

Die Unterschiede zwischen der Wt Maus und dem *Rpgr* Mausmodell liegen in einer artifiziell eingefügten Punktmutation im ORF15 des *Rpgr* Gens, die beim Menschen zur Ausbildung von XLRP führt. Somit stellt diese Mauslinie ein Krankheitsmodell für XLRP dar, wobei die morphologischen und funktionellen Veränderungen nach etwa neun Monaten signifikante Level erreichen. Aus diesem Grund wurden sowohl drei, als auch neun Monate alte *Rpgr* Tiere untersucht. Da sich die beiden Mauslinien lediglich durch die Punktmutation unterscheiden, die einen Einfluss auf die Expression des RPGR Proteins hat, war eine Veränderung der Expression von DNA-Reparaturgenen nicht zu erwarten. In Übereinstimmung mit der vorangegangenen These konnten keine Unterschiede in der Expression der DNA-Reparaturgene zwischen Wt und *Rpgr* Maus gefunden werden. Einzige Ausnahme stellt das Gen *DNA-PKcs*, auch *Prkdc*, dar (Abbildung 35). Das Gen codiert für das gleichnamige Protein, welches als Bestandteil des NHEJ Reparaturwegs von dem Ku Heterodimer an den DSB

rekrutiert wird und Autophosphorylierungsaktivität besitzt. Die Ursache für die abnehmende Expression während der organotypischen Retinakultur bedarf weiteren Untersuchungen. Möglicherweise übernimmt dieses Protein noch weitere Aufgaben, die an dieser Stelle zu tragen kommen.

Auch zwischen den drei- und neun Monate alten *Rpgr* Tieren konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression der DNA-Reparaturgene gefunden werden (Abbildung 29 und 30), sodass davon auszugehen ist, dass die Mutation im *Rpgr* Gen keinen Einfluss auf die Reparaturmechanismen in den Zellen hat. Dieses Modell eignet sich also sehr gut, um geplante Therapiestrategien bei XLRP zu testen.

2.3 Chromatinstruktur der adulten Stäbchen Photorezeptoren von Mäusen

Weiterhin konnte durch vorangegangene Studien gezeigt werden, dass die spezielle Chromatinstruktur von adulten Stäbchen Photorezeptoren zu einem Reparaturdefekt in Mäusen führt. Während 90% der DSB in anderen Zelltypen in der Retina, im Gehirn oder verschiedenen anderen Geweben binnen eines Tages repariert werden, bleiben etwa ein Drittel der DSB in den Stäbchen der Mäuse für bis zu sechs Tage vorhanden. Nach bestem Wissen stellt dies die ineffizienteste und langsamste Reparatur aller Zelltypen in Wt Tieren dar, trotz robuster Expressionslevel von wichtigen Reparaturfaktoren wie Ku80 und DNA-PKcs (Frohns et al., 2014). Dies wiederum gibt einen Hinweis darauf, dass das Heterochromatin im Allgemeinen die Reparatur von DSB in Säugern *in vivo* beeinträchtigt.

Ursache für diese spezielle Chromatinstruktur sind die Abwesenheit des Lamin B Rezeptors (LBR), sowie von Lamin A/C. Diese Proteine sorgen für das Binden des Heterochromatins an die Kernhülle. Fehlen diese Proteine, kommt es in postmitotischen Zellen zu einer Relokalisation in das Innere des Kerns. Somit sind diese Proteine der Kernhülle maßgeblich an der Verteilung des Heterochromatins, der Genexpression und zellulären Differenzierung während der Entwicklung beteiligt (Solovei et al., 2013). Um zu vergleichen, welchen Einfluss diese Chromatinstruktur auf die Genexpression der DNA-Reparaturgene hat, wurde zusätzlich zur Wt Maus auch die sogenannte *Lbr2* Maus untersucht. Die Mauslinie besitzt in etwa 30% ihrer Stäbchenphotorezeptoren die konventionelle Chromatinstruktur, welche der Chromatinstruktur des Menschen entspricht. Sie zeichnet sich durch Verteilung des inaktiven Heterochromatins in der nukleären Peripherie aus, wohingegen das aktive Euchromatin im Inneren des Kerns zu finden ist (Solovei et al., 2016; van Steensel and Belmont, 2017). Dagegen ist die invertierte Chromatinstruktur der Stäbchen von nachtaktiven Tieren durch ein einziges Chromozentrum von Heterochromatin gekennzeichnet, mit einer Hülle von Euchromatin (Falk et al., 2018; Solovei et al., 2009).

Unterschiede in der Expression von DNA-Reparaturgenen zwischen der Wt und der *Lbr2* Maus konnten jedoch lediglich bei dem Gen *53bp1* gefunden werden (Abbildung 35). Während die Expression von *53bp1* in der Netzhaut von Wt Mäusen über die Dauer der Kultur abnahm, blieb sie bei den *Lbr2* Mäusen auf einem stabilen Level von etwa zwei. Da der

einzigste Unterschied der beiden Mäuse in der Expression des Lamin B Rezeptors liegt, ist davon auszugehen, dass dies die Ursache für die unterschiedliche Expression darstellt. Um dies jedoch endgültig beweisen und gleichzeitig die Auswirkungen auf die DNA-Reparatur in den verschiedenen Netzhäuten bewerten zu können, sind weitere Untersuchungen nötig. 53BP1 hat neben der Förderung von NHEJ durch Einschränkung der Endresektion von DNA-DSB weitere Funktionen. Dazu zählt die Interaktion mit p53 und der Ubiquitin-spezifischen Protease USP28, welche die p53-vermittelten Transkription reguliert, was jedoch unabhängig von der Rolle in der DNA-DSB-Reparatur ist (Cuella-Martin et al., 2016). Zudem ist zu beachten, dass lediglich ein geringer Anteil der Stäbchen Photorezeptoren der *Lbr2* Maus die konventionelle Chromatinstruktur besitzt, was möglicherweise die Unterschiede in der Expression minimiert.

2.4 DNA-Reparatur in verschiedenen murinen Organen

Mitose findet in den Geweben von adulten Tieren und Menschen lediglich in manchen Organen statt. Nach abgeschlossener Entwicklung benötigen nicht alle Organe eine dauerhafte Zellteilung. So findet beispielsweise keine Zellteilung in Nervenzellen, die retinaspezifischen mit eingeschlossen, statt, ebenso wie in Muskelzellen und damit auch im Herzen. In Leber und Niere findet dagegen Mitose, falls nötig, statt. Sie verbleiben metabolisch aktiv und gehen nach Erhalt von molekularen Signalen in die G1 Phase über. Die Lunge besitzt mit ihren Lungenepithelzellen Kompartimente, die sich dauerhaft teilen. Auch im Hoden findet dauernd Mitose während der Spermatogenese statt (Cooper, 2000).

Tabelle 14: Zusammenfassung der Expression von NHEJ und HDR spezifischen Genen in murinen Geweben von Wt -Tieren, normalisiert auf Expression in der Retina. ↑: $\Delta\Delta Ct \geq 5$. ↓: $\Delta\Delta Ct \leq -5$. →: $-5 < \Delta\Delta Ct < 5$. Fett: Statistisch signifikantes Ergebnis.

Gewebe	NHEJ			HDR		
	<i>53bp1</i>	<i>Ku80</i>	<i>DNA-PKcs</i>	<i>CtIP</i>	<i>Rad50</i>	<i>Brca1</i>
Hoden	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Lunge	↑	↑	↑	↑	↑	→
Niere	→	→	→	→	→	↓
Gehirn	→	→	→	→	→	↓
Leber	→	→	↓	→	→	↓
Herz	→	→	↓	→	→	↓
Muskel	↓	→	↓	→	→	↓

Für einen besseren Überblick über die Ergebnisse in den einzelnen murinen Geweben, wurden sie in Tabelle 14 zusammengefasst und dadurch jedoch stark vereinfacht. Auffällig sind die Ergebnisse der Expressionen der DNA-Reparaturgene in Hoden und Lunge. Sie sind fast ausschließlich deutlich stärker exprimiert, als in der Retina. Eine mögliche Erklärung dafür wäre ihr Zellzyklusstatus. Beide Organe besitzen Zellen, die mitotisch aktiv sind. Damit

unterscheiden sie sich von allen anderen Organen, deren Zellen sich in den meisten Fällen in der G₀-Phase befinden. Es wurde damit also gezeigt, dass mitotisch aktive Zellen höhere Expressionsraten von DNA-Reparaturgenen aufweisen. Diese Erkenntnisse passen damit zu anderen Studien, die zeigten, dass sich die DNA-Reparaturmechanismen in mitotischen Zellen in einem semi-aktivierten Zustand befinden, selbst wenn akut kein DNA-Schaden vorliegt (Shang et al., 2014).

3. Zelltypspezifische Analyse der Expression

Zu Beginn dieser Arbeit wurden ausschließlich Analysen der gesamten Retina durchgeführt. Die Tatsache, dass Unterschiede der Proteinverteilung zwischen den verschiedenen retinalen Schichten gefunden wurden, machte die Untersuchung der einzelnen Zelltypen und –Schichten der Retina unabdingbar. So begann die Suche nach einer validen Methode, um Genexpressionsstudien der ONL und damit der Kerne der Photorezeptoren zu ermöglichen, die die späteren Zielzellen einer möglichen Genome Editing Therapie darstellen. Vorangegangene Versuche durch FACS Sort die Photorezeptoren von den anderen retinalen Zellen zu trennen, sind gescheitert. Deshalb kam es zur Nutzung der Lasermikrodissektion, die sich besonders gut für die Anwendung an heterogenen Geweben eignet. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit, eine kleine Anzahl an Zellen, einzelne Zellen oder sogar Zellorganelle zu isolieren (Chen et al., 2009; Satori et al., 2012). Außerdem ermöglicht diese Technologie die Isolation von lebenden Zellen. Zudem ist sie weniger zeitaufwendig als andere Mikrodissektions-Methoden. Gleichzeitig hat die Technik auch ein paar Nachteile. Zunächst ist es eine sehr teure Methode, da allein das Gerät und dazu die Verbrauchsmaterialien viel teurer sind, als gewöhnliche. Es werden beispielsweise spezielle Objektträger mit PEN-Membran benötigt. Weiterhin besteht das Risiko, dass die gewonnenen Proben nicht über ausreichende Qualität für weiterführende Analysen, wie der qPCR, verfügen. Daher sollte der Anwender ausreichend Zeit für Training der Methode und Troubleshooting einplanen, um gute Qualität der Proben sicherzustellen (Chung and Shen, 2015).

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, ist es eine zeitaufwendige aber gute Methode, um Genexpression in einzelnen retinalen Schichten messen zu können. Es konnten valide Marker für die ONL und innere Retina gefunden werden (Abbildung 36), wie schon zuvor von Hackler und Kollegen, die diese Methode dazu nutzen, um die Verteilung von MicroRNAs in den einzelnen retinalen Schichten zu untersuchen (Hackler et al., 2012, 2010). Auch Chung und Kollegen haben die Methode der LMD erfolgreich an der Retina angewandt. Sie isolierten spezielle retinale Zellen, um sie anschließend auf Genexpressionsebene bezüglich des mTOR Signalwegs zu untersuchen (Chung et al., 2013).

Weiterhin war in dieser Arbeit auch eine Analyse der Genexpression von DNA-Reparaturgenen in der organotypischen Retinakultur von Wt, *Rpgr* und *Lbr2* Mäusen bis zu Tag acht möglich. Dies ist ein wichtiger Schritt bei der Untersuchung der Retina auf Genebene. Vergleicht man die Ergebnisse der Expressionsstudien der einzelnen retinalen Schichten mit dem Ergebnis der gesamten Retina, hier am Beispiel der *Rpgr* Maus, so fällt auf, dass es deutliche Unterschiede gibt. Während die Expression der DNA-Reparaturgene in der gesamten Retina meist auf einem stabilen Level blieb, kam es bei den Untersuchungen in der ONL zu einem starken Anstieg in der Expression dieser Gene (Abbildung 44). Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Ergebnisse auf zwei unterschiedlichen House Keeping Genen basieren

und daher ein direkter Vergleich nur eingeschränkt möglich ist. Die Normalisierung der Ergebnisse durch ein Referenzgen ist von großer Bedeutung, um inter- und intrakinetische qPCR Variationen ausschließen zu können (Pfaffl and Hageleit, 2001).

Diese Ergebnisse zeigen, wie bedeutsam und aufschlussreich die Untersuchung einzelner retinaler Zelltypen und –Schichten ist. Deshalb sollten sich die zukünftigen Analysen von der gesamten Retina weg hin zu spezifischeren Analysen entwickeln, auch im Hinblick auf geplante Genome Editing Strategien in der Retina.

4. Ku80 in der murinen Retina

Das Protein Ku80, auch Xrcc5, ist bei Maus und Mensch homolog zueinander und ein Schlüsselprotein des NHEJ Reparaturwegs. Aufgrund der besonderen Lokalisation innerhalb der murinen Retina, gefunden durch immunhistochemische Färbungen durch Kollegen in der Arbeitsgruppe, sowie der Beobachtung eines deutlichen Anstiegs der Expression in der ONL, wurden weitere Analysen abgeschlossen.

Wie bereits Frohns und Kollegen beschrieben haben, konnte für Retinae von adulten Mäusen im Western Blot unter Verwendung eines Ku80 Antikörpers ein ausgeprägtes Signal gezeigt werden, was für die Anwesenheit des Proteins in der Retina spricht (Frohns et al., 2014). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, wenn auch das Signal deutlich schwächer ausgefallen ist (Abbildung 45).

Wie aus den dargestellten Ergebnissen deutlich wird, sind weitere Western Blots nötig, um eine eindeutige Aussage über das Vorhandensein und die Menge des Ku80 Proteins in den verschiedenen murinen Organen und Geweben treffen zu können. Da das Protokoll des Western Blots so viele Schritte umfasst, sind einige Möglichkeiten zur Optimierung vorhanden. Dazu zählt beispielsweise eine andere oder verbesserte Methode zur Lyse der Gewebe. Man könnte zusätzlich zur hier verwendeten Lyse Ultraschall einsetzen, um eine höhere Menge des Proteins isolieren zu können. Eine weitere Möglichkeit wäre einen anderen Antikörper zu testen, um unspezifische Bindungen ausschließen zu können. Wie vom Hersteller angegeben wurde, bindet der hier verwendete Antikörper am C-Terminus des Proteins.

In einer Arbeit von Tadi und Kollegen, in der Untersuchungen an Rattengeweben stattgefunden haben, wurden ebenfalls Banden unterschiedlicher Proteingröße im Western Blot mit Ku80 Antikörper detektiert (Tadi et al., 2016). An dieser Stelle wurde nicht weiter auf die Ursache dieser unterschiedlich großen Proteine eingegangen. Eine weitere mögliche Ursache für die unterschiedliche Größe des Proteins könnten post-translationale Modifikationen sein. So ist beispielsweise bei dem humanen KU80 Protein bekannt, dass durch PARP3 eine ADP-Ribosylierung stattfindet (Beck et al., 2014). Zudem könnten SUMOylierungen eine Rolle spielen (Gocke et al., 2005). Außerdem finden Phosphorylierungen durch PRKDC an Serinresten statt, was für die Erhöhung der Helikase-Aktivität sorgen könnte (Chan et al., 1999).

5. Ausblick

Die erfolgreiche Charakterisierung der organotypischen Retinakultur inklusive dem Wissen über die DNA-Reparaturgene, stellt einen wichtigen ersten Schritt bei der Aufklärung des Potentials zur Reparatur von DNA-DSB in der Retina dar. Die Möglichkeiten des Genome Editings erscheinen vielversprechend. Um die Reparaturmechanismen ausnutzen zu können, ist weiteres Wissen über den Status dieser Mechanismen nötig. Weiterhin könnten die Reparaturmechanismen beispielsweise durch Zugabe von Inhibitoren beeinflusst werden. So wurde bereits gezeigt, dass eine Inhibition von NHEJ zum direkten Anstieg der HDR Rate führte (Robert et al., 2015; Srivastava et al., 2012).

In der weiterführenden Charakterisierung der organotypischen Retinakultur sollte versucht werden, die Ergebnisse auf Genexpressionsebene durch Daten auf Proteinebene zu bestätigen oder zu konkretisieren. Dazu bieten sich Untersuchungen mittels Western Blot, Immunhistochemische Färbungen und Aktivitätsassays an.

Eine Optimierung der Kulturbedingungen für die Netzhaut könnte möglicherweise den Zeitraum zur Nutzung, der sich aktuell auf acht Tage beschränkt, vergrößern oder beispielsweise den Verlust des RNA-Gehalts reduzieren. Dazu wäre die Zugabe von Vitaminen oder Hormonen, wie z.B. Insulin oder Progesteron, zum Kulturmedium möglich (Donovan and Dyer, 2006; Gustmann and Dünker, 2010). Außerdem wäre ein Wechsel von der Maus- zur Schweineretina als Modellorganismus denkbar, da diese aufgrund ihrer Anatomie viel näher an der Situation des Menschen ist (Wang et al., 2011).

V Zusammenfassung

Zu den retinalen neurodegenerativen Erkrankungen zählt u.a. Retinitis Pigmentosa, eine Gruppe von erblichen retinalen Krankheiten, bei denen es durch das Absterben von Photorezeptoren zu einer Netzhautdegeneration kommt. Genome Editing stellt an dieser Stelle eine vielversprechende Therapiemöglichkeit dar. Durch den Einsatz hochspezifischer Nukleasen, die einen gezielten DSB in die DNA einfügen, kann mit Hilfe eines gesunden exogenen DNA-Templates das mutierte Gen ausgetauscht werden. Um die Anwendung und das Potenzial der Gentherapien zu überprüfen, bevor es am gesamten Organismus, der Maus, getestet wird, sollen organotypische Retinakulturen zum Einsatz kommen. Diese stellen ein Modellsystem dar, das physiologisch nah an der *in vivo* Situation ist, da neuronale Interaktionen der verschiedenen Zelltypen und –schichten erhalten bleiben. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Genexpression von DNA-Reparaturproteinen in der organotypischen Retinakultur von adulten Wt-, *Rpgr conditional knock-out* (B6J.Sv129-Rpgr^{tm1Sti}) und *Lbr2 knock-in* Mäusen untersucht werden. Ziel war es eine Grundlage zu schaffen, diese Methode als Modellsystem für das Studium gentherapeutischer Anwendungen zu etablieren und den Status der DNA-Reparaturmechanismen aufzuklären. Dazu wurden Netzhäute von adulten Wildtyp-, *Rpgr*-, und *Lbr2*-Mäusen bis zu acht Tage in Kultur genommen die Genexpression mittels qPCR untersucht. Es wurden ganze Netzhäute oder einzelne retinale Schichten, nach Lasermikrodissektion, zur Analyse verwendet. Bei den Analysen standen die NHEJ-Gene *53bp1*, *Ku80* und *DNA-PKcs* sowie die HDR-Gene *CtIP*, *Rad50* und *Bra1* im Fokus. Die Untersuchungen ergaben, dass die Kulturbedingungen durchaus einen großen Einfluss auf den allgemeinen Zustand der Retina haben, was sich durch starken Verlust des RNA-Gehalts auswirkt. Es zeigte sich zudem eine starke Abnahme der Rhodopsin-Expression, was vermutlich auf den Verlust zahlreicher Außensegmente der Photorezeptoren und des RPE zurückzuführen ist. Die starke Zunahme der Expression von Glia-spezifischen Genen weist auf eine Gliose in der Retinakultur hin. Die nahezu unveränderten Expressionsraten der NHEJ Reparaturgene in den Untersuchungen der gesamten Retina könnte ein Indiz für die reduzierte Effizienz der Reparatur von DSB in den Photorezeptoren sein. Es gibt Hinweise darauf, dass MMEJ einen möglichen alternativen Reparaturweg in der Retina darstellt. Der Vergleich der drei Mauslinien untereinander zeigte keine signifikanten Unterschiede. Es wurde jedoch gezeigt, dass eine Zellschicht-spezifische Analyse der Expression der Retina nötig ist, um eine detaillierte Grundlage für geplante Genome Editing Therapien zu schaffen. Durch die hier geleisteten Expressionsanalysen, zusammen mit den histologischen Untersuchungen durch Müller et al. (2017) lässt sich postulieren, dass die organotypische Retinakultur bis etwa zum achten Tag der Kultur für die gentherapeutische Anwendung genutzt werden kann. Sie könnte somit dazu beitragen, die gentherapeutischen Ansätze zu optimieren, bevor sie *in vivo* im Tierversuch angewendet werden. Dies soll auch zu einer deutlich niedrigeren Zahl an Versuchstieren beitragen.

VI Abstract

Retinal neurodegenerative diseases include Retinitis Pigmentosa, a group of hereditary retinal diseases, that result in retinal degeneration due to the death of photoreceptors. Genome Editing represents a promising therapeutic option. By using highly specific nucleases, which insert a targeted DSB into the DNA, the mutated gene can be exchanged with the help of a healthy exogenous DNA template. Prior to testing gene therapies on the entire organism of a mouse, retinal explants are being used to control the usage and potential. These retinal explants represent an *in vitro* system, which is physiologically very similar to the *in vivo* situation since neuronal interactions of different cell types and layers remain intact. In this work the expression of DNA repair genes in retinal explants of adult Wt, *Rpgr* conditional knock-out (B6J.Sv129-Rpgr^{tm1Sti}) and *Lbr2* knock-in (B6-Tg(pNRL-Lbr2)1) mice was studied. The aim was to establish this method as a model system for the study of gene therapeutic application as well as the analysis of the DNA repair status. For this purpose, retinas of adult Wt, *Rpgr* and *Lbr2* mice were kept in culture for up to eight days. Subsequently, gene expression was examined via qPCR experiments. Whole retina samples as well as single retinal layers were analyzed. We focused on the expression of *53bp1*, *Ku80* und *DNA-PKcs* (NHEJ Genes) as well as *Ctip*, *Rad50* und *Brca1* (HDR genes). This study shows that the culture conditions have a vast influence on the overall condition of the retina, which affects the RNA yield. Additionally an immense decrease of rhodopsin expression was noted, which was probably due to the loss of photoreceptor outer segments, as well as the loss of RPE. The strong increase in the expression of the glia specific genes indicates a gliosis in the retina culture. The nearly unchanged expression of NHEJ repair genes, could be a sign for reduced efficiency of DSB repair in photoreceptors. There is evidence that MMEJ could be an alternative repair mechanism in the retina. The comparison of the three mouse lines showed no significant differences in the expression of DNA repair genes. In contrast to this, the analysis of the expression in single retinal layers showed that a layer specific analysis is indispensable for future genome editing studies. The preliminarily achieved expression analyses combined with the histological studies of Müller et al. (2017) give evidence, that retinal explants can be used for gene therapeutic application up to eight days after being cultured. Thus, retinal explants can be applied to optimize gene therapeutic approaches, prior to application in animals *in vivo*. This could also lead to considerably lower numbers of experimental animals being used.

VII Appendix

1. Abkürzungen

% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
°C	Grad Celsius
μ	mikro- (10 ⁻⁶)
53BP1	<i>tumor protein p53 binding protein 1</i>
A	Adenin
A	Ampere
AAV	Adeno-assoziierte Viren
Abb.	Abbildung
Aif1	<i>Allograft inflammatory factor 1</i>
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BRCA1	<i>breast cancer 1</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
Ca	Calcium
CC	<i>connecting cilium</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CtIP	<i>CtBP-interacting protein</i>
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PKs	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch (<i>doublestrand break</i>)
E	Glutaminsäure
ECL	Elektrochemolumineszenz
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FIB	Fibroblasten
FKS	Fetales Kälberserum
fwd	vorwärts (<i>forward</i>)
g	Gramm
G	Guanin
G	Glycin

GAPDH	<i>Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase</i>
GCL	Ganglienzellschicht (<i>ganglion cell layer</i>)
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HDR	<i>homology directed repair</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
INL	innere Körnerschicht (<i>inner plexiform layer</i>)
IPL	innere plexiforme Schicht (<i>inner plexiform layer</i>)
iPSCs	Induzierte pluripotente Stammzellen (<i>induced pluripotent stem cells</i>)
iPS-PPC	Photorezeptor-ähnliche iPS
IS	Inneres Segment (<i>inner segment</i>)
K	Lysin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
LCA	Lebersche kongenitalen Amaurose
LBR	Lamin B Rezeptor
LMD	Lasermikrodissektion
m	milli- (10^{-3})
m	Meter
M	molar (mol/L)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MMEJ	<i>Microhomology-mediated end joining</i>
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
n	nano- (10^{-9})
N	Zellkern
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
Neg.	Negativkontrolle
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
OLM	äußere Grenzmembran (<i>outer limiting membrane</i>)
ONL	äußere Körnerschicht (<i>outer nuclear layer</i>)
OPL	äußere plexiforme Schicht (<i>outer plexiform layer</i>)
ORF15	<i>open reading frame 15</i>
OS	äußeres Segment (<i>outer segment</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerasechainreaction</i>)
PEN	Polyethylenphthalat
PKC α	Proteinkinase C alpha
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative PCR
R	Arginin
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RNA	Ribonukleinsäure

rev	rückwärts (<i>reverse</i>)
RP	Retinitis pigmentosa
RPE	retinales Pigmentepithel
RPGR	<i>Retinitis pigmentosa GTPase regulator</i>
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLB	<i>SDS Lysis Buffer</i>
T	Thymin
TALE	<i>transcriptional activator-like effectors</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Trp53bp1	<i>transformation related protein 53 binding protein</i>
V	Volt
XLRP	<i>X-linked retinitis pigmentosa</i>
z.B.	zum Beispiel
βME	Mercaptoethanol
γH2ax	phosphoryliertes H2ax

2. Literaturverzeichnis

- Ahrabi, S., Sarkar, S., Pfister, S.X., Pirovano, G., Higgins, G.S., Porter, A.C.G., Humphrey, T.C., 2016. A role for human homologous recombination factors in suppressing microhomology-mediated end joining. *Nucleic Acids Res.* 44, 5743–57. doi:10.1093/nar/gkw326
- Badie, S., Carlos, A.R., Folio, C., Okamoto, K., Bouwman, P., Jonkers, J., Tarsounas, M., 2015. BRCA1 and CtIP promote alternative non-homologous end-joining at uncapped telomeres. *EMBO J.* 34, 410–424. doi:10.15252/embj.201488947
- Baehr, W., Wu, S.M., Bird, A.C., Palczewski, K., 2003. The retinoid cycle and retina disease. *Vision Res.* 43, 2957–2958. doi:10.1016/J.VISRES.2003.10.001
- Bakondi, B., Lv, W., Lu, B., Jones, M.K., Tsai, Y., Kim, K.J., Levy, R., Akhtar, A.A., Breunig, J.J., Svendsen, C.N., Wang, S., 2015. In Vivo CRISPR/Cas9 Gene Editing Corrects Retinal Dystrophy in the S334ter-3 Rat Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Mol. Ther.* doi:10.1038/mt.2015.220
- Baleriola, J., Suárez, T., de la Rosa, E.J., 2010. DNA-PK promotes the survival of young neurons in the embryonic mouse retina. *Cell Death Differ.* 17, 1697–1706. doi:10.1038/cdd.2010.46
- Beck, C., Boehler, C., Guirouilh Barbat, J., Bonnet, M.-E., Illuzzi, G., Ronde, P., Gauthier, L.R., Magroun, N., Rajendran, A., Lopez, B.S., Scully, R., Boussin, F.D., Schreiber, V., Dantzer, F., 2014. PARP3 affects the relative contribution of homologous recombination and nonhomologous end-joining pathways. *Nucleic Acids Res.* 42, 5616–5632. doi:10.1093/nar/gku174
- Beltran, W.A., Cideciyan, A. V., Boye, S.E., Ye, G.-J., Iwabe, S., Dufour, V.L., Marinho, L.F., Swider, M., Kosyk, M.S., Sha, J., Boye, S.L., Peterson, J.J., Witherspoon, C.D., Alexander, J.J., Ying, G.-S., Shearman, M.S., Chulay, J.D., Hauswirth, W.W., Gamlin, P.D., Jacobson, S.G., Aguirre, G.D., 2017. Optimization of Retinal Gene Therapy for X-Linked Retinitis Pigmentosa Due to RPGR Mutations. *Mol. Ther.* 25, 1866–1880. doi:10.1016/j.ymthe.2017.05.004
- Beltran, W.A., Cideciyan, A. V., Lewin, A.S., Iwabe, S., Khanna, H., Sumaroka, A., Chiodo, V.A., Fajardo, D.S., Román, A.J., Deng, W.-T., Swider, M., Alemán, T.S., Boye, S.L., Genini, S., Swaroop, A., Hauswirth, W.W., Jacobson, S.G., Aguirre, G.D., 2012. Gene therapy rescues photoreceptor blindness in dogs and paves the way for treating human X-linked retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 2132–7. doi:10.1073/pnas.1118847109
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–54.
- Brandsma, I., Gent, D.C., 2012. Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr.* 3, 9. doi:10.1186/2041-9414-3-9
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S., Osborne, N., Reichenbach, A., 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 25, 397–424. doi:10.1016/j.preteyeres.2006.05.003
- Bringmann, A., Wiedemann, P., 2009. Involvement of Müller glial cells in epiretinal membrane formation. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 247, 865–883. doi:10.1007/s00417-009-1082-x
- Bull, N.D., Johnson, T. V, Welsapar, G., DeKorver, N.W., Tomarev, S.I., Martin, K.R., 2011. Use of an adult rat retinal explant model for screening of potential retinal ganglion cell neuroprotective therapies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 3309–20. doi:10.1167/iovs.10-6873

- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Campbell, M., Humphries, M.M., Humphries, P., 2013. Barrier modulation in drug delivery to the retina. *Methods Mol. Biol.* 935, 371–80. doi:10.1007/978-1-62703-080-9_26
- Cepko, C., 1993. Lineage versus environment in the embryonic retina. *Trends Neurosci.* 16, 96–7; author reply 98.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R.G., Boulton, S.J., 2012. Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Mol. Cell* 47, 497–510. doi:10.1016/j.molcel.2012.07.029
- Charteris, D.G., Downie, J., Aylward, G.W., Sethi, C., Luthert, P., 2007. Intraretinal and periretinal pathology in anterior proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 245, 93–100. doi:10.1007/s00417-006-0323-5
- Chen, C.-M., Lee, J.-A., Yen, C.-F., 2009. Improvement in resolution of laser capture microdissection using near-field probe to capture nanoparticles. *IEEE Trans. Nanobioscience* 8, 113–9. doi:10.1109/TNB.2009.2019698
- Chu, V.T., Weber, T., Wefers, B., Wurst, W., Sander, S., Rajewsky, K., Kühn, R., 2015. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 33, 543–548. doi:10.1038/nbt.3198
- Chung, S.H., Shen, W., 2015. Laser capture microdissection: from its principle to applications in research on neurodegeneration. *Neural Regen. Res.* 10, 897–8. doi:10.4103/1673-5374.158346
- Chung, S.H., Shen, W., Gillies, M.C., 2013. Laser Capture Microdissection-Directed Profiling of Glycolytic and mTOR Pathways in Areas of Selectively Ablated Müller Cells in the Murine Retina 6578–6584. doi:10.1167/iovs.13-12311
- Cooper, G.M., 2000. *The Eukaryotic Cell Cycle*.
- Cuella-Martin, R., Oliveira, C., Lockstone, H.E., Snellenberg, S., Grolmusova, N., Chapman, J.R., 2016. 53BP1 Integrates DNA Repair and p53-Dependent Cell Fate Decisions via Distinct Mechanisms. *Mol. Cell* 64, 51–64. doi:10.1016/J.MOLCEL.2016.08.002
- Cuenca, N., Fernández-Sánchez, L., Campello, L., Maneu, V., De la Villa, P., Lax, P., Pinilla, I., 2014. Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Prog. Retin. Eye Res.* 43, 1–59. doi:10.1016/j.preteyeres.2014.07.001
- Daiger, S.P., Bowne, S.J., Sullivan, L.S., 2007. Perspective on Genes and Mutations Causing Retinitis Pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.* 125, 151. doi:10.1001/archophth.125.2.151
- Deng, S.K., Gibb, B., de Almeida, M.J., Greene, E.C., Symington, L.S., 2014. RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 405–12. doi:10.1038/nsmb.2786
- Deng, W.-T., Dyka, F.M., Dinculescu, A., Li, J., Zhu, P., Chiodo, V.A., Boye, S.L., Conlon, T.J., Erger, K., Cossette, T., Hauswirth, W.W., 2015. Stability and Safety of an AAV Vector for Treating *RPGR-ORF15* X-Linked Retinitis Pigmentosa. *Hum. Gene Ther.* 26, 593–602. doi:10.1089/hum.2015.035
- Donovan, S.L., Dyer, M. a, 2006. Preparation and square wave electroporation of retinal explant cultures. *Nat. Protoc.* 1, 2710–8. doi:10.1038/nprot.2006.454
- Doug W. Chan, Ruiqiong Ye, Christian J. Veillette, and, Lees-Miller*, S.P., 1999. DNA-Dependent Protein Kinase Phosphorylation Sites in Ku 70/80 Heterodimer†.
- Dyer, M.A., Cepko, C.L., 2001. Regulating proliferation during retinal development. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 333–342. doi:10.1038/35072555

- Falk, M., Feodorova, Y., Naumova, N., Imakaev, M., Lajoie, B.R., Leonhardt, H., Joffe, B., Dekker, J., Fudenberg, G., Solovei, I., Mirny, L., 2018. Heterochromatin drives organization of conventional and inverted nuclei. *bioRxiv* 244038. doi:10.1101/244038
- Ferrari, S., Di Iorio, E., Barbaro, V., Ponzin, D., S. Sorrentino, F., Parmeggiani, F., 2011. Retinitis Pigmentosa: Genes and Disease Mechanisms. *Curr. Genomics* 12, 238–249. doi:10.2174/138920211795860107
- Fischer, M.D., McClements, M.E., Martinez-Fernandez de la Camara, C., Bellingrath, J.-S., Dauletbekov, D., Ramsden, S.C., Hickey, D.G., Barnard, A.R., MacLaren, R.E., 2017. Codon-Optimized RPGR Improves Stability and Efficacy of AAV8 Gene Therapy in Two Mouse Models of X-Linked Retinitis Pigmentosa. *Mol. Ther.* 25, 1854–1865. doi:10.1016/j.ymthe.2017.05.005
- Fonfara, I., Curth, U., Pingoud, A., Wende, W., 2012. Creating highly specific nucleases by fusion of active restriction endonucleases and catalytically inactive homing endonucleases. *Nucleic Acids Res.* 40, 847–860. doi:10.1093/nar/gkr788
- Frohns, A., Frohns, F., Naumann, S.C., Layer, P.G., Löbrich, M., 2014. Inefficient double-strand break repair in murine rod photoreceptors with inverted heterochromatin organization. *Curr. Biol.* 24, 1080–1090. doi:10.1016/j.cub.2014.03.061
- Gabsalilow, L., Schierling, B., Friedhoff, P., Pingoud, A., Wende, W., 2013. Site- and strand-specific nicking of DNA by fusion proteins derived from MutH and I-SceI or TALE repeats. *Nucleic Acids Res.* 41, e83. doi:10.1093/nar/gkt080
- Gancharova, O.S., Manskikh, V.N., Zamyatnin, A.A., Philippov, P.P., 2013. Organotypic culture of neural retina as a research model of neurodegeneration of ganglion cells. *Biochemistry. (Mosc).* 78, 1280–6. doi:10.1134/S0006297913110084
- Ginjala, V., Nacerddine, K., Kulkarni, A., Oza, J., Hill, S.J., Yao, M., Citterio, E., van Lohuizen, M., Ganesan, S., 2011. BMI1 Is Recruited to DNA Breaks and Contributes to DNA Damage-Induced H2A Ubiquitination and Repair. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1972–1982. doi:10.1128/MCB.00981-10
- Gocke, C.B., Yu, H., Kang, J., 2005. Systematic Identification and Analysis of Mammalian Small Ubiquitin-like Modifier Substrates. *J. Biol. Chem.* 280, 5004–5012. doi:10.1074/jbc.M411718200
- Greferath, U., Grünert, U., Wässle, H., 1990. Rod bipolar cells in the mammalian retina show protein kinase C-like immunoreactivity. *J. Comp. Neurol.* 301, 433–442. doi:10.1002/cne.903010308
- Grimm, D., 2009. Small silencing RNAs: State-of-the-art. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 672–703. doi:10.1016/j.addr.2009.05.002
- Guadagni, V., Novelli, E., Piano, I., Gargini, C., Strettoi, E., 2015. Pharmacological approaches to retinitis pigmentosa: A laboratory perspective. *Prog. Retin. Eye Res.* 48, 62–81. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.06.005
- Gustmann, S., Dünker, N., 2010. In vivo-like organotypic murine retinal wholemount culture. *J. Vis. Exp.* doi:10.3791/1634
- Hackler, L., Masuda, T., Oliver, V.F., Merbs, S.L., Zack, D.J., 2012. Use of laser capture microdissection for analysis of retinal mRNA/miRNA expression and DNA methylation. *Methods Mol. Biol.* 884, 289–304. doi:10.1007/978-1-61779-848-1_21
- Hackler, L., Wan, J., Swaroop, A., Qian, J., Zack, D.J., Zack, D.J., 2010. MicroRNA profile of the developing mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 1823–31. doi:10.1167/iovs.09-4657
- Hartong, D.T., Berson, E.L., Dryja, T.P., 2006. Retinitis pigmentosa. *Lancet* 368, 1795–1809. doi:10.1016/S0140-6736(06)69740-7
- Holthausen, J.T., Wyman, C., Kanaar, R., 2010. Regulation of DNA strand exchange in homologous recombination. *DNA Repair (Amst).* 9, 1264–72.

- doi:10.1016/j.dnarep.2010.09.014
- Hong, D.-H., Li, T., 2002. Complex expression pattern of RPGR reveals a role for purine-rich exonic splicing enhancers. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 3373–82.
- Imai, Y., Kohsaka, S., 2002. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: Role of Iba1. *Glia* 40, 164–174. doi:10.1002/glia.10149
- Iyama, T., Wilson, D.M., 2013. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)*. 12, 620–36. doi:10.1016/j.dnarep.2013.04.015
- 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 Res.* 44, 1615–22. doi:10.1016/j.visres.2004.01.016
- Jeon, C.J., Strettoi, E., Masland, R.H., 1998. The major cell populations of the mouse retina. *J. Neurosci.* 18, 8936–46. doi:10.1523/JNEUROSCI.18-21-08936.1998
- Jones, B.W., Marc, R.E., 2005. Retinal remodeling during retinal degeneration. *Exp. Eye Res.* 81, 123–137. doi:10.1016/j.exer.2005.03.006
- Karlstetter, M., Scholz, R., Rutar, M., Wong, W.T., Provis, J.M., Langmann, T., 2014. Retinal Microglia: Just Bystander or Target for Therapy? *Prog. Retin. Eye Res.* 1–28. doi:10.1016/j.preteyeres.2014.11.004
- Kay, M.A., 2011. State-of-the-art gene-based therapies: the road ahead. *Nat. Rev. Genet.* 12, 316–328. doi:10.1038/nrg2971
- Kim, S.-I., Matsumoto, T., Kagawa, H., Nakamura, M., Hirohata, R., Ueno, A., Ohishi, M., Sakuma, T., Soga, T., Yamamoto, T., Woltjen, K., 2018. Microhomology-assisted scarless genome editing in human iPSCs. *Nat. Commun.* 9, 939. doi:10.1038/s41467-018-03044-y
- Kolb, H., 2003. How the Retina Works. *Am. Sci.* 91.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–5.
- Lamarche, B.J., Orazio, N.I., Weitzman, M.D., 2010. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett.* 584, 3682–95. doi:10.1016/j.febslet.2010.07.029
- Lamb, T.D., Collin, S.P., Pugh, E.N., 2007. Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 960–976. doi:10.1038/nrn2283
- Langerak, P., Russell, P., 2011. Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 366, 3562–3571. doi:10.1098/rstb.2011.0070
- Laucke, L.L., 2017. Untersuchung zur morphologischen Integrität der organotypischen Retinakultur von adulten C57Bl6 Mäusen. Justus-Liebig Universität Gießen.
- Lewis, G.P., Fisher, S.K., 2003. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int. Rev. Cytol.* 230, 263–90.
- Li, G., Liu, D., Zhang, X., Quan, R., Zhong, C., Mo, J., Huang, Y., Wang, H., Ruan, X., Xu, Z., Zheng, E., Gu, T., Hong, L., Li, Z., Wu, Z., Yang, H., 2018. Suppressing Ku70/Ku80 expression elevates homology-directed repair efficiency in primary fibroblasts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 99, 154–160. doi:10.1016/j.biocel.2018.04.011
- Liberto, C.M., Albrecht, P.J., Herx, L.M., Yong, V.W., Levison, S.W., 2004. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J. Neurochem.* 89, 1092–100. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02420.x
- Ma, J.-L., Kim, E.M., Haber, J.E., Lee, S.E., 2003. Yeast Mre11 and Rad1 proteins define a Ku-independent mechanism to repair double-strand breaks lacking overlapping end sequences. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8820–8.

- Maerker, T., van Wijk, E., Overlack, N., Kersten, F.F., McGee, J., Goldmann, T., Sehn, E., Roepman, R., Walsh, E.J., Kremer, H., Wolfrum, U., 2008. A novel Usher protein network at the periciliary reloading point between molecular transport machineries in vertebrate photoreceptor cells. doi:10.1093/hmg/ddm285
- Maguire, A.M., Simonelli, F., Pierce, E.A., Pugh, E.N., Mingozzi, F., Bennicelli, J., Banfi, S., Marshall, K.A., Testa, F., Surace, E.M., Rossi, S., Lyubarsky, A., Arruda, V.R., Konkle, B., Stone, E., Sun, J., Jacobs, J., Dell'Osso, L., Hertle, R., Ma, J., Redmond, T.M., Zhu, X., et al., 2008. Safety and Efficacy of Gene Transfer for Leber's Congenital Amaurosis. *N. Engl. J. Med.* 358, 2240–2248. doi:10.1056/NEJMoa0802315
- Makharashvili, N., Tubbs, A.T., Yang, S.-H., Wang, H., Barton, O., Zhou, Y., Deshpande, R.A., Lee, J.-H., Loblrich, M., Sleckman, B.P., Wu, X., Paull, T.T., 2014. Catalytic and noncatalytic roles of the CtIP endonuclease in double-strand break end resection. *Mol. Cell* 54, 1022–33. doi:10.1016/j.molcel.2014.04.011
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., Gorbunova, V., 2008. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA Repair (Amst)*. 7, 1765–1771. doi:10.1016/J.DNAREP.2008.06.018
- Marc, R.E., Jones, B.W., Anderson, J.R., Kinard, K., Marshak, D.W., Wilson, J.H., Wensel, T., Lucas, R.J., 2007. Neural Reprogramming in Retinal Degeneration. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 48, 3364. doi:10.1167/iovs.07-0032
- Martinez-Fernandez De La Camara, C., Nanda, A., Salvetti, A.P., Fischer, M.D., MacLaren, R.E., 2018. Gene therapy for the treatment of X-linked retinitis pigmentosa. *Expert Opin. orphan drugs* 6, 167–177. doi:10.1080/21678707.2018.1444476
- McVey, M., Lee, S.E., 2008. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet.* 24, 529–38. doi:10.1016/j.tig.2008.08.007
- Megaw, R.D., Soares, D.C., Wright, A.F., 2015. RPGR: Its role in photoreceptor physiology, human disease, and future therapies. *Exp. Eye Res.* 138, 32–41. doi:10.1016/j.exer.2015.06.007
- Meindl, A., Dry, K., Herrmann, K., Manson, E., Ciccodicola, A., Edgar, A., Carvalho, M.R.S., Achatz, H., Hellebrand, H., Lennon, A., Migliaccio, C., Porter, K., Zrenner, E., Bird, A., Jay, M., Lorenz, B., Wittwer, B., D'Urso, M., Meitinger, T., Wright, A., 1996. A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Nat. Genet.* 13, 35–42. doi:10.1038/ng0596-35
- Mimitou, E.P., Symington, L.S., 2009. Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem. Sci.* 34, 264–272. doi:10.1016/j.tibs.2009.01.010
- Morales, J.C., Franco, S., Murphy, M.M., Bassing, C.H., Mills, K.D., Adams, M.M., Walsh, N.C., Manis, J.P., Rassidakis, G.Z., Alt, F.W., Carpenter, P.B., 2006. 53BP1 and p53 synergize to suppress genomic instability and lymphomagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3310–5. doi:10.1073/pnas.0511259103
- Müller, B., 2019. Organotypic Culture of Adult Mouse Retina. Humana Press, New York, NY, pp. 181–191. doi:10.1007/978-1-4939-9086-3_13
- Müller, B., Ellinwood, N.M., Lorenz, B., Stieger, K., 2018. Detection of DNA Double Strand Breaks by γ H2AX Does Not Result in 53bp1 Recruitment in Mouse Retinal Tissues. *Front. Neurosci.* 12, 286. doi:10.3389/fnins.2018.00286
- Müller, B., Wagner, F., Lorenz, B., Stieger, K., 2017. Organotypic Cultures of Adult Mouse Retina: Morphologic Changes and Gene Expression. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 58, 1930. doi:10.1167/iovs.16-20718
- Nathans, J., Thomas, D., Hogness, D.S., 1986. Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments. *Science* 232, 193–202.

- Neal, J.A., Meek, K., 2011. Choosing the right path: does DNA-PK help make the decision? *Mutat Res* 711, 73–86. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.02.010
- Ogilvie, J.M., Speck, J.D., Lett, J.M., Fleming, T.T., 1999. A reliable method for organ culture of neonatal mouse retina with long-term survival. *J. Neurosci. Methods* 87, 57–65.
- Pfaffl, M.W., Hageleit, M., 2001. Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnol. Lett.* 23, 275–282. doi:10.1023/A:1005658330108
- Pingoud, A., Wende, W., 2011. Generation of Novel Nucleases with Extended Specificity by Rational and Combinatorial Strategies. *ChemBioChem* 12, 1495–1500. doi:10.1002/cbic.201100055
- Puthussery, T., Gayet-Primo, J., Taylor, W.R., 2010. Localization of the calcium-binding protein secretagogin in cone bipolar cells of the mammalian retina. *J. Comp. Neurol.* 518, 513–525. doi:10.1002/cne.22234
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., Zhang, F., 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 8, 2281–2308. doi:10.1038/nprot.2013.143
- Rao, K.N., Li, L., Zhang, W., Brush, R.S., Rajala, R.V.S., Khanna, H., 2016. Loss of human disease protein retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) differentially affects rod or cone-enriched retina. *Hum. Mol. Genet.* 25, 1345–1356. doi:10.1093/hmg/ddw017
- Reichenbach, A., Robinson, S.R., 1995. Phylogenetic constraints on retinal organisation and development. *Prog. Retin. Eye Res.* 15, 139–171. doi:10.1016/1350-9462(95)00008-9
- Reidel, B., Orisme, W., Goldmann, T., Smith, W.C., Wolfrum, U., 2006. Photoreceptor vitality in organotypic cultures of mature vertebrate retinas validated by light-dependent molecular movements. *Vision Res.* 46, 4464–4471. doi:10.1016/J.VISRES.2006.07.019
- Robert, F., Barbeau, M., Éthier, S., Dostie, J., Pelletier, J., 2015. Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing. *Genome Med.* 7, 93. doi:10.1186/s13073-015-0215-6
- Rocha-Martins, M., Njaine, B., Silveira, M.S., 2012. Avoiding pitfalls of internal controls: validation of reference genes for analysis by qRT-PCR and Western blot throughout rat retinal development. *PLoS One* 7, e43028. doi:10.1371/journal.pone.0043028
- Roof, D.J., Adamian, M., Hayes, A., 1994. Rhodopsin accumulation at abnormal sites in retinas of mice with a human P23H rhodopsin transgene. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 4049–62.
- Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique.*
- Satori, C.P., Kostal, V., Arriaga, E.A., 2012. Review on recent advances in the analysis of isolated organelles. *Anal. Chim. Acta* 753, 8–18. doi:10.1016/j.aca.2012.09.041
- Schipler, A., Iliakis, G., 2013. DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice. *Nucleic Acids Res.* 41, 7589–7605. doi:10.1093/nar/gkt556
- Schlegel, J., Hoffmann, J., Röhl, D., Müller, B., Günther, S., Zhang, W., Janise, A., Vössing, C., Fühler, B., Neidhardt, J., Khanna, H., Lorenz, B., Stieger, K., 2018. Toward genome editing in X-linked RP-development of a mouse model with specific treatment relevant features. *Transl. Res.* 0. doi:10.1016/j.trsl.2018.08.006
- Schneider, L., Fumagalli, M., d’Adda di Fagagna, F., 2012. Terminally differentiated astrocytes lack DNA damage response signaling and are radioresistant but retain DNA repair proficiency. *Cell Death Differ.* 19, 582–591. doi:10.1038/cdd.2011.129
- Shang, Z., Yu, L., Lin, Y.-F., Matsunaga, S., Shen, C.-Y., Chen, B.P.C., 2014. DNA-PKcs activates the Chk2-Brca1 pathway during mitosis to ensure chromosomal stability. *Oncogenesis* 3, e85. doi:10.1038/oncsis.2013.49
- Solovei, I., Kreysing, M., Lanctôt, C., Kösem, S., Peichl, L., Cremer, T., Guck, J., Joffe, B.,

2009. Nuclear Architecture of Rod Photoreceptor Cells Adapts to Vision in Mammalian Evolution. *Cell* 137, 356–368. doi:10.1016/j.cell.2009.01.052
- Solovei, I., Thanisch, K., Feodorova, Y., 2016. How to rule the nucleus: divide et impera. *Curr. Opin. Cell Biol.* 40, 47–59. doi:10.1016/j.ceb.2016.02.014
- Solovei, I., Wang, A.S., Thanisch, K., Schmidt, C.S., Krebs, S., Zwerger, M., Cohen, T. V., Devys, D., Foisner, R., Peichl, L., Herrmann, H., Blum, H., Engelkamp, D., Stewart, C.L., Leonhardt, H., Joffe, B., 2013. LBR and lamin A/C sequentially tether peripheral heterochromatin and inversely regulate differentiation. *Cell* 152, 584–98. doi:10.1016/j.cell.2013.01.009
- Srivastava, M., Nambiar, M., Sharma, S., Karki, S.S., Goldsmith, G., Hegde, M., Kumar, S., Pandey, M., Singh, R.K., Ray, P., Natarajan, R., Kelkar, M., De, A., Choudhary, B., Raghavan, S.C., 2012. An inhibitor of nonhomologous end-joining abrogates double-strand break repair and impedes cancer progression. *Cell* 151, 1474–87. doi:10.1016/j.cell.2012.11.054
- Stieger, K., Lhériteau, E., Lhériteau, E., Moullier, P., Rolling, F., 2009. AAV-mediated gene therapy for retinal disorders in large animal models. *ILAR J.* 50, 206–24.
- Stieger, K., Lorenz, B., 2010. Gene therapy for vision loss -- recent developments. *Discov. Med.* 10, 425–33.
- Stone, J., Dreher, Z., 1987. Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J. Comp. Neurol.* 255, 35–49. doi:10.1002/cne.902550104
- Strauss, O., 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* 85, 845–81. doi:10.1152/physrev.00021.2004
- Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J., Kim, E.J., Hatanaka, F., Yamamoto, M., Araoka, T., Li, Z., Kurita, M., Hishida, T., Li, M., Aizawa, E., Guo, S., Chen, S., Goebel, A., Soligalla, R.D., Qu, J., Jiang, T., Fu, X., Jafari, M., Esteban, C.R., Berggren, W.T., Lajara, J., Nuñez-Delicado, E., Guillen, P., Campistol, J.M., Matsuzaki, F., Liu, G.H., Magistretti, P., Zhang, Kun, Callaway, E.M., Zhang, Kang, Belmonte, J.C.I., 2016. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* 540, 144–149. doi:10.1038/nature20565
- Tadi, S.K., Sebastian, R., Dahal, S., Babu, R.K., Choudhary, B., Raghavan, S.C., 2016. Microhomology-mediated end joining is the principal mediator of double-strand break repair during mitochondrial DNA lesions. *Mol. Biol. Cell* 27, 223–35. doi:10.1091/mbc.E15-05-0260
- Tang, P.H., Kono, M., Koutalos, Y., Ablonczy, Z., Crouch, R.K., 2013. New insights into retinoid metabolism and cycling within the retina., *Progress in retinal and eye research.* doi:10.1016/j.preteyeres.2012.09.002
- Thanos, S., Kacza, J., Seeger, J., Mey, J., 1994. Old dyes for new scopes: the phagocytosis-dependent long-term fluorescence labelling of microglial cells in vivo. *Trends Neurosci.* 17, 177–182. doi:10.1016/0166-2236(94)90098-1
- Truong, L.N., Li, Y., Shi, L.Z., Hwang, P.Y.-H., He, J., Wang, H., Razavian, N., Berns, M.W., Wu, X., 2013. Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 7720–5. doi:10.1073/pnas.1213431110
- van Steensel, B., Belmont, A.S., 2017. Lamina-Associated Domains: Links with Chromosome Architecture, Heterochromatin, and Gene Repression. *Cell* 169, 780–791. doi:10.1016/j.cell.2017.04.022
- Vecino, E., Rodriguez, F.D., Ruzafa, N., Pereiro, X., Sharma, S.C., 2016. Glia–neuron interactions in the mammalian retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 51, 1–40. doi:10.1016/J.PRETEYERES.2015.06.003
- Veleri, S., Lazar, C.H., Chang, B., Sieving, P.A., Banin, E., Swaroop, A., 2015. Biology and

- therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models. *Dis. Model. Mech.* 8, 109–29. doi:10.1242/dmm.017913
- Vervoort, R., Lennon, A., Bird, A.C., Tulloch, B., Axton, R., Miano, M.G., Meindl, A., Meitinger, T., Ciccodicola, A., Wright, A.F., 2000. Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 25, 462–466. doi:10.1038/78182
- Villegas-Pérez, M.P., Lawrence, J.M., Vidal-Sanz, M., Lavail, M.M., Lund, R.D., 1998. Ganglion cell loss in RCS rat retina: a result of compression of axons by contracting intraretinal vessels linked to the pigment epithelium. *J. Comp. Neurol.* 392, 58–77.
- Wang, H., Li, Y., Truong, L.N., Shi, L.Z., Hwang, P.Y.-H., He, J., Do, J., Cho, M.J., Li, H., Negrete, A., Shiloach, J., Berns, M.W., Shen, B., Chen, L., Wu, X., 2014. CtIP maintains stability at common fragile sites and inverted repeats by end resection-independent endonuclease activity. *Mol. Cell* 54, 1012–21. doi:10.1016/j.molcel.2014.04.012
- Wang, H., Xu, X., 2017. Microhomology-mediated end joining: new players join the team. *Cell Biosci.* 7, 6. doi:10.1186/s13578-017-0136-8
- Wang, J., Kolomeyer, A.M., Zarbin, M.A., Townes-Anderson, E., 2011. Organotypic culture of full-thickness adult porcine retina. *J. Vis. Exp.* doi:10.3791/2655
- Ward, I.M., Minn, K., Deursen, J. Van, Chen, J., 2003. p53 Binding Protein 53BP1 Is Required for DNA Damage Responses and Tumor Suppression in Mice These include : p53 Binding Protein 53BP1 Is Required for DNA Damage Responses and Tumor Suppression in Mice 23, 2556–2563. doi:10.1128/MCB.23.7.2556
- Wolfe, J.H., 2009. Gene therapy in large animal models of human genetic diseases. *Introduction. ILAR J.* 50, 107–11.
- Wright, R.N., Hong, D.-H., Perkins, B., 2011. Misexpression of the Constitutive Rppg^{ex1-19} Variant Leads to Severe Photoreceptor Degeneration. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 52, 5189. doi:10.1167/iovs.11-7470
- Yan, H., Toczylowski, T., McCane, J., Chen, C., Liao, S., 2011. Replication protein A promotes 5'→3' end processing during homology-dependent DNA double-strand break repair. *J. Cell Biol.* 192, 251–261. doi:10.1083/jcb.201005110
- Yanik, M., Müller, B., Song, F., Gall, J., Wagner, F., Wende, W., Lorenz, B., Stieger, K., 2017a. In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies. *Prog. Retin. Eye Res.* 56, 1–18. doi:10.1016/j.preteyeres.2016.09.001
- Yanik, M., Wende, W., Stieger, K., 2017b. Genome Editing Tools und ihr Einsatz in der experimentellen Augenheilkunde. *Klin. Monbl. Augenheilkd.* 234, 329–334. doi:10.1055/s-0042-119205
- Yu, W.-Q., Eom, Y.S., Shin, J.-A., Nair, D., Grzywacz, S.X.Z., Grzywacz, N.M., Craft, C.M., Lee, E.-J., 2016. Reshaping the Cone-Mosaic in a Rat Model of Retinitis Pigmentosa: Modulatory Role of ZO-1 Expression in DL-Alpha-Aminoadipic Acid Reshaping. *PLoS One* 11, e0151668. doi:10.1371/journal.pone.0151668
- Yuan, J., Adamski, R., Chen, J., 2010. Focus on histone variant H2AX: To be or not to be. *FEBS Lett.* 584, 3717–3724. doi:10.1016/j.febslet.2010.05.021
- Yun, M.H., Hiom, K., 2009. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature* 459, 460–3. doi:10.1038/nature07955
- Zhang, X., Paull, T.T., 2005. The Mre11/Rad50/Xrs2 complex and non-homologous end-joining of incompatible ends in *S. cerevisiae*. *DNA Repair (Amst).* 4, 1281–94. doi:10.1016/j.dnarep.2005.06.011
- Zhu, L., Mon, H., Xu, J., Lee, J.M., Kusakabe, T., 2015. CRISPR/Cas9-mediated knockout of factors in non-homologous end joining pathway enhances gene targeting in silkworm cells. *Sci. Rep.* 5, 18103. doi:10.1038/srep18103

3. Publikationen und Präsentationen

Publikationen

Müller, B., **Wagner, F.**, Lorenz, B., Stieger, K., 2017. Organotypic Cultures of Adult Mouse Retina: Morphologic Changes and Gene Expression. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 58, 1930. doi:10.1167/iovs.16-20718

Yanik, M., Müller, B., Song, F., Gall, J., **Wagner, F.**, Wende, W., Lorenz, B., Stieger, K., 2017. In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies. *Prog. Retin. Eye Res.* 56, 1–18. doi:10.1016/j.preteyeres.2016.09.001

Präsentationen

Wagner, F., Müller, B., Laucke L., Rheinhard, W., Lorenz, B., Stieger K., 2019. Unexpected Localization of the DNA Repair Protein Ku80 within the Murine Retina. ProRetina Meeting, Potsdam.

Wagner, F., Müller, B., Lorenz, B., Stieger, K., 2018. Gene expression studies of DNA repair proteins in single layers compared to the whole retina. GGL Conference on Life Sciences, Gießen.

Wagner, F., Müller, B., Stieger, K., 2017. Gene Expression Studies on Organotypic Cultures of Adult Mouse Retina: A Model System for Gene Therapeutic Approaches. Sensory Disease Meeting, Radboud University Nijmegen, Niederlande.

Wagner, F., Müller, B., Stieger, K., 2017. The status of DNA repair mechanisms in the healthy and degenerating retina. Young Researcher Vision Camp, Schloss Wildenstein.

Wagner, F., Müller, B., Stieger, K., 2017. The status of DNA repair mechanisms in the healthy and degenerating retina. GGL Conference on Life Sciences, Gießen.

Wagner, F., Müller, B., Stieger, K., 2016. Gene expression profiles of DNA repair proteins in the retina, retinal explant cultures and somatic tissues to study genome editing mechanisms. GGL Conference on Life Sciences, Gießen.

4. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Reinhard Dammann für die Übernahme meiner Betreuung am Fachbereich Biologie als mein Doktorvater, seine wissenschaftliche Unterstützung und die hilfreichen Anregungen zu dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger danke ich für die großartige Betreuung der Arbeit und Überlassung dieses Themas, das damit verbundene Vertrauen in meine Arbeit und mein Können, sowie die stetige wissenschaftliche Unterstützung.

Bei Frau Prof. Dr. Birgit Lorenz möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die hilfreichen Anregungen während meiner Zeit in der Augenklinik bedanken.

Herrn PD Dr. Markus Preising danke ich für die gute Leitung des Labors sowie für den wissenschaftlichen Austausch.

Ich danke Dr. Brigitte Müller für die herausragende Betreuung, ihre Geduld, ihr Verständnis, ihr offenes Ohr und die Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit, besonders im Hinblick auf die Lasermikrodissektion.

Bärbel Fühler möchte ich für die großartige und zuverlässige Unterstützung bei dem Anfertigen der Retinakulturen danken. Die Zeit im Tierstall hat mir immer große Freude bereitet und die Verwaltung der Tiere war eine riesige Entlastung.

Rob Collin danke ich für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes an der Radboud University in Nijmegen sowie den wissenschaftlichen Austausch. Damit verbunden möchte ich auch Alex Garanto und den anderen Mitgliedern der AG „Genetic therapy for inherited retinal disease“ für jegliche Unterstützung in Nijmegen danken.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Surya Prakash G. Ponnampaloor für seine herzliche und ehrliche Art danken, sowie für die Möglichkeit, eine bis dato fremde Kultur kennenlernen zu dürfen.

Ein weiterer Dank gilt der AG Prof. Weißmann, insbesondere Ingrid Breitenborn-Müller, für die Bereitstellung des Laser Mikrodissektionsmikroskops, die gute Zusammenarbeit und die außergewöhnliche Hilfsbereitschaft.

Ich danke Annabella Janise für die kompetente Hilfe bei allen Fragen bezüglich des Labors, sowie für den offenen und ehrlichen Austausch zu allen möglichen anderen Themen.

Natürlich möchte ich auch der gesamten Arbeitsgruppe der Experimentellen Ophthalmologie für das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und die Hilfsbereitschaft jedes einzelnen danken. Im Besonderen gilt dieser Dank Jacky, Constanze, Christin und Jessy, die für mich die Zeit unvergesslich gemacht haben und darüber hinaus zu sehr guten Freundinnen geworden sind.

Außerdem möchte ich meinen fleißigen Korrekturleserinnen Angelina Arnold, Carina Lepper, Elisabeth Jürgens und Michelle Woods danken.

Ein besonderer Dank gilt schließlich meiner Familie, die mir während der Zeit der Promotion bedingungslosen Rückhalt im Leben gegeben hat. Ich danke meinem Freund Thomas und seinem wundervollen Sohn Jonas für die große Geduld und positive Energie, die sie mir jeden Tag entgegen bringen. Der größte Dank gebührt meinen liebevollen Eltern! Sie haben mich während des gesamten Studiums immer unterstützt, an mich geglaubt und motiviert.