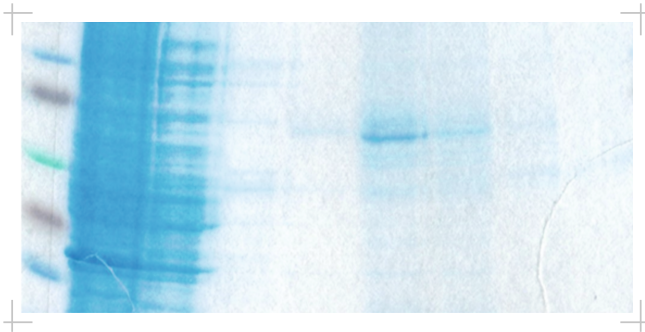


MIRJAM JULIA LAUX

---

Klonierung und Expression des murinen  
RPGR Exon<sup>1-19</sup>



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

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2019

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2019

© 2019 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: redaktion@doktorverlag.de

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

**Klonierung und Expression des murinen  
RPGR Exon<sup>1-19</sup>**

**INAUGURALDISSERTATION**

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

vorgelegt von

**Laux, Mirjam Julia**  
aus Frankfurt am Main

Gießen 2018

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde,  
unter der Leitung von Prof. Dr. Birgit Lorenz,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann

Tag der Disputation: 02.04.2019

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Einleitung .....                                     | 1  |
| 1.1   | Hinführung .....                                     | 1  |
| 1.2   | Das Auge .....                                       | 2  |
| 1.3   | Die Retina .....                                     | 3  |
| 1.3.1 | Zellen der Retina .....                              | 3  |
| 1.3.2 | Photorezeptoren .....                                | 5  |
| 1.3.3 | Connecting Cilium .....                              | 7  |
| 1.3.4 | Ziliärer Transportmechanismus .....                  | 10 |
| 1.4   | Retinitis Pigmentosa.....                            | 12 |
| 1.5   | XLRP .....   | 13 |
| 1.6   | Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator .....          | 16 |
| 1.7   | Expression von RPGR in der Photorezeptorgenese ..... | 19 |
| 1.8   | Tiermodelle .....                                    | 20 |
| 1.9   | Zielsetzung.....                                     | 21 |
| 2     | Material und Methoden.....                           | 22 |
| 2.1   | Materialien .....                                    | 22 |
| 2.1.1 | Enzyme und Marker .....                              | 22 |
| 2.1.2 | Verbrauchsmaterialien und Chemikalien .....          | 23 |
| 2.1.3 | Puffer und Lösungen .....                            | 27 |
| 2.1.4 | Kits und Vektoren .....                              | 30 |
| 2.1.5 | Primer.....  | 31 |
| 2.1.6 | Bakterienstämme .....                                | 32 |
| 2.1.7 | Geräte und Software .....                            | 32 |
| 2.1.8 | Antikörper.....                                      | 34 |
| 2.2   | Molekularbiologische Methoden .....                  | 35 |
| 2.2.1 | PCR .....  | 35 |
| 2.2.2 | Sequenzierung .....                                  | 36 |
| 2.2.3 | Gelaufreinigung .....                                | 36 |
| 2.2.4 | Restriktionsverdau.....                              | 36 |

|   |    |
|---|----|
| 2.2.5 Ligation.....   | 36 |
| 2.2.6 Elektroporation .....   | 37 |
| 2.2.7 Klonierung .....  | 38 |
| 2.2.7.1 TOPO-Klonierung .....   | 38 |
| 2.2.7.2 In-Fusion-Klonierung.....   | 38 |
| 2.2.8 Miniprep .....  | 38 |
| 2.2.9 Maxiprep .....  | 39 |
| 2.2.10 Proteinaufreinigung .....  | 39 |
| 2.2.11 SDS-Page .....   | 39 |
| 2.2.12 Coomassie-Färbung .....  | 40 |
| 2.2.13 Silbernitratfärbung .....  | 40 |
| 2.2.14 Westernblot .....  | 41 |
| 2.2.15 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....  | 41 |
| 2.2.16 Tierversuchsgenehmigung .....  | 44 |
| 3 Ergebnisse .....  | 45 |
| 3.1 Gewinnung der Expressionsplasmide .....   | 45 |
| 3.1.1 Primerdesign .....  | 46 |
| 3.1.2 Klonierung des RPGR <sup>Ex1-19</sup> in den pCR2.1.-TOPO-Vektor .....              | 46 |
| 3.1.3 Klonierung des RPGR <sup>Ex1-19</sup> in den pQE-TriSystem His-Strep 1 Vektor ..... | 49 |
| 3.1.4 Mutagenese-PCR.....   | 51 |
| 3.2 Antikörper-Design .....   | 52 |
| 3.3 Expression .....  | 54 |
| 3.3.1 Transformation in BL21(DE3)-Zellen .....  | 54 |
| 3.3.2 Expression des RPGR <sup>Ex1-19</sup> -Proteins .....                               | 55 |
| 3.3.3 Aufreinigung des rekombinanten RPGR <sup>Ex1-19</sup> .....                         | 55 |
| 3.4 Westernblot.....  | 57 |
| 3.4.1 Anti-His-tag Antikörper HRP .....   | 57 |
| 3.4.2 N-terminale Antikörper.....   | 59 |
| 3.4.2.1 RPGR H-70 Antikörper.....   | 59 |

|  |     |
|--|-----|
| 3.4.2.2 Anti-RPGR-Antikörper der Firma Davids .....  | 63  |
| 3.5 Isoelektrische Fokussierung .....  | 66  |
| 3.5.1 Silbernitratfärbung .....  | 67  |
| 3.5.2 Westernblot der Isoelektrischen Fokussierung .....   | 68  |
| 4 Diskussion.....  | 69  |
| 4.1 Die Analyse und Bedeutung des rekombinant hergestellten RPGR <sup>Ex1-19</sup> für eine nachfolgende Antikörpertestung ..... | 69  |
| 4.2 Interpretation der Westernblotergebnisse.....  | 71  |
| 4.2.1 Antikörpertestung am rekombinanten RPGR <sup>Ex1-19</sup> .....  | 71  |
| 4.2.1.1 C-terminaler Antikörper .....  | 71  |
| 4.2.1.2 N-terminale Antikörper .....   | 71  |
| 4.2.2 Antikörpertestung an murinen Gewebeproben.....   | 72  |
| 4.2.2.1 Anti-RPGR H-70 Antikörper .....  | 72  |
| 4.2.2.2 Anti-RPGR Antikörper der Firma Davids .....  | 74  |
| 4.3 Interpretation der neuen RPGR <sup>Ex1-19</sup> -Isoform.....  | 76  |
| 4.4 Schlussfolgerung/Ausblick.....   | 78  |
| 5 Zusammenfassung.....   | 80  |
| 6 Summary.....   | 81  |
| 7 Abkürzungsverzeichnis .....  | 82  |
| 8 Abbildungsverzeichnis.....   | 86  |
| 9 Tabellenverzeichnis.....   | 87  |
| 10 Literaturverzeichnis .....  | 88  |
| 11 Anhang.....   | 102 |
| 12 Ehrenwörtliche Erklärung .....  | 110 |
| 13 Danksagung .....  | 111 |
| 14 Lebenslauf .....  | 112 |





# 1 Einleitung

## 1.1 Hinführung

Retinitis Pigmentosa (RP) ist eine Erkrankung der Netzhaut, die zur Degeneration der Photorezeptorzellen führt. Im Verlauf der Erkrankung kann es unter anderem zur Nachtblindheit, Einengung des Gesichtsfeldes und vollständigen Erblindung der Patienten kommen. Die X-chromosomale Retinitis Pigmentosa (*X-linked Retinitis Pigmentosa*, XLRP) ist eine besonders schwere Form der Erkrankung, die aktuell noch nicht therapierbar ist. Zu den Hauptursachen für das Auftreten der XLRP zählen Mutationen im Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR) Gen. Es gibt zwei Hauptpleißvarianten des RPGR, von denen eine vor allem in der Retina exprimiert wird, die andere ubiquitär im Körper vorkommt. Im Labor für experimentelle Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen wurde ein neuer Antikörper generiert, der gegen beide Hauptpleißvarianten des RPGR gerichtet ist. Die rekombinante Herstellung des ubiquitär vorkommenden RPGR-Proteins zur Erzeugung einer Positivkontrolle und zur Testung des neu generierten Antikörpers war Ziel der Arbeit.

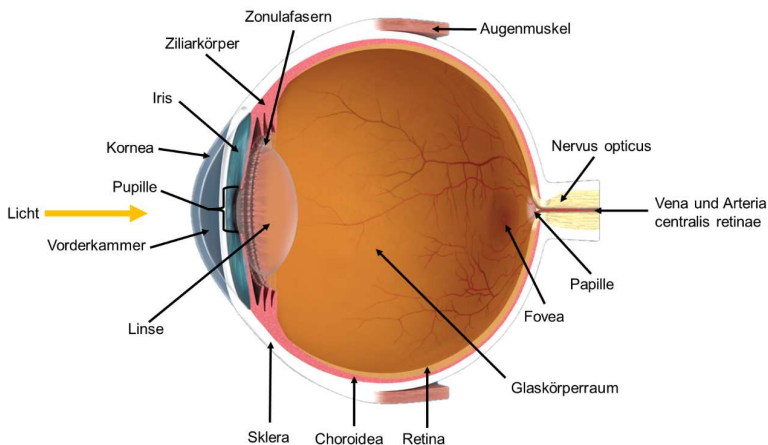
In der Einleitung wird zunächst auf die Anatomie des Auges und das Krankheitsbild der XLRP mit Lokalisation des RPGR, seine Aktionspartner und die differierende Expression der beiden Hauptvarianten des RPGR in der Photorezeptorentwicklung eingegangen. Der Hauptteil der Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung, Aufreinigung und dem Nachweis des rekombinant hergestellten Proteins sowie der Testung verschiedener gegen das Protein gerichteter Antikörper anhand dieses Proteins und muriner Gewebeproben mittels Westernblot und Isoelektrischer Fokussierung.

In der Diskussion werden die Ergebnisse der Westernblots interpretiert und mit bekannten Isoformen des RPGR verglichen. Die zukünftige Verwendung des rekombinant hergestellten Proteins wird ebenfalls kurz erläutert.

Die Herstellung des rekombinanten Proteins sowie die Testung verschiedener Antikörper liefern einen Beitrag zur Diagnostik von Tiermodellen.

## 1.2 Das Auge

Das Auge ist der periphere Teil des Lichtsinnesapparates und ermöglicht die Wahrnehmung elektromagnetischer Wellen mit Wellenlängen zwischen etwa 380 nm und 750 nm (Sachsenweger, 2003). Es wiegt rund 7,5 g, ist beim Erwachsenen circa 24 mm lang und liegt geschützt in der knöchernen Orbita (Sachsenweger, 2003). Der Aufbau des Auges gliedert sich in drei Schichten (Grehn, 2012). Die äußere Schicht besteht aus der derben Sklera und der Kornea, durch die Lichtstrahlen in das Auge gelangen (Purves, Augustine & Fitzpatrick, 2001). Die mittlere Schicht ist die Uvea, die aus Iris, dem Ziliarkörper und der Choroidea besteht (Sachsenweger, 2003). Die innerste Schicht des Auges ist die Netzhaut (Retina), die aus einem sensorischen Teil mit Stütz- und Sinneszellen und dem retinalen Pigmentepithel besteht (Grehn, 2012).



**Abb. 1.1 Schematische Darstellung des menschlichen Auges**

Copyright „Heidelberg Engineering“, genehmigt und modifiziert.

## 1.3 Die Retina

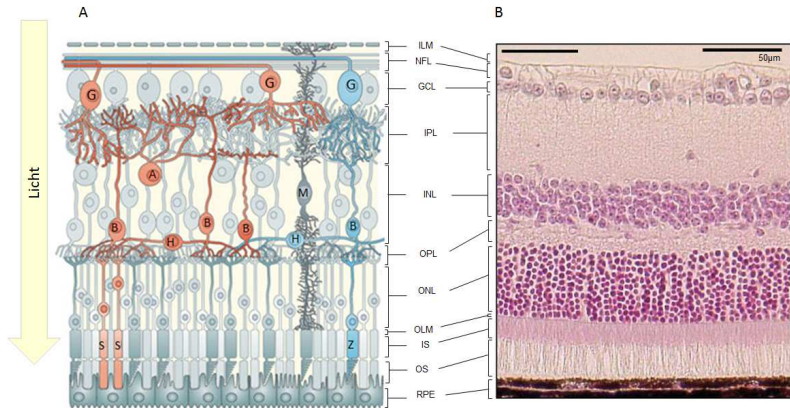
Die Retina ist 0,5 mm dick (Kolb, 1991) und dient der Aufnahme und Verarbeitung von visuellen Reizen (Grehn, 2012). Durch photochemische Vorgänge werden diese Reize in der Retina durch Änderungen des Membranpotentials und Ausschüttung von Neurotransmittern über den Nervus opticus zum Sehzentrum des Cortex cerebri geleitet (Hoon, Okawa, Della Santina & Wong, 2014) (Sachsenweger, 2003). Dort erfolgt die eigentliche Auswertung und Interpretation der Sinneseindrücke (Sachsenweger, 2003). An den retinalen Prozessen sind vor allem die Photorezeptoren (1. Neuron), die Bipolar-, Amakrin- und Horizontalzellen (2. Neuron) und die Ganglienzellen (3. Neuron) beteiligt (Sachsenweger, 2003) (Slijkerman et al., 2015).

Ontogenetisch entsteht die Retina durch einen vorgeschobenen Teil des Diencephalons aus Zellen des Neuralrohres, die als paarig angelegte primäre Augenblase hervorstechen (Grehn, 2012) (Kolb, 2005). Die Netzhaut ist somit ein vorgeschobener Gehirnteil (Grehn, 2012). Die distale Wand stülpt sich ein, ihr Stiel wird zum Nervus opticus, die innere Zellschicht zur sensorischen Netzhaut und die äußere Schicht zum retinalen Pigmentepithel (Grehn, 2012) (Kolb, 2005). Netzhaut und Sehnerv werden als sensorischer Apparat des Auges zusammengefasst (Sachsenweger, 2003).

### 1.3.1 Zellen der Retina

Die Photorezeptoren sind Sinneszellen und liegen aufgrund der oben genannten Einstülpung der primären Augenblase zum retinalen Pigmentepithel (RPE) hin, sodass das Licht zunächst durch alle Netzhautschichten hindurch muss, bis es auf die Photorezeptoren trifft und diese aktiviert werden (Kolb, 1991). Das RPE schirmt unter anderem das einfallende Licht zur Choroidea ab und nimmt die abgestoßenen Discs der Photorezeptoren auf (Grehn, 2012). Die Zellkerne der Photorezeptoren liegen in der äußeren Körnerzellschicht (*outer nuclear layer*, ONL) (Grehn, 2012). Ihre Axone sind mit den Dendriten der Zellen der inneren Körnerzellschicht (*inner nuclear layer*, INL) in der äußeren plexiformen Schicht (*outer plexiform layer*, OPL) verschaltet (Slijkerman et al., 2015). Zu den Zellen der INL gehören die Bipolar-, Horizontal- und Amakrinzellen (Goldman, 2015). Die Axone dieser Zellen bilden in der inneren plexiformen Schicht (*inner plexiform layer*, IPL) synaptische Kontakte mit den Dendriten der Ganglienzellen, die an der Innenseite der Netzhaut zum Glaskörper hin in der Ganglionzellschicht (*ganglion cell layer*, GCL) liegen (Slijkerman et al., 2015). Die unmyelinisierten Axone

der Ganglienzellen ziehen in der Nervenfaserschicht (*nerve fiber layer*, NFL) zur Papille hin und bilden ab dort den Sehnerv (Grehn, 2012). Die Papille ist die einzige Stelle der Netzhaut, die keine Photorezeptoren enthält, wodurch physiologisch der sogenannte blinde Fleck im Gesichtsfeld entsteht (Grehn, 2012) (Burk & Burk, 2005). Als Stützgewebe der Retina dienen die Müllerzellen, deren Zellkerne ebenfalls in der INL liegen (Swaroop, Kim & Forrest, 2010) (Sachsenweger, 2003). Dies sind spezielle Gliazellen, die neben der Stützfunktion wesentlich an der Ionenverteilung in der Retina während der Erregungsprozesse beteiligt sind (Grehn, 2012). Die äußere Grenzmembran (*outer limiting membrane*, OLM) entsteht durch Kontakte zwischen Photorezeptorzellen und den Axonen der Müllerzellen (Goldman, 2015) (Kolb, 1991). Die innere Grenzmembran (*inner limiting membrane*, ILM) ist der Übergang von Retina zum Glaskörper und wird von den Astrozyten und den Dendriten der Müllerzellen gebildet (Goldman, 2015). Das Zentrum der humanen Retina bildet die temporal der Papille liegende Macula lutea (= gelber Fleck), die ihren Namen aufgrund der gelblichen Pigmentierung erhalten hat und zentral eine gefäßfreie, grubenförmige Vertiefung, die Fovea centralis, aufweist (Grehn, 2012). Die Grube selbst (Foveola) enthält nur Photorezeptoren, und zwar ausschließlich Zapfen, weshalb sie die Stelle des schärfsten Sehens darstellt (Schlote, Grüb, Mielke & Rohrbach, 2004) (Grehn, 2012). In der murinen Retina sind die Zapfen zwar nicht gleichmäßig verteilt, aber sie bilden im Gegensatz zur Fovea des Menschen auch keine Zapfen-dominierende Region (Slijkerman et al., 2015).



### Abb. 1.2 Aufbau der Retina

**A** schematische Darstellung, A = Amakrinzellen, B = Bipolarzellen, G = Ganglienzellen, H = Horizontalzellen, M = Müllerzellen, S = Stäbchen, Z = Zapfen (modifiziert nach Swaroop et al., 2010) und **B** Paraffinschnitt der Retina (HE-gefärbt) zur Veranschaulichung der einzelnen Schichten der Netzhaut (Quelle: Augenklinik JLU Gießen). RPE = retinales Pigmentepithel, OS = Außensegment der Photorezeptoren, IS = Innensegment der Photorezeptoren, OLM = äußere Grenzmembran, ONL = äußere nukleäre Schicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, INL = innere nukleäre Schicht, IPL = innere plexiforme Schicht, GCL = Ganglienzellschicht, NFL = Sehnervenfaserschicht, ILM = innere Grenzmembran, Maßstabsbalken 50 µm.

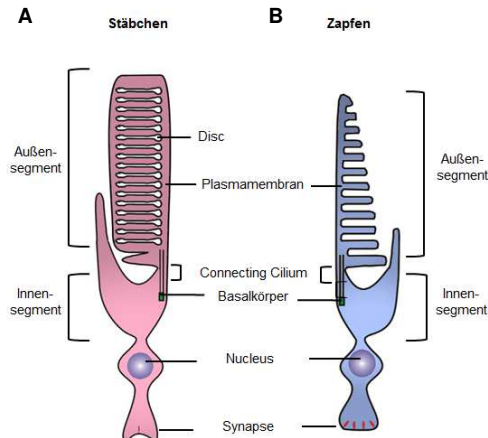
### 1.3.2 Photorezeptoren

Insgesamt enthält die Retina etwa 126 Millionen Photorezeptoren zur Umwandlung von Licht in elektrische Impulse (Sachsenweger, 2003). Man unterscheidet zwei Photorezeptortypen, nämlich Stäbchen und Zapfen, die den Namen aufgrund ihrer jeweiligen Morphologie erhalten haben (Whewey, Parry & Johnson, 2014). In der zentralen Netzhaut finden sich vorwiegend Zapfen (etwa 6 Millionen) für das Tag- und Farbsehen (photopisches Sehen) (Patnaik et al., 2015). Die Peripherie weist überwiegend die etwa 120 Millionen Stäbchen für das Dämmerungs- und Nachtsehen (skotopisches Sehen) auf (Patnaik et al., 2015), die sehr sensitiv auf Licht reagieren und denen ein einziges Photon ausreicht, um aktiviert zu werden (Baylor, Lamb & Yau,

1979). Beide Rezeptortypen bestehen aus einem permanenten Innensegment (*inner segment*, IS) und einem regenerierungsfähigen, lichtsensitiven Außensegment (*outer segment*, OS), die über ein *Connecting Cilium* (CC) miteinander verbunden sind (Hosch, Lorenz & Stieger, 2011) (Sachsenweger, 2003). Das IS enthält die für die Proteinbiosynthese der Photorezeptoren notwendigen Zellorganellen, das OS ist hochangereichert mit Proteinen, die für die Signaltransduktion des einfallenden Lichts notwendig sind (Pearing, 2012) (Anand & Khanna, 2012). Das Außensegment, das bei Stäbchen und Zapfen funktionell und morphologisch unterschiedlich aufgebaut ist (Pearing, 2012), besteht aus gestapelten Membranscheiben, sogenannte *Discs*, in die das jeweilige Sehpigment zur Umwandlung von Photonen in elektrische Impulse eingelagert ist (Rachel, Li & Swaroop, 2012). Das Sehpigment beider Photorezeptortypen besteht aus Opsin-Proteinen (Patnaik et al., 2015). In den Stäbchen liegen die *Disc*-Membranen und die Plasmamembran separiert voneinander vor, in den Zapfen bestehen sie aus der eingestülpten Plasmamembran (Whewey et al., 2014) (Pearing, 2012). Rhodopsin ist das Sehpigment der Stäbchen, wohingegen in Zapfen drei unterschiedliche, vom Subtyp abhängige Photopsinmoleküle als Sehpigment vorhanden sind (Slijkerman et al., 2015). Diese drei gliedern sich in S-Zapfen mit blausensitivem S-Opsin für Licht kurzer Wellenlängen (*short wavelength*,  $\lambda_{\max} \sim 415 - 430$  nm), M-Zapfen mit grünsensitivem M-Opsin für Licht mittlerer Wellenlängen (*medium wavelength*,  $\lambda_{\max} \sim 530 - 537$  nm) und aufgrund einer erworbenen Besonderheit auf dem X-Chromosom des Menschen in L-Zapfen mit rotsensitivem L-Opsin (*long wavelength*,  $\lambda_{\max} \sim 555 - 565$  nm), die dem Menschen ein trichromatisches Sehen ermöglichen (Roorda & Williams, 1999) (Mustafi, Engel & Palczewski, 2012) (Swaroop et al., 2010). Die murine Retina hingegen ist auf eine Nachtaktivität der Tiere ausgerichtet (Slijkerman et al., 2015). Bei Mäusen liegen nur zwei Zapfentypen vor, die entweder sensitiv gegenüber langwelligem Licht (L/M-Zapfen) oder sensitiv gegenüber kurzwelligem UV-Licht (UV-Zapfen) sind (Gouras & Ekesten, 2004). Die Mäuse zählen somit zu den Dichromaten (Swaroop et al., 2010). Einige Zapfen sind eventuell für langwelliges und UV-Licht gleichermaßen sensitiv (Slijkerman et al., 2015). Die L/M-Zapfen finden sich in der superioren, die UV-Zapfen in der inferioren Hemisphäre der Retina (Swaroop et al., 2010) (Szel et al., 1992). Beim Menschen hingegen zeigt sich eine Verdichtung der Zapfen in der Fovea, die in der murinen Retina nicht vorhanden ist (Swaroop et al., 2010). In der Peripherie nimmt die Zahl der Zapfen ab, die Anzahl der Stäbchen steigt (Swaroop et al., 2010).

Nachts werden ca. 10 % der OS-Discs von den Zellen des RPE phagozytiert und von der Basis des OS mit Hilfe des CC erneuert (Slijkerman et al., 2015). Durch die fehlenden Zellorganellen im OS ist das CC unabdingbar zur Aufrechterhaltung des OS, da es die

einzige Verbindung zwischen IS und OS darstellt (Q. Liu, 2007) (Anand & Khanna, 2012).



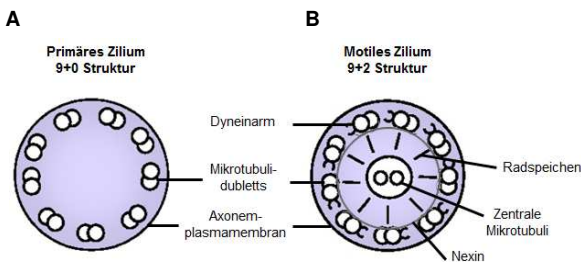
**Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Photorezeptoren**

**A** Stäbchen und **B** Zapfen (modifiziert nach Slijkerman et al., 2015)

### 1.3.3 Connecting Cilium

Zilien sind auf Mikrotubuli basierende, winzige, haar-ähnliche Organellen, die aus der Zelloberfläche hervorragen und einer Vielzahl von sensorischen Funktionen dienen (Patnaik et al., 2015). Als Axonem wird das Konstrukt aus Mikrotubuli und den assoziierten Proteinen bezeichnet (Lodish, Berk & Zipursky, 2000). Die Zilien werden in zwei Kategorien eingeteilt. Zum einen in die motilen Zilien, die aus einer 9+2 Struktur aufgebaut sind und unter anderem im Respirationstrakt vorkommen, wo sie durch ihre Bewegungen für den Abtransport des Schleimes und der Bakterien aus den Atemwegen sorgen (Norris & Grimes, 2012) (Kotov et al., 2011) (Urbanska et al., 2015). Bei diesem Zilium sind neun äußere Mikrotubuli-Dubletts, die durch Nexin miteinander verbunden sind, um zwei zentrale Mikrotubuli angeordnet (Praveen, Davis & Katsanis, 2015). Zur Bewegung des Ziliums dienen zwei Dyneinarme pro Mikrotubuli-Dublett, die ATP

hydrolysieren, wodurch die benötigte Energie frei wird (Praveen et al., 2015) (Satir & Christensen, 2007). Die Radspeichen verbinden die äußeren mit den zwei zentralen Mikrotubuli und sind für mechanochemische Signalübertragung verantwortlich (Smith & Yang, 2004). Zum anderen werden die Zilien in die nicht-motilen, primären Zilien eingeteilt, die aus einer 9+0 Struktur aufgebaut sind und bei denen die zwei zentralen Mikrotubuli und die Dyneinarme fehlen (Kotov et al., 2011). Sie spielen in der Signalübertragung der Zelle und der chemo-, mechano- und thermosensitiven Wahrnehmung eine Rolle (Fliegaf, Benzing & Omran, 2007) (Szymanska & Johnson, 2012).



#### Abb. 1.4 Schematische Ziliendarstellung

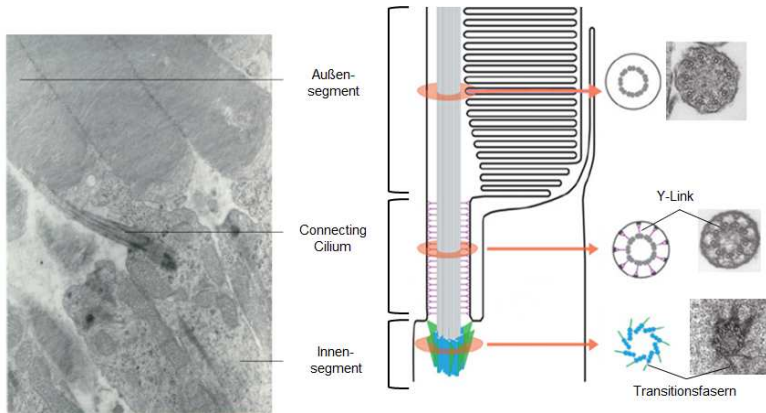
Querschnitt durch ein **A** primäres Zilium und **B** motiles Zilium (modifiziert nach Norris & Grimes, 2012).

Das Zilium der Photorezeptoren ist ein modifiziertes primäres Zilium, das Basalkörper, *Connecting Cilium* (CC) und Axonem umfasst (Patnaik et al., 2015) (R. D. Megaw, Soares & Wright, 2015). Der Basalkörper bildet die Verankerung des Ziliums und koordiniert die Zusammensetzung der Mikrotubuli (A. F. Wright, Chakarova, Abd El-Aziz & Bhattacharya, 2010). Er besteht aus neun Triplet-Mikrotubuli, von denen sich zwei zum Axonem fortsetzen, während der dritte Mikrotubulus mittels Transitionsfasern der Verankerung des Basalkörpers mit der Plasmamembran dient (Pearing, 2012). Proximal des Basalkörpers setzt sich das *Rootlet* fort, ein großes Zytoskelett, das ebenfalls der Verankerung des Ziliums in der Zelle dient und aus dem Protein Rootletin besteht (Hong, Pawlyk, Sokolov et al., 2003) (Whewey et al., 2014). Es wird angenommen, dass Rootletin als Andockstation für Transportproteine agiert, die mit Vesikeln für das CC oder OS beladen sind (Whewey et al., 2014). Als CC wird der



Bereich zwischen Basalkörper und Axonem bezeichnet, der die einzige Verbindung zwischen IS und OS darstellt (Q. Liu, 2007) (Insinna & Besharse, 2009) und homolog zu der Transitionszone von primären und motilen Zilien ist (Hong, Pawlyk, Sokolov et al., 2003) (Bukowy-Bieryłto et al., 2013). Das CC ist ein enger Kanal und nimmt eine entscheidende Rolle im Proteintransport ein (Brunner et al., 2008). Ein kontinuierlicher Fluss durch das CC wird unter anderem zur Erneuerung der Opsin-beladenen Discs benötigt (Kennedy, 2012). Pro Sekunde werden 2000 Opsin- Moleküle und  $0,1 \mu\text{m}^2$  neue Membranstücke durch das CC geschleust (Wolfrum & Schmitt, 2000) (Sahel, 2011). Dieser zielgerichtete Transport der Proteine und Membranen wird Intraflagellärer Transport (IFT) genannt (Kennedy, 2012) (Anand & Khanna, 2012). Im Bereich des CC gibt es zusätzliche Y-förmige Quervernetzungen (*Y-Link*), die eine Verbindung zwischen den Mikrotubuli-Dubletts und der anliegenden Axonemplasmamembran schaffen (Pearing, 2012) (Insinna & Besharse, 2009). Das Axonem gilt als Stütze oder Säule des Ziliums und besteht aus neun, kreisförmig angeordneten Microtubuli-Dubletts (A. F. Wright et al., 2010), die sich am distalen Ende des OS zu neun einzelnen Mikrotubuli umwandeln (Wheway et al., 2014). Der Basalkörper ist im IS lokalisiert, wohingegen das Axonem als Stütze bis in das OS der Photorezeptoren hineinreicht (R. D. Megaw et al., 2015) (Pearing, 2012).

Defekte im Aufbau oder in der Funktion des CC führen zu Veränderungen im Proteintransport zum OS hin und so zu einer Degeneration der Photorezeptoren, wie es beispielsweise bei Retinitis pigmentosa (RP) vorkommt (Anand & Khanna, 2012) (Rao, Li, Anand & Khanna, 2015).



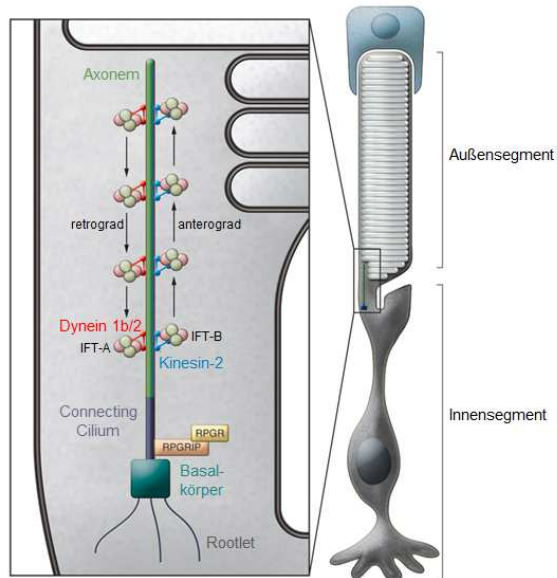
**Abb. 1.5 Connecting Cilium**

Links ist ein elektronenmikroskopischer Längsschnitt durch Photorezeptoren mit Innen- und Außensegmenten und einem dazugehörigen Connecting Cilium und rechts eine schematische Abbildung mit elektronenmikroskopischem Querschnitt durch diese Zellkompartimente dargestellt (modifiziert nach Fliegau et al., 2007 links und Pearring, 2012 rechts).

### 1.3.4 Ziliärer Transportmechanismus

Da alle Proteine nur im IS hergestellt werden können, wird ein selektiver Import und Transport aller im Zilium und OS benötigten Proteine mittels IFT durchgeführt (Patnaik et al., 2015). IFT ist ein Prozess, bei dem die benötigten Proteine entlang des Axonems befördert werden (Hsiao, Tuz & Ferland, 2012) und wurde erstmals in den Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* beschrieben und in nahezu allen Zilien tragenden Zellen identifiziert (Anand & Khanna, 2012) (Katsanis, 2011). Der Transport erfolgt in zwei Richtungen und entsprechend den zwei Richtungen sind IFT-Proteine in zwei Komplexe eingeteilt, die verantwortlich für den Transport sind (Patnaik et al., 2015). Es gibt zum einen den anterograden Transport vom IS ausgehend in Richtung des OS, vermittelt durch Kinesin-2-Motoren (Lopes et al., 2010), die IFT-B-Komplex-Proteine und andere Proteine befördern (Szymanska & Johnson, 2012), zum anderen den retrograden Transport vom OS zum IS hin, bei dem mittels Dynein-2- oder Dynein-1b-Motoren IFT-A-Komplex-Proteine transportiert werden (Szymanska & Johnson, 2012) (A. F. Wright et

al., 2010) (Norris & Grimes, 2012) (Kardon & Vale, 2009). Da täglich 10 % des OS-Volumens am distalen Ende der Phagozytose der Discs durch die RPE-Zellen verloren gehen, lässt dies die Annahme zu, dass der retrograde Transport vermutlich nicht essenziell beim Transport von wichtigen Proteinen ist (Insinna & Besharse, 2009).



**Abb. 1.6 Schematische Darstellung des intraflagellaren Transports (IFT)**

Das Zilium ist im Basalkörper verankert und verbindet das Innensegment, welches den Stoffwechsel der Zelle beinhaltet, mit dem photosensitiven Außensegment (modifiziert nach Sahel, 2011). RPGR = Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator, RPGRIP = RPGR-interacting protein.

## 1.4 Retinitis Pigmentosa

Retinitis Pigmentosa (RP) ist eine klinisch und genetisch sehr heterogene degenerative Netzhauterkrankung (Rao et al., 2015), die zu einem fortschreitenden Verlust der Photorezeptoren beider Augen führt (Parmeggiani et al., 2011) (Patnaik et al., 2015) (Jiang et al., 2017). RP ist der häufigste Grund für eine erbliche Degeneration von Photorezeptoren (A. F. Wright et al., 2010) und tritt mit einer Prävalenz von 1:3000 auf (R. D. Megaw et al., 2015). In den meisten Fällen degenerieren zuerst die Stäbchen, gefolgt von einer Degeneration der Zapfen (Hartong, Berson & Dryja, 2006) (Gupta, Brown & Milam, 2003) (Sharon et al., 2003). Diese Art der Degeneration wird auch Stäbchen-Zapfen-Dystrophie genannt und ist in den meisten RP-Fällen vorherrschend (A. F. Wright et al., 2010). Es gibt auch Fälle, in denen es zur gleichzeitigen Degeneration von Stäbchen und Zapfen (Hartong et al., 2006) oder zu einer Degeneration der Zapfen mit erst später auftretender Stäbchen-Degeneration kommt (Birch, Anderson & Fish, 1999) (Rao, Zhang et al., 2016).

Alle RP-Fälle verlaufen progressiv, aber die Geschwindigkeit und das klinische Bild variieren zwischen den Patienten, selbst wenn genetisch die gleiche Mutation vorliegt (Garci et al., 2006) (Petr-Silva & Linden, 2013).

Klinisch zeigen sich Nachtblindheit, die in der Regel das erste Symptom darstellt, zunehmende Gesichtsfeldeinengung, Störung des Kontrastsehens, erhöhte Blendungsempfindlichkeit, reduziertes Farbsehen und Visusminderung (Zobor & Zrenner, 2012).

Funduskopisch fallen eine wachsgelbe Papille, attenuierte Gefäße und vorwiegend mittelperipher beginnende Veränderungen des RPE auf (Zobor & Zrenner, 2012) (Neidhardt et al., 2008). Diese RPE-Veränderungen beginnen mit einer Depigmentierung und anschließender Hyperpigmentierung, die aufgrund ihrer funduskopischen Erscheinung als Knochenkörperchen bezeichnet werden (Zobor & Zrenner, 2012). Knochenkörperchen gelten als Kennzeichen der RP und sind Melanin granula des RPE, die sich perivaskulär in der neuralen Retina ablagern (Li, Possin & Milam, 1995) (Den Hollander, Black, Bennett & Cremers, 2010) (Jaisle et al., 2010). Makuläre Veränderungen wie eine epiretinale Gliose, ein zystoides Makulaödem und Makulaforamen führen zur weiteren Visusminderung der betroffenen Patienten (Ikeda et al., 2015).

Im Elektroretinogramm (ERG), das zur Beurteilung der Netzhautfunktion dient, fällt eine verminderte Funktion der Photorezeptoren in Form verringerter Amplituden lange vor dem Auftreten von Symptomen auf (Berson, 1996) (Hartong et al., 2006) (Petr-Silva & Linden, 2013). Anhand der Gesichtsfeldeinschränkung soll die Schwere und

Schwierigkeit der RP-Erkrankung im Alltag dargestellt werden. So ist für Autofahrer eine rechtzeitige Wahrnehmung von Fußgängern oder seitlich herankommender Fahrzeuge erschwert oder gar nicht mehr möglich (Hamel, 2006).

RP kann anhand des Erbgangs in autosomal-dominante RP (30 - 40 %), autosomal-rezessive RP (50 - 60 %) und X-chromosomale RP (5 - 15 %) eingeteilt werden (Hartong et al., 2006). Daneben treten gelegentlich mitochondriale und digenetische Vererbungen auf, die allerdings nur eine kleine Anzahl der RP-Fälle ausmachen (Boloc, Castillo-Lara, Marfany, González-Duarte & Abril, 2015). Die RP kann auch infolge anderer Erkrankungen als syndromische RP auftreten (Daiger, Bowne & Sullivan, 2008). Hier ist als häufigste Ursache das Usher-Syndrom zu nennen, bei dem es schon kongenital oder in sehr früher Kindheit zur Hörverschlechterung beziehungsweise Gehörlosigkeit mit Entwicklung einer RP in früher Jugend kommen kann (Daiger et al., 2008). Auch das Bardet-Biedl-Syndrom, welches unter anderem RP, Polydaktylie, Adipositas, Nierenerkrankungen und geistige Entwicklungsverzögerung umfasst, ist aufgrund der Schwere der Erkrankung als zweithäufigste Ursache einer syndromischen RP zu erwähnen (Katsanis, 2004) (Daiger et al., 2008) (Rao, Li et al., 2016) (Y. Zhang et al., 2014).

## 1.5 XLRP

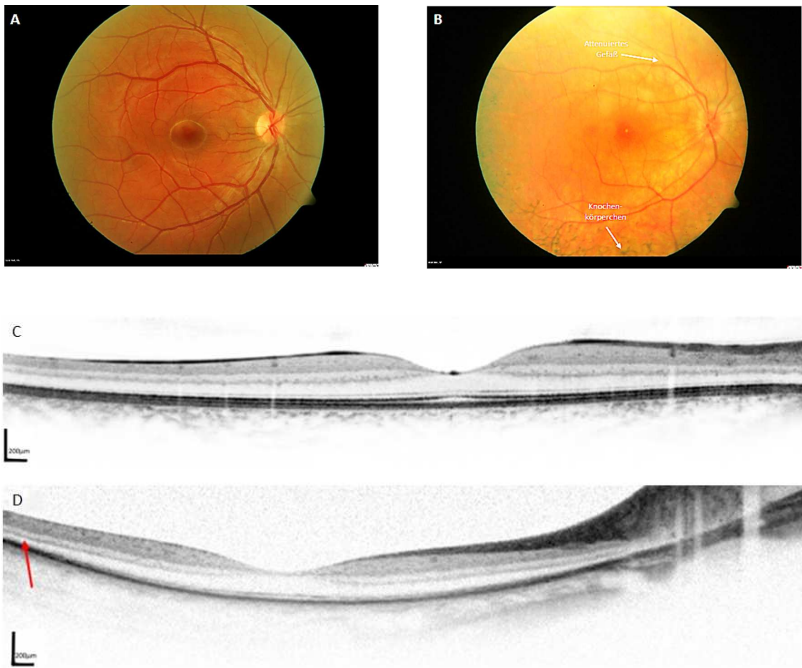
X-chromosomale Retinitis Pigmentosa (*X-linked Retinitis Pigmentosa*, XLRP) zählt zur besonders schweren Form der RP und ist durch einen frühen Beginn der Erkrankung mit schnellem Verlauf charakterisiert (F. Liu et al., 2015) (Petrs-Silva & Linden, 2013) (Rao, Anand & Khanna, 2016). Bei der X-chromosomalen Vererbung sind meist nur Männer betroffen, Frauen können als heterozygote Konduktorinnen (Träger) eine Genmutation über mehrere Generationen weiter vererben (Zobor & Zrenner, 2012).

Lyonisierung, auch Inaktivierung des X-Chromosoms genannt, bezeichnet den Zustand, bei dem die ursächliche X-chromosomale Vererbung zu einem Mosaik der Zellen führt und die Zellen entweder die normale oder die mutierte genetische Information ausprägen (Preisning, Stieger & Lorenz, 2014). Dieser Vorgang findet bereits in der frühen embryonalen Entwicklung statt (Wegscheider, Preisning & Lorenz, 2004). Weibliche Träger zeigen ein breites Spektrum klinischer Merkmale von keiner bis zur schweren Ausprägung (Jin, Gu, Ma & Nao-i, 2007). Neben der zufälligen Lyonisierung wird ein Zusammenhang zwischen Geno- und Phänotyp diskutiert (Neidhardt et al., 2008). Die klinischen Auffälligkeiten können beispielsweise als Ausdünnungen des peripheren

Pigmentepithel (Alan C. Bird, 1975) und schwere Stäbchen- und Zapfen-Dysfunktionen auftreten (R. D. Megaw et al., 2015), was sich in einem pathologischen ERG zeigt (Murga-Zamalloa, Swaroop & Khanna, 2010). Ein perimakulärer, tapetalähnlicher Reflex, ein goldschimmernder Fundusreflex, ähnlich dem Tapetum der Tiere, wird bei Konduktorinnen als Hinweis des Träger-Status beschrieben, konnte aber nicht bei allen Konduktorinnen entdeckt werden. (Cideciyan & Jacobson, 1994) (Acton, 2012) (Branham et al., 2012). Weiterhin wird eine Abnahme der ONL-Schichtdicke (Acton, 2012) und ein Verlust der OS beschrieben (Ben-Arie-Weintrob, Berson & Dryja, 2005). Die XLRP führt bei den betroffenen Männern meist schon vor dem 10. Lebensjahr zur Nachtblindheit (Stäbchenfunktion), in der zweiten Dekade zeigen sich Gesichtsfeldeinschränkungen (Stäbchen- und Zapfenfunktion) und im weiteren Verlauf eine deutliche Visusminderung (Zapfenfunktion) in der dritten und vierten Dekade (Alan C. Bird, 1975) (Xinhua Shu et al., 2007) (Hosch et al., 2011). Dies kann in der vollständigen Erblindung der Patienten um das 40. Lebensjahr enden (Rao et al., 2015). Auch ein gehäuftes Vorkommen von Myopie wird beschrieben (Hamel, 2006). Die Lebensqualität der Patienten ist durch den schnellen und schweren Verlauf der Erkrankung stark beeinträchtigt, weshalb diese Form der RP klinisch besonders relevant ist (Hong, Yue, Adamian & Li, 2001) (Da Costa et al., 2015).

Bisher konnten sechs Genloci der XLRP zugeordnet, allerdings nur zwei dieser Gene identifiziert werden (Petr-Silva & Linden, 2013). Eines dieser zwei Gene ist das RP2-Gen, das bei Mutation für etwa 10 % der XLRP-Fälle verantwortlich ist (Murga-Zamalloa, Swaroop et al., 2010). Das zweite Gen ist das in über 70 % der XLRP-Fälle mutierte RPGR-Gen auf dem RP3-Genlocus (Breuer et al., 2002) (Ferrari et al., 2011) (Wätzlich et al., 2013).

Zurzeit existiert noch keine kausale Therapie der Erkrankung (R. D. Megaw et al., 2015). Eine Verlangsamung des Krankheitsverlaufes kann über Nahrungsergänzungsmittel wie beispielsweise mit Omega-3-Fettsäure reichem Lutein, Calciumblockern, Vitamin A und Vitamin C versucht werden (Hartong et al., 2006).



### Abb. 1.7 Klinische Befunde bei XLRP

X-chromosomale Retinitis pigmentosa aufgrund von Mutationen im RPGR-Gen. Fundusfotos (A und B) und optische Kohärenztomographie (*optical coherence tomography* = OCT) -Aufnahmen (C und D) von einem 14-jährigen gesunden Jungen und einem 14-jährigen XLRP-Patienten mit Mutation im RPGR. Das Fundusfoto A und die OCT-Aufnahme C des 14-jährigen, gesunden Jungen zeigen einen regelrechten Befund. B zeigt das Fundusfoto eines 14-jährigen XLRP-Patienten mit Mutation im RPGR. Es sind bereits attenuierte (= verengte) Gefäße und Knochenkörperchen sichtbar. Auf der OCT-Aufnahme dieses erkrankten Patienten (D) zeigt der rote Pfeil auf die verdünnte und kaum noch vorhandene ONL, Maßstabsbalken 200 µm (Quelle: Augenklinik JLU Gießen).

## 1.6 Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator

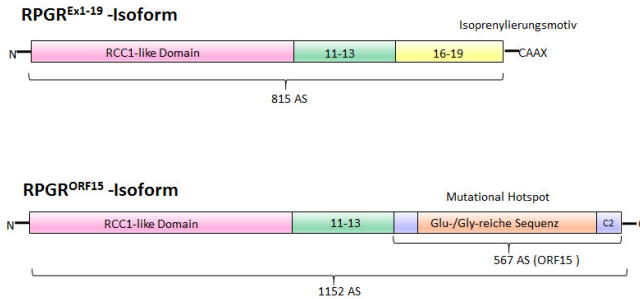
Das RPGR-Gen liegt auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp21.1) und umfasst 172 Kilobasen (Patnaik et al., 2015). Es gibt zwei Hauptisoformen des RPGR, das RPGR<sup>EX1-19</sup> und das RPGR<sup>ORF15</sup>, die beide den gleichen N-Terminus, aber unterschiedliche C-Termini aufweisen (Remans, Bürger, Vetter & Wittinghofer, 2014). Zusätzlich zu diesen zwei Hauptisoformen gibt es noch viele weitere Spleißvarianten (Hong & Li, 2002), wobei die genaue Anzahl der RPGR-Isoformen in der Retina nicht bekannt ist (Fahim et al., 2011).

Das RPGR<sup>EX1-19</sup> wird auch konstitutive Form genannt und in vielen Geweben, wie beispielsweise der Retina, dem Gehirn, der Lunge und dem Hoden, exprimiert (Meindl et al., 1996) (Roepman et al., 1996) (Kirschner et al., 1999) (Hong, Pawlyk, Adamian & Li, 2003). RPGR<sup>EX1-19</sup> ist im CC der Photorezeptoren, in der Transitionszone anderer primärer und motiler Zilien (Hong, Pawlyk, Sokolov et al., 2003) (Iannaccone, 2003) (Kirschner et al., 1999) und an Zentrosomen von sich teilenden Zellen lokalisiert (R. D. Megaw et al., 2015). Das Transkript des humanen RPGR<sup>EX1-19</sup> beinhaltet 19 Exons und kodiert für ein Protein, bestehend aus 815 Aminosäuren mit einem Isoprenylierungsmotiv am C-Terminus (Ferreira, 2005) (Patnaik et al., 2015). Ursprünglich wurde angenommen, dass das Isoprenylierungsmotiv für die Bindung des RPGR<sup>EX1-19</sup> an den Golgiapparat essenziell ist (Yan et al., 1998). Mittlerweile ist aber eine Verankerung des Isoprenylierungsmotiv am Endoplasmatischen Retikulum gezeigt worden (Patil et al., 2012). Mutationen im RPGR<sup>EX1-19</sup> führen zu 15 - 20 % der XLRP-Fälle (Xinhua Shu et al., 2007).

Das RPGR<sup>ORF15</sup> zeigt die höchste Expression in den Photorezeptoren und wird deshalb auch als Retina-spezifische Isoform bezeichnet (Iannaccone, 2003) (Xinhua Shu et al., 2007). Das humane RPGR<sup>ORF15</sup> ist 1152 Aminosäuren lang, enthält Exon 1-13 des RPGR<sup>EX1-19</sup> und ein alternativ gespleißtes C-terminales Exon ORF15, das für 567 Aminosäuren kodiert und aus Exon 14/15 und Teilen des Introns 15 besteht (Anand & Khanna, 2012) (A. Wright & Shu, 2007) (Vervoort et al., 2000). Dieses terminale Exon besteht aus repetitiven Glycin- und Glutamin-Sequenzen (Yang et al., 2002) (A. Wright & Shu, 2007). Beim Menschen treten diese Sequenzen als EEEGEGEGE-Motiv, bei Mäusen als EEGEGE-Motiv auf und sind in allen Spezies evolutionär konserviert (Vervoort et al., 2000) (X Shu et al., 2005). Zu 60 - 80 % findet man XLRP-auslösende Mutationen des RPGR im ORF15 (Vervoort et al., 2000) (Fahim et al., 2011), weshalb dieser Bereich auch als „*mutation hotspot*“ bezeichnet wird (Kirschner et al., 2001). Diese Mutationen sind häufig große Deletionen oder Duplikationen (Anand & Khanna, 2012).



Der N-terminale Bereich aller bisher bekannten RPGR-Isoformen zeigt von Exon 1-10 eine Sequenz, die dem RCC1 (*regulator of chromosome condensation 1*)-Protein ähnelt und als RLD (*RCC1-like domain*) bezeichnet wird (A. Wright & Shu, 2007). Das RCC1-Protein ist ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF) für die kleine Guanintriphosphatase Ran (RanGTPase), die den nukleozytoplasmatischen Transport und den Aufbau mitotischer Spindeln reguliert (Hong, Pawlyk, Sokolov et al., 2003) (Zhao et al., 2003) (Lui & Huang, 2009). Dieser Vorgang wird durch die wechselnde Bindung von GTP (Guanosintriphosphat) und GDP (Guanosindiphosphat) ermöglicht (Roepman et al., 1996) (Lui & Huang, 2009). Aufgrund der Homologie der RLD zum RCC1-Protein liegt eine Interaktion der RLD mit einer GTPase und so eine Funktion als GEF nahe (Meindl et al., 1996) (Roepman et al., 1996). Diese Vermutung konnte anhand des Rab8A-Proteins bestätigt werden (Murga-Zamalloa, Atkins, Peranen, Swaroop & Khanna, 2010). Rab8A ist eine GTPase, die beim Transport Rhodopsin-beladener Vesikel vom Golgi-Apparat zur Basis des CC eine entscheidende Rolle spielt (Moritz et al., 2001) und für die das RPGR die Aufgabe als GEF wahrnimmt (Murga-Zamalloa, Atkins et al., 2010). Die RLD interagiert mit weiteren Proteinen, wie beispielsweise dem RPGR-*interacting protein 1* (RPGRIP1) oder der *delta*-Untereinheit der Phosphodiesterase (PDE $\delta$ ) (Boylan & Wright, 2000) (Linari et al., 1999). Mutationen im RPGRIP1 führen zur Leberschen Congenitalen Amaurose (LCA), einer schweren Photorezeptordegeneration von Geburt oder früher Kindheit an (Dryja et al., 2001) (Remans et al., 2014). Die Expression von RPGRIP1 scheint auf die Retina begrenzt zu sein, wo das Protein in den Photorezeptoren und den amakrinen Zellen lokalisiert ist (Castagnet, Mavlyutov, Cai, Zhong & Ferreira, 2003) (Mavlyutov, Zhao & Ferreira, 2002). Über das C-terminale Ende ist das RPGRIP1 mit der RLD des RPGR verbunden (Zhao et al., 2003) und sorgt für die Verankerung des RPGR im CC (Hong et al., 2000) (Hong et al., 2001) (R. N. Wright, Hong & Perkins, 2011). Darüber hinaus dient RPGRIP1 als Verbindung von RPGR mit weiteren Proteinen, beispielsweise dem Nephrocystin-6 (Gerner et al., 2010), das bei Mutation ebenfalls zur LCA führt (den Hollander et al., 2006). PDE $\delta$  ist für die Förderung isoprenylierter Proteine aus der Membran, wie beispielsweise des Rab-Proteins, und den darauffolgenden Transport der Proteine zuständig (Anand & Khanna, 2012). RPGR kann durch die Interaktion mit PDE $\delta$  den Transport der isoprenylierten Proteine regulieren (Wätzlich et al., 2013). Obwohl das ORF15 als „*mutational hotspot*“ bekannt ist, zeigen Patienten mit besonders schwerer XLRP häufig Mutationen in der RLD, was die Wichtigkeit dieser Region noch einmal unterstreicht (Ferreira, 2005) (Wätzlich et al., 2013). In den Exonen 16-19 des RPGR<sup>Ex1-19</sup> wurden bisher noch keine Mutationen beschrieben (Wu et al., 2015) (R. D. Megaw et al., 2015).



### Abb. 1.8 Hauptpleißvarianten des RPGR-Gens

RPGR-Isoformen RPGR<sup>Ex1-19</sup> und RPGR<sup>ORF15</sup> (modifiziert nach R. N. Wright et al., 2011)

Patienten mit einer veränderten RPGR-Sequenz zeigen häufig weitere ziliäre Auffälligkeiten, wie gestörte Entwicklung der Spermien, Hörschäden oder Infekte des Respirationstrakts (Brunner et al., 2008) (Iannaccone, 2003) (Zito et al., 2003). Dies macht die Bedeutung des RPGR auch in anderen Geweben deutlich (Schmid et al., 2010).

Die genaue Funktion des RPGR ist bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar (R. D. Megaw et al., 2015). Es wird angenommen, dass das RPGR eine Rolle in der Kontrolle und im Transport von Proteinen einnimmt, die das Zilium passieren wollen (Hong et al., 2000) (He, Parapuram, Hurd & Behnam, 2008) (R. D. Megaw et al., 2015). Das Auftreten von Photorezeptordegenerationen und Opsindelokalisationen in einigen Photorezeptoren von Patienten mit RPGR-Mutationen und RPGR-*knock-out*-Mäusen unterstützen diese Vermutung (Hong et al., 2000) (Adamian, Pawlyk, Hong & Berson, 2006).

Die Lokalisation des RPGR ist durch speziesspezifische Unterschiede gekennzeichnet (Patnaik et al., 2015). So ist das RPGR in den murinen Photorezeptoren vorrangig im CC lokalisiert, wohingegen es bei Menschen und Rindern auch im OS der Photorezeptoren vorkommt (Mavlyutov et al., 2002) (Hong, Pawlyk, Sokolov et al., 2003). Des Weiteren konnte eine hohe Anzahl gewebespezifischer Spleißvarianten des RPGR gezeigt werden, was die Vermutung nahelegt, dass die verschiedenen Isoformen unterschiedliche Aufgaben in den Geweben wahrnehmen und Mutationen im RPGR die Expression alternativer Isoformen beeinträchtigen (Kirschner et al., 2001) (Brunner et al., 2008) (Schmid et al., 2010).

RPGR-Mutationen zeigen sich auch zu etwa 15 % bei Männern ohne familiäre Vorbelastung (Branham et al., 2012) und sogar in mutmaßlich angenommenen autosomal-dominanten Familien (Churchill et al., 2013) (Sullivan et al., 2013).

## 1.7 Expression von RPGR in der Photorezeptorgenes

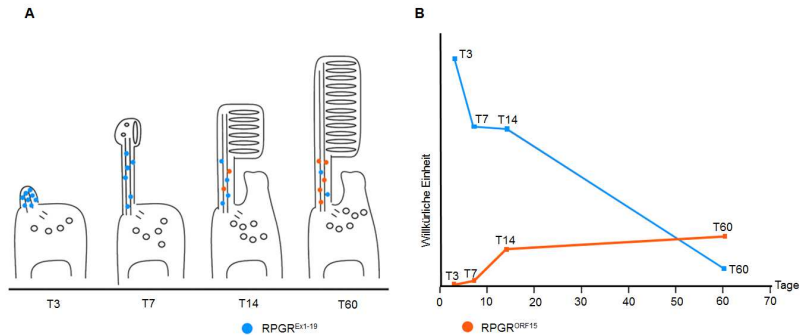
Zur Untersuchung der Expression der zwei Hauptspleißvarianten RPGR<sup>Ex1-19</sup> und RPGR<sup>ORF15</sup> wurden von Wright und Kollegen 2011 mehrere Mausmodelle entwickelt. Dafür wurden transgene Mäuse gezüchtet, die entweder das RPGR<sup>Ex1-19</sup> oder das RPGR<sup>ORF15</sup> exprimierten. Die Ergebnisse wurden mit Wildtyp- und *knock-out*-Mäusen verglichen. Es konnte anhand des RPGR-Protein-Levels und anhand immunhistochemischer Färbungen ein zeitlicher Unterschied in der Expression der beiden Proteine festgestellt werden.

Das RPGR<sup>Ex1-19</sup> wird vor allem in der frühen Entwicklung der Retina exprimiert und in der ausgereiften Retina wieder herabreguliert. Erst ab Tag 14 (T14) (siehe Abb. 1.9 A) zeigt sich ein verstärktes Auftreten von RPGR<sup>ORF15</sup>. In Abb. 1.9 A ist die Entwicklung der Photorezeptoren mit Expression der zwei Hauptspleißvarianten schematisch verdeutlicht. Das Schaubild wurde anhand immunhistochemischer Färbungen erstellt und zeigt die Expression des RPGR<sup>Ex1-19</sup> schon ab der frühen Entwicklung der Photorezeptoren (Tag 3 und Tag 7). Ab Tag 14 wird in verstärktem Maße auch das RPGR<sup>ORF15</sup> exprimiert und es kommt zum Anstieg der Expression bis zum Zeitpunkt Tag 60, an dem die murinen Photorezeptoren ausgereift sind. Abb. 1.9 B bildet schematisch die Proteinquantifizierung von RPGR<sup>Ex1-19</sup> und RPGR<sup>ORF15</sup> ab. Die Hochregulation des RPGR<sup>Ex1-19</sup> mit anschließender Herabregulierung sowie das zunächst niedrige Expressionslevel des RPGR<sup>ORF15</sup> mit langsam ansteigender Quantität wurden gegenüber der zeitlichen Entwicklung der Photorezeptoren dargestellt.

Die Daten bilden eine Korrelation zwischen der Entwicklung der Photorezeptoren und dem Wechsel des RPGR-Isoformen-Verhältnisses ab. Die Vermutung liegt nahe, dass die Isoformen unterschiedliche Aufgaben wahrnehmen. Allerdings konnten diese noch nicht genau erforscht werden.

Eine weitere Beobachtung bei diesem Mausmodell war, dass es zu einer deutlichen Überexpression der beiden RPGR-Varianten im Verhältnis zu Wildtyp-Mäusen kam. Die Überexpression führte im Falle des RPGR<sup>Ex1-19</sup> zu atypischen Akkumulationen des Proteins im Außensegment, zu einer abnormen Morphologie der Photorezeptoren und zur schweren retinalen Degenerationen. Die Auffälligkeiten waren im Vergleich zu

RPGR-*knock-out*-Mäusen viel stärker ausgeprägt. Dahingegen tolerierten die Photorezeptoren eine Überexpression von RPGR<sup>ORF15</sup> ohne Hinweis einer Degeneration (R. N. Wright et al., 2011)



### Abb. 1.9 Expression des RPGRs in der Photorezeptorgnese

Die schematische Darstellung A zeigt die Expression von RPGR<sup>Ex1-19</sup> und RPGR<sup>ORF15</sup> in der murinen Photorezeptorgnese und B das quantitative Expressionslevel der zwei Hauptisoformen im zeitlichen Verhältnis zueinander (modifiziert nach R. N. Wright et al., 2011); T = Tag.

## 1.8 Tiermodelle

Krankheitsbezogene Tiermodelle sind essentiell für die Entwicklung und Überprüfung neuer Therapien (Beltran et al., 2012). Für die durch RPGR-Mutationen ausgelöste XLRP existieren sowohl Maus- als auch natürlich vorkommende Hundemodelle (Hong et al., 2000) (Chang et al., 2002) (Hong, Pawlyk, Adamian et al., 2003).

Im Labor für experimentelle Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen wurde 2011 in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung Bad Nauheim das Mausmodell B6J.Sv129-Rpgr<sup>tm1sti</sup> (Rpgr<sup>tm1sti</sup>) entwickelt. Durch homologe Rekombination wurde eine Punktmutation in der repetitiven Sequenz des Exon ORF15 eingefügt, die vergleichbar

mit einer Punktmutation eines schwer betroffenen XLRP-Patienten ist. Die Expression des mutierten Proteins konnte zunächst auf RNA-Ebene gezeigt werden. In Paraffinschnitten konnten im zeitlichen Verlauf auch histologische Auffälligkeiten nachgewiesen werden. Diese zeigten einen Verlust der strukturellen Ordnung der OS und IS sowie der ONL. (Dissertation Röll, 2014) (Dissertation Schlegel, 2011)

## 1.9 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Klonierung und Expression eines rekombinant hergestellten RPGR<sup>Ex1-19</sup> zur Analyse und Optimierung der Nachweismethode für RPGR-Proteine im Gewebe. Die bisherig verwendeten Positivkontrollen sind murine Gewebeproben.

Des Weiteren erfolgt die Testung eines neu generierten Antikörpers, der gegen die RLD der bekannten RPGR-Isoformen gerichtet ist. Dieser Antikörper soll der genaueren Charakterisierung von Mausmodellen, speziell des Rpgg<sup>tm1sti</sup>, dienen.

Das rekombinant hergestellte RPGR<sup>Ex1-19</sup> wird mit bekannten Isoformen verglichen und interpretiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Enzyme und Marker

| Restriktionsenzym | Erkennungssequenz                        | Hersteller  |
|-------------------|--|---|
| BamHI             | 5' ...G↓GATCC...3'<br>3' ...CCTAG↑G...5' | New England BioLabs,<br>Frankfurt am Main,<br>Deutschland |
| EcoRI             | 5' ...G↓AATC...3'<br>3' ...CTTA↑G...5'   | New England BioLabs,<br>Frankfurt am Main,<br>Deutschland |
| EcoRV-HF          | 5' ...GAT↓ATC...3'<br>3' ...CTA↑TAG...5' | New England BioLabs,<br>Frankfurt am Main,<br>Deutschland |
| EcoRV             | 5' ...GAT↓ATC...3'<br>3' ...CTA↑TAG...5' | New England BioLabs,<br>Frankfurt am Main,<br>Deutschland |
| HindIII           | 5' ...A↓AGCTT...3'<br>3' ...TTCGA↑A...5' | New England BioLabs,<br>Frankfurt am Main,<br>Deutschland |
| PstI              | 5' ...CTGCA↓G...3'<br>3' ...G↓ACGTC...5' | New England BioLabs,<br>Frankfurt am Main,<br>Deutschland |

Tab. 2.1 Restriktionsenzyme

| Enzym     | Hersteller  |
|-----------|---|
| T4 Ligase | New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland |
| Phusion   | New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland |
| Takara    | Takara/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich  |

Tab. 2.2 Enzyme

| Marker   | Hersteller                                 |
|--|--|
| GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder               | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| GeneRuler 1 kb DNA Ladder                      | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| 6xHis Protein Ladder                           | QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland           |
| Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |

**Tab. 2.3 Marker**

## 2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

| Allgemeine Verbrauchsmaterialien             |  |
|--|--|
| BD Falcon 15 ml und 50 ml Tube               | BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA                      |
| CryoPure Gefäß 1,6 ml                        | Sarstedt AG und Co., Nürnbrecht, Deutschland                 |
| DURAN® Erlenmeyerkolben, verschiedene Größen | DURAN Group GmbH, Wertheim/Main, Deutschland                 |
| Einmalhandschuhe, Nitril                     | Ansell GmbH, München, Deutschland                            |
| Einmal-Küvetten PS 1,5 ml                    | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland                   |
| Electroporation Cuvettes                     | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland               |
| Fotokassette                                 | Dr. Goos-Suprema-GmbH, Heidelberg, Deutschland               |
| Glaswaren Ilmabor®                           | Technische Glaswerke Ilmenau GmbH, Ilmenau, Deutschland      |
| IPG-Streifen pH 3-10                         | GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden              |
| Magnetrührer                                 | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland              |
| Messzylinder, verschiedene Größen            | Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland |

|   |   |
|---|---|
| Parafilm  | Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA        |
| Petrischalen  | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland    |
| peQlab Ceramic Kit 1,4 mm 2 ml                        | VWR International GmbH, Erlangen, Deutschland       |
| Pinzetten   | Hammacher, Solingen, Deutschland                    |
| Pipetten  | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland          |
| Pipetten  | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland          |
| Pipettenspitzen                                       | Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland          |
| Pipettenspitzen                                       | Corning Incorporated Life Science, Lowell, MA, USA  |
| Poly-Prep® Chromatography Columns                     | Bio-Rad Laboratories, Inc. Philadelphia, PA, USA    |
| Protran BA 83 Nitrocellulose Blotting Membrane        | GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland    |
| Reaktionsgefäße div. Größen (Eppis)                   | Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland         |
| Reswelling Tray, Rehydrierungswanne (28-9334- 92)     | GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden     |
| Transportgefäß für flüssigen Stickstoff               | KGW-Isotherm, Karlsruhe, Deutschland                |
| Universalstift<br>Staedtler Permanent Lumocolor F 318 | STAEDTLER Mars GmbH & Co. KG, Nürnberg, Deutschland |
| Whatman™ 3MM Chromatography Paper                     | Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA              |
| Whatman® Gel Blotting Paper GB005                     | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA                   |

**Tab. 2.4 Verbrauchsmaterialien**



| Chemikalie/Verbrauchsmaterial                         | Hersteller/Bezugsquelle                             |
|---|---|
| Acrylamide/Bis Solution, 37,5:1                       | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent | GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland    |
| Amersham Hyperfilm™ ECL                               | GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland    |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS)                          | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Auftragspuffer 6x DNA Loading Dye                     | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA          |
| Bradford Lösung                                       | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA          |
| Bromphenolblau  | Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland        |
| ddH2O   | Eigene Herstellung                                  |
| dNTPs   | New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland |
| EDTA Dinatriumsalz Dihydrat                           | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Entwickler  | AGFA HealthCare, Bonn, Deutschland                  |
| Ethanol   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Ethidiumbromid  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Essigsäure  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Fixierer  | AGFA HealthCare, Bonn, Deutschland                  |
| Paraformaldehyd                                       | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| GenAgarose LE   | Genaxxon, Ulm, Deutschland                          |
| Glycin  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Glycerin  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |
| Glycerol  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland     |

|  |   |
|--|---|
|  | Deutschland                                     |
| HCl  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Imidazol                                       | Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland    |
| Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid IPTG        | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Isopropanol                                    | Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland    |
| KCl  | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| DeStreak Rehydration Solution (17-6003-19)     | GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT)                       | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA               |
| LB Broth Base                                  | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland              |
| Methanol                                       | Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland    |
| Milchpulver                                    | Einzelhandel                                    |
| Plus One Drystrip Cover Fluid (17-1335-01)     | GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden |
| NaCl   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>               | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumcarbonat                                | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumthiosulfat                              | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Ni-NTA Agarose                                 | QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland                |
| PageBlue™ Protein Staining Solution            | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA      |
| IPG Puffer pH 3-10 (17-6000- 87)               | GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden |
| <i>sodium dodecyl sulfate</i> (SDS) ultra pure | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe,             |

|              |   |
|--------------|---|
|              | Deutschland                                     |
| Select Agar  | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland              |
| Silbernitrat | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| TEMED        | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Tris         | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| TritonX100   | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Tween 20     | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Urea         | Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland    |

**Tab. 2.5 Chemikalien/Verbrauchsmaterialien**

| Antibiotikum | Konzentration | Hersteller                  |
|--------------|---------------|-----------------------------|
| Ampicillin   | 100 µg/ml     | Sigma, München, Deutschland |

**Tab. 2.6 Antibiotikum**

## 2.1.3 Puffer und Lösungen

| Puffer und Lösungen | Herstellung   |
|---------------------|---|
| 1xTBE               | 1 M Tris<br>0,82 M Borsäure<br>10 mM EDTA   |
| 1xTBS               | 25 mM Tris<br>150 mM NaCl<br>2 mM KCl<br>pH 7,4<br>mit dest. Wasser auf 1 l auffüllen |
| 1x TBST             | 1000 ml 1x TBS  |

|   |   |
|---|---|
|   | 2 ml TritonX100   |
| 10x Tris-Glycin-Puffer<br>(Westerntransferpuffer) | 30,275 g Tris<br>144 g Glycin<br>20 % SDS<br>mit dest. Wasser auf 1 l auffüllen   |
| 1x Westerntransferpuffer                          | 100 ml 10x Tris-Glycin-Puffer<br>200 ml Methanol<br>700 ml ddH <sub>2</sub> O   |
| 1x Tris-Glycin-Laufpuffer                         | 100 ml 10x Tris-Glycin-Puffer<br>900 ml ddH <sub>2</sub> O  |
| Blockierlösung 3 % / 5 %                          | 100 ml 1xTBS<br>3 g / 5 g Milchpulver   |
| 1xPBS zum Verdünnen                               | 8 g NaCl<br>0,2 g KCl<br>14,4 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>pH 7,4<br>mit dest. Wasser auf 1 l auffüllen |
| 1,5 M TrisHCl pH 8,8                              | 90,825 g Tris<br>pH 8,8 mit HCl einstellen<br>mit dest. Wasser auf 500 ml auffüllen   |
| 1 M TrisHCl pH 6,8                                | 12,14 g Tris<br>pH 6,8 mit HCl einstellen<br>mit dest. Wasser auf 100 ml auffüllen  |
| 0,5 M TrisHCl pH 6,8                              | 30,275 g Tris<br>pH 6,8 mit HCl einstellen<br>mit dest. Wasser auf 500 ml auffüllen   |
| 20 % SDS-Lösung                                   | 50 g SDS<br>250 ml ddH <sub>2</sub> O   |
| Tris-HCL Stock Solution                           | 61 g Tris<br>pH 6,8 mit HCl einstellen<br>mit dest. Wasser auf 1l auffüllen   |
| Equilibrierlösung                                 | 20 ml Tris-HCL Stock Solution<br>72 g Urea<br>60 ml Glycerol<br>2 g SDS   |

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
|                                  | mit ddH <sub>2</sub> O auf 200 ml auffüllen   |
| Ladepuffer Westernblot 5xLaemmli | 1 g SDS<br>5 ml Glycerol<br>3 ml 1M Tris pH 6,8<br>0,05 g Bromphenolblau<br>2 ml ddH <sub>2</sub> O |

**Tab. 2.7 Puffer und Lösungen**

| Lösung für Silberfärbungen | Zusammensetzung   |
|----------------------------|---|
| Fixierlösung               | 50 % (v/v) Methanol<br>12 % (v/v) Essigsäure<br>In ddH <sub>2</sub> O bei RT gelagert<br>Direkt vor Gebrauch erfolgt die Zugabe von 0,05 % (v/v) Paraformaldehyd            |
| Thiosulfatlösung           | 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat<br>In ddH <sub>2</sub> O bei RT gelagert   |
| Imprägnierlösung           | 0,2 % (w/v) Silbernitrat<br>In ddH <sub>2</sub> O frisch eingesetzt<br>Direkt vor Gebrauch erfolgt die Zugabe von 0,05 % (v/v) Paraformaldehyd                              |
| Entwicklerlösung           | 6 % (w/v) Natriumcarbonat<br>2 % (v/v) Thiosulfatlösung<br>In ddH <sub>2</sub> O bei RT gelagert<br>Direkt vor Gebrauch erfolgt die Zugabe von 0,05 % (v/v) Paraformaldehyd |
| Stopplösung                | 50 mM EDTA Dinatriumsalz Dihydrat<br>In ddH <sub>2</sub> O bei RT gelagert  |

**Tab. 2.8 Lösungen für die Silbernitratfärbung**

| Gel             | Inhaltsstoffe  |
|-----------------|--|
| Trenngel 10 %   | 3,3 ml Acrylamide/Bis Solution, 37,5:1<br>4,2 ml dH <sub>2</sub> O<br>100 µl 10 % SDS-Lösung<br>2,5 ml 1,5M TrisHCl pH 8,8<br>5 µl TEMED<br>50 µl 10 % APS |
| Sammelgel 4 %   | 0,65 ml Acrylamide/Bis Solution, 37,5:1<br>3 ml dH <sub>2</sub> O<br>50 µl 10 % SDS-Lösung<br>1,25 ml 0,5M TrisHCL pH 6,8<br>5 µl TEMED<br>50 µl 10 % APS  |
| PCR-Agarose-Gel | 1 g Agarose (LE)<br>100 ml 1x TBE<br>7 µl Ethidiumbromid   |

**Tab. 2.9 Gele**

## 2.1.4 Kits und Vektoren

| DNA-Präparations-Kits    |                                    |
|--------------------------|------------------------------------|
| Resuspension Buffer S1   | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland |
| Lysis Buffer S2          | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland |
| Neutralization Buffer S3 | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland |
| NucleoSpin Extract II    | Macherey-Nagel, Düren, Deutschland |
| QIAGEN Plasmid Mini Kit  | QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland   |
| QIAGEN Plasmid Maxi Kit  | QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland   |

**Tab. 2.10 DNA-Präparations-Kits**

| Klonierungskits                 | Hersteller   |
|---------------------------------|--|
| TOPO TA Cloning Kit             | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland                 |
| In-Fusion HD EcoDry Cloning Kit | Takara/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich |

**Tab. 2.11. Klonierungskits**

| Vektor                   | Hersteller                         |
|--------------------------|------------------------------------|
| pCR2.1 TOPO              | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland |
| pQETriSystem His-Strep 1 | QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland   |

**Tab. 2.12 Vektoren**

## 2.1.5 Primer

| Primernamen | Sequenz                             |
|-------------|-------------------------------------|
| RPGR 37a    | CGGGAGCACAGTAGTGGTCTATGCCA          |
| RPGR 37b    | GACAGCAGAACCAACCAGACATAGTTTATT      |
| in1-19 for  | TCGTGGATCCGAATTCTGGTCTATGCCAAGA     |
| in1-19 rev  | GTGCGGCCGCAAGCTTCAGTTTCTGAAAGTT     |
| M13 for     | CAGGAAACAGCTATGAC                   |
| M13 rev     | GTA AACGACGGCCAG                    |
| pQE-Tri F   | GTTATTGTGCTGTCTCATC                 |
| pQE-Tri R   | TCGATCTCAGTGGTATTTGTG               |
| RPGR1-19f5  | GCATGAATTCAATGGCGATATCCCGGGAGCTCGTG |
| RPGR1-19r7  | GCATGAATTCAGTTTCTGAAAGTTGAGGC       |

**Tab. 2.13 Primer**

## 2.1.6 Bakterienstämme

| Bakterienstämme                             | Bezugsquelle  |
|---|---|
| One Shot® TOP10 Electrocomp™ <i>E. coli</i> | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland                  |
| StellarCompetent Cells                      | Takara/Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich  |
| <i>E. coli</i> XL-1 blue                    | Eigenherstellung                                    |
| BI21(DE3)                                   | New England BioLabs, Frankfurt am Main, Deutschland |

Tab. 2.14 Bakterienstämme

## 2.1.7 Geräte und Software

| Gerät und Software          | Hersteller   |
|-----------------------------|--|
| Autoklav Dx-65              | Systec GmbH, Wetzberg, Deutschland                                 |
| BioDocAnalyze               | Biometra, Göttingen, Deutschland                                   |
| BioLane™ HTI                | Höller & Hüttner AG, Information Technology, Tübingen, Deutschland |
| BioPhotometer               | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland                         |
| Blotter                     | Biometra, Göttingen, Deutschland                                   |
| Eismaschine AF 80           | Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, USA                        |
| Software zur Proteinanalyse | <a href="http://www.expasy.org">www.expasy.org</a>                 |
| Feinwaage                   | Acculab Sartorius Group, Bradford, MA, USA                         |
| Power Supply 9009 + 3035T   | Biometra, Göttingen, Deutschland                                   |
| Gelkammer Whatman           | Biometra, Göttingen, Deutschland                                   |
| Inkubator                   | Binder, Tuttlingen, Deutschland                                    |
| Kälte-Umwälzthermostat F12  | JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland                                 |
| Magnetrührer mit Heizplatte | IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland                     |



|  |  |
|--|--|
| Microsoft Office Home and Student 2016   | microsoft corporation, Redmond, WA, USA                    |
| Mikrowelle                               | Siemens, München, Deutschland                              |
| Multigel SDS-Page                        | Biometra, Göttingen, Deutschland                           |
| Multiporator                             | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland                 |
| Multiphor™ II Electrophoresis Unit       | GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala, Schweden            |
| PCR-Cycler T Professional Basic Gradient | Biometra, Göttingen, Deutschland                           |
| pH-Meter                                 | Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland                   |
| Schüttler Certomat H                     | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland                       |
| Sterilbank                               | Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland                         |
| Thermoblock                              | Biometra, Göttingen, Deutschland                           |
| Präzisionswaage                          | Ohaus Corporation, Parsippany, NJ, USA                     |
| Precellys 24                             | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland             |
| VE-Anlage Arium 61316                    | Sartorius AG, Göttingen, Deutschland                       |
| Vector NTI Software                      | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA                 |
| Vortexer                                 | VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland             |
| Wasserbad TW12                           | JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland                         |
| Wipptisch WT17                           | Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland                      |
| Zentrifuge AK15                          | Sigma, München, Deutschland                                |
| Zentrifuge 1-15 PK                       | Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland |

**Tab. 2.15 Geräte und Software**

## 2.1.8 Antikörper

| Primärantikörper                      | Wirtspezies                              | Hersteller  |
|---------------------------------------|--|---|
| 6xHis-Antikörper (ab1187)             | <i>Rabbit</i> , polyklonal, HRP-gelabelt | Abcam, Cambridge, United Kingdom                        |
| Anti-RPGR H-70 (sc-366626)            | <i>Rabbit</i> , polyklonal               | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland |
| Anti-RPGR Antikörper der Firma Davids | <i>Chicken</i> , polyklonal              | Davids Biotechnologie GmbH, Regensburg, Deutschland     |
| Anti-GAPDH                            | <i>Rabbit</i> , polyklonal               | Merck Chemicals GmbH, Darmstadt, Deutschland            |

**Tab. 2.16 Primärantikörper**

| Sekundärantikörper                     | Spezies                    | Hersteller  |
|--|----------------------------|---|
| <i>Goat Anti-Rabbit</i> (sc-2004)      | <i>Goat Anti-Rabbit</i>    | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland |
| <i>Rabbit-Anti-Chicken</i> -Antikörper | <i>Rabbit Anti-Chicken</i> | Sigma, München, Deutschland                             |

**Tab. 2.17 Sekundärantikörper**

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 PCR

Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine *in vitro* Methode zur Herstellung großer Mengen spezifischer DNA-Fragmente definierter Länge und Sequenz, die von Oligonukleotiden (Primer) flankiert wird. Im initialen Schritt, der Denaturierung, trennen sich die beiden DNA-Doppelstränge bei 95 °C voneinander. Im Annealingschritt binden die Primer bei primerspezifischen Temperaturen an ihre komplementäre DNA-Sequenz und im Elongationsschritt werden die Primer unter dNTP-Verbrauch mittels Polymerasen so verlängert, dass die einzelsträngige DNA zu Doppelsträngen wird. Die Methode wird unter anderem zur genetischen Testung und DNA-Sequenzierung verwendet. Nach der PCR werden die Produkte auf ein Agarose-Gel aufgetragen und anhand ihrer Größe aufgetrennt.

| Standard PCR-Ansatz (10µl) | Standard PCR-Protokoll |       |
|----------------------------|------------------------|-------|
| 7,0 µl ddH <sub>2</sub> O  | 00:10 min              | 98 °C |
| 2,0 µl Puffer              | 00:10 min              | 72 °C |
| 0,8 µl dNTP                | 04:00 min              | 72 °C |
| 0,1 µl Primer a            | 00:10 min              | 98 °C |
| 0,1 µl Primer b            | 00:15 min              | 72 °C |
| 0,5 µl cDNA                | 05:00 min              | 72 °C |
| 0,1 µl Polymerase          | 10:00 min              | 4 °C  |

**Tab. 2.18 Standard-PCR-Bedingungen**

Zur Einführung von Mutationen in eine Plasmid-DNA benötigt man hingegen eine Mutagenese-PCR mit speziellen Primern und Polymerasen. Die Primer tragen die gewünschte Mutation am Ende und weisen im Unterschied zum vorherig beschriebenen Prinzip einer PCR, die der reinen Amplifikation dient, solche Sequenzen auf, die dafür sorgen, dass die DNA-Fragmente bei der Elongation in entgegengesetzte Richtungen verlängert werden. Die Polymerasen besitzen beide eine Korrekturfunktion (*Proofreading*). Da bei dieser Art von PCR das gesamte Plasmid amplifiziert wird und bei großen Plasmiden die Fehleranfälligkeit erhöht ist, stellt die Größe des Plasmids einen begrenzenden Faktor dar.

## 2.2.2 Sequenzierung

Die PCR-Produkte wurden zum Sequenzieren an das Microsynth Seqlab in Göttingen, Deutschland, geschickt.

## 2.2.3 Gelaufreinigung

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten, die aus Polyacrylamid-Gelen ausgeschnitten wurden, diente das NucleoSpin® Extract II von Macherey-Nagel. Die Methode wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

## 2.2.4 Restriktionsverdau

Die eigentliche Funktion von Restriktionsenzymen ist die Zerstörung fremder DNA, die in die Zelle eindringt. Dieses Prinzip kann man sich zur Analyse und Erzeugung von Klonierungsfragmenten zunutze machen. Dafür werden Restriktionsenzyme verwendet, die zwischen spezifischen DNA-Sequenzen einen Doppelstrangbruch erzeugen. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tab. 2.1 aufgelistet und nach Herstellerangaben verwendet worden.

## 2.2.5 Ligation

Die Methode dient beispielsweise der Verbindung von Vektoren, die zuvor durch Restriktionsenzyme linearisiert wurden, mit *Inserts*. Die Ligation wird von der T4 Ligase katalysiert. Das Enzym verbindet durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindungen das 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylende von zwei DNA-Enden. Der Ligationsansatz besteht neben dem Vektor, dem Insert und der Ligase mit ihrem dazugehörigen Puffer aus ddH<sub>2</sub>O, das zum Auffüllen auf ein bestimmtes Gesamtvolumen dient. Der Ansatz wird 60 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

| Ligation                                   |
|--|
| x µl Vektor                                |
| x µl Insert                                |
| 2 µl T4 Ligationspuffer                    |
| 1 µl T4 Ligase                             |
| mit ddH <sub>2</sub> O auf 20 µl auffüllen |
| 60 Minuten bei RT inkubieren               |

**Tab. 2.19 Ligationsansatz**

## 2.2.6 Elektroporation

Für die Elektroporation sollten die benötigten Arbeitsutensilien (Küvette, elektrokompetente Zellen, Reaktionsgefäße) stets auf Eis gekühlt stehen und die Kühlkette nicht unterbrochen werden.

Das Plasmid, bestehend aus Vektor und *Insert*, wird nach der Ligation in elektrokompetente *E. coli*s transformiert, um eine Vielzahl von Plasmiden herstellen zu können. Dies erfolgt mit Hilfe von Elektroporation. Dafür werden 50 µl der Bakteriensuspension mit 2 µl des Ligationsansatzes (Vektorkonstrukt) zusammengeführt (Elektroporationsansatz) und einem kurzen elektrischen Impuls ausgesetzt (5 ms, 2000 V). So wird die Bakterienzellwand permeabel und ermöglicht es der DNA, in die Zelle einzudringen. Nach dem elektrischen Impuls wird auf 37 °C erwärmtes Luria Brother (LB) -Medium ohne Antibiotikum zum Elektroporationsansatz hinzugegeben und die Küvette auf diese Weise ausgespült. Diese Suspension wird für 60 Minuten bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert, wodurch den Zellen ermöglicht wird, sich zu teilen und die Resistenzgene zu exprimieren. Anschließend werden 100 µl der Suspension auf Ampicillin enthaltenden LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

## 2.2.7 Klonierung

### 2.2.7.1 TOPO-Klonierung

Für die Ligation von Vektor und Insert muss zunächst an das PCR-Produkt ein A-Überhang angehängt werden. Unter Tab. 2.20 ist das Vorgehen beschrieben. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben. Das Konstrukt wurde anschließend nach dem unter 2.2.6 beschriebenen Prinzip in One Shot® TOP10 Electrocomp™ *E.coli* kloniert.

| A-Überhang                                 |
|--|
| 1-7 µl PCR-Produkt                         |
| 1 µl Taq-Puffer mit MgCl <sub>2</sub>      |
| dATP (finale Konzentration 0,2mM)          |
| 5 Units Taq                                |
| mit ddH <sub>2</sub> O auf 10 µl auffüllen |
| 20 min bei 70 °C inkubieren                |

Tab. 2.20 A-Überhang

### 2.2.7.2 In-Fusion-Klonierung

Die In-Fusion-Klonierung wurde anhand des Herstellerprotokolls durchgeführt. Es wurden der pQE-TriSystem His-Strep 1 Vektor und die Primer in1-19 for und in1-19 rev verwendet. Als Bakterienzellen wurden die Stellar™ *Competent Cells* verwendet. Die Transformation erfolgte mittels chemischer Transfektion.

## 2.2.8 Miniprep

Nach der TOPO-Klonierung und der In-Fusion-Klonierung wurden jeweils am nächsten Tag die gewachsenen Kolonien mittels einer Pipettenspitze von der Platte abgenommen (gepickt), in 5 ml Flüssigkultur (LB-Medium mit Ampicillin versetzt) expeditiert und bei 37 °C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert.

Am darauffolgenden Tag kann nun die Plasmid-DNA aus der Flüssigkultur isoliert werden. Dazu werden 1,5 ml der Kultur in ein Reaktionsgefäß gegeben und 5 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellett mit 100 µl S1 (*Resuspension Buffer*) Puffer resuspendiert. Nach der Resuspension werden nacheinander 100 µl S2 (*Lysis Buffer*) und S3 (*Neutralization Buffer*) Puffer hinzugegeben und jeweils einmal invertiert. Nachdem die Zelltrümmer abzentrifugiert sind (10 min bei 10.000 rpm), wird der Überstand vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun erfolgt die Zugabe von 700 µl bei -20 °C gelagertem Ethanol (absolut) zum Ausfällen der Plasmid-DNA und ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm. Der Überstand wird verworfen, 200 µl 70 %igen Ethanols hinzugegeben und 5 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird wieder verworfen und das Reaktionsgefäß mit geöffnetem Deckel bei 60 °C im Heizblock gelagert, bis der restliche Alkohol verdunstet ist. Anschließend wird das Pellett mit 20 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

## 2.2.9 Maxiprep

Für eine Maxi-Prep muss zunächst eine Übernachtskultur mit 100 ml LB-Medium, 100 µl Ampicillin und 1 ml der Flüssigkultur angesetzt werden, die über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Aufreinigung mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit nach Herstellerangaben.

## 2.2.10 Proteinaufreinigung

Die Proteinaufreinigung erfolgte nach Angaben des QIAexpressionist™ aus dem Jahre 2003 von Qiagen.

## 2.2.11 SDS-Page

Die hier verwendeten Gele der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-Page) bestehen jeweils aus einem zehnpromzentigen Trenngel und einem vierpromzentigen Sammelgel, die zwischen zwei Glasplatten gegossen werden. Als Marker wurde der Spectra™Multicolor

Broad Range Protein Ladder verwendet. Die Proben wurden mit einem Auftragspuffer versetzt und vor der Gelauftragung 5 Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend 3 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand der Proben wurde in die Geltaschen pipettiert. Die SDS-Gele liefen jeweils 55 Minuten lang bei 200 Volt umgeben von SDS-Laufpuffer. Anschließend konnten die Gele vorsichtig aus den Glasplatten gelöst und weiterverarbeitet werden.

### **2.2.12 Coomassie-Färbung**

Das SDS-Gel kann nach der Gelelektrophorese gefärbt und somit die darin enthaltenen Proteine sichtbar gemacht werden.

Dafür wird das Gel nach dem Lauf kurz mit vollentsalztem Wasser (VE-Wasser) abgespült und dann für eine Stunde in der PageBlue™ Protein Staining Solution gefärbt. Anschließend wird das Gel in VE-Wasser unter regelmäßigem Austausch des VE-Wasser geschwenkt, sodass am Ende nur noch die mit der Lösung angefärbten Proteine sichtbar sind.

### **2.2.13 Silbernitratfärbung**

Die Silbernitratfärbung ist sensitiver (0,1 – 1 ng/Bande) als die Coomassie-Färbung (0,1-0,5 µg/Bande) und kann nach einer SDS-Page erfolgen. Dafür wurde das Gel eine Stunde bei Raumtemperatur in Fixierlösung gelegt, danach dreimal für jeweils 10 min mit einer 50 %-igen Ethanollösung gewaschen und für 1 min in Thiosulfatlösung sensibilisiert. Anschließend folgte eine 20-minütige Färbung des Gels mit 0,2 %-iger Silbernitratlösung (Imprägnierlösung) und nach dreimaligem Waschen des Gels mit ddH<sub>2</sub>O für jeweils 10 min die Inkubation der auf dem Gel enthaltenen Proteine mittels Entwicklerlösung. Zum Stoppen der Entwicklungsreaktion wurde eine entsprechende Stopplösung hinzugegeben.



## 2.2.14 Westernblot

Das SDS-Gel kann nach dem Lauf anstatt gefärbt auch geblottet werden. Dabei werden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose Membran transferiert und anschließend mit spezifischen, gegen einzelne Proteine gerichteten Antikörpern detektiert.

Auf den Blotter wurden folgende Bestandteile der Reihenfolge nach hingelegt: ein dickes Chromatographie-Papier, zwei dünne Chromatographie-Papiere, Nitrocellulose Membran, Gel, zwei dünne Chromatographie Papiere, ein dickes Chromatographie Papier. Alle diese Bestandteile wurden zunächst in Westerntransferpuffer gelegt und dann übereinandergeschichtet. Die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte 52 Minuten bei 200 mA.

Die Membran wurde anschließend eine Stunde in 3 % oder 5 % Blockierlösung auf dem Wipptisch inkubiert, anschließend kurz mit 1xTBS abgewaschen und der jeweilige Antikörper darauffolgend hinzugegeben. Nach Inkubation eines Antikörpers wurde die Membran 3 x 10 Minuten mit 1xTBS gewaschen, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Der Waschgang wurde bei Verwendung eines Sekundärantikörpers nach Inkubation wiederholt.

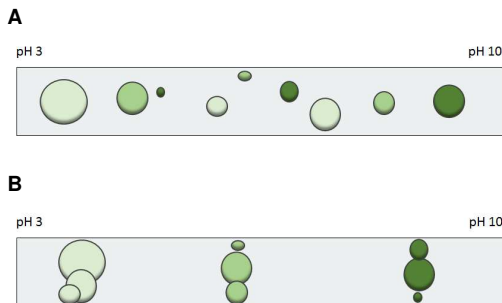
Zur Detektion der Proteine, die von den Antikörpern gebunden wurden, erfolgte die Chemolumineszenz mit ECL. Hierbei katalysiert ein Enzym, das mit den Antikörpern gekoppelt ist und *horseradish peroxidase* (HRP) heißt, die Oxidation von Luminol, sodass Lumineszenz beim Auflegen eines Röntgenfilms detektiert werden kann.

## 2.2.15 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE) dient der Auftrennung von Proteinen sowohl anhand ihres isoelektrischen Punktes (pI) mittels Isoelektrischer Fokussierung (IEF) als auch anhand ihres Molekulargewichtes mithilfe eines SDS-Gels.

Die IEF ist die 1. Dimension der 2D-GE und trennt Proteine entlang eines pH-Gradienten auf. Ein Protein setzt sich aus Aminosäuren verschiedener Ladungen zusammen. Der pI ist der pH-Wert, bei dem sich die Ladungen eines Proteins gegeneinander aufheben und das Protein somit nach außen hin die Ladung Null trägt. Bei diesem pH-Wert sinkt die elektrophoretische Beweglichkeit und das Protein verharrt an der Stelle. Der dafür benötigte pH-Gradient ist auf einem Streifen aufgetragen, der immobilisierter pH-Gradient-Streifen (IPG-Streifen) genannt wird. Der IPG-Streifen besteht aus trockenem

Polyacrylamid-Gel, in dem schwache Säure- und Basen-Gruppen (Immobiline) gebunden sind. Dadurch entsteht ein pH-Gradient, der nicht beweglich ist. Der hier verwendete IPG-Streifen trennt Proteine mit pH-Werten zwischen 3 und 10 auf. Zur Vorbereitung der IEF wurde der IPG-Streifen auf ein Gemisch aus 5 µg Eluat, 95 µl DeStreak Rehydration Solution und 20 µl IPG Puffer pH 3-10 gebettet, anschließend mit Plus One Drystrip Cover Fluid überschichtet und über Nacht im Reswelling Tray bei Raumtemperatur rehydriert. Am nächsten Tag wurde der IPG-Streifen nach kurzem Abspülen mit destilliertem Wasser in den Immobiline Strip Holder mit der Agarose nach oben zeigend in ein gekühltes Multiphor-Gerät (14 °C) gelegt und an beiden Enden mit einem mit destilliertem Wasser benetzten Whatman Papier bedeckt und anschließend mit Dry Strip Cover Fluid überschichtet. Anschließend wurde Strom angeschlossen, sodass die Proteine der Probe entlang des pH-Gradienten wandern konnten (siehe Abb. 2.1 und Tab. 2.21). Die Proteine der Probe sind jetzt in der 1. Dimension aufgetrennt. Anschließend können IPG-Streifen bei -80 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet werden. (Görg, 2004)



**Abb. 2.1 Schematische Darstellung von Proteinen auf einem IPG-Streifen**

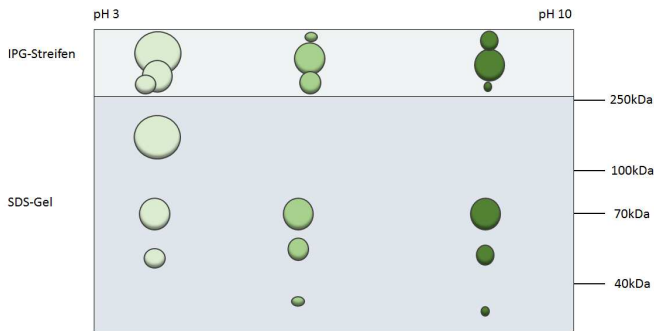
Die verschiedenen Proteine sind in unterschiedlichen Grün-Tönen **A** vor der IEF (= Isoelektrische Fokussierung) und **B** nach IEF dargestellt.

| Schritt | Volt (V) | Current mA | Power (W) | Volt/hour | Zeit in min |
|---------|----------|------------|-----------|-----------|-------------|
| S 0     | 150      | 1          | 1         | 75        | 30          |
| S 1     | 300      | 1          | 1         | 150       | 30          |
| S 2     | 600      | 1          | 1         | 300       | 30          |
| S 3     | 1500     | 1          | 1         | 2250      | 90          |
| S 4     | 3000     | 1          | 1         | 3000      | 120         |

**Tab. 2.21 IEF-Laufbedingungen**

Die Laufbedingungen gelten für die Power supply 9009 und IPG Strip 7 cm.

Proteine, die eine ähnliche Ladung, aber ein unterschiedliches Molekulargewicht haben, lassen sich mit der IEF nicht unterscheiden. Hierfür wird die Auftrennung im SDS-Gel (2. Dimension), das nur aus 10 % Trenngel besteht, benötigt. Der IPG-Streifen wird zur Vorbereitung 2 x 15 Minuten auf dem Wipptisch in Equilibrierlösung + 0,1 g DTT bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend längs in die vorbereitete Geltasche eingelegt, umgeben von 0,5 % Agarose. Bei Anlegen von Strom können die Proteine vom IPG-Streifen in das SDS-Gel wandern und nach dem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Hier wurden zunächst 100 Volt für 10 Minuten angelegt, anschließend 50 Minuten bei 150 Volt. Eine schematische Abbildung dieses Vorgangs ist unter Abb. 2.2 dargestellt. (Görg, 2004)



### Abb. 2.2 Prinzip der 2D-Gelelektrophorese.

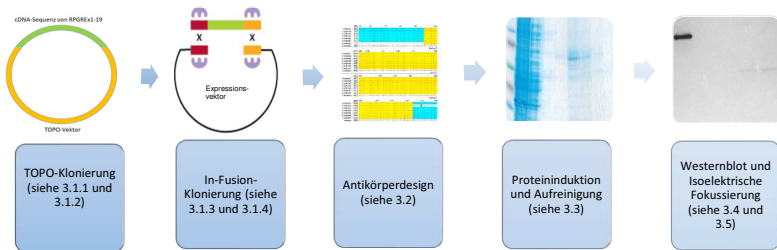
Die verschiedenen Proteine (hier schematisch in verschiedenen Grün-Tönen dargestellt) werden im IPG-Streifen anhand des Isoelektrischen Punktes (1. Dimension) geordnet und anschließend im SDS-Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (2. Dimension)

### 2.2.16 Tierversuchsgenehmigung

Die Genehmigung für die Entnahme der Gewebeprobe wurde vom Regierungspräsidium Gießen erteilt und ist unter dem Geschäftszeichen „V 54 - 19 c 20 15 h 01 GI 20/16 Nr. 94/2014“ zu finden.

### 3 Ergebnisse

Zur Herstellung des rekombinanten RPGR<sup>Ex1-19</sup> wurden zunächst mehrere Klonierungsschritte benötigt, bevor ein neuer Antikörper designt und anschließend am aufgereinigten Protein mit weiteren Antikörpern getestet werden konnte. Unter Abb. 3.1 ist dieses Vorgehen kurz schematisch abgebildet.



**Abb. 3.1 Arbeitsschritte im Ergebnisteil**

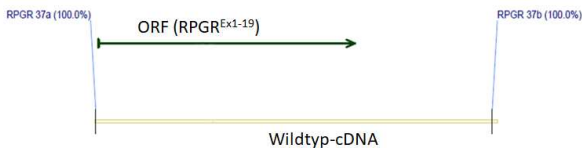
Kurze Übersicht der Arbeitsschritte. Die entsprechenden Kapitelnummerierungen sind jeweils den Arbeitsschritten zugeordnet.

#### 3.1 Gewinnung der Expressionsplasmide

Nachfolgend werden die Ergebnisse der Klonierung des RPGR<sup>Ex1-19</sup> in verschiedene Vektoren präsentiert. Zunächst wurde das RPGR<sup>Ex1-19</sup> aus komplementärer Desoxyribonukleinsäure (*complementary deoxyribonucleic acid*, cDNA) einer Wildtyp-Maus in den pCR2.1.-TOPO-Vektor zur Herstellung eines Plasmids kloniert. Nach Überprüfung des Konstrukts erfolgte die Klonierung der RPGR<sup>Ex1-19</sup>-Sequenz in den pQE-TriSystem His-Strep 1 Expressionsvektor.

### 3.1.1 Primerdesign

Um die cDNA-Sequenz des RPGR<sup>Ex1-19</sup> zu erhalten, wurde zunächst ein Primerpaar 37a und 37b designt, das in einem 2685 Basenpaar (bp) großen Bereich der Wildtyp-cDNA liegt und neben dem 1750 bp großen *open reading frame* (ORF) RPGR<sup>Ex1-19</sup> auch einen untranslatierten Bereich enthält. Das Primerpaar 37a und 37b wurde mittels VectorNTI designt und unter Abb. 3.2 eine schematische Darstellung der Primerlage zu der verwendeten cDNA abgebildet.



#### Abb. 3.2 Primerlage 37a und 37b

Der gewünschte cDNA-Bereich einer Wildtypmaus mit Abbildung des *open reading frame* (ORF) RPGR<sup>Ex1-19</sup> wird vom Primerpaar 37a und 37b eingerahmt.

### 3.1.2 Klonierung des RPGR<sup>Ex1-19</sup> in den pCR2.1.-TOPO-Vektor

Nach dem Primerdesign erfolgte nun eine PCR mit dem Primerpaar 37a und 37b im unter 3.1.1 beschriebenen cDNA-Bereich. Das Prinzip einer PCR wurde unter 2.2.1 erläutert, die gewählten PCR-Bedingungen und der Ansatz für diese PCR im Anhang aufgeführt.



**Abb. 3.3 PCR mit Primerpaar 37a und 37 b**

In der linken Spur ist der Marker aufgetragen, die drei folgenden Banden zeigen das PCR-Produkt. Die erwartete Größe der PCR-Produkte liegt bei 2685 bp.

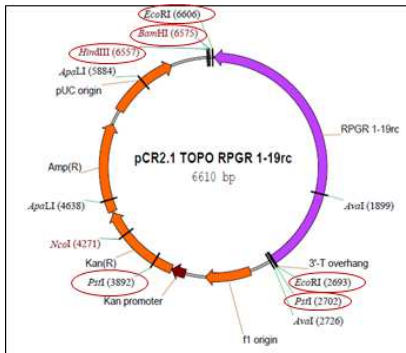
Die drei PCR-Produkte in Abb. 3.3 entsprachen ungefähr der erwarteten Größe und wurden deshalb ausgestanzt. Es erfolgte die Gelaufreinigung mit dem NucleoSpin® Extract II von Macherey-Nagel, deren Prinzip unter 2.2.3 bereits beschrieben wurde. Bevor die Klonierung in den pCR2.1.-TOPO-Vektor vorgenommen werden konnte, musste zunächst am 3'-Ende des aufgereinigten PCR-Produktes ein A-Überhang zugefügt werden.

Zur Klonierung des PCR-Produktes mit dem pCR2.1.-TOPO-Vektor wurde das Prinzip der TOPO-Klonierung angewendet. Das Konstrukt wurde mithilfe von Elektroporation in XL-1 Blue Zellen transformiert. Es konnten 24 Klone gepickt und zur Plasmid-Aufreinigung aufgezogen werden, die mittels Miniprep aufgereinigt wurden. Zur ersten Kontrolle des Plasmids wurde ein Restriktionsverdau der 24 Proben mit EcoRI durchgeführt (Abb. 3.5). Die erwarteten Größen des Verdau sind in Tab. 3.1 aufgeführt. Klon 18 zeigte in etwa die erwarteten Größen, was durch eine Sequenzierung des Inserts mit dem Primerpaar M13 *forward* und M13 *reverse* bestätigt wurde.

Daraufhin erfolgte der Ansatz einer 100 ml Bakterienkultur des Klons 18, um eine Maxiprep des Klons herstellen zu können. Nach der Aufreinigung des Plasmids wurde ein Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoRI, PstI, HindIII und BamHI durchgeführt. Die erwarteten Größen der vier Kontrollverdaue sind in Tab. 3.1 zusammengefasst. Die Kontrollverdaue zeigten alle ungefähr die erwarteten Größen, sodass anschließend eine Sequenzierung des Plasmids zur Kontrolle der RPGR<sup>EX1-19</sup>-Sequenz erfolgte.

| Restriktions-<br>enzym | Erwartete<br>Fragmentgrößen |
|------------------------|-----------------------------|
| EcoRI                  | 3913 bp<br>2697 bp          |
| PstI                   | 5420 bp<br>1190 bp          |
| HindIII                | 6610 bp                     |
| BamHI                  | 6610 bp                     |

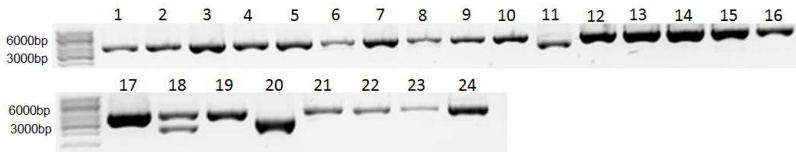
**Tab. 3.1 Auflistung der Restriktionsenzyme**



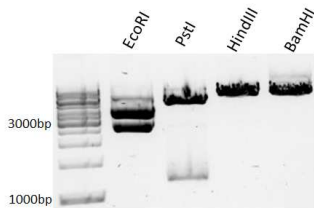
**Abb. 3.4 Schnittstellen im TOPO-Vektor**

In der Tab. 3.1 sind die Restriktionsenzyme EcoRI, PstI, HindIII, BamHI mit den erwarteten Fragmentgrößen aufgeführt und in Abb. 3.4 farblich hervorgehoben (rote Umkreisung) anhand ihrer Schnittstellen im neu hergestellten TOPO-Vektor.





**Abb. 3.5 Verdau der 24 aufgereinigten Plasmide mit EcoRI**

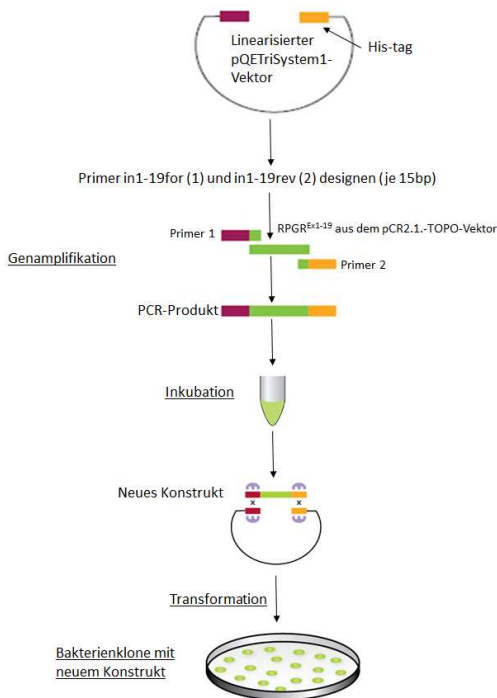


**Abb. 3.6 Verdau der Maxiprep mit EcoRI, PstI, HindIII, BamHI**

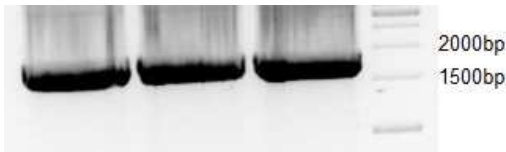
### 3.1.3 Klonierung des RPGR<sup>Ex1-19</sup> in den pQE-TriSystem His-Strep 1 Vektor

Nach erfolgreicher Klonierung der RPGR<sup>Ex1-19</sup>-Sequenz in den pCR2.1.-TOPO-Vektor erfolgten die Vorbereitungen zur In-Fusion-Klonierung. Das Prinzip dieser Klonierung ist unter 2.2.7.2 nachzulesen und in der Abb. 3.7 schematisch dargestellt. Für die Herstellung des rekombinanten RPGR<sup>Ex1-19</sup>-Proteins wurde der pQE-TriSystem His-Strep 1 Vektor als Expressionsvektor gewählt. Die Expression des rekombinanten Proteins wird durch einen T5-Promotor initiiert. Die Wahl des Vektors wurde aufgrund des C-terminal liegenden His-tags getroffen, da dieser Anhang später eine Proteinaufreinigung mittels *Nickel-Nitrilotriacetic acid* (Ni-NTA) *Beads* (Prinzip unter Abb. 3.15 dargestellt) möglich macht. Zunächst wurden die Primer in1-19for und in1-19rev für die In-Fusion-Klonierung designt. Es erfolgte die Optimierung der PCR für diese Primer und dem RPGR<sup>Ex1-19</sup> aus dem pCR2.1.-TOPO-Vektor. Das PCR-Produkt (Abb. 3.8) wurde ausgeschnitten und aufgereinigt. Das verwendete PCR-Protokoll ist im Anhang

zu finden. Der pQE-TriSystem His-Strep 1 Vektor wurde zunächst durch die Restriktionsenzyme EcoRI und HindIII linearisiert und konnte anschließend mit dem aufgereinigten PCR-Produkt des RPGR<sup>Ex1-19</sup> mittels In-Fusion-Kit zusammenligiert werden. Es erfolgte die Transformation in Stellar<sup>TM</sup> Competent Cells. Sechs Klone wurden zur Plasmid-Aufreinigung angezüchtet und nach erfolgter Aufreinigung zur ersten Klonierungskontrolle mithilfe des Restriktionsenzym EcoRV geschnitten (Abb. 3.9). Die zwei Schnittstellen des EcoRV liegen zum einen am Übergang des Vektors zum Insert und zum anderen im Insert selbst, genauer gesagt im RPGR<sup>Ex1-19</sup> (siehe Abb. 3.13). Klon 2 deutete zwar daraufhin, dass Insert und Vektor als Plasmid vorhanden waren, aber in der anschließend erfolgten Sequenzierung zeigte sich eine *Frameshift*-Mutation. Durch zwei zusätzliche Basen im C-terminalen Übergang zwischen Exon 1-19 und dem Vektor entstand eine Leserasterverschiebung, sodass die DNA-Sequenz des C-terminalen His-tags nicht mehr *in-frame* war. Aus diesem Grund wurde eine Mutagenese-PCR durchgeführt.

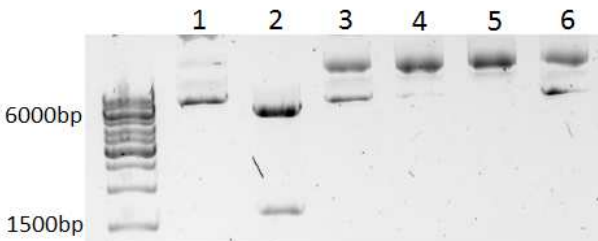


**Abb. 3.7 Schema der In-Fusion-Klonierung** (modifiziert nach clontech.com)



**Abb. 3.8 PCR mit In-Fusion-Primern**

PCR mit RPGR<sup>Ex1-19</sup> aus dem TOPO-Vektor unter Verwendung der In-Fusion-Primer.



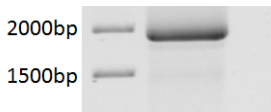
**Abb. 3.9 Verdau der In-Fusion-Klonierung mit EvoRV**

### 3.1.4 Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR wurde nach dem in 2.2.1 erwähnten Prinzip mit den Primern RPGR1-19f5 und RPGR1-19r7 aufgrund der *Frameshift*-Mutation durchgeführt. In Abb. 3.10 ist die Mutagenese-PCR dargestellt und das entsprechende Protokoll im Anhang beigefügt. Das PCR-Produkt wurde nach der Aufreinigung mit dem EcoRI verdauten pQE-TriSystem His-Strep-1-Vektor ligiert und anschließend in XL-1 Blue *E.colis* transformiert. Nach der Aufreinigung von 24 Klonen erfolgte der Verdau der Plasmide mit EcoRV (siehe Abb. 3.11). Die erwarteten Größen liegen bei 5840 bp und 1641 bp. Die Klone 4, 11, 19 und 20 wurden zur Sequenzierung weggeschickt. Nach Überprüfung des Konstruktes mittels Sequenzierung und Sicherstellung, dass die *Frameshift*-Mutation nun nicht mehr Teil der Sequenz und so der *His-tag* am C-terminalen Ende wieder in-frame war, wurde mit Klon 4 weitergearbeitet und mittels Maxiprep eine

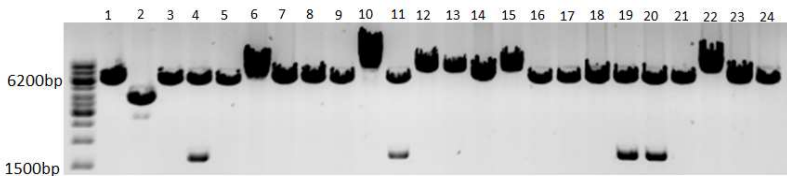
größere Menge des Plasmids für spätere Zwecke generiert. Die cDNA-Sequenz des RPGR<sup>Ex1-19</sup> ist in Anhang zu finden.

Die Klonierung war abgeschlossen und das vollständige Plasmid, bestehend aus dem pQE-TriSystem-His-Strep-1-Vektor und der RPGR<sup>Ex1-19</sup>-Sequenz, lag vor. Das fertige Plasmid wird nachfolgend als pQT1Ex1-19 bezeichnet.



**Abb. 3.10 Mutagenese-PCR**

Das erwartete PCR-Produkt liegt bei 1848 bp.



**Abb. 3.11 Restriktionsverdau der 24 Klone mit EcoRV**

Die erwarteten Größen des Restriktionsverdaus liegen bei 5840 bp und 1641 bp.

## 3.2 Antikörper-Design

Die cDNA-Sequenz des RPGR<sup>Ex1-19</sup> kann in eine Proteinsequenz translatiert werden. Die Proteinsequenz wurde mithilfe von VectorNTI bestimmt und ist unter Abb. 3.12 dargestellt.

Die Sequenz wurde mit den bekannten Isoformen des RPGR verglichen. Die übereinstimmenden Sequenzen zwischen allen Isoformen und der Proteinsequenz dieser Arbeit besteht aus 149 Aminosäuren. Es wurde eine Sequenz ausgewählt, die jeweils ungefähr in der Mitte der übereinstimmenden Proteinsequenz liegt. Die vollständigen Aminosäuresequenzen mit dem Alignment der Isoformen sind im Anhang

aufgeführt. Ein Vergleich der Isoformen ist in verkürzter Form unter Tab. 3.2 abgebildet und im Anhang die entsprechende Quellenangabe aufgelistet.

|            |                  |             |                   |                   |
|------------|------------------|-------------|-------------------|-------------------|
| MPRGSRWGSQ | GVGQHLRLNR       | VAPAIFFPKQA | QIPFAGFGMA        | EESLVPDTG         |
| AVFTFGKTKF | AENIPSKFWF       | KNDIPICLSC  | GDEHTAIVTG        | NNKLYMFGSN        |
| NWGQLGLGSK | AAIIKPTCIK       | ALKPEKVKLA  | ACGRNHTLVS        | TDTGGVYAAG        |
| GNNEGQLGLG | DTDDRDTFHQ       | IVFFTPADTI  | <b>KQLSAGANTS</b> | <b>AALTEDGKLF</b> |
| MWGDNSEGQI | GLEDKSNVCI       | PHEVTVGKPI  | SWISCGYYHS        | AFVTMDGELY        |
| TFGEPENGLK | GLPSELLMNH       | RSPQRVLGIP  | ERVIQVACGG        | GHTVVLTEKV        |
| VYAFGLGQFG | QLGLGTFLFE       | TSEPKIIERI  | KDQKICHISC        | GENHTALMTE        |
| LGLLYTFGDG | RHGKLG LGME      | NFTNQFFPTL  | CSNFLRFAVQ        | LIACGGCHML        |
| VFATPRLGTI | DEPKFEDVYE       | PYISTGSFSI  | NDLSPRSSLN        | RSLSARLRRR        |
| ERERPPCSAS | MVGTLPPLEG       | TSASTSAYFY  | PSSPPFHLSV        | NNYPEKSPSE        |
| SMEPLDSDYF | EDKMNKDTET       | ENSSAVDSEN  | FGETNDILNM        | THMMTTSSNE        |
| KLLDFSPIQK | QQAPQLSETG       | NSQISARLQV  | DGTGSKLAAA        | QLYTRASAWS        |
| HPQFEKLE   | <b>HH HHHHHH</b> |             |                   |                   |

**Abb. 3.12 Proteinsequenz der neuen RPGR<sup>Ex1-19</sup> Isoform**

Der C-terminale His-tag ist grün, die gewählte Antikörpersequenz rot markiert.

| Isoformen | Aminosäuren | Molekulargewicht<br>in kDa | Isoelektrischer Punkt |
|-----------|-------------|----------------------------|-----------------------|
| 1         | 1039        | 115,92 kDa                 | 4,60                  |
| 2         | 972         | 108,46 kDa                 | 4,57                  |
| 3         | 746         | 82 kDa                     | 5,04                  |
| 4         | 651         | 71,62 kDa                  | 4,88                  |
| 5         | 557         | 60,98 kDa                  | 5,47                  |
| 6         | 258         | 27,80 kDa                  | 6,99                  |
| 7         | 616         | 67,45 kDa                  | 5,97                  |

**Tab. 3.2 Vergleich der sieben RPGR<sup>Ex1-19</sup> Isoformen**

Vergleich anhand der Aminosäuren, des Molekulargewichts und dem Isoelektrischen Punkt. Die Proteinsequenzen wurden der NCBI- Datenbank entnommen und die entsprechenden Vergleichsgrößen mittels [www.expasy.org](http://www.expasy.org) berechnet.

### 3.3 Expression

Mithilfe von VectorNTI wurde nicht nur die DNA-Sequenz des pQT1Ex1-19 in Aminosäuren umgeschrieben, sondern somit auch eine Vorhersage über Größe und Molekulargewicht getroffen. Anhand der Sequenz kodiert das Protein für 616 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von knapp 67 kDa. Einfachheitshalber wurde die Proteinsequenz bereits unter 3.2 in Abb. 3.12 aufgeführt, da sie in diesem Kapitel eine wichtige Rolle spielt.

#### 3.3.1 Transformation in BL21(DE3)-Zellen

Zur Vorbereitung der Expression des RPGR<sup>Ex1-19</sup>-Proteins wurde das pQT1Ex1-19-Plasmid in BL21(DE3)-Zellen transformiert. Nach erfolgreicher Klonierung konnten vier Klone aufgereinigt werden. Es erfolgte ein Restriktionsverdau mit EcoRV-HF (Schnittstellen siehe Abb. 3.13) zur Überprüfung der Plasmide. Die erwarteten Fragmente liegen bei 5840 bp und 1641 bp und das Ergebnis ist unter Abb. 3.14 dargestellt. Es zeigte sich bei allen vier Klonen zwei Fragmente nach dem Restriktionsverdau. Die Richtigkeit aller Konstrukte wurde mittels Sequenzierung überprüft. Die Bakterienkultur von Klon 3 wurde zum einen als Glycerol-Stock angelegt, zum anderen als Vorbereitung der Proteinexpression weiterverarbeitet.

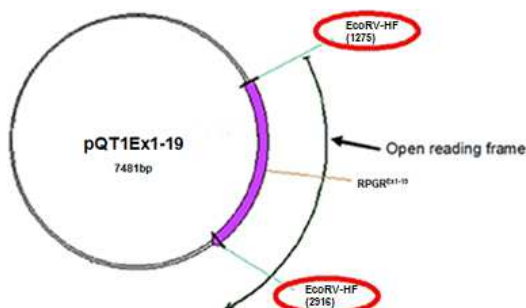
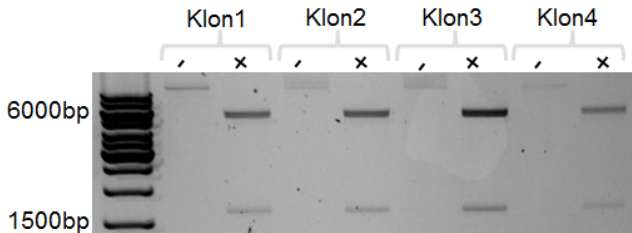


Abb. 3.13 Schnittstellen von EcoRV im pQT1Ex1-19



### Abb. 3.14 Restriktionsverdau

Restriktionsverdau des pQT1Ex1-19-Plasmids mit EcoRV-HF. - unverdaut, + verdaut.

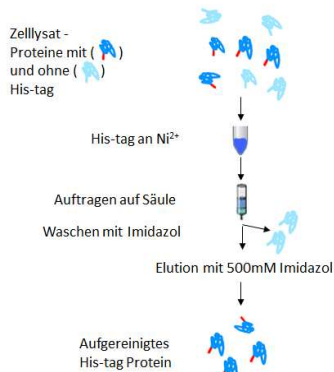
### 3.3.2 Expression des RPGR<sup>Ex1-19</sup>-Proteins

Zur Vorbereitung der Proteinexpression des RPGR<sup>Ex1-19</sup>, die anhand des QIAexpressionist<sup>TM</sup> aus dem Jahre 2003 erfolgte, wurde eine Vorkultur mit 10 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin und 10 µl Bakterienkultur des Klon 3 angesetzt, die über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert wurde. Die Vorkultur wurde in 400 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin weiterverarbeitet. Sobald diese Kultur eine OD600 (optische Dichte) von 0,6-0,8 erreicht hatte, erfolgte die Induktion mit Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) zur Inaktivierung des *lac* Repressors, sodass die nach dem T5-Promotor, der auf dem pQE-TriSystem His-Strep-1-Vektor vorhanden ist, folgende DNA-Sequenz transkribiert werden kann. Das so produzierte Transkript sollte dann in Aminosäuren translatiert werden. Nach vier Stunden wurde die Bakterienlösung abzentrifugiert, das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.3.3 Aufreinigung des rekombinanten RPGR<sup>Ex1-19</sup>

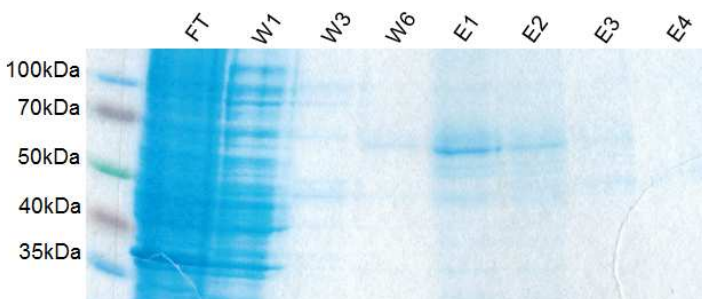
Die Aufreinigung des rekombinanten RPGR<sup>Ex1-19</sup> erfolgte nach dem im QIAexpressionist<sup>TM</sup> aufgeführten Prinzip mithilfe von Ni-NTA-Agarose Beads (Abb. 3.15). Der Proteingehalt der einzelnen Aufreinigungsschritte wurde mittels Bradford-Test ermittelt. Zur Darstellung der Aufreinigung und zur ersten Erfolgskontrolle wurde eine *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-Page) mit schließender *Coomassie*-Färbung durchgeführt. Mithilfe der Färbung können Proteine auf dem Gel sichtbar gemacht werden. Das Ergebnis ist unter Abb. 3.16 abgebildet. Die

anhand der DNA-Sequenz von VectorNTI ermittelte Proteingröße liegt bei etwa 67 kDa. Besonders im Elutionsschritt 1 (E1) ist eine Bande auf Höhe des Molekulargewichtsbereiches zu sehen, was als erster Hinweis auf eine Überexpression eines Proteins interpretiert werden kann. Zur Überprüfung dieses Proteins wurden Westernblots durchgeführt.



**Abb. 3.15 Prinzip der His-tag-Aufreinigung** (modifiziert nach qiagen.com)

mM = Millimolar



**Abb. 3.16 Coomassie-Färbung der Ni-NTA-Aufreinigung**

FT = flow through, W1 = Waschschrift 1, W3 = Waschschrift 3, W6 = Waschschrift 6, E1 = Elutionsschritt 1, E2 = Elutionsschritt 2, E3 = Elutionsschritt 3, E4 = Elutionsschritt 4.



## 3.4 Westernblot

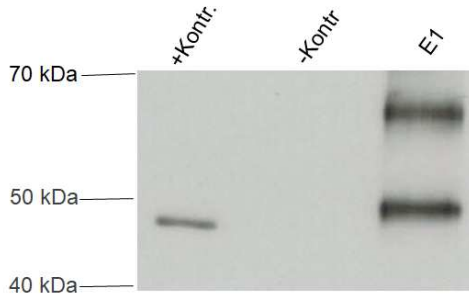
Ob es sich bei der überexprimierten Bande im Elutionsschritt E1 (Abb. 3.16) um das rekombinant hergestellte RPGR<sup>Ex1-19</sup>-Protein handelt, kann mittels spezifischer Antikörperbindung getestet werden. Dafür wurden ein C-terminal und ein N-terminal bindender Antikörper verwendet. Des Weiteren erfolgte die Testung des neu generierten Anti-Peptidantikörpers, der in unserer Arbeitsgruppe designt wurde und in der in 1.6 erwähnten RLD ebenfalls im N-Terminus bindet.

Die Proteinsequenz ist in Abb. 3.12 dargestellt. Farblich markiert sind der His-tag (grün) sowie die Bindungssequenz des neuen N-terminalen Antikörpers (rot).

### 3.4.1 Anti-His-tag Antikörper HRP

Zur Überprüfung der Ni-NTA-Aufreinigung erfolgte zunächst ein Westernblot mit dem Anti-6x His tag® Antikörper von abcam. Dieser Antikörper bindet an sechs aufeinander folgenden Histidinen. In der Proteinsequenz des rekombinanten RPGR<sup>Ex1-19</sup> sollten bei korrekter Translation acht Histidine am C-Terminus aufeinander folgen. Der Antikörper kann so das rekombinante Protein am C-terminalen Ende binden. Eine natürlich vorkommende Abfolge von mehreren Histidinen in der Proteinsequenz wurde im Vorfeld ausgeschlossen.

Der Antikörper ist ein polyklonaler *Rabbit* Antikörper und HRP-gelabelt, weshalb kein Sekundärantikörper zur Darstellung auf dem Westernblot benötigt wird. Als Positivkontrolle wurde der 6xHis Proteinmarker von Qiagen verwendet, als Negativkontrolle XL-1Blue *E. coli* Lysat ohne integriertes Plasmid.



**Abb. 3.17 Westernblot mit Anti-6x His tag® Antikörper**

Als Positivkontrolle (+ Kontr.) wurde ein 6x His-Protein Marker der Firma QIAGEN GmbH verwendet, als Negativkontrolle XL-1Blue *E.coli* Lysat (- Kontr.) und 2 µg des Eluat 1 (E1).

Die verwendeten Antikörperbedingungen und die Expositionszeit sind in der Tab. 3.3 aufgeführt. In der Negativkontrolle ist kein Signal zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass *E. coli* kein Protein exprimieren, das den Anti-6x® His tag Antikörper unter diesen Bedingungen bindet. Die Positivkontrolle ist positiv und bindet den Antikörper. Im Eluat zeigen sich zwei Banden. Die obere liegt etwas unterhalb von 70 kDa, die untere Bande auf Höhe von 50 kDa. Erwartet wird ein Protein, das 67 kDa groß ist. Die obere Bande entspricht ungefähr der Größe des erwarteten rekombinant hergestellten RPGR<sup>Ex1-19</sup>.

|                            |                                      |
|----------------------------|--------------------------------------|
| <b>Antikörperbedingung</b> | 1:4.000 in 5 %MP und 1xTBSTritonX100 |
| <b>Inkubation</b>          | 1h bei RT                            |
| <b>Expositionszeit</b>     | 20 Sekunden                          |

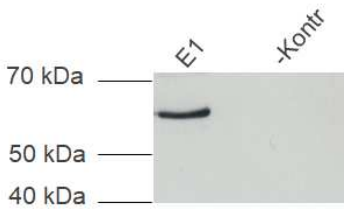
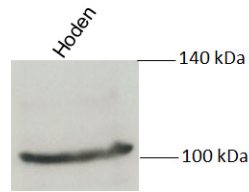
**Tab. 3.3 Spezielle Antikörperbedingungen des Anti-His-Antikörpers**

### 3.4.2 N-terminale Antikörper

Neben dem C-terminal bindenden Anti-6x<sup>®</sup> His *tag* Antikörper wurden zwei polyklonale, N-terminal bindende Antikörper verwendet. Beide Antikörper binden in der RLD des RPGR. Der Anti-RPGR H-70 Antikörper von Santa Cruz Biotechnology ist gegen die Aminosäuren 201 - 270 des Menschen gerichtet. Die genaue Proteinsequenz des Antikörpers ist vom Hersteller nicht angegeben. Aus diesem Grund wurde in der Arbeitsgruppe für experimentelle Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen in Zusammenarbeit mit Davids Biotechnologie GmbH in Regensburg ein N-terminaler Antikörper designt, der ebenfalls in der RLD des RPGR bindet und als Anti-RPGR Antikörper der Firma Davids bezeichnet wird. So erfolgte die Kontrolle des rekombinant hergestellten RPGR<sup>Ex1-19</sup> mithilfe des kommerziellen Anti-RPGR H-70 Antikörper und die anschließende Testung des neu designten Anti-RPGR Antikörper der Firma Davids.

#### 3.4.2.1 RPGR H-70 Antikörper

Nachdem zuerst der C-terminale anti-6x-His-tag Antikörper einen ersten Hinweis lieferte, dass ein His-getagtes Protein im Elutionsschritt 1 enthalten ist, erfolgte die Kontrolle mit einem spezifisch gegen den N-Terminus des RPGR-Protein gerichteten Anti-RPGR H-70 Antikörper. Dieser Antikörper ist gegen eine Proteinsequenz in der RLD gerichtet und sollte sowohl das RPGR<sup>Ex1-19</sup> als auch das RPGR<sup>ORF15</sup> binden. Der Antikörper ist wieder ein polyklonaler *Rabbit* IgG-Antikörper, der als Sekundäntikörper einen *Goat*-Anti-*Rabbit*-Antikörper benötigt. Der Hersteller verwendet als Positivkontrolle murines Hodengewebe und gibt die Proteingröße mit 113 kDa an. Hodengewebe von Wildtyp-Mäusen wurde hier ebenfalls als Positivkontrolle verwendet. Die Antikörperbedingungen und die Expositionszeit sind in Tab. 3.4 zusammengefasst. Es wurden 6 µg von E1 aufgetragen.

**A****B****Abb. 3.18 Westernblot mit Anti-RPGR H-70**

Für den Westernblot wurde der Anti-RPGR H-70 Antikörper verwendet. Unter **A** ist das Eluat E1 und die Negativkontrolle XL-1Blue *E. coli* Lysat (- Kontr) ohne Plasmid und unter **B** die Positivkontrolle (Hodengewebe) dargestellt.

|                         | A                            | B                            |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Primärantikörper (1°)   | 1:200 in 1xTBS und 5 % MP    | 1:200 in 1xTBS und 1 % MP    |
| Inkubation 1°           | ü.N. bei +4 °C               | ü.N. bei +4 °C               |
| Sekundärantikörper (2°) | 1:10.000 in 1xTBS und 1 % MP | 1:10.000 in 1xTBS und 1 % MP |
| Inkubation 2°           | 2 Stunden                    | 2 Stunden                    |
| Exposition              | 15 Sekunden                  | 15 Sekunden                  |

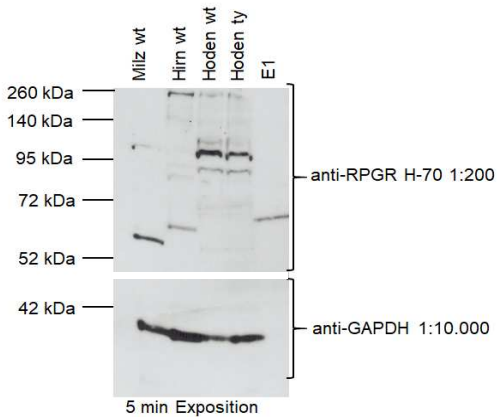
**Tab. 3.4 Antikörperbedingungen zu Westernblot Abb. 3.18**

Optimierte Antikörperbedingungen des Anti-RPGR H-70 Antikörpers (Primärantikörper) mit dem entsprechenden Sekundärantikörper.

E1 zeigt in diesem Westernblot eine Bande zwischen 50 und 70 kDa. Die Bande auf Höhe von 50 kDa, wie sie im Westernblot mit dem Anti-6x His tag Antikörper detektiert wurde, konnte in diesem Blot nicht mehr gezeigt werden. Der Hoden zeigt ein positives Signal auf der Höhe von etwa 100 kDa.

Zur weiteren Überprüfung wurden Westernblots mit dem rekombinant hergestellten RPGR und verschiedenen Gewebeproben und einer Kontrolle des *housekeeping-gene*

GAPDH durchgeführt. Die Ergebnisse mit den jeweiligen Antikörperbedingungen sind nachfolgend aufgeführt.



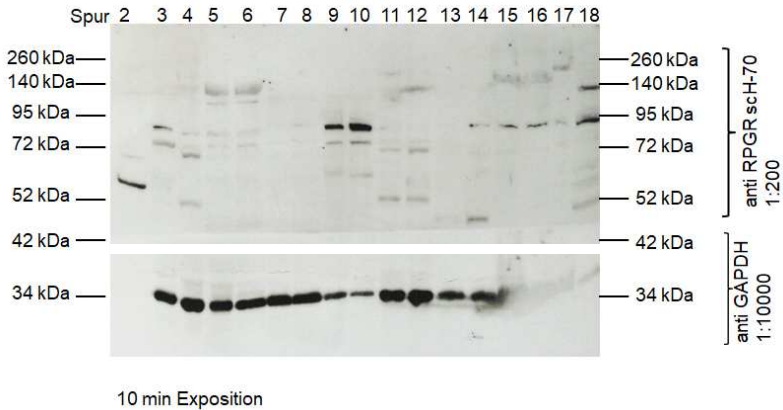
**Abb. 3.19 Gewebeproben und E1 im Westernblot**

Westernblot mit Gewebe von Milz, Hirn und Hoden von Wildtyp-Mäusen, Hoden von mutierten Mäusen und dem Eluat E1. Es wurden der Anti-RPGR H-70 und zur Ladekontrolle der Anti-GAPDH Antikörper verwendet. Die Antikörperbedingungen sind Tab. 3.5 zu entnehmen. wt = Wildtyp, ty = mutiertes Männchen, E1 = Eluat1

|                         | Anti-RPGR H70                | Anti-GAPDH                    |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Primärantikörper (1°)   | 1:200 in 1xTBS und 5 % MP    | 1:10.000 in 1x TBS und 5 % MP |
| Inkubation 1°           | ü.N. bei +4 °C               | 1h bei RT                     |
| Sekundärantikörper (2°) | 1:10.000 in 1xTBS und 1 % MP |                               |
| Inkubation 2°           | 2 Stunden                    |                               |
| Exposition              | 5 Minuten                    | 5 Minuten                     |

**Tab. 3.5 Antikörperbedingungen zu Westerblot Abb. 3.19**

Spezielle Antikörperbedingungen für Anti-RPGR H-70 Antikörper mit dem entsprechenden Sekundärantikörper und Anti-GAPDH im Westernblot mit verschiedenen Gewebeproben.



### Abb. 3.20 Weitere Gewebeproben im Westernblot

Es wurden Gewebeproben von Wildtyp-Mäusen, mutierten Mäusen (männliche und weibliche), HEK-Zellen und dem Eluat E1 verwendet. In der Tab. 3.6 ist aufgezählt, welche Probe sich in den verschiedenen Westernblots Spuren befindet. Es wurden wieder der Anti-RPGR H-70 und zur Ladekontrolle der anti-GAPDH Antikörper verwendet. Die jeweiligen Antikörperbedingungen sind in Tab. 3.7 aufgeführt.

| Spur | Probe    | Spur | Probe      |
|------|----------|------|------------|
| 2    | E1       | 11   | Hirn wt    |
| 3    | Herz wt  | 12   | Hirn ty    |
| 4    | Herz ty  | 13   | Lunge wt   |
| 5    | Leber wt | 14   | Lunge ty   |
| 6    | Leber ty | 15   | Retina wt  |
| 7    | Niere wt | 16   | Retina tx  |
| 8    | Niere ty | 17   | Retina ty  |
| 9    | Hoden wt | 18   | HEK-Zellen |
| 10   | Hoden ty |      |            |

### Tab. 3.6 Zuordnung der Gewebeproben

Zuordnung der Gewebeproben zu den Westernblots Spuren aus Abb. 3.20, wt = Wildtyp, ty = mutiertes Männchen, tx = heterozygotes Weibchen.

|                         | Anti-RPGR H70                | Anit-GAPDH                    |
|-------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Primärantikörper (1°)   | 1:200 in 1xTBS und 5 % MP    | 1:10.000 in 1x TBS und 5 % MP |
| Inkubation 1°           | ü.N. bei +4 °C               | 1h bei RT                     |
| Sekundärantikörper (2°) | 1:10.000 in 1xTBS und 1 % MP |                               |
| Inkubation 2°           | 2 Stunden                    |                               |
| Exposition              | 10 Minuten                   | 10 Minuten                    |

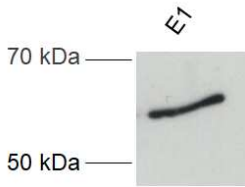
**Tab. 3.7 Antikörperbedingungen zu Westernblot Abb. 3.20**

Optimierte Antikörperbedingungen für Anti-RPGR H-70 Antikörper mit dem entsprechenden Sekundärantikörper und Anti-GAPDH im Westernblot mit verschiedenen Gewebeproben.

### 3.4.2.2 Anti-RPGR-Antikörper der Firma Davids

Nun erfolgte die Testung des zweiten N-terminalen Antikörpers, der gegen die Proteinsequenz KQLSAGANTSAAALTEGDKL der RLD aller bisher beschriebenen Isoformen gerichtet ist. Die Isoformen sind mit ihrer Proteinsequenz im Anhang aufgelistet. Die Bindestelle des Anti-RPGR Antikörper der Firma Davids ist jeweils farblich unterlegt. Dass der Antikörper theoretisch im rekombinant hergestellten RPGR<sup>Ex1-19</sup> bindet, ist bereits in Abb. 3.12 dargelegt worden.

Der Antikörper ist ein polyklonaler *chicken* IgY Antikörper, der als Sekundärantikörper einen *Rabbit-Anti-Chicken*-Antikörper benötigt. Die Testung des Antikörpers erfolgte zunächst am rekombinanten RPGR<sup>Ex1-19</sup>, das schon mit dem RPGR H-70 Antikörper ein positives Signal auf dem Westernblot zeigte. Die Antikörperbedingungen und die Expositionszeit sind in Tab. 3.8 aufgelistet.



**Abb. 3.21 Westernblot mit Anti-RPGR Antikörper der Firma Davids**

Es wurden 2 µg von E1 (= Eluat 1) aufgetragen.

|                         |                              |
|-------------------------|------------------------------|
| Primärantikörper (1°)   | 1:500 in 1xTBS und 5 % MP    |
| Inkubation 1°           | Über Nacht bei +4 °C         |
| Sekundärantikörper (2°) | 1:10.000 in 1xTBS und 1 % MP |
| Inkubation 2°           | 2 Stunden                    |
| Exposition              | 15 Sekunden                  |

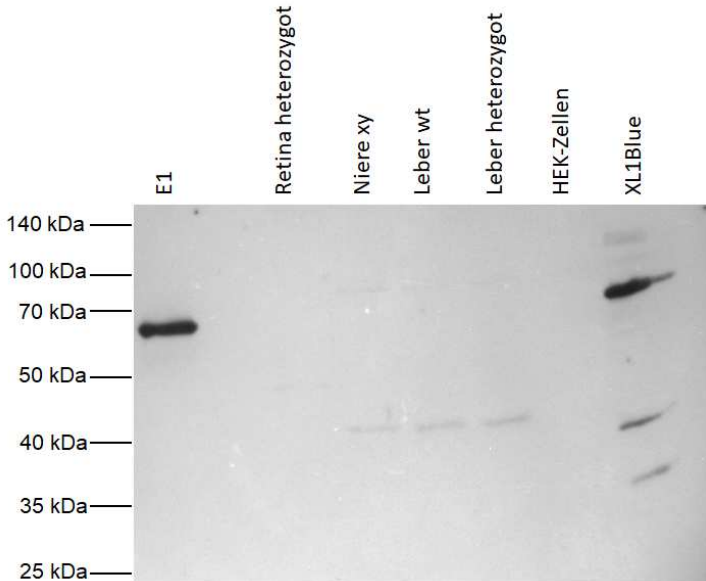
**Tab. 3.8 Antikörperbedingungen zu Westernbot Abb. 3.21**

Spezielle Antikörperbedingungen des Anti-RPGR-Antikörpers der Firma Davids mit dem zugehörigen Sekundärantikörper.

Zwischen 50 und 70 kDa zeigt sich eine Bande auf dem Westernblot. Beim Vergleich der Abb. 3.18 A und 3.21 fällt auf, dass das Bandenmuster des Eluats auf beiden Westernblots auf vergleichbarer Höhe ist. Der Antikörper bindet scheinbar ein Protein, das in etwa die Größe des errechneten Molekulargewichts des rekombinant hergestellten Proteins aufweist.

Es erfolgte daraufhin ein weiterer Westernblot (Abb. 3.22) mit verschiedenen Gewebeproben und einem Lysat aus XL1 Blue Zellen ohne Plasmid als Negativkontrolle. Diese wurde so auch im Westernblot mit dem anti-RPGR sc H70 Antikörper verwendet und zeigte dort ein negatives Signal. Die Antikörperbedingungen sind in Tab. 3.9 aufgeführt.





**Abb. 3.22 Westernblot (Antikörper der Firma Davids) an weiteren Proben**

Der Westernblot wurde mit Eluat 1, unterschiedlichen Geweben, HEK-Zellen und XL-1Blue *E.coli* Lysat ohne Plasmid durchgeführt. Als Antikörper wurde der Anti-RPGR Antikörper der Firma Davids verwendet. E1 = Eluat 1, xy = Wildtyp-Männchen, wt = Wildtyp.

|                         |                              |
|-------------------------|------------------------------|
| Primärantikörper (1°)   | 1:25 in 1xTBS und 5 % MP     |
| Inkubation 1°           | Über Nacht bei +4 °C         |
| Sekundärantikörper (2°) | 1:10.000 in 1xTBS und 1 % MP |
| Inkubation 2°           | 2 Stunden                    |
| Exposition              | 2 Minuten                    |

**Tab. 3.9 Antikörperbedingungen zu Westerblot Abb. 3.22**

Spezielle Antikörperbedingungen Anti-RPGR Antikörper der Firma Davids mit dem entsprechenden Sekundärantikörper

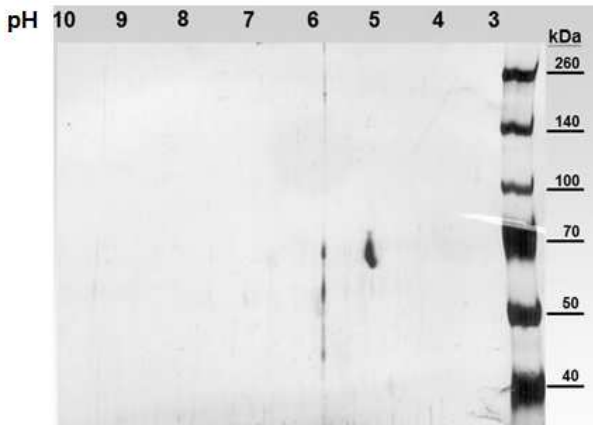
### 3.5 Isoelektrische Fokussierung

Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung des rekombinant hergestellten Proteins ist die Isoelektrische Fokussierung (IEF). Bei dieser Methode werden Proteine nach ihrem pH-Wert aufgetrennt. Jedes Protein hat einen zugehörigen pH-Wert, auch isoelektrischer Punkt (pI) genannt. Eine genauere Beschreibung dieser Methode ist unter 2.2.15 zu finden.

Der theoretisch errechnete pI des rekombinanten RPGR<sup>Ex1-19</sup> liegt laut VectorNTI bei 5,97. Zur Überprüfung des Proteins erfolgte zunächst die IEF des Proteins entlang eines immobilisierten pH-Gradient (IPG)-Streifens. Dieser Vorgang ermöglicht die Auftrennung der im Eluat E1 enthaltenen Proteine in der 1. Dimension. Nach diesem Schritt erfolgte die Auftrennung der Proteine in der 2. Dimension mithilfe einer SDS-Page. Der Vorteil dieser Methode ist die genauere Aufteilung der Proteine nicht nur nach dem Molekulargewicht, sondern auch nach ihrem pH-Wert. Diese Methode ist genauer als eine reine Darstellung auf einem Westernblot. Der Nachteil besteht in der fehlenden Möglichkeit, Positiv- und Negativkontrollen zusammen mit dem Eluat in einem Blot darstellen zu können.

### 3.5.1 Silbernitratfärbung

Zunächst erfolgte die Auftrennung von E1 entlang des IPG-Streifens. Danach wurden die entlang ihres pH-Wertes aufgetrennten Proteine auf einer SDS-Page nach dem Molekulargewicht separiert und mittels Silbernitratfärbung sichtbar gemacht.



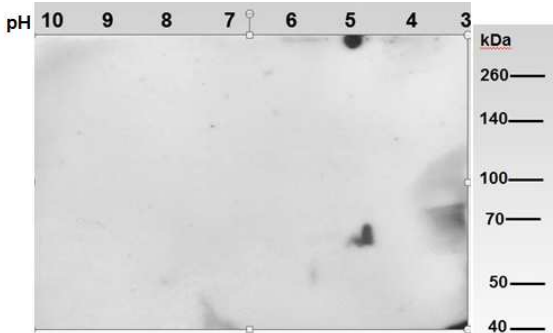
**Abb. 3.23 Silbernitratfärbung des E1 nach der IEF**

Für die Isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde das Eluat 1 (E1) verwendet. Das Prinzip der IEF ist unter Abb. 2.2 dargestellt.

Die errechneten theoretischen Größen des rekombinanten RPGR<sup>Ex1-19</sup> liegen bei einem pH von 5,97 und einem Molekulargewicht von 67 kDa. Zwischen pH 5 und 6 befinden sich mehrere Spots, die auch auf einer Höhe zwischen 50 und 70 kDa liegen. Es erfolgte die Überprüfung des Eluats E1 in einem weiteren Westernblot, dem aber eine IEF voranging.

### 3.5.2 Westernblot der Isoelektrischen Fokussierung

Die IEF und das Auftrennen in die 2. Dimension wurden mit dem Eluat E1 erneut durchgeführt. Im Anschluss an die SDS-Page wurde das Gel geblottet und die Membran mit dem RPGR H-70 Antikörper inkubiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.24 dargestellt.



**Abb. 3.24 Westernblot nach der IEF**

Nach der IEF des Eluats E1 wurde mit dem Antikörper Anti-RPGR H-70 ein Westernblot durchgeführt.

|                         |                                 |
|-------------------------|---------------------------------|
| Primärantikörper (1°)   | 1:200 in 1xTBS und 5 % MP       |
| Inkubation 1°           | ü.N. bei +4 °C                  |
| Sekundärantikörper (2°) | 1:10.000 in 1xTBS<br>und 1 % MP |
| Inkubation 2°           | 2 Stunden                       |
| Exposition              | 15 Sekunden                     |

**Tab. 3.10 Antikörperbedingungen zu Westernblot Abb. 3.24**

Spezielle Antikörperbedingungen des Anti-RPGR H70 Antikörpers mit dem entsprechenden Sekundärantikörper.

Im Westernblot sieht man einen großen Spot bei einem pH von etwa 5 und einem Molekulargewicht etwas unterhalb von 70 kDa. Die in der Silbernitratfärbung sichtbaren Spots bei einem pH von etwas niedriger als 6 sind im Westernblot nicht mehr sichtbar.

## 4 Diskussion

Die XLRP führt zu einem frühen progredienten Verlust von Photorezeptoren und damit unter anderem zur Nachblindheit und kompletter Erblindung in der dritten Lebensdekade (Heckenlively, Yoser, Friedman & Oversier, 1988) (A C Bird, 1987). Da in der Literatur über 3000 Mutationen in über 70 Genen beschrieben werden, die zur Retinitis Pigmentosa führen können, ist die Diagnostik und die Entwicklung einer möglichen Therapiestrategie im klinischen Alltag schwer (Dias et al., 2017). Nichtsdestotrotz gibt es erste erfolgreiche, therapeutische Ansätze einer Gentherapie bei anderen degenerativen Erblindungserkrankungen wie der Leberschen Congenitalen Amaurose (Giers et al., 2017) (Bainbridge et al., 2008) (Lh riteau et al., 2009). Die Behandlung erblicher retinaler Erkrankungen könnte somit auch in Zukunft durch eine Gentherapie maßgeblich beeinflusst werden. Die Grundvoraussetzung für die Durchführung einer solchen Therapieform bildet eine möglichst exakte Diagnostik dieses Krankheitsbildes auf genomischer Ebene.

Ziel dieser Arbeit war daher die Herstellung eines Proteins, das in der Pathophysiologie der Retinitis Pigmentosa eine wichtige Rolle einnimmt. An diesem Protein, dem RPGR<sup>Ex1-19</sup>, wurden zwei Antikörper im Tiermodell getestet, um daraus neue Diagnostikmöglichkeiten entwickeln zu können. Hierfür wurde das zugrunde liegende Protein rekombinant hergestellt und die Antikörper an verschiedenen Gewebeproben getestet.

### 4.1 Die Analyse und Bedeutung des rekombinant hergestellten RPGR<sup>Ex1-19</sup> für eine nachfolgende Antik rperpestung

Das RPGR weist ein komplexes Expressionsmuster mit verschiedenen gespleißten Isoformen auf. Die zwei Hauptspleißvarianten sind die beiden Isoformen RPGR<sup>ORF15</sup> und RPGR<sup>Ex1-19</sup>, welches in der Literatur auch als RPGR<sup>const</sup> bezeichnet wird (Vervoort et al., 2000)(Kirschner et al., 1999). Das RPGR<sup>Ex1-19</sup> wird ubiquitär exprimiert und ist in Geweben wie beispielsweise Hirn, Lunge, Leber, Milz, Hoden und Retina vorhanden (Dias et al., 2017) (Q. Zhang et al., 2002) (Hong, Pawlyk, Sokolov et al., 2003). Die Expression der zweiten Hauptisoform RPGR<sup>ORF15</sup> findet vor allem in der Retina statt (X Shu et al., 2005). Das RPGR<sup>Ex1-19</sup> ist in allen Zelltypen, das RPGR<sup>ORF15</sup> nach heutigem Wissensstand in primären Zilien vorzufinden (He et al., 2008). Allerdings gibt es auch

speziesspezifische Unterschiede bei der Lokalisation des RPGRs (Mavlyutov et al., 2002).

Besonders schwere Verlaufsformen sind für die in dieser Arbeit untersuchte Isoform RPGR<sup>Ex1-19</sup> beschrieben worden, die vor allem bei einer retinalen Überexpression dieses Proteins aufzutreten scheinen (R. N. Wright et al., 2011). Es ist noch nicht abschließend geklärt, inwiefern sich hierbei die Transkription von verschiedenen Isoformen auf die jeweilige Proteinexpression gewebespezifisch auswirken. Demnach ist es besonders in der Diagnostik der Retinitis pigmentosa von herausragender Bedeutung zu klären, welche Isoform vorliegt und in welchem Ausmaß das entsprechende Protein gebildet wird (Schmid et al., 2010).

In der Literatur sind bisher sechs Isoformen des RPGRs bei der Maus beschrieben worden. In dieser Arbeit konnte jedoch vermutlich eine neue Isoform mittels Sequenzierung ermittelt werden, die sich sowohl hinsichtlich der Länge (616 Aminosäuren), des Molekulargewichtes (67,45 kDa) als auch des pI-Wertes 5,97 unterscheidet. Bezogen auf diese drei Vergleichsgrößen liegt diese Isoform zwischen Isoform 4 und Isoform 5 (Charng et al., 2016) (R. Megaw et al., 2017), was die These unterstützt, dass es sich hierbei um eine neue Isoform handeln könnte. Folglich wäre die Existenz von weiteren Isoformen denkbar, die wiederum einen Einfluss auf die Diagnostik und Therapie hätten.

Das in dieser experimentellen Arbeit hergestellte rekombinante RPGR-Protein könnte im Rahmen einer zukünftigen Antikörperdiagnostik von Gewebeproben Verwendung finden, indem dieses Protein als Positivkontrolle fungieren könnte. Bei beispielsweise einem Westernblot könnte ein so hergestelltes RPGR-Protein verschiedene Gewebeproben als Positivkontrollen ersetzen und somit die Probenmengen für die Optimierung von Westernblots und anschließend auch immunhistochemischer Färbungen reduzieren und schonen.

Da das RPGR in vielen verschiedenen Geweben im Körper exprimiert wird (Yan et al., 1998), eine Veränderung der Proteinbildung schwerwiegende Folgen hat (Rao, Zhang et al., 2016) (den Hollander et al., 2006) (Fliegau et al., 2007) (Bukowy-Bieryłto et al., 2013) und ein komplexes Interaktionsmuster mit multiplen, am zellulären Transport beteiligten Proteinen besteht (Dias et al., 2017) (He et al., 2008), ist eine interdisziplinäre fächerübergreifende Verwendung wie beispielweise in der Nephrologie, der HNO und Urologie in Diagnostik und Therapie im klinischen Alltag denkbar.

## 4.2 Interpretation der Westernblotergebnisse

### 4.2.1 Antikörperrestung am rekombinanten RPGR<sup>Ex1-19</sup>

An dem rekombinant hergestellten RPGR<sup>Ex1-19</sup> wurden anschließend verschiedene Antikörper getestet, die nachfolgend antikörperbindungsspezifisch in Zusammenhang mit der Datenlage der aktuellen Literatur gebracht und diskutiert werden.

#### 4.2.1.1 C-terminaler Antikörper

Zur Überprüfung der Vollständigkeit des Translationsvorgangs bei der Proteinherstellung wurde zunächst ein Anti-6x® His tag Antikörper verwendet, der direkt hinter der RPGR-Sequenz am C-Terminus des pQE-TriSystem His-Strep 1 Plasmids bindet, wie in Abb. 3.7 und 3.12 dargestellt, und gegen acht aufeinander folgende Histidine gerichtet ist. Die Positivkontrolle stellte ein His-tag Marker dar, als Negativkontrolle wurden *E. coli*s ohne transformiertes Plasmid verwendet, um zu zeigen, dass der Antikörper nicht gegen das reine Bakterium gerichtet ist. Dies konnte unter Abb. 3.17 gezeigt werden. Lediglich der His-tag-Marker wurde von dem Anti-6x® His tag Antikörper detektiert, nicht aber die reinen *E. coli* Bakterien. Die Überprüfung des aufgereinigten Eluats erfolgte ebenfalls in diesem Westernblot, wobei sich zwei Banden zeigten. Die obere Bande lag im Bereich der im Vorfeld errechneten und erwarteten Proteingröße von 67 kDa. Die darunter erscheinende Bande lag auf Höhe von etwa 50 kDa. In der Literatur wurde beschrieben, dass so ein Phänomen durch Abbauprodukte der Citrat-Synthase auftreten kann (Lindner et al., 1997).

#### 4.2.1.2 N-terminale Antikörper

Nach Testung des aufgereinigten Proteins mit dem Anti-6x® His tag Antikörper erfolgte die Anwendung der zwei N-terminalen Antikörper.

Der kommerziell erworbene Anti-RPGR H-70 Antikörper zeigt eine Bande auf Höhe von etwa 67 kDa bei Testung am Eluat und detektiert nun nicht mehr zusätzlich die noch mit dem Anti-6x® His tag Antikörper abgebildete Bande auf Höhe von circa 50 kDa (Abb.

3.18 A). Das deutet darauf hin, dass dieses Protein vermutlich keine RLD (*RCC1-like domain*) besitzt, die von dem N-terminalen Antikörper gebunden wird, und es sich somit nicht um das rekombinante RPGR-Protein handelt. Dies würde die vorher genannte These, dass die untere Bande ein Abbauprodukt der Citrat-Synthase ist, unterstützen (Remington, Wiegand & Huber, 1982). Als Positivkontrolle wurde, wie vom Hersteller empfohlen, Hodengewebe verwendet, das eine Bande auf Höhe von etwa 100 kDa zeigt (Abb. 3.18 B). Dies ist mit den Ergebnissen von anderen Arbeitsgruppen in Einklang zu bringen, die ebenfalls bei Verwendung von Anti-RPGR-Antikörpern am Hodengewebe eine Proteingröße von 95 kDa detektieren konnten (Hong et al., 2000). In der hier vorliegenden Arbeit wurden XL1-Blue E. coli ohne Plasmid als Negativkontrolle verwendet und von dem Anti-RPGR H-70 Antikörper nicht detektiert.

## 4.2.2 Antikörperpestung an murinen Gewebeproben

### 4.2.2.1 Anti-RPGR H-70 Antikörper

In der Literatur werden zwei Hauptisoformen des RPGRs beschrieben (Rao, Li et al., 2016): Einerseits RPGR<sup>Ex1-19</sup> (Yan et al., 1998) mit einer Proteingröße von 90 kDa und andererseits das RPGR<sup>ORF15</sup> mit einer Größe von 140 kDa (Vervoort et al., 2000). Der hier verwendete Anti-RPGR H-70 Antikörper bindet N-terminal an beide Isoformen.

Unter Verwendung dieses Antikörpers an murinen Gewebeproben im Westernblot konnte anhand des Molekulargewichtes eine Expression des RPGR<sup>Ex1-19</sup> im Hirn von Wildtypmäusen wie auch an genetisch erkrankten Mäusen gezeigt werden (siehe Abb. 3.19). Weiterhin zeigt sich im Hodengewebe von gesunden wie auch erkrankten Mäusen eine starke Expression dieser Isoform, wobei jedoch die Expression in Lunge und Retina bei beiden Gruppen schwächer war. Weiterhin konnte diese Isoform in menschlichem embryonalen Nierengewebe (HEK) nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.20).

In der aktuellen Literatur lassen sich zahlreiche Belege für die ubiquitäre Expression dieser Isoform finden. So konnten die Arbeitsgruppen von Meindl, Kirschner und Roepman in Analogie zu den Ergebnissen dieser Arbeit im Tiermodell eine Expression von RPGR<sup>Ex1-19</sup> im menschlichen Gewebe wie Retina, Gehirn, Lunge und Hoden zeigen (Roepman et al., 1996) (Meindl et al., 1996) (Kirschner et al., 2001)). Eine ebenfalls gehäuft auftretende Expression dieser Isoform in unterschiedlichsten Geweben zeigte auch Kirschner, die aber in ihrem Vergleich von Mensch und Maus eine



speziesspezifische Regulation des Splicings beschreibt, was das Auftreten von zwölf verschiedenen Isoformen bedingen kann und wiederum einen regulatorischen Einfluss auf die Expression der jeweiligen Isoform haben könnte (Kirschner et al., 1999).

Die hier gezeigte retinale Expression von RPGR<sup>Ex1-19</sup> bei Wildtyp- wie auch erkrankten Mäusen findet Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Hong, der sowohl dieses Protein in der Maus wie auch bei anderen Säugetieren nachwies und dabei gleichzeitig das Auftreten in verschiedensten zellulären Kompartimenten betonte (Hong, Pawlyk, Sokolov et al., 2003). Ebenfalls eine retinale Expression in der Maus wie auch beim Rind wurde von He gezeigt, der bis zu fünf verschiedene Isoformen des RPGR<sup>Ex1-19</sup> nachwies und gleichzeitig bei einem heterogenen Expressionsmuster, bezogen auf die zellulären Subkompartimente, eine mögliche Beeinflussung des retinalen Mikrotubulusapparates sieht (He et al., 2008).

Die zweite zu vergleichende Isoform RPGR<sup>ORF15</sup>, auch als Retina-spezifische Isoform in der Literatur beschrieben (Kirschner et al., 1999), wurde im Hirn von Wildtypmäusen gut, bei erkrankten Tieren jedoch schwach nachgewiesen (siehe Abb. 3.19). Zudem fand sich ein schwaches Expressionsmuster in der Leber von gesunden wie erkrankten Tieren. In der Retina zeigte sich jedoch bei beiden Versuchstiergruppen kein Expressionsmuster (siehe Abb. 3.20).

He, der in seiner Arbeit bis zu 3 verschiedene Isoformen des RPGR<sup>ORF15</sup> beschreibt, konnte für die dritte Isoform Unregelmäßigkeiten in der retinalen Expression ausmachen und führte eine auftretende Nichtdetektierbarkeit auf eine molekulare Instabilität, sehr geringe Expressionsraten oder posttranslationale Modifikation dieser Isoformuntergruppe zurück (He et al., 2008). Diese beschriebenen zellulären Einflussfaktoren könnten auch im hier vorliegenden Fall den Nachweis von RPGR<sup>ORF15</sup> im retinalen Gewebe verhindert haben. Zur besseren Detektion dieser Isoform verwenden manche Arbeitsgruppen daher Antikörper, die speziell an den repetitiven Glycin-/Glutamin-Sequenzen des terminalen Exons binden (Rao, Anand et al., 2016), von denen bekannt ist, dass sie auch zu einer Nichtbindung des hier verwendeten Antikörpers führen können.

Die Retinitis pigmentosa zählt zu den retinalen Ziliopathien, die ein weit gefächertes Bild an klinischen Symptomkomplexen bilden können (Adams et al., 2009). Beschrieben wird ein breites Spektrum von der verspäteten geistigen Entwicklung, Nierenerkrankungen, Atemwegserkrankungen bis hin zu Lebererkrankungen. Da nun Ziliopathien nachgewiesenermaßen zu Lebererkrankungen führen können (Patnaik et al., 2015), wäre die Expression einer RPGR Isoform wie die der ORF15 denkbar, auch wenn diese nach heutigem Kenntnisstand überwiegend ein retinales Expressionsmuster zeigt

(Kirschner et al., 1999). Gestützt wird diese Vermutung von Khanna, der zeigen konnte, dass diese vorwiegend retinale Isoform auch in der Geißel von Spermien nachgewiesen worden ist und somit als ein Hinweis für eine mögliche Expression in anderen Organen, wie beispielsweise hier in der Leber, gewertet werden könnte (Khanna et al., 2005).

#### 4.2.2.2 Anti-RPGR Antikörper der Firma Davids

Bei dem hier im zweiten Schritt des Westernblots verwendeten N-terminalen Antikörper der Firma Davids handelt es sich um einen speziell designten Antikörper, der gegen die Proteinsequenz KQLSAGANTSAAALTEDGKL der RLD gerichtet ist. Alle bisher in der Literatur bekannten Isoformen des RPGR zeigen eben in diesem Bereich, welcher von Exon 1-10 codiert wird, diese Sequenz (A. Wright & Shu, 2007), was noch einmal ihre Bedeutung in der Analytik unterstreicht.

Zahlreiche andere Arbeitsgruppen machen sich dieses Prinzip der RLD als Epitop für einen Antikörper in der Detektion von RPGR Isoformen zu Nutze. He verwendet in seinen Arbeiten bei Maus, Rind und Mensch in einem ersten Schritt den GR-P1 Antikörper, der auch gegen die RLD der RPGR<sup>Ex1-19</sup> Isoform gerichtet ist, und differenziert dann in einem zweiten Schritt die so detektierten Isoformen mit einem Antikörper gegen das Exon 19 (RPGR-E-19) (He et al., 2008). Auch Yan verwendete in seinem Mausmodell der Retinitis pigmentosa den GR-P1 Antikörper mit der RLD-Region als Epitop, welches für ein 16 Aminosäure langes Peptid mit der Sequenz GKSKFAENPGKFWFK codiert (Yan et al., 1998). Ebenfalls nutzte Hong bei RPGR *knock-out*-Mäusen einen gegen dieses Epitop gerichteten Antikörper, um das RPGR mit einem Molekulargewicht von 95 kDa in Hirn, Retina und Hoden nachzuweisen (Hong et al., 2000). Khanna wiederum verwendete zu seinem Nachweis einer RPGR<sup>ORF15</sup> Isoform in der Geißel von bovinen Spermien ebenfalls einen GR-P1 Antikörper mit dem Exon 2 der RLD als Epitop (Khanna et al., 2005). Rao wiederum verwendete ebenfalls bei RPGR<sup>Ex1-19</sup> wie auch bei RPGR<sup>ORF15</sup>-*knock-out*-Mäusen einen Anti-RPGR Antikörper, der ebenfalls N-terminal bindet (Rao, Anand et al., 2016) und bereits zuvor von Rao und auch 2009 von Ghosh charakterisiert wurde (Rao et al., 2015) (Ghosh et al., 2009). Rao konnte 2016 ebenfalls zeigen, dass eine Verwendung von C-terminalen Antikörpern ein Problem darstellen kann, da es zur Glutaminierung am C-Terminus von RPGR<sup>ORF15</sup> kommen kann und somit eine Antikörperbindung C-terminal erschwert sein kann (Rao, Anand et al., 2016).

Die Verwendung des gegen die RLD-Region gerichteten Antikörpers der Firma Davids führte in dieser Arbeit im Westernblot zu einem schwachen Nachweis der RPGR<sup>Ex1-19</sup> Isoform in Niere und Leber bei etwa 45 kDa (Abb. 3.22). Diese Bande wurde mittels des H70 Antikörpers in Niere und Leber nicht detektiert, allerdings deutlich in der Lunge (Abb 3.20).

Dies findet eine teilweise Übereinstimmung mit der aktuellen Datenlage in der Literatur (Hong, Pawlyk, Sokolov et al., 2003), in der immer mehr Gewebe speziesspezifisch identifiziert werden, bei denen RPGR und seine intrazelluläre Signalkaskade eine Rolle zu spielen scheinen. So konnte Boylan sowohl bei humanen als auch bei bovinen Proben zeigen, dass Transkripte des mit dem RPGR interagierenden Protein (RPGRIP1) neben ihrer Expression im Herz, Nebenniere, Ovarien und Skelettmuskel auch in der Niere und in der Leber nachweisbar waren (Boylan & Wright, 2000). Im Vergleich zu dieser Arbeit handelte es sich zwar nicht um den direkten Nachweis des Proteins der Isoform, doch um ein Transkript eines in der intrazellulären Signalkaskade wichtigen Proteins, was somit die Existenz des RPGR<sup>Ex1-19</sup> Proteins in Leber und Niere theoretisch als möglich erscheinen lässt. Einen weiteren Hinweis für diesen möglichen Zusammenhang lieferte Gerner, der am Modell des Zebrafisches zeigen konnte, dass bei einer Depletion des RPGRs schwerwiegende Nierenerkrankungen wie die Nephronophthise (eine Form einer tubulointerstitiellen Nephritis) auftreten können, ausgelöst durch eine fehlende Kopplung von RPGR und Nephrocystin (Gerner et al., 2010). Ebenfalls am Modell des Zebrafisches zeigte Raghupathy eine schwache Expression der speziesspezifischen Isoform von ZF-RPGR<sup>Ex1-17</sup> in Leber und Niere wie sie auch hier im Mausmodell gesehen wurde (Raghupathy, Gautier, Soares, Wright & Shu, 2015). Auch Hong erwähnt in seiner Arbeit eine renale wie auch hepatische Expression einer 95 kDa schweren RPGR<sup>Ex-19</sup> Isoform bei der Maus in Analogie zu den Ergebnissen dieser Arbeit (Hong et al., 2000). Klinisch kann sich eine Fehlfunktion eines Proteins, welches ein ubiquitäres Expressionsmuster aufweist, in einer Ziliopathie widerspiegeln (Fliegau et al., 2007) (Rachel et al., 2012). Mögliche Symptomkomplexe bestehen hier bei renaler Manifestation aus Zystennieren wie beim Joubert Syndrom (Parisi, 2009) oder bei hepatischer Manifestation aus einer Leberfibrose (Otto et al., 2009).

### 4.3 Interpretation der neuen RPGR<sup>Ex1-19</sup>-Isoform

Erstmals konnte eine neue Isoform des RPGR<sup>Ex1-19</sup> in dieser Arbeit gezeigt werden. Im Westenblot mit dem RPGR H70 Antikörper wurde sie vermutlich im Hirn von Wildtypmäusen mit einem Molekulargewicht von etwa 67 kDa nachgewiesen und ist damit leichter als die beiden bekannten Hauptisoformen RPGR<sup>Ex1-19</sup> mit 90 kDa sowie die RPGR<sup>ORF15</sup> mit 240 kDa (siehe Abb. 3.19, vergleiche Abb. 1.8 und Tab. 3.2). Ebenfalls schwach wurde diese neue Isoform im Hodengewebe von erkrankten wie Wildtypmäusen nachgewiesen (siehe Abb. 3.20). Mit dem speziell designten Antikörper der Firma Davids war sie nur im Eluat (siehe Abb. 3.22) nachweisbar. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde die Isoelektrische Fokussierung (IEF) durchgeführt, die diese neue Isoform ebenfalls bei 67 kDa und bei einem pH-Wert von 5 bestätigte, obwohl der theoretisch errechnete pI-Wert bei 5,97 liegt. Mögliche Gründe für diese vorliegende Diskrepanz könnten sein, dass es sich um einen rein theoretisch ermittelten Wert von einem bisher unbekanntem Protein handelt. Zudem birgt die hier verwendete Methodik an sich immer eine gewisse Schwankungsbreite, obwohl sie in Kombination mit der Silbernitratfärbung (siehe Abb. 3.23) ebenfalls Proteinspots zwischen 50 und 70 kDa bei ebenfalls einem pI-Wert von knapp 5 zeigte und somit die Ergebnisse der IEF mit nachfolgender Anti-RPGR H-70 Antiköpertestung bestätigen. Ein weiteres Erklärungsmodell könnte die Etablierung des pH-Gradienten an sich darstellen, welcher in dieser Arbeit über immobilisierte Ladungsträger erzeugt wurde. Diese sind jedoch kovalent mit dem Trägergel verbunden. Es wäre somit eine Wechselwirkung zwischen Trägermolekül und rekombinant hergestelltem Protein möglich, was ebenfalls zur Verschiebung des pI-Punktes beigetragen haben könnte (Görg, 2004) (Gorg et al., 2000) (Weber & Boček, 1996) (Westermeier, Postel, Weser & Görg, 1983).

In der aktuellen Literatur finden sich einige Autoren, die die Möglichkeit von neuen Isoformen der beiden bereits bekannten Isoformen RPGR<sup>Ex1-19</sup> und RPGR<sup>ORF15</sup> postulieren. He zeigte 2008 am Mausmodell, dass ein RPGR-Antikörper, der im Exon 19 bindet und die Proteinsequenz NLQDSTTPNMEGKS detektiert, fünf verschiedene Isoformen des RPGR<sup>Ex1-19</sup> von retinalem Gewebe detektieren kann. Die Proteingrößen lagen bei 90 kDa, 110 kDa, 140 kDa, 150 kDa und 160 kDa. Beim Vergleich mit den bisher sechs bekannten Isoformen aus Tab. 3.2 (Proteinsequenz im Anhang) bindet der Antikörper nur an zwei dieser Formen, nämlich Isoform 4 und 5. He erklärt das Auftreten der fünf Isoformen mit einer möglichen posttranslationalen Modifizierung oder alternativen Splicing-Varianten (He et al., 2008). Die Arbeitsgruppe von Neidhardt beschreibt eine Isoform bei der ein neues Exon in Intron 9 gefunden (RPGR<sup>Ex9a</sup>) wurde

(Neidhardt et al., 2007). Identifiziert wurde dieses Protein in der humanen Retina, wobei betont wird, dass es sich bei dieser Isoform mit ihrer Mutation im Exon 9a um eine erstmalige Beschreibung einer Mutation in der RLD am N-terminalen Ende handeln würde, weil alle bis dato bekannten Isoformen C-terminale Mutationen aufgewiesen hätten (Kirschner et al., 2001) (Vervoort & Wright, 2002). Ebenfalls Kirschner und Vervoort konnten in ihren Arbeiten belegen, dass die prä-mRNA der RPGR<sup>ORF15</sup> Isoform auch dem alternativen Spleißen unterliegt. Die Exons 15a und 15b werden dabei in das Transkript überführt, wobei Exon 14 und 15 gewöhnlich herausgespleißt werden (Kirschner et al., 1999) (Vervoort et al., 2000), wobei die Menge des jeweiligen Transkriptes Auswirkungen auf den Schweregrad der klinischen Symptomatik hat (Kirschner et al., 2001) (Sharon et al., 2003). Moore wiederum konnte für die RPGR<sup>Ex1-19</sup> Isoform eine alternative Spleißvariante von Exon 6 detektieren, die bei Patienten mit XLRP vorlag und bei syndromatischer Manifestation in Nasenepithelzellen gefunden wurde und eine Deletion von 57 Basenpaaren in diesem Exon aufwies (Moore et al., 2006). Iannaccone wies ebenfalls bei Patienten mit einer syndromatischen Form der XLRP eine Mutation im Exon 6 nach (Iannaccone, 2003), die zu einer wiederkehrenden Otitis media, respiratorischen Infekten und Hörverlust führte (Iannaccone, 2003). Zito beschäftigte sich mit Mutationen in Exon 8, die ebenfalls zu einem komplexen klinischen Symptombild führen können, das phänotypisch der primären Ziliendyskinesie und dem Usher-Syndrom ähnelt (Zito et al., 2003). Schmid untersuchte das Blut von Patienten mit XLRP und konnte die vier bis dato neuen Isoformen RPGR<sup>Ex11a</sup>, RPGR<sup>SkipEx12</sup>, RPGR<sup>SkipEx14</sup> und RPGR<sup>SkipEx15</sup> nachweisen, welche auch noch gewebeabhängig verschiedene Expressionsmuster aufwiesen. Er postulierte, dass das alternative Spleißen, welches zudem noch eine gewebeabhängige Komponente besitzt, direkt den Phänotyp dieses Krankheitsbildes maßgeblich beeinflussen könnte (Schmid et al., 2010). Diesen Arbeiten ist gemeinsam, dass sie die ubiquitäre Expression der RPGR<sup>Ex1-19</sup>-Isoform aufzeigen. Zudem machen sie deutlich, dass es bei einer Mutation im entsprechenden Exon zu syndromatischen Manifestationen im klinischen Bild kommen kann. Als Begründung für das Auftreten verschiedenster Isoformen wird immer wieder das alternative Spleißen als pathognomonisches Erklärungsmodell angeführt, bei dem es sich um einen biologisch sehr effizienten Mechanismus handelt, aus einem Gen verschiedenste Proteine und damit auch wie in dieser Arbeit verschiedenste Isoformen zu generieren (Blencowe, 2006). Die so entstandenen Proteine entscheiden sich untereinander signifikant in ihrer zellulären Interaktion, räumlicher Struktur und ihrem zeitlichen wie räumlichen Expressionsmuster (Faustino, Cooper & Andre, 2003). Bezogen auf das Krankheitsbild der XLRP lässt sich demnach eine Isoform-getriggerte Ausprägung des Phänotypes als wahrscheinlich erachten.

Die in dieser Arbeit neu entdeckte Isoform des RPGR<sup>Ex1-19</sup> lässt dies in Zusammenschau der beschriebenen Publikationen als theoretisch möglich erscheinen, da im Rahmen weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen immer mehr Exon-Mutationen entdeckt werden sowie ihre gewebeabhängige Transkription zunehmend verstanden wird.

#### 4.4 Schlussfolgerung/Ausblick

Mithilfe der hier durchgeführten molekularbiologischen Untersuchungen konnte ein Beitrag im Hinblick auf die Entwicklung gentherapeutischer Ansätze des Krankheitsbildes XLRP geleistet werden. Genetisch sind hauptsächlich zwei Isoformen, das ubiquitär vorkommende RPGR<sup>Ex1-19</sup> und das primär retinal exprimierte RPGR<sup>ORF15</sup>, für dieses Krankheitsbild verantwortlich. Mithilfe des für diese Erkrankung etablierten RPGR<sup>tm1st1</sup> Mausmodells wurde eine neue Isoform der bereits bekannten RPGR<sup>Ex1-19</sup> Isoform rekombinant hergestellt. Mit einem speziell designten Antikörper wurde sowohl die Expression dieser Isoform als auch die Verteilung der beiden bereits bekannten Isoformen gewebeabhängig untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass der Nachweis der primär retinalen Isoform ORF15 extraretinal in Leber und Hirn von Mäusen möglich ist. Die Darstellung der ubiquitären Expression der RPGR<sup>Ex1-19</sup> Isoformvariante gelang in Hoden, Lunge und Retina. In einem ersten Schritt wurde eine neue Isoformvariante des RPGR<sup>Ex1-19</sup> rekombinant hergestellt und mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung überprüft. Dann wurde erfolgreich der speziell designte Antikörper an diesem rekombinant hergestellten Protein getestet. In einem zweiten Schritt wurde dieser neue Antikörper an den bereits bekannten Isoformen ebenfalls getestet und so die Existenz der Exon 1-19-Variante in Hirn, Leber und Niere bestätigt.

In der Literatur werden durch alternatives Spleißen sowohl von Exon 1-19 wie auch von ORF15 ständig neue Isoformen detektiert. Bei dem alternativen Spleißen handelt es sich um ein physiologisches Geschehen bei dem aus einem Gen eine Vielzahl an unterschiedlichen Proteinen gewonnen wird. In Bezug auf das Krankheitsbild der XLRP besteht noch Unklarheit darüber, welche Isoform in welchem Gewebe gebildet wird, da auch die Spleißvarianten sich in ihrer weiteren zellulären Interaktion wie auch in ihrer wechselseitigen Beeinflussung stark zu unterscheiden scheinen. Es ist somit der Fokus in weiterführenden Untersuchungen darauf zu richten zu klären, in welcher Art und

Weise die jeweilige Isoform speziesabhängig wie auch gewebeabhängig den Phänotyp dieses Krankheitsbildes beeinflusst.

In darauf aufbauenden Arbeiten sollte versucht werden, das genaue Expressionsmuster dieser neuen Isoform in anderen Geweben zu bestätigen und dann im nächsten Schritt vom Tiermodell auf den Menschen zu übertragen.

Da diese genetische Erkrankung je nach Vererbung auch eine syndromale Manifestation zeigt, ist die Diagnostik und Therapie in der Zukunft eventuell von einem multidisziplinären Ansatz geprägt. Da in diesem Kontext für eine mögliche Therapie eine umfassende Diagnostik von verschiedensten Geweben notwendig ist, würde sich das in dieser Arbeit rekombinante Isoform-Protein als mögliche Positivkontrolle anbieten und so gleichzeitig die Menge an untersuchtem Probenmaterial schonen.

Eine auf diese Art und Weise verbesserte Diagnostik könnte somit der Wegbereiter für die Entwicklung gentherapeutischer Ansätze sein. Zudem wäre neben der initialen Diagnostik ein Verlaufsmonitoring der Therapie denkbar.

## 5 Zusammenfassung

Die Retinitis pigmentosa (RP) zählt zur Gruppe der erblichen Netzhautdystrophien, die ein sehr komplexes Krankheitsbild mit unterschiedlichen Krankheitsverläufen aufweist und im Verlauf unter anderem zu Gesichtsfeldeinschränkungen und Erblindung führen kann. Die X-chromosomal vererbte RP stellt hierbei eine besonders schwere Form dar, die durch Mutationen in einer der beiden Hauptisoformen des RPGR Gens (RPGR<sup>Ex1-19</sup> und RPGR<sup>ORF15</sup>) gekennzeichnet ist. Die Isoformen zeichnen sich N-terminal durch die gleiche Sequenz, die auch RCC1-like domain (RLD) genannt wird, aus. In dieser Arbeit wurde ein Mausmodell (Rpg<sup>tm1stl</sup>), welches zuvor durch Arbeitsgruppen der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen 2011 entwickelt wurde, genutzt. Durch eine dem Menschen ähnliche Punktmutation im ORF15 kommt es zur retinalen Degeneration. Ziel war die Klonierung und nachfolgende Expression eines rekombinant hergestellten RPGR<sup>Ex1-19</sup> zur Generierung einer Positivkontrolle für zukünftige Westernblots. Zudem erfolgte die Testung eines neu designten Antikörpers, der gegen die RLD der beiden bekannten RPGR-Isoformen gerichtet ist. Dieser Antikörper sollte der genaueren Expressionsanalyse der bereits bekannten beiden Isoformen im Mausmodell dienen. Hierfür wurde die cDNA der RPGR<sup>Ex1-19</sup> Isoform von Wildtypmäusen mittels Klonierung in XL1 Blue Zellen transformiert. In einem zweiten Schritt wurde mittels In-Fusion-Klonierung ein Expressionsvektor in BL21(DE3)-Zellen transfiziert und die Proteininduktion eingeleitet. Anhand dieser Proteinsequenz wurde ein Antikörper designt, welcher sowohl am rekombinant hergestellten Protein wie auch an verschiedenen murinen Gewebeproben im Westernblot getestet wurde. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der rekombinant hergestellten RPGR<sup>Ex1-19</sup> Isoform um eine vermutlich neue Isoform dieses Proteins handelt, welche zudem im Hirn von Mäusen erfolgreich nachgewiesen werden konnte. Der neu designte Antikörper detektiert eine schwache Expression der bekannten RPGR<sup>Ex1-19</sup> Isoform in Niere und Leber, was durch einen weiteren N-terminalen Antikörper bestätigt wurde. Mit dieser Arbeit konnten weitere Einblicke in die Expression verschiedener Isoformen, welche zu einem gewebespezifisch aber auch zum anderen speziesspezifisch zu sein scheint, gewonnen werden. Die neu detektierte Isoform des RPGR<sup>Ex1-19</sup> und ihr Nachweis im Hirn unterstreicht die Bedeutung der verschiedenen gewebeabhängigen Isoformen für das Verständnis des Krankheitsbildes der XLRP. Da eine teilweise ubiquitäre Expression des RPGR<sup>Ex1-19</sup> beschrieben worden ist und klinisch in Analogie auch syndromale Krankheitsverläufe bekannt sind, könnte das hier rekombinant hergestellte Protein als Positivkontrolle in der Diagnostik einen wertvollen Beitrag leisten.



## 6 Summary

The retinitis pigmentosa is counted among inherited retinal dystrophies, which are characterized by a complexity of clinical symptoms with different disease progressions. They could end up in limitations of the visual field and subsequent blindness. The X-linked retinitis pigmentosa (XLRP) is an early-onset and phenotype, which is caused by mutation in the Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR) resulting in two main isoforms RPGR<sup>Ex1-19</sup> and RPGR<sup>ORF15</sup>. The N-terminal part of both isoforms is similar and homologous to RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation 1) and so called RLD. In this study a mouse model (Rpgr<sup>tm1stl</sup>) was used, which was previously developed in the department of ophthalmology of Justus-Liebig-University Giessen. It is distinguished by very similar mutation of ORF15 in comparison to human resulting in a retinal degeneration.

The aim of the following study was the cloning and the subsequent protein expression of RPGR<sup>Ex1-19</sup>, which could later on serve as a positive control in future western blots. Furthermore, a new antibody was generated targeting the RLD of both known isoforms to detect the expression pattern of them in different murine tissues.

Therefore, the cDNA of RPGR<sup>Ex1-19</sup> from murine mouse was transformed by cloning in XL1 blue cells. Afterwards, an expression vector was transferred to BL21(DE3) cells through In-Fusion cloning to induce the protein expression of the isoform. An antibody against this protein sequence was designed and afterwards tested with the recombinant isoform as well as with different murine tissues in western blot analysis.

In this study, it was shown that the recombinantly expressed protein could be interpreted as a new isoform of RPGR<sup>Ex1-19</sup>, which was also detected in the brain. In addition, the newly designed antibody was able to detect the known isoforms in liver and kidney as well, which was confirmed by a second N-terminal binding antibody.

With the results of this study, it is possible to get a better understanding of the expression pattern of different isoforms, which seems to be influenced in tissue dependent as well as in species specific manner. The probably new isoform and its expression in the brain underlines the importance of different isoforms and their understanding and influence in the setting of XLRP. As RPGR is well-known to have an ubiquitous expression and syndromal manifestations are possible, the recombinant protein could have a potential role in western blot diagnostics of different tissues.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

|                    |  |
|--------------------|--|
| °C                 | Grad Celsius   |
| 1°                 | Primärantikörper   |
| 2°                 | Sekundärantikörper   |
| %                  | Prozent  |
| $\lambda_{\max}$   | maximale Wellenlänge   |
| $\mu\text{g}$      | Mikrogramm   |
| $\mu\text{l}$      | Mikroliter   |
| $\mu\text{m}$      | Mikrometer   |
| $\mu\text{m}^2$    | Quadratmikrometer  |
| 2-D-GE             | zweidimensionale Gelelektrophorese   |
| Abb.               | Abbildung  |
| APS                | Ammoniumperoxid-Disulfat   |
| ATP                | Adenosintri-phosphat   |
| bp                 | Basenpaare   |
| CC                 | <i>connecting cilium</i>   |
| cDNA               | <i>complementary DNA</i>   |
| cm                 | Zentimeter   |
| dATP               | Desoxyadenosintri-phosphat   |
| ddH <sub>2</sub> O | doppelt destilliertes Wasser   |
| dH <sub>2</sub> O  | destilliertes Wasser   |
| DNA                | Desoxyribonukleinsäure,<br><i>deoxyribonucleic acid</i>                        |
| dNTP               | Desoxyribonukleosidtri-phosphat  |
| DTT                | 1,4-Dithiothreitol   |
| E. coli            | Escherichia coli   |
| EDTA               | Ethylendiamintetraacetat   |
| ERG                | Elektroretinogramm   |
| g                  | Gramm  |
| GCL                | Ganglionzellschicht, <i>ganglion cell layer</i>                                |
| GAPDH              | Glycerinaldehyd-3-phosphat-<br>Dehydrogenase                                   |
| GDP                | Guanosindiphosphat   |
| GEF                | Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor,<br><i>guanine nucleotide exchange factor</i> |

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| GTP                              | Guanosintriphosphat  |
| h                                | Stunde, <i>hour</i>  |
| HCl                              | Hydrogenchlorid  |
| HEK-Zellen                       | <i>human embryonic kidney</i> -Zellen                      |
| HNO                              | Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde                           |
| HRP                              | <i>horseradish peroxidase</i>                              |
| IEF                              | Isoelektrische Fokussierung                                |
| IFT                              | Intraflagellarer Transport                                 |
| ILM                              | innere Grenzmembran,<br><i>inner limiting membrane</i>     |
| INL                              | innere Körnerzellschicht, <i>inner nuclear layer</i>       |
| IPG                              | Immobilisierter pH-Gradient                                |
| IPL                              | innere plexiforme Schicht,<br><i>inner plexiform layer</i> |
| IPTG                             | Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid                 |
| IS                               | Innensegment, <i>inner segment</i>                         |
| JLU Gießen                       | Justus-Liebig-Universität Gießen                           |
| kb                               | Kilobasen  |
| KCl                              | Kaliumchlorid  |
| kDa                              | Kilodalton   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | Kaliumdihydrogenphosphat                                   |
| l                                | Liter  |
| LCA                              | Lebersche Congenitale Amaurose                             |
| L-Zapfen                         | <i>long wavelength sensitive</i> Zapfen                    |
| M                                | Molar  |
| mA                               | Milliampere  |
| ml                               | Milliliter   |
| mm                               | Millimeter   |
| mM                               | Millimolar   |
| MgCl <sub>2</sub>                | Magnesiumchlorid   |
| min                              | Minuten  |
| MP                               | Milchpulver  |
| mRNA                             | <i>messenger</i> RNA                                       |
| M-Zapfen                         | <i>medium wavelength sensitive</i> Zapfen                  |
| NaCl                             | Natriumchlorid   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | Natriumdihydrogenphosphat                                  |
| NFL                              | Nervenfaserschicht, <i>nerve fiber layer</i>               |

|            |  |
|------------|--|
| ng         | Nanogramm  |
| Ni-NTA     | Nickel-Nitrilotriessigsäure,<br><i>Nickel-Nitrilotriacetic acid</i>  |
| nm         | Nanometer  |
| OCT        | optische Kohärenztomographie,<br><i>optical coherence tomography</i>   |
| OD         | Optische Dichte  |
| OLM        | äußere Grenzmembran,<br><i>outer limiting membrane</i>   |
| ONL        | äußere Körnerzellschicht,<br><i>outer nuclear layer</i>  |
| OPL        | äußere plexiforme Schicht,<br><i>outer plexiform layer</i>   |
| ORF        | <i>open reading frame</i>  |
| OS         | Außensegment, <i>outer segment</i>   |
| PBS        | <i>phosphate buffered saline</i>   |
| PCR        | Polymerase-Kettenreaktion,<br><i>polymerase chain reaction</i>   |
| PDEδ       | delta-Untereinheit der Phosphodiesterase   |
| pl         | Isoelektrischer Punkt  |
| RCC1       | <i>regulator of chromosome condensation 1</i>  |
| RLD        | <i>RCC1-like domain</i>  |
| RNA        | Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>  |
| RP         | Retinitis Pigmentosa   |
| RPE        | retinales Pigmentepithel   |
| RPGR       | Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator  |
| RPGRIP     | <i>RPGR-interacting protein</i>  |
| Rpgrtm1sti | B6J.Sv129-Rpgrtm1sti   |
| rpm        | <i>revolutions per minute</i>  |
| RT         | Raumtemperatur   |
| SDS-Page   | Natriumdodecylsulfat-<br>Polyacrylamidgelelektrophorese,<br><i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide<br/>gel electrophoresis</i> |
| S-Zapfen   | <i>short wavelength sensitive Zapfen</i>   |
| Tab.       | Tabelle  |
| TE         | Tris-EDTA  |

|           |  |
|-----------|--|
| TEMED     | Tetramethylethylendiamin   |
| ty        | mutiertes Männchen   |
| tx        | heterozygotes Weibchen   |
| UV        | Ultraviolett   |
| V         | Volt   |
| VE-Wasser | vollentsalztes Wasser  |
| v/v       | <i>volume/volume</i>   |
| W         | Watt   |
| wt        | Wildtyp  |
| w/v       | <i>weight/volume</i>   |
| XLRP      | X-chromosomale Retinitis Pigmentosa,<br><i>X-linked Retinitis Pigmentosa</i> |
| xy        | männlicher Wildtyp   |

## 8 Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abb. 1.1 Schematische Darstellung des menschlichen Auges.....                 | 2  |
| Abb. 1.2 Aufbau der Retina .....  | 5  |
| Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Photorezeptoren.....                    | 7  |
| Abb. 1.4 Schematische Ziliendarstellung .....                                 | 8  |
| Abb. 1.5 Connecting Cilium .....  | 10 |
| Abb. 1.6 Schematische Darstellung des intraflagellaren Transports (IFT) ..... | 11 |
| Abb. 1.7 Klinische Befunde bei XLRP.....                                      | 15 |
| Abb. 1.8 Hauptpleißvarianten des RPGR-Gens.....                               | 18 |
| Abb. 1.9 Expression des RPGRs in der Photorezeptorgenese .....                | 20 |
| Abb. 2.1 Schematische Darstellung von Proteinen auf einem IPG-Streifen .....  | 42 |
| Abb. 2.2 Prinzip der 2D-Gelelektrophorese. ....                               | 44 |
| Abb. 3.1 Arbeitsschritte im Ergebnisteil .....                                | 45 |
| Abb. 3.2 Primerlage 37a und 37b .....   | 46 |
| Abb. 3.3 PCR mit Primerpaar 37a und 37 b.....                                 | 47 |
| Abb. 3.4 Schnittstellen im TOPO-Vektor.....                                   | 48 |
| Abb. 3.5 Verdau der 24 aufgereinigten Plasmiden mit EcoRI .....               | 49 |
| Abb. 3.6 Verdau der Maxiprep mit EcoRI, PstI, HindIII, BamHI.....             | 49 |
| Abb. 3.7 Schema der In-Fusion-Klonierung .....                                | 50 |
| Abb. 3.8 PCR mit In-Fusion-Primern .....                                      | 51 |
| Abb. 3.9 Verdau der In-Fusion-Klonierung mit EvoRV .....                      | 51 |
| Abb. 3.10 Mutagenese-PCR.....   | 52 |
| Abb. 3.11 Restriktionsverdau der 24 Klone mit EcoRV .....                     | 52 |
| Abb. 3.12 Proteinsequenz der neuen RPGR <sup>Ex1-19</sup> Isoform.....        | 53 |
| Abb. 3.13 Schnittstellen von EcoRV im pQT1Ex1-19 .....                        | 54 |
| Abb. 3.14 Restriktionsverdau.....   | 55 |
| Abb. 3.15 Prinzip der His-tag-Aufreinigung.....                               | 56 |
| Abb. 3.16 Coomassie-Färbung der Ni-NTA-Aufreinigung .....                     | 56 |
| Abb. 3.17 Westernblot mit Anti-6x His tag® Antikörper.....                    | 58 |
| Abb. 3.18 Westernblot mit Anti-RPGR H-70 .....                                | 60 |
| Abb. 3.19 Gewebeprobe und E1 im Westernblot.....                              | 61 |
| Abb. 3.20 Weitere Gewebeprobe im Westernblot .....                            | 62 |
| Abb. 3.21 Westernblot mit Anti-RPGR Antikörper der Firma Davids .....         | 64 |
| Abb. 3.22 Westernblot (Antikörper der Firma Davids) an weiteren Proben .....  | 65 |
| Abb. 3.23 Silbernitratfärbung des E1 nach der IEF.....                        | 67 |

|  |    |
|--|----|
| Abb. 3.24 Westernblot nach der IEF ..... | 68 |
|--|----|

## 9 Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tab. 2.1 Restriktionsenzyme .....                                       | 22 |
| Tab. 2.2 Enzyme .....   | 22 |
| Tab. 2.3 Marker .....   | 23 |
| Tab. 2.4 Verbrauchsmaterialien.....                                     | 24 |
| Tab. 2.5 Chemikalien/Verbrauchsmaterialien .....                        | 27 |
| Tab. 2.6 Antibiotikum.....  | 27 |
| Tab. 2.7 Puffer und Lösungen .....                                      | 29 |
| Tab. 2.8 Lösungen für die Silbernitratfärbung.....                      | 29 |
| Tab. 2.9 Gele .....   | 30 |
| Tab. 2.10 DNA-Präparations-Kits .....                                   | 30 |
| Tab. 2.11. Klonierungskits .....  | 31 |
| Tab. 2.12 Vektoren.....   | 31 |
| Tab. 2.13 Primer.....   | 31 |
| Tab. 2.14 Bakterienstämme .....   | 32 |
| Tab. 2.15 Geräte und Software .....                                     | 33 |
| Tab. 2.16 Primärantikörper .....  | 34 |
| Tab. 2.17 Sekundärantikörper .....                                      | 34 |
| Tab. 2.18 Standard-PCR-Bedingungen .....                                | 35 |
| Tab. 2.19 Ligationsansatz .....   | 37 |
| Tab. 2.20 A-Überhang.....   | 38 |
| Tab. 2.21 IEF-Laufbedingungen .....                                     | 43 |
| Tab. 3.1 Auflistung der Restriktionsenzyme.....                         | 48 |
| Tab. 3.2 Vergleich der sieben Isoformen .....                           | 53 |
| Tab. 3.3 Spezielle Antikörperbedingungen des Anti-His-Antikörpers ..... | 58 |
| Tab. 3.4 Antikörperbedingungen zu Westernblot Abb. 3.18 .....           | 60 |
| Tab. 3.5 Antikörperbedingungen zu Westerblot Abb. 3.19.....             | 61 |
| Tab. 3.6 Zuordnung der Gewebeproben.....                                | 62 |
| Tab. 3.7 Antikörperbedingungen zu Westernblot Abb. 3.20 .....           | 63 |
| Tab. 3.8 Antikörperbedingungen zu Westernbot Abb. 3.21.....             | 64 |
| Tab. 3.9 Antikörperbedingungen zu Westerblot Abb. 3.22.....             | 65 |
| Tab. 3.10 Antikörperbedingungen zu Westernblot Abb. 3.24.....           | 68 |

## 10 Literaturverzeichnis

- Acton, J. et al. (2012). Evaluation of Multimodal Imaging of X-Linked Retinitis Pigmentosa. *Changes*, 29(6), 997–1003.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Adamian, M., Pawlyk, B. S., Hong, D. & Berson, E. L. (2006). Rod and Cone Opsin Mislocalization, 515–518.
- Adams, N. A., Awadein, A., Toma, H. S., Awadein, A., Toma, H. S., Retinal, T., ... Toma, H. S. (2009). The Retinal Ciliopathies The Retinal Ciliopathies, 6810(2007).  
<https://doi.org/10.1080/13816810701537424>
- Anand, M. & Khanna, H. (2012). Ciliary transition zone (TZ) proteins RPGR and CEP290: role in photoreceptor cilia and degenerative diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(6), 541–551.  
<https://doi.org/10.1517/14728222.2012.680956>
- Bainbridge, J. W. B., Smith, A. J., Barker, S. S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., ... Ali, R. R. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *The New England Journal of Medicine*, 358(21), 2231–2239. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802268>
- Baylor, B. Y. D. a, Lamb, T. D. & Yau, K. (1979). RESPONSES OF RETINAL RODS TO SINGLE PHOTONS. *Power*, (1979), 613–634.
- Beltran, W. a., Cideciyan, a. V., Lewin, a. S., Iwabe, S., Khanna, H., Sumaroka, a., ... Aguirre, G. D. (2012). Gene therapy rescues photoreceptor blindness in dogs and paves the way for treating human X-linked retinitis pigmentosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(6), 2132–2137.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1118847109>
- Ben-Arie-Weintrob, Y., Berson, E. L. & Dryja, T. P. (2005). Histopathologic-genotypic correlations in retinitis pigmentosa and allied diseases. *Ophthalmic Genetics*, 26(2), 91–100. [https://doi.org/10.1016/S0084-392X\(08\)70402-7](https://doi.org/10.1016/S0084-392X(08)70402-7)
- Berson, E. L. (1996). Retinitis pigmentosa: unfolding its mystery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(10), 4526–4528. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.4526>
- Birch, D. G., Anderson, J. L. & Fish, G. E. (1999). Yearly rates of rod and cone functional loss in retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy. *Ophthalmology*, 106(2), 258–268. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(99\)90064-7](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(99)90064-7)
- Bird, A. C. (1975). X-linked retinitis pigmentosa. *Brit.J. Ophthalm.*, 94(2–3), 78–79.  
<https://doi.org/10.1136/bjo.59.4.177>



- Bird, A. C. (1987). Clinical investigation of retinitis pigmentosa. *Progress in Clinical and Biological Research*, 247, 3–20.
- Blencowe, B. J. (2006). Alternative Splicing: New Insights from Global Analyses. *Cell*, 126(1), 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.023>
- Boloc, D., Castillo-Lara, S., Marfany, G., González-Duarte, R. & Abril, J. F. (2015). Distilling a Visual Network of Retinitis Pigmentosa Gene-Protein Interactions to Uncover New Disease Candidates. *Plos One*, 10(8), e0135307. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135307>
- Boylan, J. P. & Wright, A. F. (2000). Identification of a novel protein interacting with RPGR. *Human Molecular Genetics*, 9(14), 2085–2093.
- Branham, K., Othman, M., Brumm, M., Karoukis, A. J., Atmaca-Sonmez, P., Yashar, B. M., ... Swaroop, A. (2012). Mutations in RPGR and RP2 account for 15% of males with simplex retinal degenerative disease. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(13), 8232–8237. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11025>
- Breuer, D. K., Yashar, B. M., Filippova, E., Hiriyan, S., Lyons, R. H., Mears, A. J., ... Swaroop, A. (2002). A comprehensive mutation analysis of RP2 and RPGR in a North American cohort of families with X-linked retinitis pigmentosa. *American Journal of Human Genetics*, 70(6), 1545–54. <https://doi.org/10.1086/340848>
- Brunner, S., Colman, D., Travis, A. J., Luhmann, U. F. O., Shi, W., Feil, S., ... Berger, W. (2008). Overexpression of RPGR Leads to Male Infertility in Mice Due to Defects in Flagellar Assembly 1, 617(June), 608–617. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.067454>
- Bukowy-Bieryło, Z., Ziętkiewicz, E., Loges, N. T., Wittmer, M., Geremek, M., Olbrich, H., ... Witt, M. (2013). RPGR mutations might cause reduced orientation of respiratory cilia. *Pediatric Pulmonology*, 48(4), 352–363. <https://doi.org/10.1002/ppul.22632>
- Burk, A. & Burk, R. (2005). *Checkliste Augenheilkunde*.
- Castagnet, P., Mavlyutov, T., Cai, Y., Zhong, F. & Ferreira, P. (2003). RPGRIP1s with distinct neuronal localization and biochemical properties associate selectively with RanBP2 in amacrine neurons. *Human Molecular Genetics*, 12(15), 1847–1863. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg202>
- Chang, B., Hawes, N. L., Hurd, R. E., Davisson, M. T., Nusinowitz, S. & Heckenlively, J. R. (2002). Retinal degeneration mutants in the mouse, 42, 517–525.
- Chang, J., Cideciyan, A. V., Jacobson, S. G., Sumaroka, A., Schwartz, S. B., Swider, M., ... Swaroop, A. (2016). Variegated yet non-random rod and cone photoreceptor disease patterns in RPGR-ORF15-associated retinal degeneration. *Human Molecular Genetics*, 25(24), 5444–5459.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddw361>

- Churchill, J. D., Bowne, S. J., Sullivan, L. S., Lewis, R. A., Wheaton, D. K., Birch, D. G., ... Daiger, S. P. (2013). Mutations in the X-linked retinitis pigmentosa genes RPGR and RP2 found in 8.5% of families with a provisional diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *54*(2), 1411–1416. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11541>
- Cideciyan, A. V. & Jacobson, S. G. (1994). Image analysis of the tapetal-like reflex in carriers of X-linked retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *35*(11), 3812–3824.
- Da Costa, R., Glaus, E., Tiwari, A., Kloeckener-Gruissem, B., Berger, W. & Neidhardt, J. (2015). Localizing the RPGR protein along the cilium: a new method to determine efficacies to treat RPGR mutations. *Gene Therapy*. <https://doi.org/10.1038/gt.2014.128>
- Daiger, S. P., Bowne, S. J. & Sullivan, L. S. (2008). Perspective on Genes and Mutations Causing Retinitis Pigmentosa, *125*(2), 151–158. <https://doi.org/10.1001/archophth.125.2.151.Perspective>
- Den Hollander, A. I., Black, A., Bennett, J. & Cremers, F. P. M. (2010). Lighting a candle in the dark: Advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *Journal of Clinical Investigation*, *120*(9), 3042–3053. <https://doi.org/10.1172/JCI42258>
- den Hollander, A. I., Koenekoop, R. K., Yzer, S., Lopez, I., Arends, M. L., Voeseenek, K. E. J., ... Cremers, F. P. M. (2006). Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *American Journal of Human Genetics*, *79*(3), 556–561. <https://doi.org/10.1086/507318>
- Dias, M. F., Joo, K., Kemp, J. A., Fialho, S. L., da Silva Cunha, A., Woo, S. J. & Kwon, Y. J. (2017). Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: Basic research and clinical perspectives. *Progress in Retinal and Eye Research*, *63*(June 2017), 107–131. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.10.004>
- Dryja, T. P., Adams, S. M., Grimsby, J. L., McGee, T. L., Hong, D. H., Li, T., ... Berson, E. L. (2001). Null RPGRIP1 alleles in patients with Leber congenital amaurosis. *American Journal of Human Genetics*, *68*(5), 1295–1298. <https://doi.org/10.1086/320113>
- Fahim, A. T., Bowne, S. J., Sullivan, L. S., Webb, K. D., Williams, J. T., Wheaton, D. K., ... Daiger, S. P. (2011). Allelic heterogeneity and genetic modifier loci contribute to clinical variation in males with X-linked retinitis pigmentosa due to RPGR mutations. *PLoS ONE*, *6*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023021>
- Faustino, N. A., Cooper, T. a & Andre, N. (2003). Pre-mRNA splicing and human

- disease. *Genes & Development*, 17(4), 419–437.  
<https://doi.org/10.1101/gad.1048803.snRNP>
- Ferrari, S., Di Iorio, E., Barbaro, V., Ponzin, D., S. Sorrentino, F. & Parmeggiani, F. (2011). Retinitis Pigmentosa: Genes and Disease Mechanisms. *Current Genomics*, 12(4), 238–249. <https://doi.org/10.2174/138920211795860107>
- Ferreira, P. A. (2005). Insights into X-linked retinitis pigmentosa type 3 , allied diseases and underlying pathomechanisms, 14(2), 259–267.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi272>
- Fliegau, M., Benzing, T. & Omran, H. (2007). When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(11), 880–893.  
<https://doi.org/10.1038/nrm2317>
- Garcı, M., Garcia-sandoval, B., Cantalapiedra, D., Riveiro, R., Lorda-sa, I., Trujillo-tiebas, M. J., ... Ayuso, C. (2006). Mutational Screening of the RP2 and RPGR Genes in Spanish Families with X-Linked Retinitis Pigmentosa AND.  
<https://doi.org/10.1167/iovs.06-0323>
- Gerner, M., Haribaskar, R., Pütz, M., Czerwitzki, J., Walz, G. & Schäfer, T. (2010). The retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1 (RPGRIP1) links RPGR to the nephronophthisis protein network. *Kidney International*, 77(10), 891–896. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.27>
- Ghosh, A. K., Murga-Zamalloa, C. A., Chan, L., Hitchcock, P. F., Swaroop, A. & Khanna, H. (2009). Human retinopathy-associated ciliary protein retinitis pigmentosa GTPase regulator mediates cilia-dependent vertebrate development. *Human Molecular Genetics*, 19(1), 90–98. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp469>
- Giers, B. C., Klein, D., Mendes-Madeira, A., Isiegas, C., Lorenz, B., Haverkamp, S. & Stieger, K. (2017). Outer plexiform layer structures are not altered following AAV-mediated gene transfer in healthy rat retina. *Frontiers in Neurology*, 8(FEB), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00059>
- Goldman, D. (2015). Müller glia cell reprogramming and retina regeneration. *Changes*, 29(6), 997–1003. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Görg, A. (2004). 2-D Electrophoresis. Principles and Methods. *Handbook*, 163.  
<https://doi.org/10.1186/1755-8794-4-24>
- Gorg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. & Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 21(6), 1037–1053.  
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2683\(20000401\)21:6<1037::AID-ELPS1037>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1037::AID-ELPS1037>3.0.CO;2-V)
- Gouras, P. & Ekesten, B. (2004). Why do mice have ultra-violet vision? *Experimental*

- Eye Research*, 79(6), 887–892. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2004.06.031>
- Grehn, F. (2012). *Augenheilkunde*, 31. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Gupta, N., Brown, K. E. & Milam, A. H. (2003). Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, 76(4), 463–471. [https://doi.org/10.1016/S0014-4835\(02\)00332-9](https://doi.org/10.1016/S0014-4835(02)00332-9)
- Hamel, C. (2006). Retinitis pigmentosa. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 1, 40. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-1-40>
- Hartong, D. T., Berson, E. L. & Dryja, T. P. (2006). Retinitis pigmentosa. *Lancet*, 368(9549), 1795–1809. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69740-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69740-7)
- He, S., Parapuram, S., Hurd, T. & Behnam, B. (2008). Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR) protein isoforms in mammalian retina: insights into X-linked Retinitis Pigmentosa and associated ciliopathies. *Vision Research*. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2007.08.005>
- Heckenlively, J. R., Yoser, S. L., Friedman, L. H. & Oversier, J. J. (1988). Clinical findings and common symptoms in retinitis pigmentosa. *American Journal of Ophthalmology*, 105(5), 504–511.
- Hong, D. & Li, T. (2002). Complex Expression Pattern of RPGR Reveals a Role for Purine-Rich Exonic Splicing Enhancers AND, 3373–3382.
- Hong, D., Pawlyk, B. S., Adamian, M. & Li, T. (2003). Dominant , Gain-of-Function Mutant Produced by Truncation of RPGR, 36–41. <https://doi.org/10.1167/iov.03-0787>
- Hong, D., Pawlyk, B. S., Shang, J., Sandberg, M. A., Berson, E. L. & Li, T. (2000). A retinitis pigmentosa GTPase regulator ( RPGR ) - deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa ( RP3 ), 97(7), 3649–3654.
- Hong, D., Pawlyk, B., Sokolov, M., Strissel, K. J., Yang, J., Tulloch, B., ... Li, T. (2003). RPGR Isoforms in Photoreceptor Connecting Cilia and the Transitional Zone of Motile Cilia, 44(6). <https://doi.org/10.1167/iov.02-1206>
- Hong, D., Yue, G., Adamian, M. & Li, T. (2001). Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator ( RPGR ) -interacting Protein Is Stably Associated with the Photoreceptor Ciliary Axoneme and Anchors RPGR to the Connecting Cilium \*, 276(15), 12091–12099. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009351200>
- Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L. & Wong, R. O. L. (2014). Functional architecture of the retina: Development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 42(i), 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2014.06.003>
- Hosch, J., Lorenz, B. & Stieger, K. (2011). RPGR: role in the photoreceptor cilium, human retinal disease, and gene therapy. *Ophthalmic Genetics*, 32(1), 1–11.

- <https://doi.org/10.3109/13816810.2010.535889>
- Hsiao, Y.-C., Tuz, K. & Ferland, R. J. (2012). Trafficking in and to the primary cilium. *Cilia*, 1(1), 4. <https://doi.org/10.1186/2046-2530-1-4>
- Iannaccone, A. (2003). Clinical and immunohistochemical evidence for an X linked retinitis pigmentosa syndrome with recurrent infections and hearing loss in association with an RPGR mutation, 1–9.
- Ikeda, Y., Yoshida, N., Murakami, Y., Nakatake, S., Notomi, S., Hisatomi, T., ... Ishibashi, T. (2015). Long-term Surgical Outcomes of Epiretinal Membrane in Patients with Retinitis Pigmentosa. *Scientific Reports*, 5, 13078. <https://doi.org/10.1038/srep13078>
- Insinna, C. & Besharse, J. C. (2009). Intraflagellar Transport and the Sensory Outer Segment of Vertebrate Photoreceptors, 237(8), 1982–1992. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21554>. Intraflagellar
- Jaissle, G. B., May, C. A., Van De Pavert, S. a., Wenzel, A., Claes-May, E., Giel, A., ... Seeliger, M. W. (2010). Bone spicule pigment formation in retinitis pigmentosa: Insights from a mouse model. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 248(8), 1063–1070. <https://doi.org/10.1007/s00417-009-1253-9>
- Jiang, J., Wu, X., Shen, D., Dong, L., Jiao, X., Hejtmancik, J. F. & Li, N. (2017). Analysis of RP2 and RPGR Mutations in Five X-Linked Chinese Families with Retinitis Pigmentosa. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep44465>
- Jin, Z.-B., Gu, F., Ma, X. & Nao-i, N. (2007). Identification of a Novel. *Ophthalmic Molecular Genetics*, 125(10), 1407–1412.
- Kardon, J. R. & Vale, R. D. (2009). Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(12), 854–865. <https://doi.org/10.1038/nrm2804>
- Katsanis, N. (2004). The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. *Human Molecular Genetics*, 13 Spec No(1), R65–R71. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddh092>
- Katsanis, N. (2011). Ciliopathies, 1533–1543.
- Kennedy, B. (2012). What drives cell morphogenesis - a look inside the vertebrate photoreceptor. *Changes*, 29(6), 997–1003. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Khanna, H., Hurd, T. W., Lillo, C., Shu, X., Parapuram, S. K., He, S., ... Swaroop, A. (2005). RPGR-ORF15, Which Is Mutated in Retinitis Pigmentosa, Associates with SMC1, SMC3, and Microtubule Transport Proteins \*, 280(39), 33580–33587. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505827200>

- Kirschner, R., Erturk, D., Zeitz, C., Sahin, S., Ramser, J. & Cremers, F. P. M. (2001). DNA sequence comparison of human and mouse retinitis pigmentosa GTPase regulator ( RPGR ) identifies tissue-specific exons and putative regulatory elements, 271–278. <https://doi.org/10.1007/s004390100572>
- Kirschner, R., Rosenberg, T., Schultz-heienbrok, R., Lenzner, S., Feil, S., Roepman, R., ... Berger, W. (1999). RPGR transcription studies in mouse and human tissues reveal a retina-specific isoform that is disrupted in a patient with X-linked retinitis pigmentosa, 8(8), 1571–1578.
- Kolb, H. (1991). Simple Anatomy of the Retina by Helga Kolb.
- Kolb, H. (2005). Gross Anatomy of the Eye. *Webvision The Organization of the Retina and Visual System*. <https://doi.org/NBK11534> [bookaccession]
- Kotov, N. V., Bates, D. G., Gizatullina, a. N., Gilaziev, B., Khairullin, R. N., Chen, M. Z. Q., ... Valeyev, N. V. (2011). Computational modelling elucidates the mechanism of ciliary regulation in health and disease. *BMC Systems Biology*, 5(1), 143. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-5-143>
- Lh riteau, E., Libeau, L., Stieger, K., Deschamps, J.-Y., Mendes-Madeira, A., Provost, N., ... Rolling, F. (2009). The RPGRIP1-deficient dog, a promising canine model for gene therapy. *Molecular Vision*, 15(July 2008), 349–361. <https://doi.org/36> [pii]
- Li, Z. Y., Possin, D. E. & Milam, a H. (1995). Histopathology of bone spicule pigmentation in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology*, 102(5), 805–816. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(95\)30953-0](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(95)30953-0)
- Linari, M., Ueffing, M., Manson, F., Wright, a, Meitinger, T. & Becker, J. (1999). The retinitis pigmentosa GTPase regulator, RPGR, interacts with the delta subunit of rod cyclic GMP phosphodiesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(4), 1315–1320. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.4.1315>
- Lindner, P., Bauer, K., Krebber, A., Nieba, L., Kremmer, E., Krebber, C., ... Pl ckthun, A. (1997). Specific detection of His-tagged proteins with recombinant anti-His tag scfv-phosphatase or scFv-phage fusions. *BioTechniques*, 22(1), 140–149. <https://doi.org/#>
- Liu, F., Chen, J., Yu, S., Raghupathy, R. K., Liu, X., Qin, Y., ... Liu, M. (2015). Knockout of RP2 decreases GRK1 and rod transducin subunits and leads to photoreceptor degeneration in zebrafish. *Human Molecular Genetics*, 24(16), 4648–4659. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv197>
- Liu, Q. (2007). The Proteome of the Mouse Photoreceptor Sensory Cilium Complex, 23(4), 333–336. <https://doi.org/10.1097/WAD.0b013e3181aba588.MRI>
- Lodish, H., Berk, A. & Zipursky, S. (2000). Cell Biology. 4th edition.

- Lopes, V. S., Jimeno, D., Khanobdee, K., Song, X., Chen, B., Nusinowitz, S. & Williams, D. S. (2010). Dysfunction of Heterotrimeric Kinesin-2 in Rod Photoreceptor Cells and the Role of Opsin Mislocalization in Rapid Cell Death, *21*, 4076–4088. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10>
- Lui, K. & Huang, Y. (2009). RanGTPase: A Key Regulator of Nucleocytoplasmic Trafficking. *Changes*, *29*(6), 997–1003. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Mavlyutov, T. A., Zhao, H. & Ferreira, P. A. (2002). Species-specific subcellular localization of RPGR and RPGRIP isoforms : implications for the phenotypic variability of congenital retinopathies among species, *11*(16), 1899–1907.
- Megaw, R., Abu-Arafah, H., Jungnickel, M., Mellough, C., Gurniak, C., Witke, W., ... Ffrench-Constant, C. (2017). Gelsolin dysfunction causes photoreceptor loss in induced pluripotent cell and animal retinitis pigmentosa models. *Nature Communications*, *8*(1), 271. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00111-8>
- Megaw, R. D., Soares, D. C. & Wright, A. F. (2015). RPGR: Its role in photoreceptor physiology, human disease, and future therapies. *Experimental Eye Research*, *138*, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2015.06.007>
- Meindl, A., Dry, K., Herrmann, K., Manson, F., Ciccodicola, A., Edgar, A., ... Wright, A. (1996). A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Nature Genetics*, *13*(1), 35–42. <https://doi.org/10.1038/ng0596-35>
- Moore, a, Escudier, E., Roger, G., Tamalet, a, Pelosse, B., Marlin, S., ... Amselem, S. (2006). RPGR is mutated in patients with a complex X linked phenotype combining primary ciliary dyskinesia and retinitis pigmentosa. *Journal of Medical Genetics*, *43*(4), 326–333. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.034868>
- Moritz, O. L., Tam, B. M., Hurd, L. L., Peränen, J., Deretic, D. & Papermaster, D. S. (2001). Mutant rab8 Impairs docking and fusion of rhodopsin-bearing post-Golgi membranes and causes cell death of transgenic Xenopus rods. *Molecular Biology of the Cell*, *12*(8), 2341–2351.
- Murga-Zamalloa, C. a., Atkins, S. J., Peranen, J., Swaroop, A. & Khanna, H. (2010). Interaction of retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) with RAB8A GTPase: Implications for cilia dysfunction and photoreceptor degeneration. *Human Molecular Genetics*, *19*(18), 3591–3598. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq275>
- Murga-Zamalloa, C., Swaroop, A. & Khanna, H. (2010). Multiprotein complexes of retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR), a ciliary protein mutated in X-linked retinitis pigmentosa (XLRP). In *Advances in Experimental Medicine and*

*Biology*. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1399-9\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1399-9_13)

- Mustafi, D., Engel, A. H. & Palczewski, K. (2012). *Structure of Cone Photoreceptors. Changes* (Vol. 29). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Neidhardt, J., Glaus, E., Barthelmes, D., Zeitz, C., Fleischhauer, J. & Berger, W. (2007). Identification and characterization of a novel RPGR isoform in human retina. *Human Mutation*, *28*(8), 797–807. <https://doi.org/10.1002/humu.20521>
- Neidhardt, J., Glaus, E., Lorenz, B., Netzer, C., Li, Y., Schambeck, M., ... Berger, W. (2008). Identification of novel mutations in X-linked retinitis pigmentosa families and implications for diagnostic testing. *Molecular Vision*, *14*(August 2007), 1081–1093.
- Norris, D. P. & Grimes, D. T. (2012). Mouse models of ciliopathies: the state of the art. *Disease Models & Mechanisms*, *5*(3), 299–312. <https://doi.org/10.1242/dmm.009340>
- Otto, E. A., Tory, K., Attanasio, M., Zhou, W., Chaki, M., Paruchuri, Y., ... Hildebrandt, F. (2009). Hypomorphic mutations in meckelin (MKS3/TMEM67) cause nephronophthisis with liver fibrosis (NPHP11). *Journal of Medical Genetics*, *46*(10), 663–670. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.066613>
- Parisi, M. A. (2009). Disorders, (4), 326–340. <https://doi.org/10.1002/ajmg.c.30229>. Clinical
- Parmeggiani, F., Sato, G., De Nadai, K., R. Romano, M., Binotto, A. & Costagliola, C. (2011). Clinical and Rehabilitative Management of Retinitis Pigmentosa: Up-to-Date. *Current Genomics*, *12*(4), 250–259. <https://doi.org/10.2174/138920211795860125>
- Patil, H., Guruju, M. R., Cho, K. -i., Yi, H., Orry, A., Kim, H. & Ferreira, P. A. (2012). Structural and functional plasticity of subcellular tethering, targeting and processing of RPGRIP1 by RPGR isoforms. *Biology Open*. <https://doi.org/10.1242/bio.2011489>
- Patnaik, S. R., Raghupathy, R. K., Zhang, X., Mansfield, D., Shu, X., Hospital, I. R. & Pa, G. (2015). The Role of RPGR and Its Interacting Proteins in Ciliopathies, 2015.
- Pearring, J. N. et al. (2012). Protein sorting, targeting and trafficking in photoreceptor cells. *Changes*, *29*(6), 997–1003. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Petr-Silva, H. & Linden, R. (2013). Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa. *Clinical Ophthalmology*, *8*, 127–136. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S38041>
- Praveen, K., Davis, E. E. & Katsanis, N. (2015). Unique among ciliopathies: primary



- ciliary dyskinesia, a motile cilia disorder. *F1000Prime Reports*, 7(March).  
<https://doi.org/10.12703/P7-36>
- Preising, M. N., Stieger, K. & Lorenz, B. (2014). Augenheilkunde up2date Genetik ophthalmologischer Erkrankungen, 177–191.
- Purves, D., Augustine, G. & Fitzpatrick, D. (2001). Anatomy of the Eye - Neuroscience - NCBI Bookshelf.pdf.
- Rachel, R. a, Li, T. & Swaroop, A. (2012). Photoreceptor sensory cilia and ciliopathies: focus on CEP290, RPGR and their interacting proteins. *Cilia*, 1(1), 22.  
<https://doi.org/10.1186/2046-2530-1-22>
- Raghupathy, R. K., Gautier, P., Soares, D. C., Wright, A. F. & Shu, X. (2015). Evolutionary characterization of the retinitis pigmentosa GTPase regulator gene. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 56(11), 6255–6264.  
<https://doi.org/10.1167/iovs.15-17726>
- Rao, K. N., Anand, M. & Khanna, H. (2016). The carboxyl terminal mutational hotspot of the ciliary disease protein RPGR<sup>ORF15</sup> (retinitis pigmentosa GTPase regulator) is glutamylated *in vivo*. *Biology Open*, 5(4), 424–428.  
<https://doi.org/10.1242/bio.016816>
- Rao, K. N., Li, L., Anand, M. & Khanna, H. (2015). Ablation of retinal ciliopathy protein RPGR results in altered photoreceptor ciliary composition. *Scientific Reports*, 5, 11137. <https://doi.org/10.1038/srep11137>
- 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. *Human Molecular Genetics*, 25(7), 1345–1356. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw017>
- Rao, K. N., Zhang, W., Li, L., Ronquillo, C., Baehr, W. & Khanna, H. (2016). Ciliopathy-associated protein CEP290 modifies the severity of retinal degeneration due to loss of RPGR. *Human Molecular Genetics*, 25(10), 2005–2012.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddw075>
- Remans, K., Bürger, M., Vetter, I. R. & Wittinghofer, A. (2014). C2 domains as protein-protein interaction modules in the ciliary transition zone. *Cell Reports*.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.049>
- Remington, S., Wiegand, G. & Huber, R. (1982). Crystallographic refinement and atomic models of two different forms of citrate synthase at 2.7 and 1.7 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 158(1), 111–152.  
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90452-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90452-1)
- Roepman, R., Van Duijnhoven, G., Rosenberg, T., Pinckers, A. J. L. G., Bleeker-Wagemakers, L. M., Bergen, A. a B., ... Berger, W. (1996). Positional cloning of

- the gene for X-linked retinitis pigmentosa 3: Homology with the guanine-nucleotide-exchange factor RCC1. *Human Molecular Genetics*, 5(7), 1035–1041. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.7.1035>
- Röll, D. (2014). Morphologische und funktionelle Charakterisierung eines Mausmodells der Augenkrankheit Retinitis Pigmentosa aufgrund einer Mutation im Rpgr Gen; Dissertation 2014; VVB Laufersweiler (Edition scientifique).
- Roorda, a & Williams, D. R. (1999). The arrangement of the three cone classes in the living human eye. *Nature*, 397(6719), 520–522. <https://doi.org/10.1038/17383>
- Sachsenweger, M. (2003). *Augenheilkunde*, 2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
- Sahel, J.-A. (2011). Spotlight on childhood blindness, 121(8), 2145–2149. <https://doi.org/10.1172/JCI58300.Highlights>
- Satir, P. & Christensen, S. T. (2007). Overview of structure and function of mammalian cilia. *Annual Review of Physiology*, 69, 377–400. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236>
- Schlegel, J. (2011). Entwicklung eines humanisierten Mausmodells für X-chromosomale Retinitis Pigmentosa, hervorgerufen durch eine Punktmutation im RPGR Gen; Dissertation 2011.
- Schlote, T., Grüb, M., Mielke, J. & Rohrbach, M. (2004). *Taschenatlas Augenheilkunde*, 1. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart
- Schmid, F., Glaus, E., Cremers, F. P. M., Kloeckener-Gruissem, B., Berger, W. & Neidhardt, J. (2010). Mutation- and tissue-specific alterations of RPGR transcripts. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(3), 1628–1635. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4031>
- Sharon, D., Sandberg, M. A., Rabe, V. W., Stillberger, M., Dryja, T. P. & Berson, E. L. (2003). RP2 and RPGR Mutations and Clinical Correlations in Patients with X-Linked Retinitis Pigmentosa, 1131–1146.
- Shu, X., Black, G. C., Rice, J. M., Hart-holden, N., Jones, A., Grady, A. O., ... Å, A. F. W. (2007). MUTATION UPDATE RPGR Mutation Analysis and Disease : An Update, 28(December 2006), 322–328. <https://doi.org/10.1002/humu>
- Shu, X., Fry, A. M., Tulloch, B., Manson, F. D. C., Crabb, J. W., Khanna, H. & Faragher, A. J. (2005). RPGR ORF15 isoform co-localizes with RPGRIP1 at centrioles and basal bodies and interacts with nucleophosmin, 14(9), 1183–1197. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi129>
- Slijkerman, R. W. N., Song, F., Astuti, G. D. N., Huynen, M. a., van Wijk, E., Stieger, K. & Collin, R. W. J. (2015). The pros and cons of vertebrate animal models for functional and therapeutic research on inherited retinal dystrophies. *Progress in Retinal and Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.04.004>

- Smith, E. F. & Yang, P. (2004). The Radial Spokes and Central Apparatus: Mechano-Chemical Transducers That Regulate Flagellar Motility. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 57(1), 8–17. <https://doi.org/10.1002/cm.10155>
- Sullivan, L. S., Bowne, S. J., Reeves, M. J., Blain, D., Goetz, K., Difer, V. N., ... Daiger, S. P. (2013). Prevalence of mutations in eyeGENE probands with a diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(9), 6255–6261. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12605>
- Swaroop, A., Kim, D. & Forrest, D. (2010). Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(8), 563–576. <https://doi.org/10.1038/nrn2880>
- Szel, a., Rohlich, P., Caffè, a. R., Juliusson, B., Aguirre, G. & Van Veen, T. (1992). Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. *Journal of Comparative Neurology*, 325(3), 327–342. <https://doi.org/10.1002/cne.903250302>
- Szymanska, K. & Johnson, C. a. (2012). The transition zone: an essential functional compartment of cilia. *Cilia*, 1(1), 10. <https://doi.org/10.1186/2046-2530-1-10>
- Urbanska, P., Song, K., Joachimiak, E., Krzemien-Ojak, L., Koprowski, P., Hennessey, T., ... Wloga, D. (2015). The CSC proteins FAP61 and FAP251 build the basal substructures of radial spoke 3 in cilia. *Molecular Biology of the Cell*, 26. <https://doi.org/10.1091/mbc.E14-11-1545>
- Vervoort, R., Lennon, A., Bird, A. C., Tulloch, B., Axton, R., Miano, M. G., ... Wright, A. F. (2000). Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa, 25(august), 462–466.
- Vervoort, R. & Wright, A. F. (2002). Mutations of RPGR in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Human Mutation*, 19(5), 486–500. <https://doi.org/10.1002/humu.10057>
- Wätzlich, D., Vetter, I., Gotthardt, K., Miertzschke, M., Chen, Y.-X., Wittinghofer, A. & Ismail, S. (2013). The interplay between RPGR, PDEd and Arl2/3 regulate the ciliary targeting of farnesylated cargo. *EMBO Reports*, 14, 465–47237. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.37>
- Weber, G. & Boček, P. (1996). Optimized continuous flow electrophoresis. *Electrophoresis*, 17(12), 1906–1910. <https://doi.org/10.1002/elps.1150171216>
- Wegscheider, E., Preising, M. N. & Lorenz, B. (2004). Fundus autofluorescence in carriers of X-linked recessive retinitis pigmentosa associated with mutations in RPGR, and correlation with electrophysiological and psychophysical data. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, 242(6), 501–511. <https://doi.org/10.1007/s00417-004-0891-1>

- Westermeier, R., Postel, W., Weser, J. & Görg, A. (1983). High-resolution two-dimensional electrophoresis with isoelectric focusing in immobilized pH gradients. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 8(4), 321–330. [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(83\)90006-4](https://doi.org/10.1016/0165-022X(83)90006-4)
- Whewey, G., Parry, D. a & Johnson, C. a. (2014). The role of primary cilia in the development and disease of the retina. *Organogenesis*, 10(1), 69–85. <https://doi.org/10.4161/org.26710>
- Wolfrum, U. & Schmitt, A. (2000). Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 46(2), 95–107. [https://doi.org/10.1002/1097-0169\(200006\)46:2<95::AID-CM2>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/1097-0169(200006)46:2<95::AID-CM2>3.0.CO;2-Q)
- Wright, A. F., Chakarova, C. F., Abd El-Aziz, M. M. & Bhattacharya, S. S. (2010). Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nature Reviews. Genetics*, 11(4), 273–284. <https://doi.org/10.1038/nrg2717>
- Wright, A. & Shu, X. (2007). Focus on Molecules: RPGR. *Experimental Eye Research*, 85, 2–3. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.03.006>
- Wright, R. N., Hong, D.-H. & Perkins, B. (2011). Misexpression of the Constitutive Rpgrex1-19 Variant Leads to Severe Photoreceptor Degeneration, 52(8), 5189–5201. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7470>
- Wu, Z., Hiriyan, S., Qian, H., Mookherjee, S., Campos, M. M., Gao, C., ... Swaroop, a. (2015). A long-term efficacy study of gene replacement therapy for RPGR-associated retinal degeneration. *Human Molecular Genetics*, (April), 1–15. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv134>
- Yan, D., Swain, P. K., Breuer, D., Tucker, R. M., Wu, W., Fujita, R., ... Swaroop, A. (1998). Biochemical characterization and subcellular localization of the mouse retinitis pigmentosa GTPase regulator (mRpg). *Journal of Biological Chemistry*, 273(31), 19656–19663. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.31.19656>
- Yang, Z., Peachey, N. S., Moshfeghi, D. M., Thirumalaichary, S., Chorich, L., Shugart, Y. Y., ... Zhang, K. (2002). Mutations in the RPGR gene cause X-linked cone dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 11(5), 605–611.
- Zhang, Q., Acland, G. M., Wu, W. X., Johnson, J. L., Pearce-kelling, S., Tulloch, B., ... Aguirre, G. D. (2002). Different RPGR exon ORF15 mutations in Canids provide insights into photoreceptor cell degeneration, 11(9), 993–1003.
- Zhang, Y., Seo, S., Bhattarai, S., Bugge, K., Searby, C. C., Zhang, Q., ... Sheffield, V. C. (2014). BBS mutations modify phenotypic expression of CEP290-related ciliopathies. *Human Molecular Genetics*, 23(1), 40–51. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt394>

- Zhao, Y., Hong, D., Pawlyk, B., Yue, G., Adamian, M., Grynberg, M., ... Li, T. (2003). The retinitis pigmentosa GTPase regulator ( RPGR ) - interacting protein : Subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis, *100*(7).
- Zito, I., Downes, S. M., Patel, R. J., Cheetham, M. E., Ebenezer, N. D., Jenkins, S. a, ... Hardcastle, a J. (2003). RPGR mutation associated with retinitis pigmentosa, impaired hearing, and sinorespiratory infections. *Journal of Medical Genetics*, *40*(8), 609–615. <https://doi.org/10.1136/jmg.40.8.609>
- Zobor, D. & Zrenner, E. (2012). Retinitis pigmentosa - eine Übersicht. *The Sight-Saving Review*, *42*(1), 21–28. <https://doi.org/10.1007/s00347-012-2555-6>

## 11 Anhang

| PCR-Ansatz zu Abb. 3.3    | PCR-Protokoll |       |
|---------------------------|---------------|-------|
| 7,0 µl ddH <sub>2</sub> O | 00:10 min     | 98 °C |
| 2,0 µl Puffer             | 00:10 min     | 56 °C |
| 0,8 µl dNTP               | 01:30 min     | 72 °C |
| 0,1 µl Primer 37a         | 00:10 min     | 98 °C |
| 0,1 µl Primer 37b         | 00:15 min     | 72 °C |
| 0,1 µl cDNA               | 05:00 min     | 72 °C |
| 0,1 µl Polymerase         | 10:00 min     | 4 °C  |

45 Zyklen

| PCR-Ansatz zu Abb. 3.8    | PCR-Protokoll |       |
|---------------------------|---------------|-------|
| 6,9 µl ddH <sub>2</sub> O | 00:10 min     | 98 °C |
| 2,0 µl Puffer             | 00:10 min     | 53 °C |
| 0,8 µl dNTP               | 02:00 min     | 72 °C |
| 1 µl Primer RPGR1-19f5    | 00:10 min     | 98 °C |
| 1 µl Primer RPGR1-19r7    | 00:15 min     | 72 °C |
| 0,1 µl cDNA               | 05:00 min     | 72 °C |
| 0,1 µl Polymerase         | 10:00 min     | 4 °C  |

45 Zyklen

| Mutagenese-PCR-Ansatz zu Abb. 3.10 | PCR-Protokoll |       |
|------------------------------------|---------------|-------|
| 6,7 µl ddH <sub>2</sub> O          | 00:10 min     | 98 °C |
| 2,0 µl Puffer                      | 00:10 min     | 60 °C |
| 0,2 µl dNTP                        | 01:30 min     | 72 °C |
| 0,3 µl Primer RPGR1-19f5           | 00:10 min     | 98 °C |
| 0,3 µl Primer RPGR1-19r7           | 00:15 min     | 72 °C |
| 0,4 µl cDNA                        | 05:00 min     | 72 °C |
| 0,1 µl Polymerase                  | 10:00 min     | 4 °C  |

45 Zyklen

**cDNA-Sequenz von RPGR<sup>Ex1-19</sup>, Isoform 7:**

```
ATGCCGCGCGGCAGCCGCTGGGGCAGCCAGGGCGTGGGCCAGCATCTGC
GCCTGAACCGCGTGGCGCCGGCGATTTTTCCGAAACAGGCGCAGATCCGT
TTGCGGGCTTTGGCATGGCGGAAAGCGAAAGCCTGGTGCCGATACCGGC
GCGGTGTTTACCTTTGGCAAACCAAATTTGCGGAAAACATTCCGAGCAAAT
TTTGGTTTAAAAACGATATTCCGATTTGCCTGAGCTGCGGCGATGAACATAC
CGCGATTGTGACCGGCAACAACAACTGTATATGTTTGGCAGCAACAACCTGG
GGCCAGCTGGGCCTGGGCAGCAAAGCGGCGATTATTAACCGACCTGCATT
AAAGCGCTGAAACCGGAAAAAGTAAAAGTGGCGGCGTGCGGCCGCAACCAT
ACCCTGGTGAGCACCAGATACCGGCGGCGTGTATGCGGCGGGCGGCAACAA
CGAAGGCCAGCTGGGCCTGGGCGATACCGATGATCGCGATACCTTTTCATCA
GATTGTGTTTTTTACCCCGGCGGATACCATTAAACAGCTGAGCGCGGGGCGC
GAACACCAGCGCGGCGCTGACCGAAGATGGCAAACCTGTTTATGTGGGGCGA
TAACAGCGAAGGCCAGATTGGCCTGGAAGATAAAAGCAACGTGTGCATTCC
GCATGAAGTGACCGTGGGCAAACCGATTAGCTGGATTAGCTGCGGCTATTAT
CATAGCGCGTTTTGTGACCATGGATGGCGAACTGTATACCTTTGGCGAACCG
GAAAACGGCAAACCTGGGCCTGCCGAGCGAACTGCTGATGAACCATCGCAGC
CCGAGCGCGTGTGGGCATTCCGGAACGCGTGATTGAGGTGGCGTGCGG
CGGCGGCCATACCGTGGTGTGCTGACCGAAAAAGTGGTGTATGCGTTTGGCCT
GGGCCAGTTTGGCCAGCTGGGCCTGGGCACCTTTCTGTTTGAACCCAGCGA
ACCGAAAATTATTGAACGCATTAAGATCAGAAAATTTGCCATATTAGCTGCG
GCGAAAACCATACCGCGCTGATGACCGAACTGGGCCTGCTGTATACCTTTG
```

## Isoformen 1 – 6 mit Quellenangabe

| Isoform | Quelle  | Datum der letzten Überprüfung mit Uhrzeit |
|---------|---|---|
| 1       | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001171421?report=genbank&amp;log\$=protaln&amp;blast_rank=1&amp;RID=A7CV400F014">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001171421?report=genbank&amp;log\$=protaln&amp;blast_rank=1&amp;RID=A7CV400F014</a> | 16.8.18 21:02                             |
| 2       | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001171422.1">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001171422.1</a>   | 16.8.18 21:03                             |
| 3       | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_035415.1">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_035415.1</a>   | 16.8.18 21:03                             |
| 4       | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001171423.1">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001171423.1</a>   | 16.8.18 21:04                             |
| 5       | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001171424.1">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001171424.1</a>   | 16.8.18 21:04                             |
| 6       | <a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001171425.1">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_001171425.1</a>   | 16.8.18 21:05                             |



## Alignment der sieben RPGR-Isoformen

|                |       | Section 1   |     |     |     |     |                  |     |
|----------------|-------|---|-----|-----|-----|-----|------------------|-----|
|                |       | (1)   | 10  | 20  | 30  | 40  | 52               |     |
| rpgr isoform 2 | (1)   | MPRGSRWGSQGVGQHLRLNRRVAPAIFFPKQAQIPFFAGFGMAESES       |     |     |     |     | LPDITGAV         |     |
| rpgr isoform 6 | (1)   | MPRGRSRWGSQGVGQHLRLNRRVAPAIFFPKQAQIPFFAGFGMAESES      |     |     |     |     | LPDITGAV         |     |
| rpgr isoform 7 | (1)   | MPRGRSRWGSQGVGQHLRLNRRVAPAIFFPKQAQIPFFAGFGMAESES      |     |     |     |     | LPDITGAV         |     |
| rpgr isoform 5 | (1)   | MPRGRSRWGSQGVGQHLRLNRRVAPAIFFPKQAQIPFFAGFGMAESES      |     |     |     |     | LPDITGAV         |     |
| rpgr isoform 1 | (1)   | MPRGRSRWGSQGVGQHLRLNRRVAPAIFFPKQAQIPFFAGFGMAESES      |     |     |     |     | LPDITGAV         |     |
| rpgr isoform 3 | (1)   | MPRGRSRWGSQGVGQHLRLNRRVAPAIFFPKQAQIPFFAGFGMAESES      |     |     |     |     | LPDITGAV         |     |
| rpgr isoform 4 | (1)   | -----   |     |     |     |     |                  |     |
| Consensus      | (1)   | MPRGRSRWGSQGVGQHLRLNRRVAPAIFFPKQAQIPFFAGFGMAESES      |     |     |     |     | LPDITGAV         |     |
|                |       | Section 2   |     |     |     |     |                  |     |
|                |       | (53)  | 60  | 70  | 80  | 90  | 104              |     |
| rpgr isoform 2 | (53)  | FTFGKTKFAENIPSKFWMFKNDIPICLSCGDEHTAIVTGNKKLY          |     |     |     |     | MFGSNNWGG        |     |
| rpgr isoform 6 | (53)  | FTFGKTKFAENIPSKFWMFKNDIPICLSCGDEHTAIVTGNKKLY          |     |     |     |     | MFGSNNWGG        |     |
| rpgr isoform 7 | (53)  | FTFGKTKFAENIPSKFWMFKNDIPICLSCGDEHTAIVTGNKKLY          |     |     |     |     | MFGSNNWGG        |     |
| rpgr isoform 5 | (53)  | FTFGKTKFAENIPSKFWMFKNDIPICLSCGDEHTAIVTGNKKLY          |     |     |     |     | MFGSNNWGG        |     |
| rpgr isoform 1 | (53)  | FTFGKTKFAENIPSKFWMFKNDIPICLSCGDEHTAIVTGNKKLY          |     |     |     |     | MFGSNNWGG        |     |
| rpgr isoform 3 | (53)  | FTFGKTKFAENIPSKFWMFKNDIPICLSCGDEHTAIVTGNKKLY          |     |     |     |     | MFGSNNWGG        |     |
| rpgr isoform 4 | (1)   | -----   |     |     |     |     | MFGSNNWGG        |     |
| Consensus      | (53)  | FTFGKTKFAENIPSKFWMFKNDIPICLSCGDEHTAIVTGNKKLY          |     |     |     |     | MFGSNNWGG        |     |
|                |       | Section 3   |     |     |     |     |                  |     |
|                |       | (105)   | 105 | 110 | 120 | 130 | 140              | 156 |
| rpgr isoform 2 | (105) | LGLGSKAAIIKPTCIKALKPEKVKLAACGRNHTLVSTDTGGVYAAAGGNNEGG |     |     |     |     |                  |     |
| rpgr isoform 6 | (105) | LGLGSKAAIIKPTCIKALKPEKVKLAACGRNHTLVSTDTGGVYAAAGGNNEGG |     |     |     |     |                  |     |
| rpgr isoform 7 | (105) | LGLGSKAAIIKPTCIKALKPEKVKLAACGRNHTLVSTDTGGVYAAAGGNNEGG |     |     |     |     |                  |     |
| rpgr isoform 5 | (105) | LGLGSKAAIIKPTCIKALKPEKVKLAACGRNHTLVSTDTGGVYAAAGGNNEGG |     |     |     |     |                  |     |
| rpgr isoform 1 | (105) | LGLGSKAAIIKPTCIKALKPEKVKLAACGRNHTLVSTDTGGVYAAAGGNNEGG |     |     |     |     |                  |     |
| rpgr isoform 3 | (105) | LGLGSKAAIIKPTCIKALKPEKVKLAACGRNHTLVSTDTGGVYAAAGGNNEGG |     |     |     |     |                  |     |
| rpgr isoform 4 | (10)  | LGLGSKAAIIKPTCIKALKPEKVKLAACGRNHTLVSTDTGGVYAAAGGNNEGG |     |     |     |     |                  |     |
| Consensus      | (105) | LGLGSKAAIIKPTCIKALKPEKVKLAACGRNHTLVSTDTGGVYAAAGGNNEGG |     |     |     |     |                  |     |
|                |       | Section 4   |     |     |     |     |                  |     |
|                |       | (157)   | 157 | 170 | 180 | 190 | 208              |     |
| rpgr isoform 2 | (157) | LGLGDTDDRDTFHQIVFFTPADTIKQLSAGANTSAAALTE              |     |     |     |     | DGKLFMMWGDNSEG   |     |
| rpgr isoform 6 | (157) | LGLGDTDDRDTFHQIVFFTPADTIKQLSAGANTSAAALTE              |     |     |     |     | DGKLFMMWGDNSEG   |     |
| rpgr isoform 7 | (157) | LGLGDTDDRDTFHQIVFFTPADTIKQLSAGANTSAAALTE              |     |     |     |     | DGKLFMMWGDNSEG   |     |
| rpgr isoform 5 | (157) | LGLGDTDDRDTFHQIVFFTPADTIKQLSAGANTSAAALTE              |     |     |     |     | DGKLFMMWGDNSEG   |     |
| rpgr isoform 1 | (157) | LGLGDTDDRDTFHQIVFFTPADTIKQLSAGANTSAAALTE              |     |     |     |     | DGKLFMMWGDNSEG   |     |
| rpgr isoform 3 | (157) | LGLGDTDDRDTFHQIVFFTPADTIKQLSAGANTSAAALTE              |     |     |     |     | DGKLFMMWGDNSEG   |     |
| rpgr isoform 4 | (62)  | LGLGDTDDRDTFHQIVFFTPADTIKQLSAGANTSAAALTE              |     |     |     |     | DGKLFMMWGDNSEG   |     |
| Consensus      | (157) | LGLGDTDDRDTFHQIVFFTPADTIKQLSAGANTSAAALTE              |     |     |     |     | DGKLFMMWGDNSEG   |     |
|                |       | Section 5   |     |     |     |     |                  |     |
|                |       | (209)   | 209 | 220 | 230 | 240 | 250              | 260 |
| rpgr isoform 2 | (209) | QIGLEDKSNVICPHEVTGKPISWISCGYYHSAPVT                   |     |     |     |     | MDGELYTFGEPENGLK |     |
| rpgr isoform 6 | (209) | QIGLEDKSNVICPHEVTGKPISWISCGYYHSAPVTSKMS               |     |     |     |     | DSFPSYYC--       |     |
| rpgr isoform 7 | (209) | QIGLEDKSNVICPHEVTGKPISWISCGYYHSAPVT                   |     |     |     |     | MDGELYTFGEPENGLK |     |
| rpgr isoform 5 | (209) | QIGLEDKSNVICPHEVTGKPISWISCGYYHSAPVT                   |     |     |     |     | MDGELYTFGEPENGLK |     |
| rpgr isoform 1 | (209) | QIGLEDKSNVICPHEVTGKPISWISCGYYHSAPVT                   |     |     |     |     | MDGELYTFGEPENGLK |     |
| rpgr isoform 3 | (209) | QIGLEDKSNVICPHEVTGKPISWISCGYYHSAPVT                   |     |     |     |     | MDGELYTFGEPENGLK |     |
| rpgr isoform 4 | (114) | QIGLEDKSNVICPHEVTGKPISWISCGYYHSAPVT                   |     |     |     |     | MDGELYTFGEPENGLK |     |
| Consensus      | (209) | QIGLEDKSNVICPHEVTGKPISWISCGYYHSAPVT                   |     |     |     |     | MDGELYTFGEPENGLK |     |

|                |       | Section 8  |     |     |     |     |     |
|----------------|-------|--|-----|-----|-----|-----|-----|
|                |       | (261) 261  | 270 | 280 | 290 | 300 | 312 |
| rpgr isoform 2 | (261) | GLPNELLMNHRSPQRVLGIPERVIQVACGGGHTVVLTKEVVYAFGLGQFGQL   |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform6  | (259) | -----  |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform7  | (261) | GLPNELLMNHRSPQRVLGIPERVIQVACGGGHTVVLTKEVVYAFGLGQFGQL   |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform5  | (261) | GLPNELLMNHRSPQRVLGIPERVIQVACGGGHTVVLTKEVVYAFGLGQFGQL   |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform1  | (261) | GLPNELLMNHRSPQRVLGIPERVIQVACGGGHTVVLTKEVVYAFGLGQFGQL   |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform3  | (261) | GLPNELLMNHRSPQRVLGIPERVIQVACGGGHTVVLTKEVVYAFGLGQFGQL   |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform4  | (166) | GLPNELLMNHRSPQRVLGIPERVIQVACGGGHTVVLTKEVVYAFGLGQFGQL   |     |     |     |     |     |
| Consensus      | (261) | GLPNELLMNHRSPQRVLGIPERVIQVACGGGHTVVLTKEVVYAFGLGQFGQL   |     |     |     |     |     |
|                |       | Section 7  |     |     |     |     |     |
|                |       | (313) 313  | 320 | 330 | 340 | 350 | 364 |
| rpgr isoform 2 | (313) | GLGTFLEFETSEPKI IERIKDQKICHISCGENHTALMTELGLLYTFDGRHGK  |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform6  | (259) | -----  |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform7  | (313) | GLGTFLEFETSEPKI IERIKDQKICHISCGENHTALMTELGLLYTFDGRHGK  |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform5  | (313) | GLGTFLEFETSEPKI IERIKDQKICHISCGENHTALMTELGLLYTFDGRHGK  |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform1  | (313) | GLGTFLEFETSEPKI IERIKDQKICHISCGENHTALMTELGLLYTFDGRHGK  |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform3  | (313) | GLGTFLEFETSEPKI IERIKDQKICHISCGENHTALMTELGLLYTFDGRHGK  |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform4  | (218) | GLGTFLEFETSEPKI IERIKDQKICHISCGENHTALMTELGLLYTFDGRHGK  |     |     |     |     |     |
| Consensus      | (313) | GLGTFLEFETSEPKI IERIKDQKICHISCGENHTALMTELGLLYTFDGRHGK  |     |     |     |     |     |
|                |       | Section 8  |     |     |     |     |     |
|                |       | (365) 365  | 370 | 380 | 390 | 400 | 416 |
| rpgr isoform 2 | (365) | LGLGMENFTNQFFPTLCSNFLRFVAVQLIACGGCHMLVFATPRLGTIDEPKFE  |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform6  | (259) | -----  |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform7  | (365) | LGLGMENFTNQFFPTLCSNFLRFVAVQLIACGGCHMLVFATPRLGTIDEPKFE  |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform5  | (365) | LGLGMENFTNQFFPTLCSNFLRFVAVQLIACGGCHMLVFATPRLGTIDEPKFE  |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform1  | (365) | LGLGMENFTNQFFPTLCSNFLRFVAVQLIACGGCHMLVFATPRLGTIDEPKFE  |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform3  | (365) | LGLGMENFTNQFFPTLCSNFLRFVAVQLIACGGCHMLVFATPRLGTIDEPKFE  |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform4  | (270) | LGLGMENFTNQFFPTLCSNFLRFVAVQLIACGGCHMLVFATPRLGTIDEPKFE  |     |     |     |     |     |
| Consensus      | (365) | LGLGMENFTNQFFPTLCSNFLRFVAVQLIACGGCHMLVFATPRLGTIDEPKFE  |     |     |     |     |     |
|                |       | Section 9  |     |     |     |     |     |
|                |       | (417) 417  | 430 | 440 | 450 | 468 |     |
| rpgr isoform 2 | (417) | DYYEPIYISTGSFSINDLSPRSSLNRSLSARLRRRERERPPCSASMVGTLPPPL |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform6  | (259) | -----  |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform7  | (417) | DYYEPIYISTGSFSINDLSPRSSLNRSLSARLRRRERERPPCSASMVGTLPPPL |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform5  | (417) | DYYEPIYISTGSFSINDLSPRSSLNRSLSARLRRRERERPPCSASMVGTLPPPL |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform1  | (417) | DYYEPIYISTGSFSINDLSPRSSLNRSLSARLRRRERERPPCSASMVGTLPPPL |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform3  | (417) | DYYEPIYISTGSFSINDLSPRSSLNRSLSARLRRRERERPPCSASMVGTLPPPL |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform4  | (322) | DYYEPIYISTGSFSINDLSPRSSLNRSLSARLRRRERERPPCSASMVGTLPPPL |     |     |     |     |     |
| Consensus      | (417) | DYYEPIYISTGSFSINDLSPRSSLNRSLSARLRRRERERPPCSASMVGTLPPPL |     |     |     |     |     |
|                |       | Section 10   |     |     |     |     |     |
|                |       | (469) 469  | 480 | 490 | 500 | 510 | 520 |
| rpgr isoform 2 | (469) | EGTSASTSAYFYPSPPFHLVNNYPEKSPSESMEPLDSDYFEDKMNKDTET     |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform6  | (259) | -----  |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform7  | (469) | EGTSASTSAYFYPSPPFHLVNNYPEKSPSESMEPLDSDYFEDKMNKDTET     |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform5  | (469) | EGTSASTSAYFYPSPPFHLVNNYPEKSPSESMEPLDSDYFEDKMNKDTET     |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform1  | (469) | EGTSASTSAYFYPSPPFHLVNNYPEKSPSESMEPLDSDYFEDKMNKDTET     |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform3  | (469) | EGTSASTSAYFYPSPPFHLVNNYPEKSPSESMEPLDSDYFEDKMNKDTET     |     |     |     |     |     |
| rpgr isoform4  | (374) | EGTSASTSAYFYPSPPFHLVNNYPEKSPSESMEPLDSDYFEDKMNKDTET     |     |     |     |     |     |
| Consensus      | (469) | EGTSASTSAYFYPSPPFHLVNNYPEKSPSESMEPLDSDYFEDKMNKDTET     |     |     |     |     |     |

|                |       |   |     |     |     |     | Section 11 |
|----------------|-------|---|-----|-----|-----|-----|------------|
|                | (521) | 521   | 530 | 540 | 550 | 560 | 572        |
| rpgr isoform 2 | (521) | ENSSAVDSENFGETNDILNMTHMHTTSSNEKLLDFSPIQKQQ          |     |     |     |     | NQDTFEK--- |
| rpgr isoform6  | (259) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform7  | (521) | ENSSAVDSENFGETNDILNMTHMHTTSSNEKLLDFSPIQKQQ          |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform5  | (521) | ENSSAVDSENFGETNDILNMVIISWLLDMSYINFNYL               |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform1  | (521) | ENSSAVDSENFGETNDILNMTHMHTTSSNEKLLDFSPIQKQQ          |     |     |     |     | NQDTFEKVM  |
| rpgr isoform3  | (521) | ENSSAVDSENFGETNDILNMTHMHTTSSNEKLLDFSPIQKQQ          |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform4  | (426) | ENSSAVDSENFGETNDILNMTHMHTTSSNEKLLDFSPIQKQQ          |     |     |     |     | -----      |
| Consensus      | (521) | ENSSAVDSENFGETNDILNMTHMHTTSSNEKLLDFSPIQKQQ          |     |     |     |     | -----      |
|                |       |   |     |     |     |     | Section 12 |
|                | (573) | 573   | 580 | 590 | 600 | 610 | 624        |
| rpgr isoform 2 | (570) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform6  | (259) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform7  | (563) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform5  | (558) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform1  | (573) | STPCTENEDSYEYEENSKIKEVIVYKQYLAGIYMIRPAEILEAFSDDEVGN |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform3  | (563) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform4  | (468) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| Consensus      | (573) | -----   |     |     |     |     | -----      |
|                |       |   |     |     |     |     | Section 13 |
|                | (625) | 625   | 630 | 640 | 650 | 660 | 676        |
| rpgr isoform 2 | (570) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform6  | (259) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform7  | (563) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform5  | (558) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform1  | (625) | GLDQVEEPRVFTDGGKLGKQVKGESDEEIVSEKKTVEVMEVADVKKIRSEE |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform3  | (563) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform4  | (468) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| Consensus      | (625) | -----   |     |     |     |     | -----      |
|                |       |   |     |     |     |     | Section 14 |
|                | (677) | 677   | 690 | 700 | 710 | 728 |            |
| rpgr isoform 2 | (570) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform6  | (259) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform7  | (563) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform5  | (558) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform1  | (677) | NSKSDSLPDDLPDKTMNSESEDNKDIAEERRSQNMFDSETELVEEPPDSY  |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform3  | (563) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform4  | (468) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| Consensus      | (677) | -----   |     |     |     |     | -----      |
|                |       |   |     |     |     |     | Section 15 |
|                | (729) | 729   | 740 | 750 | 760 | 770 | 780        |
| rpgr isoform 2 | (570) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform6  | (259) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform7  | (563) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform5  | (558) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform1  | (729) | MECERHSEQDSAEELQPKLVEYSSEKDEKDEKDDDEVETENLWYDRNCTE  |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform3  | (563) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| rpgr isoform4  | (468) | -----   |     |     |     |     | -----      |
| Consensus      | (729) | -----   |     |     |     |     | -----      |



| Section 21           |        |       |             |                       |        |           |      |
|----------------------|--------|-------|-------------|-----------------------|--------|-----------|------|
|                      | (1041) | 1041  | 1050        | 1060                  | 1070   | 1080      | 1092 |
| rpgr isoform 2 (749) |        | VEYSS | EKKDEKDEKDD | DEVETENLWYDRNCTEQETEN | VFRATR | FFPKFDLKH |      |
| rpgr isoform6 (259)  |        | ----- | -----       | -----                 | -----  | -----     |      |
| rpgr isoform7 (617)  |        | ----- | -----       | -----                 | -----  | -----     |      |
| rpgr isoform5 (558)  |        | ----- | -----       | -----                 | -----  | -----     |      |
| rpgr isoform1 (1040) |        | ----- | -----       | -----                 | -----  | -----     |      |
| rpgr isoform3 (747)  |        | ----- | -----       | -----                 | -----  | -----     |      |
| rpgr isoform4 (652)  |        | ----- | -----       | -----                 | -----  | -----     |      |
| Consensus (1041)     |        | ----- | -----       | -----                 | -----  | -----     |      |

| Section 22           |        |       |           |               |       |               |         |
|----------------------|--------|-------|-----------|---------------|-------|---------------|---------|
|                      | (1093) | 1093  | 1100      | 1110          | 1120  | 1130          | 1144    |
| rpgr isoform 2 (801) |        | DHLSG | IPEEQEGPE | DSEGNVVVEQVVQ | QKENL | LEFEGDRKEAKAE | APSDVIT |
| rpgr isoform6 (259)  |        | ----- | -----     | -----         | ----- | -----         |         |
| rpgr isoform7 (617)  |        | ----- | -----     | -----         | ----- | -----         |         |
| rpgr isoform5 (558)  |        | ----- | -----     | -----         | ----- | -----         |         |
| rpgr isoform1 (1040) |        | ----- | -----     | -----         | ----- | -----         |         |
| rpgr isoform3 (747)  |        | ----- | -----     | -----         | ----- | -----         |         |
| rpgr isoform4 (652)  |        | ----- | -----     | -----         | ----- | -----         |         |
| Consensus (1093)     |        | ----- | -----     | -----         | ----- | -----         |         |

| Section 23           |        |       |        |            |            |             |            |
|----------------------|--------|-------|--------|------------|------------|-------------|------------|
|                      | (1145) | 1145  | 1150   | 1160       | 1170       | 1180        | 1196       |
| rpgr isoform 2 (853) |        | EKEAP | QLSETV | KFEEGEMDEE | ISILNVEDIV | EEERKEGEKEI | VEEGSIPETE |
| rpgr isoform6 (259)  |        | ----- | -----  | -----      | -----      | -----       |            |
| rpgr isoform7 (617)  |        | ----- | -----  | -----      | -----      | -----       |            |
| rpgr isoform5 (558)  |        | ----- | -----  | -----      | -----      | -----       |            |
| rpgr isoform1 (1040) |        | ----- | -----  | -----      | -----      | -----       |            |
| rpgr isoform3 (747)  |        | ----- | -----  | -----      | -----      | -----       |            |
| rpgr isoform4 (652)  |        | ----- | -----  | -----      | -----      | -----       |            |
| Consensus (1145)     |        | ----- | -----  | -----      | -----      | -----       |            |

| Section 24           |        |       |          |           |       |                    |          |
|----------------------|--------|-------|----------|-----------|-------|--------------------|----------|
|                      | (1197) | 1197  | 1210     | 1220      | 1230  | 1248               |          |
| rpgr isoform 2 (905) |        | GSETI | IDITDEKL | DEVLKEEDS | ASLLQ | RALREYNENPKGHMYDRV | KSSSSEIL |
| rpgr isoform6 (259)  |        | ----- | -----    | -----     | ----- | -----              |          |
| rpgr isoform7 (617)  |        | ----- | -----    | -----     | ----- | -----              |          |
| rpgr isoform5 (558)  |        | ----- | -----    | -----     | ----- | -----              |          |
| rpgr isoform1 (1040) |        | ----- | -----    | -----     | ----- | -----              |          |
| rpgr isoform3 (747)  |        | ----- | -----    | -----     | ----- | -----              |          |
| rpgr isoform4 (652)  |        | ----- | -----    | -----     | ----- | -----              |          |
| Consensus (1197)     |        | ----- | -----    | -----     | ----- | -----              |          |

| Section 25           |        |       |             |
|----------------------|--------|-------|-------------|
|                      | (1249) | 1249  | 1264        |
| rpgr isoform 2 (957) |        | GGNDP | TSKDIKKAKKS |
| rpgr isoform6 (259)  |        | ----- | -----       |
| rpgr isoform7 (617)  |        | ----- | -----       |
| rpgr isoform5 (558)  |        | ----- | -----       |
| rpgr isoform1 (1040) |        | ----- | -----       |
| rpgr isoform3 (747)  |        | ----- | -----       |
| rpgr isoform4 (652)  |        | ----- | -----       |
| Consensus (1249)     |        | ----- | -----       |

Erstellt mit der *free trial license* Vector NTI Advance® 11.5 am 16.08.18 um 22:46h. Die Proteinsequenzen von Isoform 1 – 6 wurden mittels NCBI ermittelt, Isoform 7 ist unter 3.2 aufgeführt.

# 12 Ehrenwörtliche Erklärung

## Erklärung zur Dissertation

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

Gießen, den 11.04.2019

---

Ort, Datum



---

Unterschrift

## 13 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mich so tatkräftig bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger bedanke ich mich für die Bereitstellung dieses interessanten Themas sowie die sehr gute Betreuung, die lehrreichen Diskussionen und Impulse, die stets unterstützenden Worte und das offene Ohr. Besonders haben mir seine Ratschläge und die Korrekturarbeiten meiner Arbeit geholfen.

Bei Frau Univ.-Prof. Dr. Birgit Lorenz bedanke ich mich für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit in der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Labors für molekulare Ophthalmologie der Augenklinik, in dem stets ein gutes Arbeitsklima herrschte. Die Zusammenarbeit und enorme Hilfsbereitschaft waren beeindruckend.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Jutta Schlegel für die Unterstützung und große Hilfe in der Anfangs- und Einarbeitungsphase. Frau Annabella Janise und Tobias Wimmer möchte ich ebenfalls meine große Dankbarkeit aussprechen. Ihr hattet immer ein offenes Ohr, gute Tipps und habt mir stets sehr geholfen!

Schlussendlich möchte ich meinen Eltern für die beständige Hilfe, die Korrekturen sowie Anregungen zu dieser Arbeit und die Möglichkeit, diese Ausbildung zu erhalten, einen großen Dank aussprechen.

Meinen Geschwistern Eva, Johannes und Benjamin sowie auch ganz besonders meiner Freundin Lisa Engstfeld danke ich für die stetige Motivation, den Zuspruch und die enorme Unterstützung in allen Lebenslagen.

Zu guter Letzt gebührt Paul Heymann für die Korrekturarbeiten, die beeindruckende Geduld sowie die fortwährende Motivation und Hilfe auf der Zielgeraden ein großer Dank!

## 14 Lebenslauf

*Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen entfernt.*





*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6779-3



9 783835 1967793