

**Entwicklung einer Behandlungsstrategie für ein
Maus-Modell der X-chromosomalen Retinitis
Pigmentosa**

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

Des Fachbereichs Biologie und Chemie

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Jacqueline Hoffmann, geb. Gall

Gießen, 2018

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Experimentelle Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Fachbereichs 11 (Medizin) der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von September 2014 bis November 2018 unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Knut Stieger durchgeführt.

Erstgutachter: **Prof. Dr. Reinhard Dammann**

Institut für Genetik, FB08

Justus-Liebig-Universität Gießen

Heinrich-Buff-Ring 58-62, 35392 Gießen

Zweitgutachter: **Prof. Dr. Dr. Knut Stieger**

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde (FB11)

Justus-Liebig-Universität Gießen

Friedrichstr. 18, 35392 Gießen

Erklärung:

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. 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.

Jacqueline Hoffmann,

Gießen, den 22.11.2018

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Dammann für die Betreuung meiner Arbeit als mein Doktorvater, die hilfreichen Anregungen zu dieser Arbeit und die wissenschaftliche Unterstützung.

Für die direkte Betreuung möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger bedanken. Außerdem danke ich Ihm für die Bereitstellung meines Themas, die stetige wissenschaftliche Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen.

Frau Prof. Dr. Birgit Lorenz danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die hilfreichen Diskussionen und Anregungen während meiner Zeit in der Augenklinik.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn PD Dr. Markus Preising für das Interesse an meiner Arbeit und die hilfreichen wissenschaftlichen Tipps.

Frau Dr. Brigitte Müller, Frau Dr. Claudia Lopez und Herrn Dr. Mert Yanik danke ich sehr für die Unterstützung, die Anregungen zu meiner Doktorarbeit und die Diskussionen während der gesamten Zeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. Nelli Baal, Frau Gabriela Michel und Herrn Yuri Chukovetskyi für die Durchführung der Arbeiten am FACS.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Fei Song und Franziska Wagner, ohne die die Zeit im Labor und unserem kleinen Büro nicht mal halb so schön gewesen wäre. Eure Unterstützung in jeglicher Hinsicht werde ich nie vergessen!

Annabella Janise danke ich sehr für die ständige kompetente Hilfe im Labor und die große Unterstützung während meiner Elternzeit. Ich danke dir, dass du immer ein offenes Ohr für mich hattest.

Ebenso möchte ich mich bei Tobias Wimmer für die gute Zeit im Labor und die vielen Hilfestellungen bedanken.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern des Labors für experimentelle Ophthalmologie für die schöne Atmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die ständige Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir mein Studium ermöglicht hat, mich stets unterstützt und motiviert hat. Die liebevolle Betreuung unserer Tochter durch meine Mutter war mir am Ende meiner Promotion eine sehr große Hilfe.

Ein großer Dank gilt meinem Mann, der mich immer unterstützt und auf den ich mich stets verlassen kann. Danke, dass du dich durch meine wissenschaftlichen Arbeiten gekämpft hast.

Publikationen

- Yanik, M., Müller, B., Song, F., Gall, J., Wagner, F., Wende, W., Lorenz, B. and Stieger, K. (2017) 'In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies', *Progress in Retinal and Eye Research*, 56 (1-18).
- Schlegel, J., Hoffmann, J., Röhl, D., Müller, B., Günther, S., Zhang, W., Janise, A., Vössing, C., Fühler, B., Neidhardt, J., Khanna, H., Lorenz, B., Stieger, K. (2018) 'Toward genome editing in X-linked RP – development of a mouse model with specific treatment relevant features', *Translational Research*, online verfügbar.

Poster-Präsentationen

- Müller B., Song F., Gall J., Stieger K. (2015) 'Characterization of murine retinal explant cultures for XLRP treatment', EMBO (European Molecular Biology Organization) Workshop, Evry, Frankreich
- Gall J., Müller B., Yanik M., Janise A., Stieger K. (2015) 'Development of a treatment strategy for a mouse model of X-linked retinitis pigmentosa', GGL Conference on Life Sciences, Gießen
- Gall J., Janise A., Müller B., Stieger K. (2016) 'Development of a treatment strategy for a mouse model of X-linked retinitis pigmentosa', ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting, Seattle, USA
- Gall J., Janise A., Müller B., Stieger K. (2016) 'Development of a treatment strategy for a mouse model of X-linked retinitis pigmentosa', GGL Conference on Life Sciences, Gießen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis	XV
Abbildungsverzeichnis.....	XVI
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Auge.....	1
1.1.1 Aufbau der Retina.....	2
1.1.2 Funktion der Photorezeptoren	3
1.2 Retinitis Pigmentosa.....	5
1.2.1 RPGR: Aufgabe und Mutationen	6
1.2.2 <i>Rpgr</i> -Mausmodell.....	7
1.3 Gentherapie	8
1.3.1 RNA-Interferenz: siRNA.....	9
1.3.1 <i>Genome editing</i>	11
1.3.2 Hochspezifische Restriktionsendonukleasen.....	13
1.3.3 Homingendonukleasen: I-SceI	14
1.4 Gentransfer: AAV	15
1.5 <i>In vivo genome editing</i> in der Mausretina	17
1.6 Zielsetzung	17
2. Materialien & Methoden.....	19
2.1 Materialien	19
2.1.1 Enzyme und Marker	19
2.1.2 Puffer und Medien.....	21

2.1.3	Chemikalien.....	24
2.1.4	Kits.....	26
2.1.5	Bakterienstämme.....	27
2.1.6	Zellkulturen.....	27
2.1.7	Antibiotika.....	28
2.1.8	Mausstämme.....	28
2.1.9	Plasmide.....	29
2.1.10	Primer.....	30
2.1.11	Antikörper.....	34
2.1.12	Geräte.....	34
2.2	Mikrobiologische Methoden.....	36
2.2.1	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	36
2.2.2	Herstellung kompetenter Zellen für die Elektrotransformation.....	36
2.2.3	Elektrotransformation.....	37
2.2.4	Chemische Transformation.....	37
2.2.5	Glycerin-Kulturen.....	38
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	38
2.3.1	Agarosegelelektrophorese.....	38
2.3.2	Gel Extraktion.....	38
2.3.3	Isolierung von genomischer DNA, Plasmid-DNA und RNA.....	39
2.3.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	39
2.3.5	Sequenzierung.....	39
2.3.6	PCR.....	39
2.3.7	qPCR.....	41
2.3.8	Reverse Transkription.....	41

2.3.9	RNA-Qualitätskontrolle.....	42
2.3.10	DNA-Verdau durch Restriktionsenzyme.....	42
2.3.11	SURVEYOR-Assay.....	42
2.3.12	In-Fusion-Klonierung.....	44
2.3.13	TOPO™ Cloning.....	44
2.3.14	shRNA-Klonierung.....	44
2.4	Zellbiologische Methoden.....	44
2.4.1	Kultivieren und Passagieren von HEK293-Zellen.....	44
2.4.2	Transfektionen.....	45
2.4.3	Herstellung von AAVs.....	45
2.4.4	Dissoziation von Retinazellen der Maus.....	46
2.5	Biochemische Methoden.....	46
2.5.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bradford.....	46
2.5.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
2.5.3	Westernblot.....	48
2.5.4	FACS (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>).....	49
2.6	<i>In vivo</i> Methoden.....	49
2.6.1	Subretinale Injektion bei Mäusen.....	49
3.	Ergebnisse.....	51
3.1	Modelle und Antikörper-Generierung.....	51
3.1.1	Klonierung <i>Rpgr</i> -ORF15 ^{mut}	52
3.1.2	Generierung eines Zellkultur-Modells.....	53
3.1.3	Herstellung eines spezifischen RPGR-ORF15 ^{mut} Antikörper.....	54
3.2	Strategien der Gentherapie.....	56
3.3	RNA-Interferenz.....	57

3.3.1	Quantitative Analyse der <i>knockdown</i> Effizienz durch siRNA	57
3.3.2	Nachweis des <i>knockdowns</i> auf Proteinebene.....	62
3.4	<i>Genome editing</i>	63
3.4.1	Nachweis des <i>non-homologous end joining</i> in Zellkultur	65
3.4.2	Nachweis der homologen Rekombination in Zellkultur.....	67
3.4.3	Herstellung der Plasmide für die AAV-Produktion	68
3.4.4	<i>In vivo genome editing</i>	69
3.4.5	Vergleich der DNA-Reparatur <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	74
4.	Diskussion.....	75
4.1	Strategien der Gentherapie.....	75
4.1.1	RNA-Interferenz.....	76
4.1.2	<i>Genome editing</i>	80
4.2	Ausblick	86
5.	Zusammenfassung.....	88
6.	Summary	89
7.	Literaturverzeichnis	90
8.	Anhang.....	1

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
μ	mikro
μl	mikro Liter
°C	Grad Celsius
3'	drei Strich Ende
5'	fünf Strich Ende
A	Adenin
AAV	<i>adeno-associated virus</i>
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
BFP	<i>blue fluorescent protein</i>
BRCA2	<i>breast cancer type 2</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
C	Cytosin
Cap	Capsid-Gen
Cas	<i>CRISPR-associated</i>
CC	<i>Connecting Cilium</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>

ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	<i>DNA-dependent protein kinase</i>
DNA-PKcs	<i>DNA protein kinase catalytic subunit</i>
dNTP	Desoxyribonuklosidtriphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
dsDNA	doppelsträngige DNA
E	Glutaminsäure
eRNA	<i>enhancer RNA</i>
Ex	Exon
G	Glycin
GCL	<i>ganglion cell layer</i>
GEF	Guanin-Nukleotid Austausch-Faktor
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
gRNA	<i>guide RNA</i>
GTPase	Guanosintriphosphat hydrolysierendes Enzym
HDR	<i>homology directed repair</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HR	homologe Rekombination

IFT interflagellarer Transport
IgG Immunglobulin G
IgY Immunglobulin Y
Indel Insertion und Deletion
INL *inner nuclear layer*
IPL *inner plexiform layer*
IS *inner segment*
K Lysin
kb Kilobase
kDa kilo Dalton
LB Luria Broth
LCA *Leber's congenital amaurosis*
LV Lentivirus
mA milli Ampere
min Minute
miRNA Micro RNA
ml milli Liter
mM milli molar
mRNA messenger RNA
mut mutiert
Neo Neomycin
NHEJ *nonhomologous end-joining*

nm	Nanometer
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ONL	<i>outer nuclear layer</i>
OPL	<i>outer plexiform layer</i>
ORF15	<i>Open Reading Frame 15</i>
PAGE	Polyarcylamid Gelelektrophorese
PAR	<i>promoter associated RNA</i>
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	quantitative PCR
R	Arginin
rAAV	<i>recombinant adeno-associated virus</i>
rep	Replikationsgen
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RP	Retinitis Pigmentosa
RPE	Retinales Pigment Epithel
RPGR	Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator
rpm	<i>rounds per minute</i>
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat

shRNA *short hairpin RNA*

siRNA *small interfering RNA*

s.o. siehe oben

SOC *Super Optimal broth with catabolite repression*

SpCas9..... *Streptococcus pyogenes Cas9*

ssDNA *single-stranded DNA*

ssRNA *single-stranded RNA*

T Thymin

TALE *transcription activator-like effector*

TALEN *transcription activator-like effector nuclease*

TBE Tris-Bohrsäure-EDTA

TEMED Tetrathylethylendiamin

V Volt

Wt Wildtyp

XLRP *X-linked retinitis pigmentosa*

ZFN Zinkfinger Nuklease

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Enzyme	19
Tabelle 2: Verwendete Marker für Proteine und DNA.....	21
Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen	21
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien.....	24
Tabelle 5: Verwendete Kits	26
Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme	27
Tabelle 7: Verwendete Antibiotika für Bakterien- und Zellkulturen.....	28
Tabelle 8: Verwendete Plasmide	29
Tabelle 9: Verwendete Primer	30
Tabelle 10: Verwendete Antikörper für Westernblots.....	34
Tabelle 11: Verwendete Geräte	34
Tabelle 12: Zusammensetzung SDS-Gel.....	47
Tabelle 13: Sequenzen der verwendeten siRNAs.....	58
Tabelle 14: Transfektionseffizienz nach siRNA-Transfektion nach FACS-Analyse	60
Tabelle 15: Vergleich DNA-Reparatur <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des menschlichen Auges	1
Abbildung 2: Histologischer Schnitt einer Maus-Retina	2
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines menschlichen Stäbchens	5
Abbildung 4: RPGR Spleißvarianten ORF15 und Exon1-19	7
Abbildung 5: Schematische Darstellung des mutierten RPGR ^{ORF15} der B6J.Sv129-Rpgr ^{tm1stie} Maus.....	8
Abbildung 6: Dicer und RISC.....	10
Abbildung 7: Genome editing nach DSB.	12
Abbildung 8: Krystalstruktur der Homingendonuklease I-SceI	15
Abbildung 9: Transduktion einer Wirtszelle mittels Adeno-associated Virus (AAV) Vektor	16
Abbildung 10: Verwendete Strategie für die Entwicklung der Gentherapie	18
Abbildung 11: SURVEYOR-Assay.....	43
Abbildung 12: Überblick der verwendeten Modelle und der Antikörper-Generierung.	51
Abbildung 13: Klonierung des <i>Rpgr</i> -ORF15 ^{mut}	53
Abbildung 14: Schematische Darstellung des ORF15 ^{mut}	54
Abbildung 15: Aminosäuresequenz RPGR-ORF15 ^{mut}	55
Abbildung 16: Westernblot nach <i>Rpgr</i> -ORF15 ^{mut} Tranfektion von HEK293-Zellen	56
Abbildung 17: Bindestellen der verwendeten siRNAs	57

Abbildung 18: RNA-Interferenz.....	59
Abbildung 19: Sort report siRNA2.....	60
Abbildung 20: RNA-Isolation und qPCR.....	61
Abbildung 21: Ergebnisse der Transfektionen mit siRNAs.	62
Abbildung 22: <i>Genome editing</i> nach DSB.....	64
Abbildung 23: Genome editing.....	65
Abbildung 24: NHEJ <i>in vitro</i>	66
Abbildung 25: Sequenzanalyse nach NHEJ	67
Abbildung 26: Homologe Rekombination <i>in vitro</i>	68
Abbildung 27: Schematische Darstellung der verwendeten SSV9-Vektoren.....	69
Abbildung 28: Retina, der mit AAV2/8.RK-I-SceI-T2A-GFP transduzierten Augen.	70
Abbildung 29: Sortreport nach subretinaler injektion von AAV 2/5.CMV-I-SceI-T2A-GFP	71
Abbildung 30: SURVEYOR-Assay der injizierten Augen.....	72
Abbildung 31: Sequenzanalyse nach NHEJ <i>in vivo</i>	73
Abbildung 32: Sequenzanalyse nach HR.....	73

1. Einleitung

1.1 Das Auge

Das Auge der Wirbeltiere funktioniert nach dem Kameraprinzip. Der Weg des Lichts geht durch die Pupille, die eine kleine Öffnung in der Iris darstellt. Die Iris verändert den Durchmesser der Pupille wie eine Blende. Durch die Linse wird das Licht auf der Retina fokussiert. Die Photorezeptoren liegen auf der menschlichen Retina auf der lichtabgewandten Seite und wandeln das optische in ein elektrisches Signal um, das durch den Sehnerv an das Gehirn weitergeleitet wird.

Das Auge der Wirbeltiere wird von der Sklera als eine lederartige Schutzschicht umgeben. Darunter liegt die dünne Aderhaut (Chorioidea). Der vordere Bereich der Sklera bildet die Cornea, hinter der sich die Linse befindet (Abb. 1). Die Aderhaut stellt die vor der Linse sitzende Iris dar, die dem Auge ihre Farbe verleiht und den Lichtfluss durch die Pupille variieren kann (Campbell, Reece, Markl, 2006). Die innerste Zellschicht bildet die Netzhaut (Retina) mit ihren spezifischen Zelltypen, die in den folgenden Ausführungen eine bedeutsame Rolle spielen.

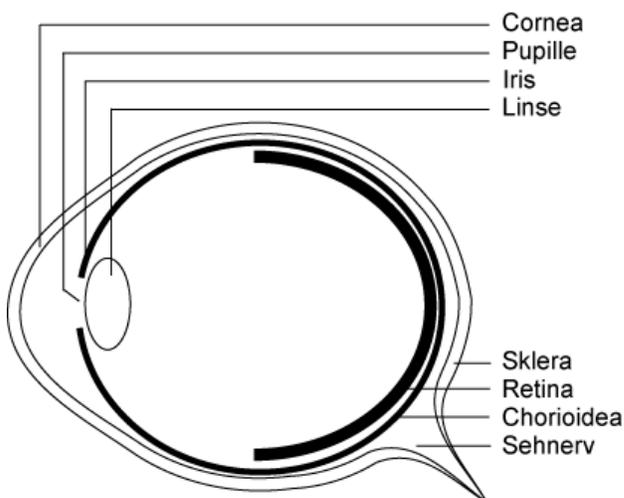


Abbildung 1: Schematische Darstellung des menschlichen Auges

Die Cornea (Hornhaut) schließt das Auge im vorderen Teil ab. Durch die Pupille, eine Öffnung innerhalb der Iris (Regenbogenhaut) fällt Licht in das Innere des Auges. Die Linse bündelt dieses Licht. Die Sklera (Lederhaut) dient dem Schutz des Auges. In der Retina (Netzhaut) werden optische Signale in Nervenimpulse umgewandelt, die durch den Sehnerv in das Zwischenhirn geleitet werden. Die Chorioidea (Aderhaut) sorgt für die Nährstoffversorgung der Retina.

1.1.1 Aufbau der Retina

Die für die Umwandlung optischer in elektrische Signale verantwortliche Retina besteht aus verschiedenen, hochspezialisierten Zellschichten (Slijkerman *et al.*, 2015), die in ihrer Funktion und ihrem Zusammenspiel einzigartig sind. Eine dieser Schichten ist die Photorezeptorschicht (Abb. 2: OS, IS, ONL), die aus zwei Zelltypen besteht: den Stäbchen und den Zapfen. Je nachdem ob es sich um das Auge eines nacht- oder tagaktiven Tieres handelt, ist entweder der Anteil der Stäbchen oder Zapfen erhöht. Nachtaktive Wirbeltiere besitzen viele Stäbchen, die sehr lichtsensitiv und zur Wahrnehmung eines einzelnen Photons in der Lage sind (Rieke, 2000), aber keine Farben unterscheiden können. Hierauf sind die Zapfen spezialisiert, die jedoch mehr Licht benötigen, um ihre Aufgabe – die Farbwahrnehmung – übernehmen zu können. Der tagaktive Mensch besitzt ca. 110 Millionen Stäbchen und 6.4 Millionen Zapfen, die nachtaktive Maus besitzt 6 Millionen Stäbchen und nur 200.000 Zapfen (Baehr, 2014).

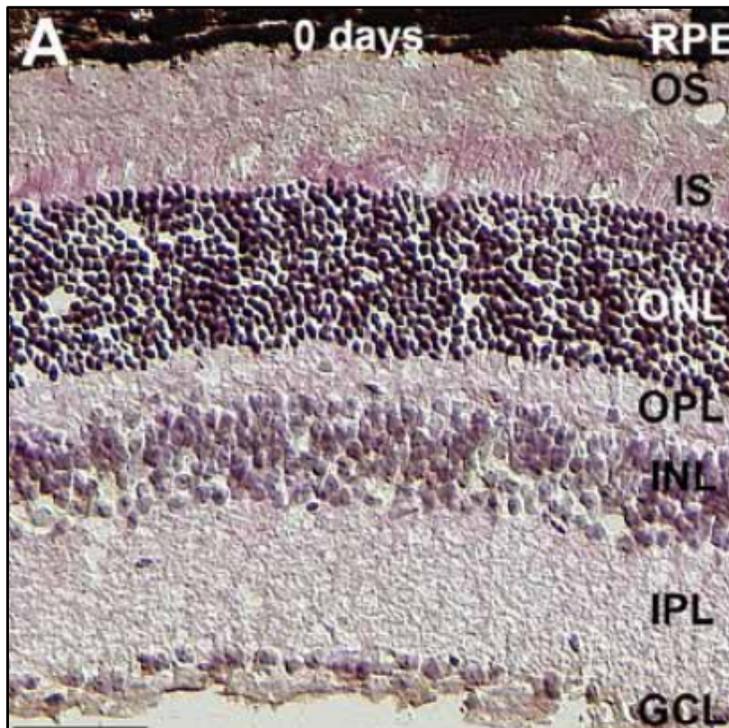


Abbildung 2: Histologischer Schnitt einer Maus-Retina

(Yanik *et al.*, 2017) Sie besteht aus der Photorezeptorschicht, die an das Retinale Pigmentepithel (RPE) grenzt. Die Retina unterteilt sich in die Außensegmente (OS), die Innensegmente (IS) und die äußere nukleäre Schicht (ONL). Darauf folgt die äußere plexiforme Schicht (OPL), die innere nukleäre Schicht (INL) und die innere plexiforme Schicht. Die letzte Schicht besteht aus den Ganglienzellen, sie bildet die Ganglienzellschicht (GCL) und liegt auf der dem Licht zugewandten Seite.

Die Photorezeptorschicht unterteilt sich ihrerseits in mehrere Schichten. Die Außensegmente (OS) der Photorezeptoren bilden die dem Retinalen Pigmentepithel (RPE) zugewandte Schicht (Abb. 2) und beinhalten die Disks, in denen sich das Sehpigment befindet. Die Innensegmente (IS) beinhalten die Zellorganellen der Stäbchen und Zapfen. Die Signale der Photorezeptoren werden über die Bipolarzellen an die Ganglienzellen (GCL, Abb. 2) weitergeleitet, die im optischen Nerv zusammenlaufen. Die Amakrinzellen und die Horizontalzellen sind für die laterale Übertragung der Signale aus den Photorezeptoren verantwortlich. Die plexiformen Schichten sind die Verbindungsstellen zwischen den verschiedenen Zelltypen. Die äußere plexiforme Schicht (OPL) wird von den Dendriten der Horizontalzellen und Bipolarzellen sowie den Synapsen der Photorezeptoren gebildet. Die innere plexiforme Schicht (IPL) besteht aus den Dendriten und Axonen der Bipolarzellen sowie den Dendriten und Axonen der Amakrinzellen und Ganglienzellen (Wässle, 2004). Die Körnerschichten hingegen werden von den Zellkörpern der jeweiligen Zellen gebildet. Die äußere Körnerschicht (ONL) besteht aus den Zellkörpern der Photorezeptoren. Die innere Körnerschicht (INL) wird von den Bipolar-, Horizontal- und Amakrinzellen gebildet (Randlett, Norden, Harris, 2011). Des Weiteren enthält die Retina Müller-Glia-Zellen, die den Stoffwechsel innerhalb der Retina unterstützen (Hoon *et al.*, 2014).

1.1.2 Funktion der Photorezeptoren

Photorezeptoren sind hoch spezialisierte Neurone, die sich in der äußersten Schicht der Retina befinden (Brzezinski and Reh, 2015). Die Zellen bestehen aus einem Außensegment, das die Opsine beinhaltet, und dem durch das Connecting Cilium (CC) verbundenen Innensegment, das die Zellorganellen, das Axon und die synaptische Endigung beinhaltet (Swaroop, Kim, Forrest, 2010). Die zwei Zelltypen der Photorezeptoren sind nach ihrer Form benannt. So ist das Außensegment der Stäbchen lang und gleichförmig, das Außensegment der Zapfen hingegen dreieckig geformt. Die Zelltypen unterscheiden sich jedoch nicht nur in ihrer Form, sondern auch in ihrer Funktion für die Bildgebung. Wie bereits erwähnt sind die Zapfen für die Farbwahrnehmung verantwortlich. Sie werden aber erst bei stärkerem Licht angeregt. Die Stäbchen hingegen sind lichtsensitiver und somit für das Sehen bei Dämmerung und Dunkelheit verantwortlich. Primaten besitzen eine *Fovea Centralis*, die ausschließlich aus Zapfen besteht und bei Tageslicht den Punkt des schärfsten Sehens darstellt (Provis *et al.*, 2013). Die unterschiedlichen Funktionen der Photorezeptortypen kommen durch die verschiedenen Opsine in den Disks der Stäbchen zustande. In den Disks sind die Sehpigmente gelagert. Hier bindet das

lichtsensitive 11-cis-Retinal an ein Opsin, das sich mit dem Retinal zu Rhodopsin verbindet. Durch Licht wird das 11-cis-Retinal durch Photoisomerisierung zu all-trans-Retinal (Kiser *et al.*, 2012). Dieses trennt sich vom Opsin, was wiederum ein G-Protein aktiviert und dieses aktiviert eine Phosphodiesterase. An den Natriumkanälen der Stäbchen wird nun durch die Phosphodiesterase cGMP zu GMP hydrolysiert, worauf sich die Kanäle schließen. Die Zellmembran wird hyperpolarisiert, die Abgabe von Neurotransmittern in den Synaptischen Spalt zwischen Stäbchen und Bipolarzellen wird verringert (Campbell, Reece, Markl, 2006).

Im Gegensatz zu den Stäbchen besitzen Zapfen keine Discs, sondern Einstülpungen. Außerdem kommt in den Zapfen kein Rhodopsin vor. Bei Primaten gibt es drei Zapfentypen, die für die Wahrnehmung von Rot-, Grün- und Blautönen verantwortlich sind. Sie besitzen unterschiedliche Photopsine, die bei verschiedenen Wellenlängen angeregt werden (Hoon *et al.*, 2014). Damit viele Farbtöne wahrgenommen werden können, werden die unterschiedlichen Zapfen je nach Wellenlänge des Lichts gleichzeitig, aber in verschiedener Ausprägung aktiviert. Die Maus besitzt hingegen nur zwei Typen von Zapfen, jene die Opsine für Licht kurzer Wellenlänge exprimieren und jene, die Opsine für Licht einer mittleren Wellenlänge exprimieren (Nikonov *et al.*, 2006).

Die Außensegmente der Photorezeptoren, die die Discs beinhalten, sind durch das Connecting Cilium (CC) mit den Innensegmenten verbunden (Abb. 3), in denen die Proteinproduktion stattfindet. Die Photorezeptoren haben einen sehr hohen Proteinumsatz, da die Discs während des Sehvorgangs ständig erneuert werden (Yildiz, Khanna, 2012), es wird von etwa 80 neu produzierten Discs am Tag pro Stäbchen ausgegangen (Baehr, 2014). Das CC dient als einziger Transportkanal für die Proteine, die für die Lichtreaktion benötigt werden und ist daher essenziell. Das CC gehört zu den primären Cilien und besteht aus einem Basalkörper und einem aus neun Mikrotubuli bestehendem Axonem. Der Basalkörper befindet sich an der Basis des CC, nahe dem Innensegment. Die Mikrotubuli des Axonems reichen bis hin zu den äußersten Discs der Photorezeptoren (Falk *et al.*, 2015).

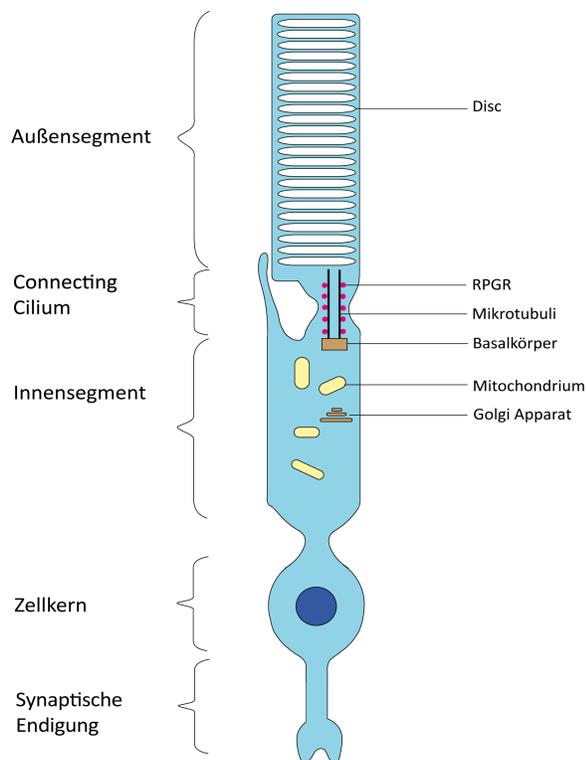


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines menschlichen Stäbchens

Dem RPE zugewandt befindet sich das Außensegment, welches die Discs beinhaltet. Das Connecting Cilium bildet die Verbindung zum Innensegment und beinhaltet vor allem Transportproteine. Im Innensegment befinden sich die Zellorganellen. Die synaptische Endigung sorgt für die Impulsweiterleitung an die Bipolarzellen.

1.2 Retinitis Pigmentosa

Retinitis Pigmentosa (RP) umfasst eine heterogene Gruppe von Netzhauterkrankungen. Hierbei kommt es durch die Degeneration der Photorezeptoren zu progressiver Erblindung. Charakteristisch für RP sind Nachtblindheit, Gesichtsfeldausfälle und eine schleichende Verschlechterung der Sehfähigkeit, bis hin zur Erblindung (Daiger, Sullivan, Bowne, 2013). Insgesamt sind derzeit über 50 Gene bekannt, deren Mutationen RP verursachen (Patnaik *et al.*, 2015a). Durch die heute als Standard geltenden molekulargenetischen Methoden können Dutzende Formen von RP unterschieden werden (Daiger, Sullivan, Bowne, 2013). Retinitis Pigmentosa ist somit ein klinischer Sammelbegriff für erblich bedingte Erkrankungen der Netzhaut mit ähnlicher symptomatischer Ausprägung hauptsächlich die Stäbchen betreffend. Die Bezeichnung lässt daher keine Aussage über die genaue Ursache der Krankheit zu. Die RP wird autosomal dominant, autosomal-rezessiv und X-chromosomal vererbt (Anasagasti *et al.*, 2012).

Die Tatsache, dass Retinitis Pigmentosa durch Mutationen in verschiedenen Genen hervorgerufen werden kann, macht sie zu einer sehr komplexen Krankheit. Es sind meist mehrere Mutationen in einem oder mehreren Genen für das Auftreten dieser Augenerkrankung verantwortlich. Bislang wurden sechs Gene beschrieben, die bei der X-chromosomal vererbten Variante von Retinitis Pigmentosa betroffen sein können (Daiger, Bowne, Sullivan, 2007). Eines dieser Gene ist das Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator Gen (*RPGR*). Es kodiert für einen Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor (GEF) für ein kleines GTP-Bindeprotein (Breuer *et al.*, 2002). *RPGR* besitzt einen *open reading frame* 15 (ORF15), der aufgrund seiner repetitiven Sequenz häufig von Mutationen betroffen ist. In diesem Bereich liegen 80 % aller Mutationen, die bisher im *RPGR*-Gen bekannt sind (Wright *et al.*, 2010) und zu Retinitis Pigmentosa führen können. Dieser *mutational hotspot* ist ein Angriffspunkt für die Gentherapie.

1.2.1 RPGR: Aufgabe und Mutationen

Die X-chromosomale Form der RP (XLRP) wird in 70-90 % der Fälle durch Mutationen im *RPGR*-Gen verursacht (Megaw, Soares, Wright, 2015). Das Gen befindet sich auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Meindl *et al.*, 1996). *RPGR*-Mutationen gehören mit 10 bis 20 % zu den häufigsten genetischen Ursachen der RP (Megaw, Soares, Wright, 2015).

RPGR spielt eine wichtige Rolle für das Überleben der Photorezeptoren. *Rpgr-knockout*-Mäuse zeigten eine Degeneration der Retina im Alter von 6 Monaten (Hong *et al.*, 2000). Das Protein ist im Connecting Cilium der Photorezeptoren lokalisiert (Patnaik *et al.*, 2015b). Es wird davon ausgegangen, dass es als wichtiges Ankerprotein in der Membran des CCs liegt und am intraflagellaren Transport (IFT) beteiligt ist (Hosch, Lorenz, Stieger, 2011). Hierbei ist es vermutlich für den Transport prenylierter Proteine durch den PDE6 δ /ARL3/RL3/RL2 Komplex unabdingbar (Baehr, 2014; Lee, Seo, 2015).

Das *RPGR*-Gen besitzt mehrere Spleißvarianten. Die beiden wichtigsten Formen sind *RPGR*^{ex1-19} und *RPGR*^{ORF15} (Abb. 4). Die ORF15-Variante konnte bisher nur in Photorezeptoren lokalisiert werden, die Ex1-19 Variante hingegen findet sich in vielen cilientragenden Zelltypen (Hong *et al.*, 2003). Der *open reading frame* 15 besitzt neben Exon 14 und 15 eine repetitive, intronische Gensequenz (Abb. 4). Durch das Überspringen des Spleißdonors für Exon 15 (Vervoort *et al.*,

2000) endet die ORF15 Variante in einer Sequenz aus Purin reichen *repeats*. Die Variante $RPGR^{ex1-19}$ besitzt diese Region nicht und ist daher weit weniger fehlerbehaftet. Am häufigsten treten Deletionen von wenigen Basenpaaren auf. Durch die Verschiebung des Leserasters kann es zu einer gravierenden Änderung des resultierenden Proteins kommen. Die normalerweise Glutamin- und Glycinreiche Proteinsequenz (sauer) wird zu einer eher basischen Sequenz verändert (Wright, Shu, 2006).

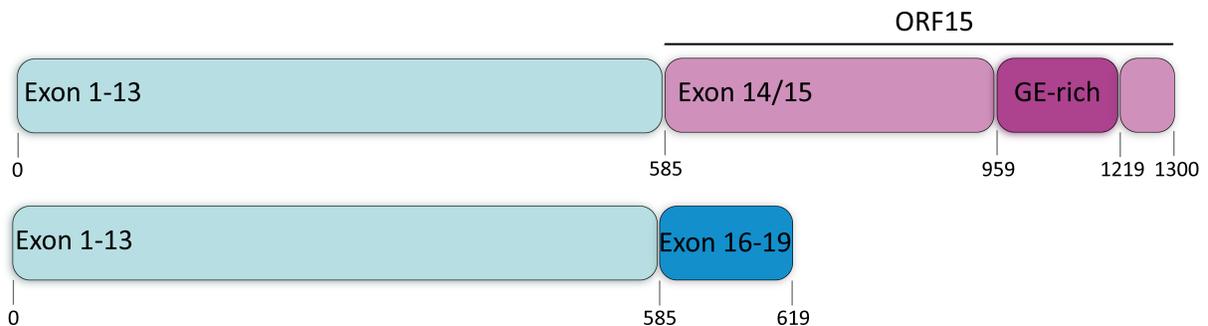


Abbildung 4: RPGR Spleißvarianten ORF15 und Exon1-19

Die Exone 1 bis 13 unterscheiden sich in beiden Spleißvarianten nicht. Die Exone 14 und 15 werden ausschließlich in der ORF15 Variante exprimiert und beinhalten eine Glutamin- und Glycinreiche (GE), repetitive Region. Die Exon1-19-Variante terminiert im Exon 19.

1.2.2 *Rpgr*-Mausmodell

Es existieren bereits mehrere Mausmodelle der XLRP, die *Rpgr*-Mutationen aufweisen (Tee *et al.*, 2016). Zwei dieser Modelle besitzen Deletionen in den vorderen Exons (Exon 4-6 bzw. Exon 1) (Hong *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2012). Außerdem wurde mit der *Rpgr*-null-Maus eine Mauslinie entwickelt, die keine der *Rpgr*-Isoformen produziert (Pawlyk *et al.*, 2015). Des Weiteren existiert mit der Mauslinie Rd9 (retinal degeneration 9) ein natürlich vorkommendes Mausmodell der XLRP (Thompson *et al.*, 2012). Dieses Modell besitzt im ORF15 eine 32 bp Duplikation, die einen *frameshift* verursacht und somit den *open reading frame* (ORF) verändert und zu einem verfrühten Stopcodon führt (Thompson *et al.*, 2012). Im Vorfeld zu dieser Arbeit wurde die transgene Mauslinie B6J.Sv129-Rpgr^{tm1stie} erstellt, die eine Punktmutation (Deletion) in der ORF15 Region des *Rpgr*-Gens besitzt. Diese Punktmutation führt zu ähnlichen Veränderungen des *open reading frames* wie bei einigen Patienten mit XLRP und spiegelt somit die Situation im Patienten wider. Durch die Deletion kommt es zum *frameshift*. Die Glutamin/Glycin (Abb. 4,

GE) -reiche Aminosäuresequenz im N-Terminus des Proteins wird zu einer Arginin/Lysin (Abb. 5, RK) -reichen Sequenz. Außerdem wurden stille Mutationen für die Vereinfachung des Screenings sowie eine Schnittstelle für die Homingendonuklease I-SceI integriert, um Behandlungsstrategien der Erkrankung RP mittels *genome editing* testen zu können. So können mit Hilfe des Mausmodells die verschiedenen zelleigenen Reparaturwege Non-homologous end joining (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR) *in vivo* getestet werden.

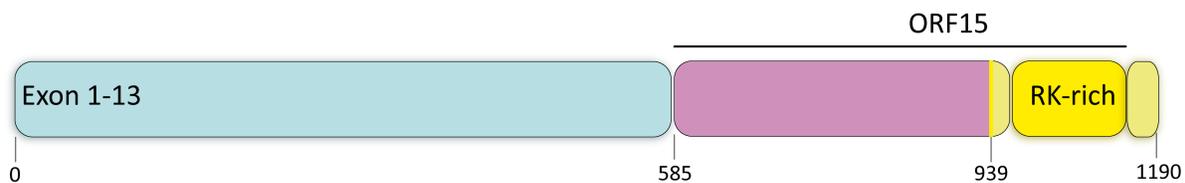


Abbildung 5: Schematische Darstellung des mutierten RPGR^{ORF15} der B6J.Sv129-Rpgr^{tm1stie} Maus
 In der wt-Variante befindet sich eine GE-reiche Region im ORF15. In der B6J.Sv129-Rpgr^{tm1stie} Maus liegt hier die Arginin- und Lysin-reiche (RK) Region des Proteins.

Die B6J.Sv129-Rpgr^{tm1stie} Maus zeigt eine langsame, aber progressive Degeneration der Retina, mit frühen Veränderungen der äußeren Retina.

1.3 Gentherapie

Die Gentherapie bezeichnet das Einbringen von Genen in Gewebe oder Zellen zum Zwecke eines therapeutischen Nutzens (*Entwicklung der Gentherapie Stellungnahme der DFG, 2007*). Genetische Defekte, die zu schweren Krankheitsbildern führen, stehen im Fokus der Gentherapie. Den Anfang machte das *gene replacement*, bei dem eine „gesunde“ Kopie des Zielgens die Funktion eines mutierten Gens übernehmen soll. Aufgrund der Komplexität genetischer Defekte wurde schnell erkannt, dass neue Strategien entwickelt werden mussten, um die unterschiedlichen Mutationen behandeln zu können. Beispielsweise sorgt das *gene silencing* für die Stilllegung eines Gens, das einen negativen Effekt auf den Zielorganismus hat. Durch die neueste Methode der Gentherapie, das *genome editing*, ist es möglich, das Genom direkt zu verändern.

Obwohl die erste klinische Studie zur Gentherapie bereits 1990 veröffentlicht wurde (Collins, Thrasher, 2015), sind bisher nur wenige solche Medikamente auf dem Markt erhältlich. Bei dem ersten gentherapeutischen Medikament handelt es sich um Glybera. Hierdurch wird eine Genaddition des LPL (Lipoprotein lipase)-Gens durchgeführt, welches in LPLD (Lipoprotein lipase deficiency)-Patienten funktionslos ist (Wang, Gao, 2014).

1.3.1 RNA-Interferenz: siRNA

Soll eine dominant negative Mutation behandelt werden, bei der ein fehlerhaftes Protein gebildet wird, welches einen unerwünschten Effekt auf die Zelle besitzt, kann die Genaddition alleine nicht ausreichen. Bei der Genaddition würde dieses fehlerhafte Protein zusätzlich zu dem neu eingebrachten und korrigierten Protein in der Zelle weiterhin produziert. Durch das *gene silencing* mittels RNA-Interferenz hingegen kann prinzipiell jedes Gen auf mRNA-Ebene ausgeschaltet werden, es entsteht kein Genprodukt (Fellmann, Lowe, 2014). Somit können Gene mit Mutationen, die einen *gain-of-toxicity-effekt* besitzen, ausgeschaltet werden (Wang, Gao, 2014). Die RNAi wurde in Pflanzen entdeckt (Jorgensen, 1990), 2001 konnte dann auch ihre Wirksamkeit in menschlichen Zellen nachgewiesen werden (Elbashir *et al.*, 2001).

Bei der RNA-i wird die mRNA des Zielgens durch das Anlagern kurzer, homologer RNA-Sequenzen (*short interfering* RNA, siRNA) von ca. 21 Nukleotiden abgebaut. Somit wird nicht direkt in die DNA Sequenz des Zielorganismus, sondern durch einen regulatorischen, post-transkriptionellen Weg in die Proteinbiosynthese eingegriffen (Deng *et al.*, 2014). MicroRNAs (miRNAs) sind kleine, nicht kodierende doppelsträngige RNAs (dsRNAs), die vom Genom transkribiert werden (Ozcan *et al.*, 2015). MiRNAs werden durch das Enzym Dicer in kürzere, nicht perfekt gepaarte miRNAs prozessiert (Fellmann, Lowe, 2014). Diese werden durch Argonaute 2 und den *RNA-induced silencing complex* (RISC) erkannt (Leuschner *et al.*, 2006). Durch den RISC wird ein Strang der miRNA degradiert. Der andere Strang rekrutiert die Ziel-mRNA, deren Translation geblockt wird (Ozcan *et al.*, 2015). Wichtig für die Erkennung homologer mRNAs ist die Seed-Region (Position 13 bis 18) der miRNA. Hier muss eine perfekte Homologie zur Ziel-mRNA vorliegen (Bartel, 2009; Ozcan *et al.*, 2015).

Die siRNA wird zunächst als längere dsRNA (shRNA, short hairpin RNA) mit *hairpin* in die Zelle eingebracht. Der Dicer prozessiert die shRNA zu der 21 Nukleotide langen siRNA (Meister, Tuschl, 2004) wie in Abbildung 6 dargestellt. Die siRNA bindet wie die natürlich vorkommende miRNA an Argonaut 2 und RISC, ein Strang wird degradiert. Der Komplex erkennt, bindet und spaltet die komplementäre mRNA (Klug, Cummings, Spencer, 2007). Die resultierenden, kurzen mRNA-Fragmente werden anschließend abgebaut. Die Proteinbiosynthese findet nicht statt.

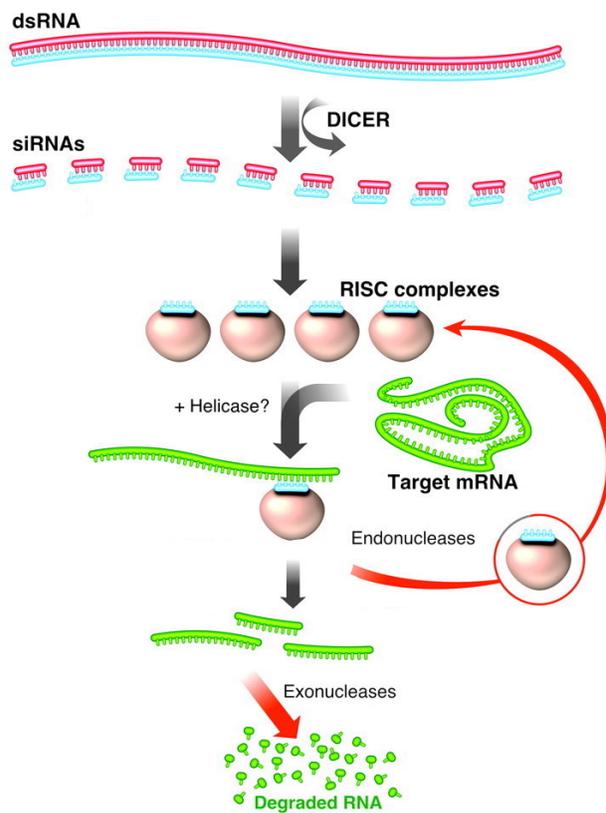


Abbildung 6: Dicer und RISC

DsRNA wird von dem Protein Dicer in siRNA prozessiert. Einzelsträngige siRNA wird von den RISC-Proteinen gebunden. Nach Aktivierung durch ATP erfolgt die Bindung an die komplementäre mRNA. Diese wird durch Endonucleasen abgebaut. (Verändert nach Dillin 2003).

SiRNAs gehören zur Familie der *non-coding* RNAs (ncRNAs) und haben eine regulierende Wirkung, zum Beispiel als *promoter associated* RNAs (PARs) oder Enhancer-RNAs (eRNAs) (Ozcan *et al.*, 2015).

Designet man eine siRNA um das Ziel-Gen stillzulegen, gibt es einige Faktoren zu beachten. Zum einen ist es wichtig, sich nicht auf eine siRNA zu verlassen, sondern mehrere zu testen. Möglicherweise stellt sich auch eine Kombination aus verschiedenen siRNAs als beste Lösung heraus, was gleichzeitig aufgrund der geringeren Konzentration der einzelnen siRNA den *off-target* Effekt minimiert (Birmingham *et al.*, 2007). Die siRNAs sollten zwischen 19 und 21 Nukleotide (nt) lang sein. Nach Möglichkeit sollte außerdem ein Guanin am 5' Ende der Sequenz liegen, um eine instabile Bindung hervorzurufen und die Expression durch die RNA Polymerase III zu ermöglichen (Fakhr, Zare, Teimoori-Toolabi, 2016). Am 3' Ende wird ein Adenin favorisiert, gefolgt von einem Uracil oder Guanin (Vermeulen *et al.*, 2005). Des Weiteren sollte der GC-Gehalt niedrig gewählt werden, zwischen 30 und 55 %, um abermals für eine nicht zu feste Doppelstrangbindung zu sorgen (Birmingham *et al.*, 2007). Es gilt außerdem sicherzustellen, dass die gewählten siRNAs keine anderen mRNA-Sequenzen erkennen. Dabei ist auch zu beachten, dass die Seed-Region der natürlich vorkommenden miRNAs ausgeschlossen wird.

Die Frage nach den Auswirkungen des Fehlens des *Targeting*-Proteins ist im Zusammenhang mit der RNAi-Methode unumgänglich. Denn durch diese Methode ist es lediglich möglich, das Gen stillzulegen, nicht jedoch zu ersetzen. Um ein funktionsfähiges Protein zu erhalten, müsste neben dem *Silencing* des Gens eine Addition des Wildtyp(wt)-Gens erfolgen. Hierbei muss beachtet werden, dass das neu eingebrachte, gesunde Gen nicht ebenfalls stillgelegt wird. Dies lässt sich durch Veränderung der Codons erreichen. Es gilt außerdem die fehlende Regulation des durch die Genaddition eingebrachten Gens durch die Zielzelle zu beachten. Im Bezug auf die XLRP ist die Forschung hier schon weit fortgeschritten. Es existiert bereits eine Mauslinie, die kein *Rpgr* produziert, um die Genaddition des *Rpgr* zu testen (Hong *et al.*, 2005). Sowohl das humane *RPGR*-ORF15 wt-Gen (Pawlyk *et al.*, 2015), als auch eine in der repetitiven Region verkürzte Variante des *Rpgr*-ORF15 (Hong *et al.*, 2005) konnten bereits erfolgreich getestet werden.

1.3.1 *Genome editing*

Beim *genome editing* werden nach Einfügen eines Doppelstrangbruchs (DSB) die zelleigenen Reparaturmechanismen *non-homologous end joining* (NHEJ) und homologe Rekombination (HR) ausgenutzt. Beim NHEJ entstehen oft kleine Insertionen oder Deletionen, wodurch Gene ausgeschaltet werden können (Schierling *et al.*, 2012). Die homologe Rekombination (HR) bzw.

homology directed repair (HDR), stellt den Reparaturweg dar, bei dem ein homologer *Template*-Strang zu dem zu reparierenden Strang benötigt wird, um einen Fehler in der DNA-Sequenz zu eliminieren. In der Gentherapie kann dieses Prinzip genutzt werden, um Gene zu verändern. Das einzubringende Gen muss hierbei an der richtigen Stelle in das Genom integriert werden. Dieses Phänomen ist äußerst selten (in etwa 10^{-6} Fällen), kann aber durch das Einfügen eines DSB erhöht werden, der die zelleigenen Reparaturmechanismen aktiviert (Pingoud, Silva, 2007). Im Allgemeinen tritt NHEJ in der Zelle häufiger auf als HR (Lieber, 2010; Cox, Platt, Zhang, 2015b). Ein DSB wird in der Zelle durch die Proteine ATM (Ataxia telangiectasia mutated) und ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein) erkannt, die das Histonprotein H2AX zu γ H2AX phosphorylieren (Yanik *et al.*, 2017). Hierdurch können MDC1, RNF8 und RNF168 rekrutiert werden (Yuan, Adamski, Chen, 2010; Brandsma, Gent, 2012). Im Anschluss wird mit der Bindung von RAP80 (receptor-associated protein 80) oder 53BP1 (p53 binding protein 1) entschieden, welcher Reparaturmechanismus stattfindet (Stewart *et al.*, 2009).

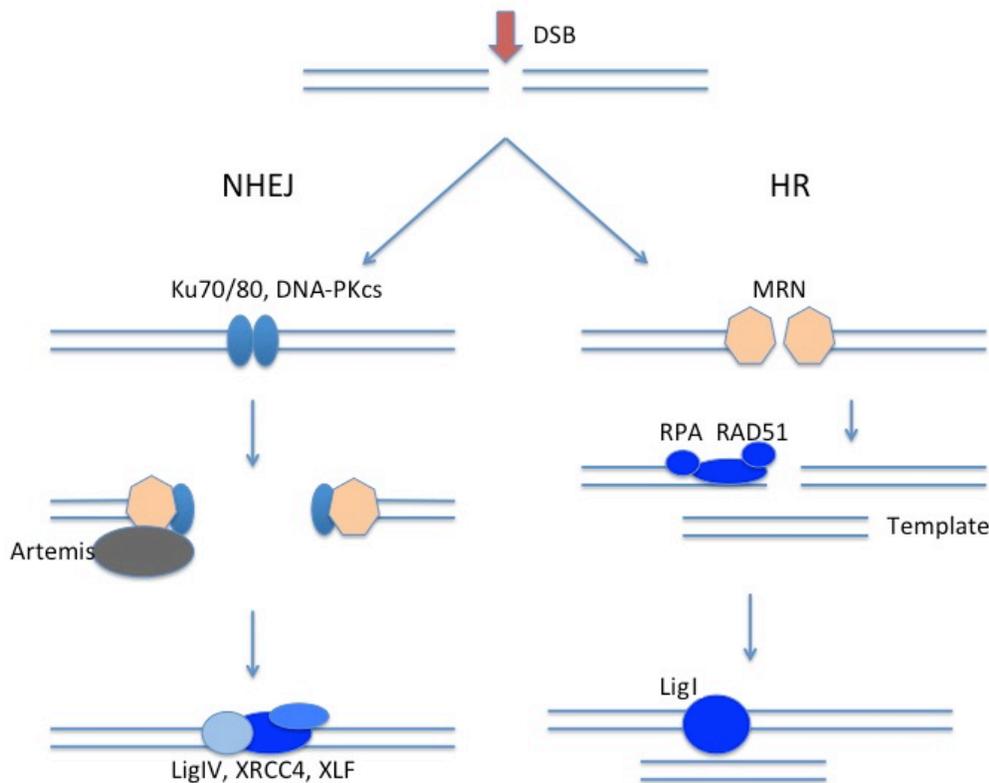


Abbildung 7: Genome editing nach DSB.

Homologe Rekombination (rechts) im Vergleich zu *non-homologous end joining* (links). NHEJ: DSB wird durch Komplex aus Ku70/80 und DNA-PKcs erkannt, Prozessierung der DNA-Enden mit Hilfe von Artemin, Ligation durch LigIV, XRCC4 und XLF. HR: MRN-Komplex leitet HR ein, RPA stabilisiert freie Enden, RAD51 sucht nach homologen Bereichen. Nach homologer Rekombination wird durch LigI religiert.

Die Reparatur des DSB durch NHEJ beginnt mit der Bindung eines Heterodimers, bestehend aus den Proteinen Ku70 und Ku80 (Abb. 7). Dieses Ku-Heterodimer ist in der Lage, Bindungen mit Nukleasen, Polymerasen und Ligasen einzugehen, wodurch das unterschiedliche Ergebnis der Reparatur erklärt werden kann (Lieber, 2008). In der Regel bildet Ku70/80 einen Komplex mit der DNA-PKcs (DNA *dependent protein kinase catalytic subunit*), die wiederum im Komplex mit der Nuklease Artemis in der Zelle vorliegt (Radhakrishnan, Jette, Lees-Miller, 2014). Durch die Autophosphorylierung der DNA-PKcs kommt es zur Konformationsänderung, wodurch Artemis Zugang zur DNA erlangt und die Enden prozessiert werden (Pannunzio *et al.*, 2014). Die am NHEJ beteiligten Polymerasen sind die Polymerasen μ und λ (Pannunzio *et al.*, 2014). Als letzter Schritt erfolgt die Ligation mit Hilfe eines Komplexes aus LigaseIV, XRCC4 und XLF (Lieber, 2010; Bhargava *et al.*, 2018)(Abb. 7).

Nach der Erkennung eines DSBs während der S- oder G2-Phase des Zellzyklus wird die HR durch den MRN Komplex (MRE11-RAD50-NSB1) eingeleitet (Yanik *et al.*, 2017) (Abb. 7). Im Anschluss erfolgt die Vorbereitung der freien DNA-Enden (*end resection*), bei der einzelsträngige 3'-Überhänge generiert werden, durch den MRN-Komplex in Kombination mit EXO1 (exonuclease 1), DNA2 (DNA replication helicase 2 homolog) und CtIP (CtBP-interacting Protein) (Symington, Gautier, 2011). Das Protein RPA (*replication protein A*) stabilisiert die einzelsträngigen DNA-Enden und wird durch RAD51 ersetzt (Abb. 7), welches in Zusammenarbeit mit dem Tumorsuppressor BRCA2 (*breast cancer 2*) nach homologen DNA-Bereichen sucht und dessen Anlagerung erzielt (Yan *et al.*, 2011). Hierdurch kommt es zu einer D-loop-Ausbildung der Ursprungs-DNA mit der Template-DNA, die in mehreren Möglichkeiten resultiert, beispielsweise der Bildung von Holiday Junctions. In einem letzten Schritt erfolgt die Ligation der DNA-Enden mittels LigI (DNA ligase I) (Yanik *et al.*, 2017) (Abb. 7).

1.3.2 Hochspezifische Restriktionsendonukleasen

Um Doppelstrangbrüche (DSB) in die DNA einzufügen, werden hochspezifische Restriktionsendonukleasen benötigt. Inzwischen gibt es viele Tools, die verwendet werden können, um DSB zu erzeugen. Diese bestehen aus einem spezifischen DNA-Bindemodul und

einer Nuklease (Gaj *et al.*, 2013). Zum einen ist es möglich, Restriktionsenzyme mit sogenannten *triple-helix forming oligonucleotides* (TFOs) zu verbinden. Diese sind programmierbar und formen eine Tripel-Helix mit der großen Furche doppelsträngiger DNA (Pingoud, Wende, 2011). Zum anderen besteht die Möglichkeit, DNA-Bindedomänen mit einer Typ IIS-Restriktionsendonuklease zu fusionieren, um deren Spezifität zu erhöhen (Pingoud, Wende, 2011). Außerdem kann eine Restriktionsendonuklease an ein DNA-Bindeprotein, das so genannte *transcription activator-like-effector*-Protein (TALE), fusioniert werden (Joung, Sander, 2013). Kurze Ribonukleinsäure-Sequenzen des CRISPR(*clustered regulatory interspaced short palindromic repeat*)/Cas9-Systems können ebenfalls verwendet werden, um DSB einzufügen (Mali, Esvelt, Church, 2013). Bei der letzten der hier vorgestellten Methoden werden die Endonukleasen der Homingendonukleasen (HE) genutzt. Diese Endonukleasen erkennen DNA-Sequenzen von ca. 20 Basenpaaren (Jacoby *et al.*, 2012). Da die Homingendonuklease I-SceI in dieser Arbeit verwendet wurde, wird diese detaillierter beschrieben.

1.3.3 Homingendonukleasen: I-SceI

Die HE I-SceI gehört zur Familie der LAGLIDADG-Proteine (LHE), die nach einer in ihnen vorkommenden Aminosäuresequenz benannt sind. Die LHE unterteilen sich in jene, die zwei LAGLIDADG-Motive besitzen (Homodimere) und diejenigen, die nur ein solches Motiv beinhalten (Monomere). I-SceI ist ein solches Monomer und besteht aus zwei asymmetrischen Domänen. Diese Asymmetrie erlaubt es dem Enzym, eine nicht palindromische DNA-Sequenz zu erkennen (Prieto *et al.*, 2016). I-SceI bildet eine Sattelform aus β -Faltblättern, die häufig bei DNA-Bindeproteinen vorkommt (Moure, Gimble, Quioco, 2008) (Abb. 8). Die HE gehören zu den *genome editing tools*. Sie sind sehr spezifisch, äußerst klein (ORF zw. 800 und 1000 bp) und nicht toxisch (Baxter *et al.*, 2012). I-SceI erkennt und spaltet eine Sequenz von 18 Nukleotiden, die im Genom der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)-Mitochondrien zu finden ist (Moure, Gimble, Quioco, 2008). Die HE sind auf eine spezifische Sequenz festgelegt. Fügt man die Sequenz in das Zielgenom ein, können diese Enzyme zur Untersuchung von DNA-Reparaturmechanismen verwendet werden. Die Endonuklease I-SceI kann die Rekombination durch das Einbringen eines DSBs um das 10000-fache erhöhen (Katz, Gimble, Storic, 2014). Die Spaltung der DNA durch HE resultiert in einem 3' Überhang, der Vorteilhaft für die homologe Rekombination ist (Maeder, Gersbach, 2016).



Abbildung 8: Krystalstruktur der Homingendonuklease I-SceI
I-SceI (grün, gelb, rot) gebunden an doppelsträngige DNA (lila).

1.4 Gentransfer: AAV

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, einen Gentransfer in die Retina durchzuführen. Der vielversprechendste Weg ist zur Zeit die Transduktion mittels AAV-Vektoren. Das AAV ist ein einzelsträngiges DNA Parvovirus, das verwendet werden kann, um Genscheren wie beispielsweise I-SceI oder aber auch shRNAs in die Zielzellen des Organismus' zu transferieren. Das Virus besteht aus einem 4.7 kB großem Genom mit zwei *inverted terminal repeats* (ITRs) (Colella, Ronzitti, Mingozzi, 2018). Zwischen den ITRs liegt das Capsid-Gen (Cap) und das Replikations-Gen (rep) (Yanik *et al.*, 2017). Um einen rekombinanten Vektor zu erhalten, wird der Bereich zwischen den ITRs durch die gewünschte Gensequenz ersetzt. AAVs sind in der Lage, postmitotisches Gewebe wie die Photorezeptoren zu transduzieren (Baba *et al.*, 2012). Nach der Transduktion durch Endozytose (Abb. 9) liegt das Virusgenom in der Zielzelle episomal vor. Es existieren verschiedene rekombinante AAV (rAAV)-Serotypen, die an unterschiedliche Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzelle binden und somit verschiedene Wirtszellen unterschiedlich gut transduzieren. Die Transduktion der Retina wird durch die Serotypen 2, 5, 8 und 9 erreicht (Yanik *et al.*, 2017). Ein großer Vorteil für die Verwendung der AAVs als Transportmittel für *genome editing tools*, die HR ermöglichen sollen, ist, dass sie die homologe Rekombination in Säugetierzellen anregen (Gaj, Epstein, Schaffer, 2015). Ein Nachteil hingegen ist die maximale Verpackungskapazität des AAV von 4.7 kB, was es unmöglich macht, große

Genscheren wie das *Streptococcus pyogenes* (Sp) Cas9 (4.2 kB) mit Promotorsequenz und der Sequenz zur spezifischen DNA-Erkennung (*guide* RNA) in einen Vektor zu verpacken. Wichtig für die sichere Verwendung als Transportmittel für Gensequenzen zu therapeutischen Zwecken ist außerdem, dass rAAVs keine Immunantwort auslösen, wenn sie subretinal injiziert werden (Yanik *et al.*, 2017).

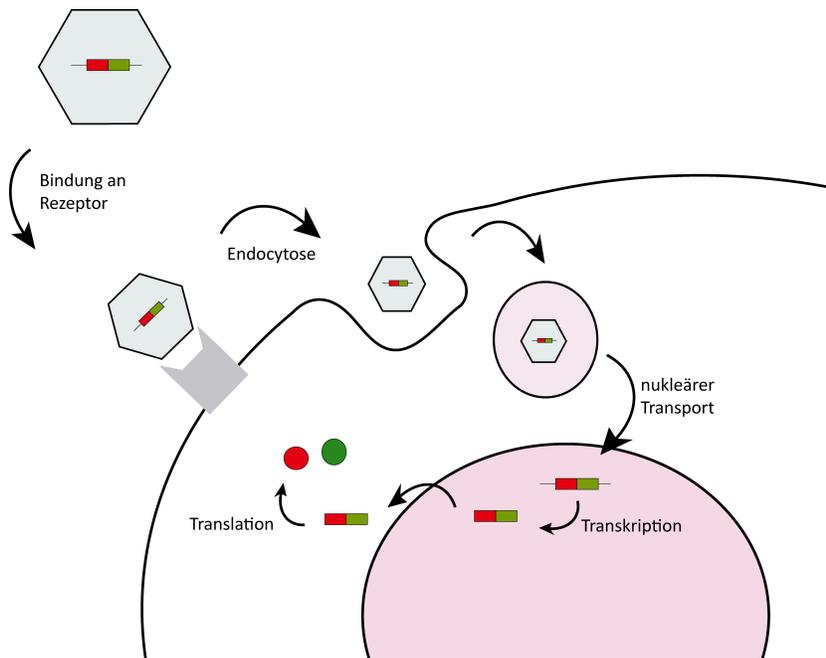


Abbildung 9: Transduktion einer Wirtszelle mittels Adeno-assoziiertem Virus (AAV) Vektor

Das Virus beinhaltet das *gene of interest* (rot, grün) und bindet durch Endozytose an die Wirtszelle. Nach der Aufnahme in den Zellkern erfolgt die Translation der Proteine (grüner und roter Punkt).

Neben den AAVs sind auch Lentiviren ein weit verbreitetes Vehikel für die Transduktion *in vivo*. Lentiviren sind Retroviren mit einem ssRNA (einzelsträngige RNA)-Genom, das sich in die DNA der Zielzelle integriert. Der Vorteil ist, dass Transgene für eine lange Zeit exprimiert werden, was für einige Zwecke, wie beispielsweise bei der Verwendung von siRNA, unabdingbar ist. Hierbei muss allerdings auch die Gefahr berücksichtigt werden, die das LV durch die zufällige Integration mit sich bringt. Im Gegensatz zu AAVs können LVs bis zu 8 kB DNA verpacken (Trapani, Puppò, Auricchio, 2014). Daher stellen sie eine gute Möglichkeit dar, große Transgene wie CRISPR/Cas9 oder TALEN zu verpacken.

1.5 *In vivo genome editing in der Mausretina*

Die Retina hat verschiedene Vorzüge, die bei einer Gentherapie hilfreich sind. Zum einen ist sie durch das Auge bezüglich des Immunsystems vom Rest des Organismus isoliert, zum anderen von außen sichtbar und für den Experimentator leicht zugänglich (Zaneveld *et al.*, 2013). Die subretinale Injektion stellt eine inzwischen gut erprobte Möglichkeit dar, die Retina zu transduzieren. Hierbei gibt es verschiedene Möglichkeiten, direkt in die innere Retina zu injizieren (Pang *et al.*, 2008). Die Wahl der Injektionsstelle ist dabei abhängig vom zu behandelnden Organismus und dem Entwicklungsstadium des Auges. So werden trans-sclerale subretinale Injektionen vor allem beim Menschen und großen Wirbeltieren vorgenommen (Jacobson *et al.*, 2012). An der Injektionsstelle bildet sich zwischen innerer Retina und subretinalem Spalt ein so genannter Bleb. Der Bleb beschreibt ein Abheben der Retina durch das Eindringen der injizierten Lösung. Die DNA-Reparaturmechanismen der Retina-Zellen sind verglichen zu HEK293-Zellen noch weitgehend unerforscht. Es wird vermutet, dass DSB in der Maus-Retina durch einen alternativen Weg der Reparatur gehen, da Untersuchungen die Abwesenheit des Proteins 53BP1 an DSB zeigen (Müller *et al.*, 2018). Dieses Protein spielt eine Rolle bei der Wahl des Reparaturwegs (NHEJ oder HR) nach einem DSB (Kap. 1.3.1).

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, Grundlagen für einen gentherapeutischen Ansatz zur Behandlung der XLRP zu generieren. Dazu wurde zwei verschiedenen Ansätzen der Gentherapie nachgegangen (Abb.10).

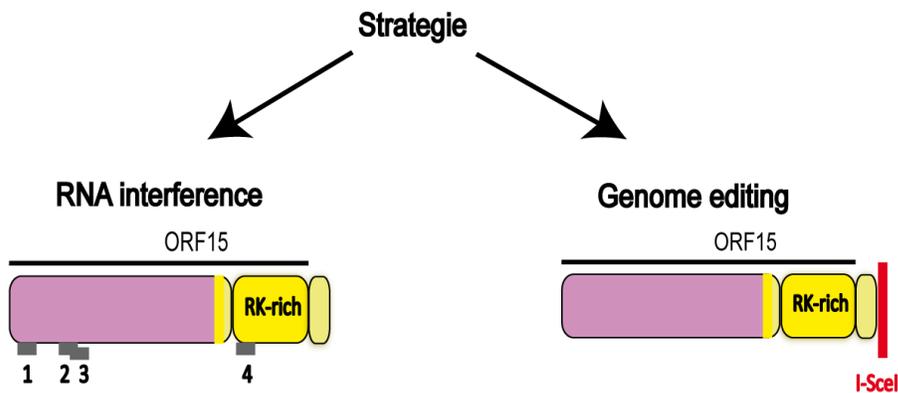


Abbildung 10: Verwendete Strategie für die Entwicklung der Gentherapie

Links: RNA-Interferenz mit vier verschiedenen siRNA-Bindestellen. Rechts: *Genome editing* im ORF15 mit I-SceI-Schnittstelle.

Eine der eingesetzten Methoden der Gentherapie ist die RNAi (Abb.10). Diese wurde genutzt, um das mutierte *Rpgr* mittels siRNAs stillzulegen. Die vier verwendeten siRNA-Sequenzen liegen im ORF15-Bereich des *Rpgr*-Gens, der als *mutational hotspot* gilt.

Des Weiteren wurde das *genome editing* mit Hilfe der Endonuklease I-SceI angewendet (Abb.10). Hierbei ging es um die Generierung von Grundlagen *in vitro* in HEK293 Zellen und *in vivo* im Mausmodell. Im Fokus stehen Beobachtungen zum NHEJ und zur HR hinsichtlich der Häufigkeit des Auftretens und der genauen Veränderung im Genom.

2. Materialien & Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Enzyme und Marker

Tabelle 1: Verwendete Enzyme

Enzym	Erkennungssequenz	Hersteller
ApaLI	5'...G↓TGCAC...3' 3'...CACGT↑G...5'	New England Biolabs (NEB)
BamHI	5'...G↓GATCC...3' 3'...CCTAG↑G...5'	New England Biolabs (NEB)
BbsI	5'...GAAGAC(N) ₂ ↓...3' 3'...CTTCTG(N) ₆ ↑...5'	New England Biolabs (NEB)
DpnI	5'...GAm↓TC...3' 3'...CT↑AmG...5'	New England Biolabs (NEB)
EcoRI	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTTAA↑G...5'	New England Biolabs (NEB)
HindIII	5'...A↓AGCTT...3' 3'...TTCGA↑A...5'	New England Biolabs (NEB)
I-SceI	5'...TAGGGATAA↓CAGGGTAAT...3' 3'...ATCCC↑TATTGTCCCATTA...5'	

NcoI	5'...C↓CATGG...3' 3'...GGTAC↑C...5'	New England Biolabs (NEB)
NdeI	5'...CA↓TATG...3' 3'...GTAT↑AC...5'	New England Biolabs (NEB)
NheI	5'...G↓CTAGC...3' 3'...CGATC↑G...5'	New England Biolabs (NEB)
PsiI	5'...TTA↓TAA...3' 3'...AAT↑ATT...5'	New England Biolabs (NEB)
XbaI	5'...T↓CTAGA...3' 3'...AGATC↑T...5'	New England Biolabs (NEB)
SmaI	5'...CCC↓GGG...3' 3'...GGG↑CCC...5'	New England Biolabs (NEB)
T7E1	Missmatches	New England Biolabs (NEB)
Phusion [®] High-Fidelity DNA Polymerase		New England Biolabs (NEB)
PrimeSTAR [®] HS DNA Polymerase		Takara
GoTaq [®] DNA Polymerase		Promega
T4 DNA Ligase		New England Biolabs (NEB)

Tabelle 2: Verwendete Marker für Proteine und DNA

Marker	Hersteller
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (10-260 kDa)	Fermentas
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	ThermoFisher Scientific
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	ThermoFisher Scientific

2.1.2 Puffer und Medien

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Blockierlösung Westernblot	5 % BSA, oder Milchpulver in 1xTBS	
CutSmart		New England Biolabs (NEB)
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)		PAN Biotec
DMEM+++	DMEM 2 % L-Glutamine 1 % Pen/Strep 10 % FKS	

HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)		PAN Biotec
Luria Broth Base (LB)	1 % Pepton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl, pH 7,5	Invitrogen
Phosphate-buffered saline (PBS) 10x	0.1 M Na ₂ HPO ₄ 0.018 M KH ₂ PO ₄ 1.37 M NaCl 0.027 M KCl	
Radioimmunoprecipitation assay (RIPA) Puffer	25 mM Tris 150 mM NaCl 0.1 % SDS 0.5 % Natriumdeoxycholat 1 % Triton X-100	
SDS Laufpuffer	250 mM Tris 1.92 mM Glycine 0.1 % SDS	
SOC Medium	0,5 % Hefeextrakt 2 % Trypton 10 mM Natriumchlorid 2.5 mM Kaliumchlorid	

		10 mM Magnesiumchlorid 10 mM Magnesiumsulfat 20 mM Glucose	
Sorting Buffer		1x PBS 4 mM EDTA 25 mM HEPES pH 7	
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) (10x)		1.5 M NaCl 30 mM KCl 250 mM Tris pH 7.4	
TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE) (10x)		890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA	
Waschpuffer Westernblot		1 x TBS 0.2 % Triton X100	

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Accutase	PAN
Aceton	Roth
Acrylamid	Serva
Agarose	Biozym
AGFA Entwicklerlösung	Röntgen-Bender
AGFA Fixierer (Röntgenfilme)	Heiland
BSA (Bovines Serumalbumin)	Roth
Coomassie Brilliant Blue	Thermo Fisher
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatrium Phosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
DNA Ladepuffer	Fermentas
DTT (Dithiothreitol)	Merck
ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth
FKS (Fötales Kälberserum)	PAN
GelRed	Genaxxon Biosciences
Glycerin	Merck
Glycin	Roth
HCl (Salzsäure)	Roth
HEPES (2-ethansulfonsäure)	Roth
Isopropanol	Roth
KCl (Kaliumchlorid)	Roth
NaCl (Natriumchlorid)	Merck
Methanol	Roth
PEI (Polyethylenimin)	Polysciences
SDS (Sodium dodecyl Sulfat)	Roth
Select Agar	Invitrogen
Tris	Roth
TritonX100	Roth
Tween20	Roth

2.1.4 Kits

Tabelle 5: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
TOPO TM -TA Cloning	ThermoFisher Scientific
Blunt-End TOPO TM Cloning	ThermoFisher Scientific
siRNA	Invivogen
In-Fusion [®] Cloning Kit	Clontech [®] Laboratories
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Nucleo-Bond [®] PC 2000 (Mega)	Macherey-Nagel
NucleoSpin [®] Plasmid	Macherey-Nagel
NucleoSpin [®] Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel
PureLink TM Genomic DNA Mini Kit	ThermoFisher Scientific
RNeasy Mini Kit	Qiagen
PrimeScript TM 1st strand cDNA Synthesis Kit	Clontech
Papain Dissociation System	Worthington

2.1.5 Bakterienstämme

Tabelle 6: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
Stellar™ Competent E. coli Cells	<i>F</i> ⁻ , <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>phoA</i> , $\Phi 80d$ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ (<i>lacZYA</i> - <i>argF</i>) <i>U169</i> , Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>), Δ <i>mcrA</i> , λ ⁻	Clontech
One Shot™ Top10 Competent E.coli Cells	<i>F</i> ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>), $\Phi 80d$ <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^r), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	ThermoFisher Scientific
XL1-Blue Competent E.coli Cells	<i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> (<i>nal</i> ^R), <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , <i>glnV44</i> , <i>F'</i> [:: <i>Tn10 proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ (<i>lacZ</i>) <i>M15</i>] <i>hsdR17</i> (<i>rK</i> ⁻ <i>mK</i> ⁺)	Stratagene

2.1.6 Zellkulturen

Für alle Versuche mit Zellkulturen wurden HEK293 (*human embryonic kidney 293*)-Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um humane, embryonale Nierenzellen. Dieser Zelltyp eignet sich hervorragend für Transfektionen mit Fremd-DNA. Die Zellen wachsen adhärent und sind daher sehr gut zu handhaben. Für einige Transfektionen wurden HEK293T-Zellen verwendet, die das SV40 large T-Antigen exprimieren. Das Antigen bindet SV40-Enhancer und sorgt dadurch für eine erhöhte Proteinproduktion.

2.1.7 Antibiotika

Tabelle 7: Verwendete Antibiotika für Bakterien- und Zellkulturen

Antibiotika	Hersteller
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Geneticin	Life Technologies
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	Biochrom
Zeocin	Invitrogen

2.1.8 Mausstämme

Für die *in vivo*-Versuche in dieser Arbeit wurden Mäuse der Linie B6J.Sv129-Rpgr^{tm1stie} verwendet. Sie wurden auf einen C57BL/6J-Hintergrund zurückgekreuzt. Die Mäuse werden im Tierstall des Biochemischen Instituts des Fachbereichs 11 der Justus-Liebig-Universität Gießen in IVC-Käfigen (*individually ventiated cages*) in Gruppen von maximal fünf adulten Tieren gehalten. Die Käfige werden mit 160 bis 180 lux für 12 Stunden am Tag beleuchtet. Die Raumtemperatur liegt bei 20°C, die Luftfeuchtigkeit beträgt 45 bis 64 %.

2.1.9 Plasmide

Tabelle 8: Verwendete Plasmide

Plasmid	Hersteller
pcDNA3.1 (+)	Invitrogen
pcDNA3.1(-)	Invitrogen
psiRNA-h7SKGFPzeo	Invivogen
pcDNA5/FRT	Invitrogen
pVAX	Thermo Fisher
pQE-Trisystem1	Qiagen
pT	Invitrogen
pET19b	Novagen
SSV9	
peGFP-N1	Clontech
pCR blunt II TOPO™	Invitrogen

2.1.10 Primer

Tabelle 9: Verwendete Primer

Nr.	Name	Sequenz (5' → 3')
3854	SSV9-BFP-f	aatcatcgatgaattcgccatgtaagcccactgcaagct
3853	SSV9-BFP-r	cacgatcggccgcgctcgagcatacttctccttctc
3852	Pt-BFP-f	agtgtgatggatatcccatagagcccaccgcatcccca
3851	Pt-BFP-r	agggcgaattctgcagttgacattgattattgactagtt
3847	Rk-ohne-CMV	caagggcgaattctgattattgactaaattcgctagcaa
3846	Rk-IF-r	ctctagttagccagacctctagaggatccccggggctga
3845	Rk-ohne-T&CMV	ggatccactagtaacattattgactaaattcgctagcaa
3844	Template-ohne-CMV	tgtcaactgcagaattcgcccttg
3843	RK-ohne-T&CMV-r	gttactagtggatccgagctcggt
3839	Rk-pT-f	ctggaattcgcccttactagtcgcaagctcagatctcg
3838	Rk-pT-r	ctctagttagccagatgtcagccccgggtcgacaagctt

3836	pT-kein-CMV-f	gccagtgctggaattgcctt
3835	pT-kein-CMV-r	tctggctaactagagaacccactg
3833	SSV9-AIO-f	cacgatcggccgctcgagcatacttctcttctc
3830	IF-SSV9-f	taatcatcgatgaattccatagagcccaccgcatccccag
3828	IF-Topo2-r	agtgtgatggatatccatagagcccaccgcatccccag
3827	IF-Topo2-f	agggcgaattctgcagttgacattgattattgactag
3809	All-in-one-r	cgctatctgtcaagatctgcagaattgcccttgctag
3808	All-in-one-f	gagcgcgcgtccgggagtgtgctggaattgcccttctc
3798	SSV9-HDR-f	gatcaagtgtgctggagtaacggccgccagtgctgga
3748	SSV9-HDR-r	gaggctgatcagcggtttaaactt
3758	IF-SSV9-T-r	aatcatcgatgaattgatacctgtccgcttctcctt
3757	IF-SSV9-T-f	agtcacgctattacagtaacggccgccagtgctgga
3747	HDR-Nachweis-f	gtggggaagatgatgaaggagagg
3588	HindIII-f	P-cttcagggtaatctaaaatgccaatgg
3587	HindIII-r	P-ctttatccctaggttagtaatgggct

3584	I-SceI-Template-f	ctcgagcatacttctccttt
3583	I-SceI-Template-r	gctagaaaagaagaaggag
3518	qPCR-r	gtctacctattacgcatcaggcat
3517	qPCR-f	gaaatatggcagacatggcacata
3297	siRNA4s-r	caaaaagtaagagcgaatagtgtactcttgatattacactattcgcctttacg
3296	siRNA4s-f	acctcgtaagagcgaatagtgtaatcaagagtattacactattcgcctttactt
3295	siRNA4-r	caaaaagattcagaaggaaatgtagtactcttgatactacatttccttctgaatcg
3294	siRNA4-f	acctcgattcagaaggaaatgtagtatcaagagtactacatttccttctgaatctt
3293	siRNA3s-r	caaaaagacttcacaaaggacgtaaactcttgatttacgtccctttgtgaagtcg
3292	siRNA3s-f	acctcgacttcacaaaggacgtaaactcaagagtttacgtccctttgtgaagtctt
3291	siRNA3-r	caaaaagtagaagaaccagacagttacctcttgagtaactgtctggttcttctacg
3290	siRNA3-f	acctcgtagaagaaccagacagttactcaagaggtactgtctggttcttctactt
3289	siRNA2s-r	caaaaaacaaggagaacggcagttatctcttgaataactgccgttctccttggtg
3288	siRNA2s-f	acctcaacaaggagaacggcagttattcaagagataactgccgttctccttgttt
3287	siRNA2-r	caaaaagtagaagaaccagacagttactcttgataactgtctggttcttctaccg

3286	siRNA2-f	acctcggtagaagaaccagacagttatcaagagtaactgtctggttctttacctt
3285	siRNA1s-r	caaaaaagagatatgaggcagatgtaactcttgattacatctgcctcatatctctg
3284	siRNA1s-f	acctcagagatatgaggcagatgtaatcaagagttacatctgcctcatatctctt
3283	siRNA1-r	caaaaagtgaaacagaattggtagaagctcttgacttctaccaattctgtttcag
3282	siRNA1-f	acctcgtgaaacagaattggtagaagtaagagcttctaccaattctgtttcactt
3249	SSV9-ISceI-r	aatcatcgatgaattccatagagcccaccgcatccccag
3248	SSV9-ISceI-f	atgcggccgcgctaggttgacattgattattgactag
3169	IF-ISceI-r	P-accggatccagttactttcaggaaagtttcggaggagat
3168	IF-ISceI-f	P-tcctcgagcgcaccatgatgggctacccttac
3167	Lin-TLR2-r	P-catggtggcgctcgaggatcgaat
3166	Lin-TLR2-f	P-gtaactggatccggtgagggcaga
3131	pQE-RPGR-r	P-gctcctctccttcacatcttccc
3130	pQE-RPGR-f	P-gatccgaattctcagatctcggcg
2999	TeilA-IF-r	cgagcatacttctcctttctca
2998	TeilA-IF-f	gacgacgacgacaagccaaga

2.1.11 Antikörper

Tabelle 10: Verwendete Antikörper für Westernblots

Antikörper	Erkennungssequenz	Hersteller
GAPDH		Cell Signaling
RPGR-ORF15mut	EELEQPKLVEYSSEEKD	Invitrogen
Alexa Fluor 488 Donkey anti-rabbit IgG	2. Antikörper	Thermo Fisher

2.1.12 Geräte

Tabelle 11: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav DX-65	Systemec GmbH
BD Aria II	BD
BioDocAnalyse	Biometra
BioPhotometer	Eppendorf
Blotter	BioRad

Eismaschine	Scotsman
Elektrophorese Powersupply	Biometra
Fluoreszenz Mikroskop	Keyence
Gelkammer Whatman	Biometra
Inkubator	Binder
Magnetrührer	IKA
Mikroskop	VWR
Multiporator	Eppendorf
PCR-Cycler T Professional Basic Gradient	Biometra
PH Meter	Mettler-Toledo GmbH
QiAxcel	Qiagen
Realplex Mastercycler	Eppendorf
Schüttler Vertomat H	Sartorius
Sterilbank	Invitrogen
Vortexer	VWR

Thermoblock	Biometra
Waage	Ohaus
Wasserbad TW12	Julabo
Zentrifuge AK15	Sigma
Zentrifuge 1-15 PK	Sigma
Zentrifuge Micro 200	Hettich

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*)

E. coli-Zellen wurden generell bei 37°C entweder in einem Schüttler (Flüssigkulturen) oder in einem Brutschrank (Agaroseplatten) über Nacht inkubiert.

2.2.2 Herstellung kompetenter Zellen für die Elektrotransformation

Für die Herstellung elektrokompenter *E. coli* Bakterien wurde eine fünf ml Übernachtskultur aus einem *E. coli* Glycerinstock unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums angeimpft. Am nächsten Morgen wurde daraus die Hauptkultur mit 200 ml LB-Medium und Antibiotikum angeimpft. Diese wurde für zwei bis drei Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert und die OD (optische Dichte) überprüft. Bei einer OD von 0,7 wurden die Bakterien für 20 Minuten auf Eis heruntergekühlt. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 5100 x g und 4°C. Der Überstand wurde im Anschluss verworfen, die Zellen wurden in 50 ml einer kalten ein mM HEPES-Lösung resuspendiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt (s.o.) wurden die Bakterien mit 25 ml der HEPES-Lösung gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand

wurde verworfen und die *E. coli*s in 10 ml kaltem, 10 prozentigem Glycerin resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden 5 ml des Glycerins hinzugegeben und ein letztes Mal zentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 500 µl Glycerin aufgenommen und in 50 µl Aliquots aufgeteilt. Diese wurden mit Hilfe von Stickstoff tiefgefroren. Als Kontrolle wurden die Bakterien mit 5 µl (50pg) des pUC19 Vektors transformiert und auf einer Agaroseplatte ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Kolonien ausgezählt, um die Kompetenz der Bakterien zu überprüfen.

2.2.3 Elektrotransformation

Ziel der Elektrotransformation ist es, die Membran von *E. coli*-Zellen für kurze Zeit permeabel zu machen, sodass fremd-DNA in die Zelle eingeschleust werden kann. Hierzu wurden kompetente *E. coli*-Zellen (siehe 2.2.2) verwendet. Da diese bei -80 °C eingefroren worden waren, wurden sie vor der Transformation für zehn Minuten auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50 µl dieser Bakterien mit 2-5 µl der zu transformierenden DNA versetzt. Der Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvette überführt. Ein Elektroporator gab daraufhin einen kurzen Impuls von 1350 V. Nach der Elektroporation wurden die Bakterien mit einem ml LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der Bakterien auf Agaroseplatten ausplattiert. Die restlichen Bakterien wurden für fünf Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen, das Zellpellett resuspendiert. Dieses wurde ebenfalls ausplattiert.

2.2.4 Chemische Transformation

Auch die chemische Transformation hat das Ziel, die Zellmembran der Bakterien für kurze Zeit permeabel zu machen. Die chemische Transformation erfolgte nach Herstellerangaben für *E. coli*-Zellen (Stellar Zellen, Invitrogen).

2.2.5 Glycerin-Kulturen

Zur Herstellung von Glycerin-Kulturen wurden 800 µl einer 20 ml Übernachtskultur der transformierten Bakterien mit 500 µl Glycerin (87 %) versetzt und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Kulturen wurden anschließend bei -80 °C eingefroren.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient dazu, DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen und durch Einlagerung eines Farbstoffs (Ethidiumbromid/Gelred) sichtbar zu machen. Hierzu wird ein Gleichspannungsfeld erzeugt, indem die DNA in Richtung der Anode läuft. Zur Herstellung der Agarosegele wird bei einem hier verwendeten 1-prozentigen Gel die entsprechende Menge Agarose eingewogen und in 1x TBE-Puffer gelöst. Dieses Gemisch wird kurz aufgekocht, damit sich die Agarose im Puffer löst. Anschließend wird der Farbstoff hinzugefügt. Nach vollständiger Aushärtung des Gels werden die Proben mit DNA-Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Dieses befindet sich nun in einer entsprechenden Kammer in 1x TBE-Puffer als Laufpuffer. Durch Elektrophorese wird die Probe innerhalb einer Stunde bei 10 V/cm aufgetrennt. Dank des integrierten Farbstoffs kann die DNA mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2.3.2 Gel Extraktion

Die mittels UV-Licht detektierten DNA-Banden wurden zu Klonierungszwecken mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Im Anschluss wurde die DNA durch das PCR clean-up Gel extraction Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerprotokoll aufgereinigt und in ddH₂O aufgenommen.

2.3.3 Isolierung von genomischer DNA, Plasmid-DNA und RNA

Für die Isolierung von gDNA, Plasmid-DNA und RNA wurden Kits von Thermofisher Scientific, Macherey-Nagel und Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben der Hersteller. Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde je nach gewünschter DNA-Menge eine Mini-, Midi-, Maxi-, oder Megapräparation durchgeführt.

2.3.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgt mit Hilfe eines Photometers. Da DNA Licht der Wellenlänge 260 nm absorbiert, wird die Absorption in diesem Bereich gemessen. Eine Absorption bei 260 nm von 1.0 entspricht dabei 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml ssDNA. Die Messung der Absorption bei 280 nm (hier absorbieren Proteine Licht) und das Errechnen des Quotienten von A₂₆₀ und A₂₈₀ geben Auskunft über die Reinheit der DNA. Wird dabei ein Verhältnis von 1.8-2.0 erreicht, wird von einer reinen Präparation ausgegangen.

2.3.5 Sequenzierung

Ziel der Sequenzierung ist die Überprüfung von DNA. Im Anschluss an eine Klonierung und die Kontrolle mittels Restriktionsenzymen erfolgt in der Regel die Sequenzierung. Dadurch soll sichergestellt werden, dass die klonierte Sequenz den Erwartungen entspricht. Außerdem können auch PCR-Fragmente mittels Sequenzierung analysiert werden. Für die Plasmid-Sequenzierung wurden 12 µl DNA (ca. 100 ng/µl) mit 2 µl (5 pmol/µl) Primer gemischt und an LGC Genomics versandt. Nach 1-2 Werktagen kann das Ergebnis der Sequenzierung zur Analyse online abrufen werden.

2.3.6 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, um DNA selektiv zu amplifizieren. Hierbei werden Sequenzinformationen der flankierenden Bereiche des zu vervielfältigenden

Stückes benötigt. Für diese Bereiche werden Oligonukleotid-Primer synthetisiert, so dass sie in gegenläufiger Richtung an den komplementären DNA-Strang binden können und so die Ziel-DNA einrahmen. Nach einer Hitze-Denaturierung werden die angelagerten Primer (*annealing*) von einer hitzestabilen DNA-Polymerase verlängert (Elongation). Dieser Vorgang (Denaturierung, *annealing*, Elongation) wird bis zu 35 mal wiederholt. Das bei jedem Zyklus entstehende Fragment dient im darauffolgenden als Matrize, so dass eine exponentielle Amplifikation stattfindet.

Wichtig für diese Reaktion ist eine hitzestabile Polymerase, da die Denaturierung der Template-DNA bei 92-98 °C stattfindet. Verwendung findet in der Regel die Taq-Polymerase, die ein Temperaturoptimum von 72 °C besitzt, jedoch kein *proofreading* durchführt. Auch die TAKARA-Polymerase und die Phusion-Polymerase wurden in dieser Arbeit verwendet. Diese Polymerasen besitzen eine 3'-5' Exonukleaseaktivität, durch die es möglich wird, ein genaueres PCR-Produkt zu erhalten. Nach Beenden der Reaktionen werden die PCR-Ergebnisse in der Regel auf ein Agarosegel aufgetragen (5-10µl).

Der Standard-Ansatz hierzu enthält folgende Reagenzien:

- 20 ng Template-DNA
- 2 µl 10 µM Primer forward
- 2µl 10 µM Primer reverse
- 5 µl dNTPs (je 2 mM)
- 1 x Taq-Polymerase-Puffer
- 1 µl Taq-Polymerase
- Mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt.

Dazu wird ein Standard-PCR-Programm verwendet:

1. Initiale Denaturierung: 95°C → 2 min
2. Denaturierung: 95°C → 30 sek
3. Annealing: 42-65°C → 30 sek
4. Extension: 72°C → 1 min/kb
5. Finale Extension: 72°C → 5 min
6. Pause: 4°C

Die Schritte 2. bis 5. wurden 35 mal wiederholt. Die *Annealing*-Temperatur ist abhängig vom gewählten Primerpaar und dessen Schmelztemperatur.

2.3.7 qPCR

Die qPCR (quantitative PCR oder *real-time* PCR) ist eine Form der PCR, die es dem Anwender erlaubt, die Ausgangs-DNA zu quantifizieren. So lassen sich Rückschlüsse auf die Expressionsmuster vieler Gene schließen. Als Vergleich dazu dient stets ein Referenz-Gen (hier GAPDH). Es gibt verschiedene Methoden, die DNA zu quantifizieren. In dieser Arbeit wurde der Ct-Wert (cycle threshold) gewählt. Dieser Wert gibt den PCR-Zyklus an, an dem die Hintergrund-Fluoreszenz erstmals überschritten wird. Bei der qPCR wird zum Standard PCR-Ansatz ein Fluorophor (LC Green) zugegeben, der in die DNA interkaliert.

- 1 µl cDNA
- 0.8 µl 10 µM Primer forward
- 0.8 µl 10 µM Primer reverse
- 3.2 µl dNTPs (je 2 mM)
- 1 x Taq-Polymerase-Puffer
- 0.2 µl Taq-Polymerase
- 2 µl LC Green
- Mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt.

2.3.8 Reverse Transkription

Nachdem RNA aus den entsprechenden Zellen isoliert worden ist, kann sie mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.3.9 RNA-Qualitätskontrolle

Für die Qualitätskontrolle der gesamten RNA nach Extraktion wurde eine Kapillarelektrophorese (QiAxcel) durchgeführt. Hierbei wird die ribosomale RNA (rRNA) in Form von Banden ähnlich des Agarosegels dargestellt. Bei guter RNA-Qualität sind die ribosomalen Untereinheiten 5S, 18S und 28S klar zu erkennen.

2.3.10 DNA-Verdau durch Restriktionsenzyme

Eine Methode zur Überprüfung eines Plasmids oder eines PCR-Fragments ist der Verdau der DNA durch Restriktionsenzyme. Enthält ein Plasmid beispielsweise nur eine Schnittstelle für ein bestimmtes Restriktionsenzym, wird das Plasmid linearisiert. Mit Hilfe der Gelelektrophorese kann dessen Größe bestimmt werden. Üblicherweise werden etwa 500 ng DNA verwendet, die mit 0.2 bis 0.5 U Enzym und 1x Puffer (wird vom Hersteller mitgeliefert) versetzt werden. Auch das Temperaturoptimum des eingesetzten Restriktionsenzym wird vom Hersteller angegeben, es liegt in den meisten Fällen bei 37 °C. Die DNA wird für eine Stunde bei der entsprechenden Temperatur mit dem Enzym versetzt. Anschließend kann man das Enzym in den meisten Fällen (auch hier gelten Herstellerangaben) durch Hitze denaturieren oder die DNA mittels DNA-Aufreinigung isolieren. Der DNA-Verdau durch Restriktionsenzyme findet auch Verwendung bei der Klonierung. Hier können Sequenzen durch Restriktionsenzyme beispielsweise aus Plasmiden „ausgeschnitten“ werden, um diese in einem anderen Kontext einzubauen.

2.3.11 SURVEYOR-Assay

Der SURVEYOR-Assay dient der Detektion von *non-homologous end joining*, einem zelleigenen Reparatursystem. Mit Hilfe dieses Assays kann außerdem nachgewiesen werden, ob eine spezifische Restriktionsendonuklease einen DSB in die DNA eingefügt hat. In einem ersten Schritt wurden HEK293-Zellen mit der Homingendonuklease I-SceI transfiziert. Hierdurch sollte an einer spezifischen Stelle ein DSB in der DNA erzeugt werden, der im Anschluss von der Zelle durch NHEJ repariert wird, wodurch verschiedene Insertionen und Deletionen entstehen (Abb. 11). Über diese Sequenz wird eine ca. 500 bp umfassende PCR durchgeführt. Hierbei ist wichtig,

100 ng Ausgangs-DNA einzusetzen. Die PCR Produkte, die entsprechend ihrer Vorlage im Bereich der Schnittstelle verschiedene Insertionen und Deletionen umfassen, werden denaturiert und in einem weiteren Schritt wieder aneinander gelagert. So entstehen *missmatches* im Bereich der Schnittstelle, da sich hier verschiedene Kombinationen aus Insertionen und Deletionen anlagern. Im Anschluss wird ein 15-minütiger Verdau bei 37°C mit der T7E1-Endonuklease durchgeführt. Diese erkennt und schneidet *missmatches*, wodurch das PCR-Produkt im Bereich der ursprünglichen Schnittstelle verdaut wird. Zum Schluss kann das Ergebnis mit Hilfe der QiAxxel ausgewertet werden.

Ansatz für Verdau durch T7E1:

- 500 ng DNA
- 2 µl Puffer
- 1 µl T7E1
- H₂O

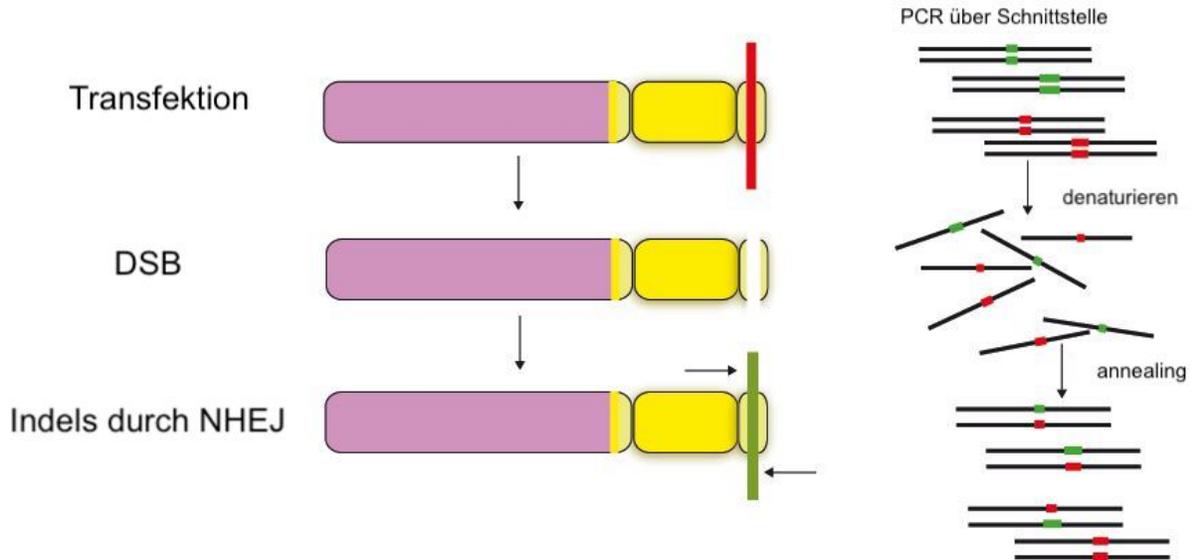


Abbildung 11: SURVEYOR-Assay

Durch Transfektion mit der Nuklease (roter Balken) wird ein Doppelstrangbruch (DSB) in der DNA der Zielzelle erzeugt. Hierdurch wird das *non-homologous end joining* (NHEJ) angeregt und es entstehen Insertionen und Deletionen (Indels, grüner Balken). Im Anschluss erfolgt eine PCR über die vorherige Schnittstelle, das PCR-Produkt wird denaturiert und wieder angelagert.

2.3.12 In-Fusion-Klonierung

Die In-Fusion-Klonierung der Firma Takara ermöglicht die Integration beliebiger Fragmente in jeden Vektor an einer beliebigen Stelle. Hierzu sind keine Restriktionsenzyme notwendig. Stattdessen wird mittels PCR sowohl an den Vektor als auch an das Insert ein Überhang generiert, der Teile des jeweils anderen enthält. Es kann jedoch auch der Vektor oder das Insert mittels Restriktionsverdau vorbereitet werden und nur der andere Teil durch PCR entsprechend manipuliert werden. Die In-Fusion-Klonierungen wurden nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

2.3.13 TOPO™ Cloning

Durch Verwendung des TOPO™ TA Cloning Kits der Firma Thermo Fisher können PCR-Produkte, die mittels Taq-Polymerase amplifiziert wurden, direkt in einen pT-Vektor kloniert werden. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren.

2.3.14 shRNA-Klonierung

Für die Herstellung der shRNAs wurde das psiRNA-h7SKGFPzeo Kit der Firma Invivogen eingesetzt. Die Klonierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Der Vektor enthält einen h7SK-Promotor, eine *gfp* Kasette und eine Zeocin Kasette. Die integrierten siRNAs wurden mit Hilfe des Onlinetools siRNA Wizard (www.siRNAwizard.com) ausgewählt.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivieren und Passagieren von HEK293-Zellen

Das Kultivieren von HEK293-Zellen erfolgte in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) unter Zugabe von 10 % FKS, 2mM L-Alanyl-L-Glutamine, 100 U Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin. Die Zellen wurden bei 37°C und 10 % CO₂ auf 10 cm² große Kulturschalen im Brutschrank kultiviert. Um ein optimales Wachstum zu gewährleisten, wurden die HEK293-Zellen zwei mal pro Woche geteilt. Hierbei wurde zuerst das Kulturmedium abgenommen, die

Zellen wurden anschließend mit Accutase versetzt und für fünf bis zehn Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert, um die Adhärenz aufzulösen. Dann wurde die Reaktion mit DMEM abgestoppt und die Zellen mit 1xPBS gewaschen. Im Anschluss wurde 1/10tel der Zellen auf eine neue Kulturschale ausgebracht.

2.4.2 Transfektionen

Transfektionen dienen der Plasmidaufnahme eukaryotischer Zellen. Man unterscheidet die physikalische und die chemische Transformation. Bei der physikalischen Transformation werden die Zellen beispielsweise durch Elektroporation kurzzeitig permeabilisiert. In dieser Arbeit wurde die chemische Transformation mit Hilfe von Polyethylenimin (PEI) verwendet. PEI bildet einen Komplex mit der DNA und wird von der Zielzelle aufgenommen.

Ansatz für 10 cm Zellkulturschalen:

- 300 µl NaCl (150 mM) werden mit 10 µg Plasmid-DNA mittels Vortexen vermischt
- 600 µl PEI werden unter erneutem Vortexen hinzugegeben und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert
- die zu transfizierenden Zellen werden mit frischem Kulturmedium versetzt und der PEI-Ansatz wird tropfenweise hinzugegeben.
- Nach 7 Stunden wird das Medium gewechselt

2.4.3 Herstellung von AAVs

Die Herstellung Adeno assoziierter Viren für die *in vivo* Transduktion erfolgte sowohl am Universitätsklinikum Nantes in Frankreich als auch im Labor von John Neidhardt in Oldenburg. Die Viren wurden durch HEK293-Transfektion erzeugt.

2.4.4 Dissoziation von Retinazellen der Maus

Die Dissoziation der frisch entnommenen Mausretinae erfolgte unter Einsatz des Papain-Kits von Worthington. Das Standard-Protokoll des Herstellers wurde etwas verändert. Die Lösungen wurden wie vom Hersteller beschrieben angesetzt. Nach der Präparation wurden die Retinae in 1x HBSS für maximal 90 Minuten vor der Dissoziation gelagert.

- Tube 1: Papain
- Tube 2: DNase + EBSS
- Tube 3: Tube 4 1:10 verdünnt in EBSS
- Tube 4: Ovomuroid/ Bovine Serum albumin je 10 g/ml in EBSS

Für die Dissoziation wurde Tube 1 aufgetaut und im Inkubator mit offenem Deckel für 15 bis 30 Minuten mit CO₂ gesättigt. Die isolierte Retina wurde in dieses Tube gelegt und für 45 Minuten bei 37°C und 700 rpm auf dem Rütteltisch platziert. Währenddessen wurden Tube 2 und 3 aufgetaut, ineinander überführt und zusammen mit Tube 4 für etwa 20 Minuten mit CO₂ angereichert. Die Retina wurde mit einer 2.5 ml Pipette (auf 250 µl eingestellt) ca. 10 mal unter Sichtkontrolle vorsichtig resuspendiert, bis keine Zellklumpen mehr sichtbar waren. Anschließend wurde Tube 2/3 dazu gegeben und invertiert. Dann gab man 250 µl aus Tube 4 hinzu und invertierte erneut. Für einen Pufferwechsel wurden die Zellen bei 300 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen in dem gewünschten Puffer resuspendiert.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Bradford

Für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde der Bradford-Test durchgeführt. Hierbei wird die Komplexbildung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue mit unpolaren Seitenketten von Proteinen ausgenutzt. Durch die Bindung an Proteine verändert sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470 nm auf 595 nm. Der Extinktionskoeffizient wird durch die Komplexbildung stark erhöht, wodurch die Proteinkonzentration bei 595 nm mittels des Photometers gemessen werden kann.

2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Methode, mit der Proteine nach ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden können. Hierzu wurden die Proteine mit einem SDS-haltigem Tris/HCl-Glycin-Puffersystem nach *Lämmli* (1970) aufgetrennt. Über dem Trenngel mit pH 8.8 befand sich ein Sammelgel mit pH 6.8.

Tabelle 12: Zusammensetzung SDS-Gel

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

Die Polymerisation startet durch Zugabe von TEMED und dem Katalysator APS, welche deshalb unmittelbar vor dem Gießen der Gele dazugegeben worden sind. Zur Ausbildung einer glatten Gelkante wurden die Trenngele bei der Polymerisation mit Ethanol überschichtet. Erst nach der Polymerisation der Trenngele wurden die Sammelgele gegossen. In die Sammelgele wurden vor der Polymerisation Gelkämme gesteckt. Nach Zusammenbau der Gelkammer wurde die Apparatur mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden mit LAP-Probenpuffer versetzt. Das Gel wurde für eine Stunde mit einem Spannungsfeld von 35 mA und 200 V versetzt. Anschließend wurde das SDS-Gel für einen Westernblot weiter verwendet oder mit *Coomassie Brilliant Blue* über Nacht gefärbt und am nächsten Tag analysiert.

2.5.3 Westernblot

Der Westernblot ist eine gängige Methode, um Proteine mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers zu detektieren. Hierfür werden Proteine zunächst mittels der SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die sich nun im SDS-Gel befindenden Proteine werden durch das Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Membran transferiert (Blotting). Hierbei werden drei Verfahren unterschieden: Dry-Blot, Semi-Dry-Blot und Tank-Blot. In dieser Arbeit wurde das Semi-Dry-Blot-Verfahren genutzt. Neben der hier verwendeten PVDF-Membran werden noch zwei dicke und zwei dünne Filterpapiere benötigt. Diese werden zusammen mit dem SDS-Gel und der Membran in einen Transferpuffer getaucht. Im Anschluss werden die Membran und das Gel ummantelt von Filterpapieren in den Blotter eingelegt. Es wird ein Spannungsfeld von 100 V für 15 Minuten angelegt.

In einem nächsten Schritt wird die Membran für eine Stunde mit Milchpulver blockiert. Dadurch wird die Anheftung weiterer Proteine an die Membran verhindert. In dieser Arbeit wurde eine 5-prozentige Milchpulverlösung in 1 x TBS verwendet.

Im Anschluss erfolgte ein kurzer Waschschrift mit 1 x TBS für 10 Minuten um die Blockierlösung zu entfernen.

Dann erfolgt die Inkubation des ersten Antikörpers, der in 1 x TBS verdünnt wird für 1 bis 12 Stunden. Der Erstantikörper bindet ein spezifisches Epitop im Ziel-Protein. Nach der Inkubation wird die Membran drei mal für 10 Minuten mit 1 x TBS gewaschen. Der Zweitantikörper bindet an den Fc (crystallisable fragment)-Teil des Erstantikörpers. Der Zweitantikörper dient der Detektion des Zielproteins und ist daher an ein Reporterprotein gekoppelt. Die Inkubationszeit mit dem Zweitantikörper beträgt ein bis zwei Stunden. Im Anschluss wird die Membran drei mal gewaschen und es erfolgt die Detektion.

Bei der Detektion wird eine ECL (Elektrochemolumineszenz)- Lösung 1:1 mit Wasser gemischt und für drei Minuten auf die Membran gegeben. In einem letzten Schritt erfolgt die Detektion im Fotolabor. Hierfür wird ein Film in einer Kassette für einige Sekunden auf die Membran gegeben. Der Film wird im Anschluss in Entwickler-Lösung geschwenkt, kurz in Wasser abgewaschen und für 30 Sekunden in Fixierlösung geschwenkt. In einem letzten Schritt wird der Film in Wasser gewaschen.

2.5.4 FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)

Die FACS-Methode, auch Durchflusszytometrie genannt, erlaubt es, Zellen nach bestimmten Eigenschaften anzureichern. Hierbei kann es sich um Fluoreszenzsignal, Größe oder Form handeln. In dieser Arbeit erfolgte die Anreicherung GFP-positiver Zellen, sowie Photorezeptoren. Bei der Durchflusszytometrie werden die zu untersuchenden Zellen mit einem Laser bestrahlt, das entstehende Signal wird detektiert und die fluoreszierenden Zellen werden in ein Tube aufgenommen.

Vorbereitung der Zellen:

Kultivierte HEK293-Zellen werden mit 150 mM Accutase versetzt, um sie schonend von der Zellkulturschale zu lösen. Nach 10-minütiger Inkubation im Brutschrank wird die Reaktion mit Kulturmedium abgestoppt. Die Zellen werden im Anschluss mit 1x PBS gewaschen und in Sorting-Puffer überführt. Die Zentrifugationsschritte erfolgen für 5 Minuten bei 300 x g. Die Zellen werden auf 10 Millionen Zellen pro Milliliter eingestellt. Dies entspricht dem für das FACS optimalen Verhältnis.

Zellen der Mausretina wurden nach erfolgter Dissoziation (vgl. Kap. 2.4.4) ebenfalls in Sorting-Puffer aufgenommen und entsprechend dem Protokoll für HEK-Zellen behandelt (s.o.).

2.6 *In vivo* Methoden

Die *in vivo* Methoden wurden von Dr. Brigitte Müller, Bärbel Schäfer und Annabella Janise durchgeführt.

2.6.1 Subretinale Injektion bei Mäusen

Für das Einbringen von Fremd-DNA wurden AAVs bei Mäusen subretinal injiziert. Die Mäuse wurden zunächst durch Intraperitoneal-Injektion von Xylazine und Ketamine anästhetisiert. Die Pupille wurde durch Tropfen mit 1 % Tropicamide geweitet. 1 µl der Vektor-Lösung wurde

mittels einer Spritze (Hamilton, Reno, NV) mit glatter, 34-gauge-Nadel in den subretinalen Spalt (zwischen Retina und Pigmentepithel) gegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Modelle und Antikörper-Generierung

Im ersten Teil dieser Arbeit wird auf die Generierung der *in vitro* Modellsysteme eingegangen (Abb. 12). Es wurde mittels mehrerer Schritte aus der cDNA der B6J.Sv129-Rpgr^{tm1stie} Mauslinie ein Vektor zur Genexpression des mutierten *Rpgrs* hergestellt. Des Weiteren wurde ein Zellkultur-Modell aus einer stabilen HEK293-Zelllinie generiert, die den mutierten ORF15-Teil des *Rpgr*-Gens beinhaltet. Außerdem wurde ein spezifischer Antikörper für das ORF15 hergestellt und getestet.

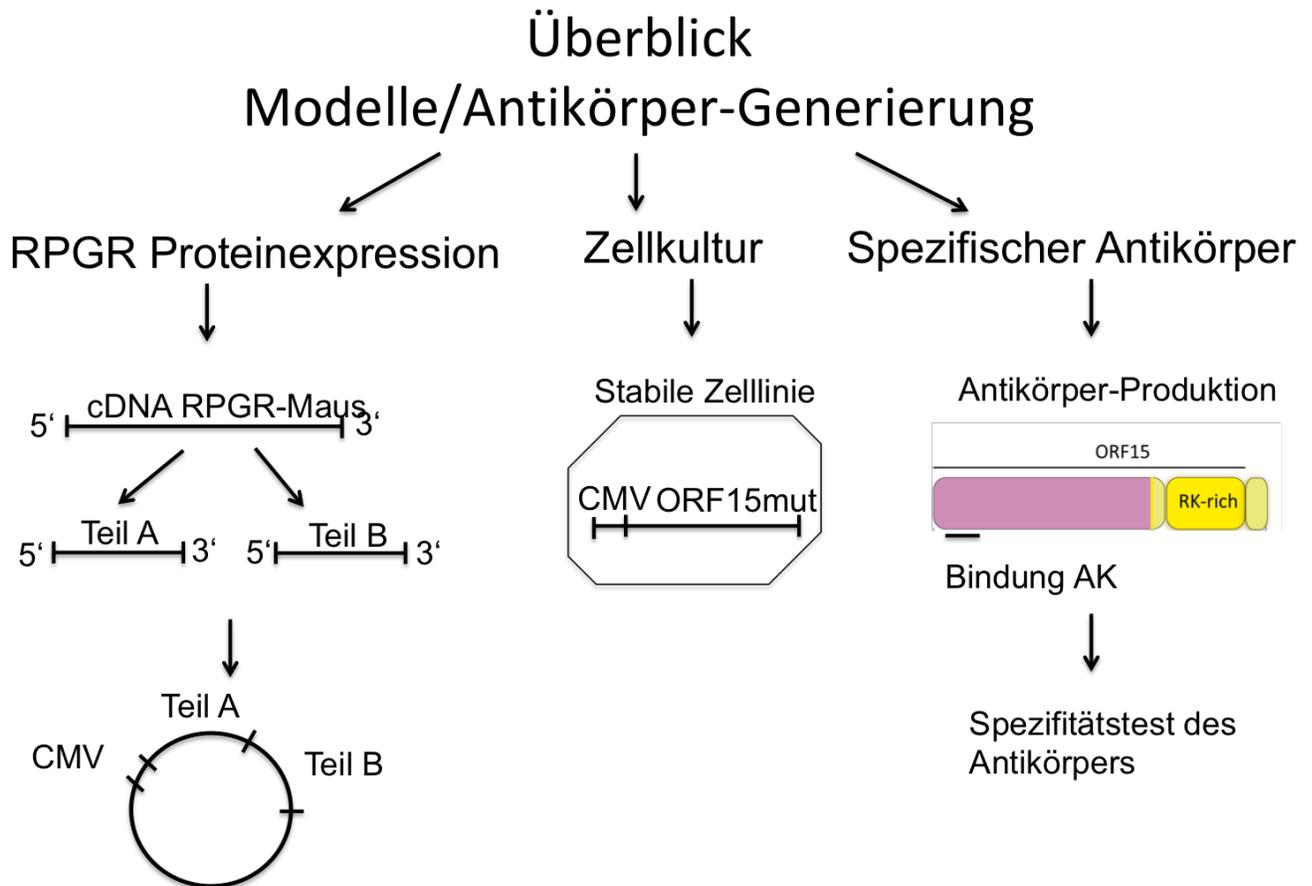


Abbildung 12: Überblick der verwendeten Modelle und der Antikörper-Generierung.

Für die Klonierung des *Rpgr*-Transgens wurde die cDNA der B6J.Sv129-Rpgr^{tm1stie}-Maus genutzt (links). Das Zellkultur-Modell besteht aus einer HEK293-Zelllinie, in die der ORF15-Teil (Teil B) des mutierten Gens stabil integriert wurde (Mitte). Es wurde ein spezifischer Antikörper für den ORF15-Bereich des Gens hergestellt und getestet (rechts).

3.1.1 Klonierung *Rpgr*-ORF15^{mut}

In einem ersten Schritt ging es darum, ein Plasmid herzustellen, welches unter Kontrolle eines CMV-Promotors das mutierte *Rpgr*-ORF15 produzieren kann. Die Sequenz sollte homolog zur Sequenz der B6J.Sv129-*Rpgr*^{tm1stie} Mauslinie sein, um im Vorfeld zu den *in vivo*-Versuchen die Strategie in der Zellkultur zu testen. Da das Exon Orf15 aus einer hochrepetitiven Sequenz besteht, wurde das Gen in zwei Teilen kloniert. Als erstes wurde der vordere Teil des Gens, der keine repetitiven Sequenzen enthält (Teil A), mittels In-Fusion-PCR in einen pET19b Vektor kloniert (Abb. 13, A). Als Vorlage diente der Vektor, der genutzt wurde, um die B6J.Sv129-*Rpgr*^{tm1stie} Mauslinie herzustellen. Um passende Schnittstellen zu erhalten, wurde der zweite Teil des Gens, der viele repetitive Sequenzen enthält, in einen pT-Vektor kloniert (Teil B). Dies erfolgte über eine PCR und anschließende A-Überhang-Generierung, um das Insert in den pT-Vektor zu klonieren (Abb. 13, B). Das Zusammenfügen der beiden Teile im pET-19b-Vektor erfolgte mittels *EcoRI*-Verdau und anschließender Ligation mit der T4-Ligase. Es wurde ein Verhältnis von 3:1 Insert zu Vektor gewählt. Die Transformation erfolgte in Top10-Zellen. Die Klone wurden am nächsten Tag gepickt und kultiviert. Nach weiteren 12 Stunden wurde die DNA aufgereinigt und die Klone mittels *NdeI*-Verdau überprüft. Abbildung 13, C zeigt, dass die Klone 5, 7, 9 und 10 die erwarteten Bandengrößen von 6364, 2041, 967 und 432 bp besitzen.

Im Anschluss wurden diese Klone sequenziert. Da sich der pET-19b-Vektor aufgrund des fehlenden eukaryotischen Expressionssystems nicht für die Proteinproduktion in HEK293-Zellen eignet, wurde das Gen in einen pcDNA3+ Vektor umkloniert. Hierbei wurde der Vektor zuerst mit *BamHI* geschnitten und im Anschluss mittels In-Fusion-PCR für die Ligation vorbereitet. Das Insert wurde mit *NcoI* und *BamHI* geschnitten und aufgereinigt. Nach der In-Fusion-Ligation wurden positive Klone gepickt und in Kultur genommen. Anschließend wurde die DNA aufgereinigt. Es folgten ein Kontrollverdau mit *ApaLI* (Abb. 13, D) sowie als letzter Schritt die Sequenzierung des positiven Klons.

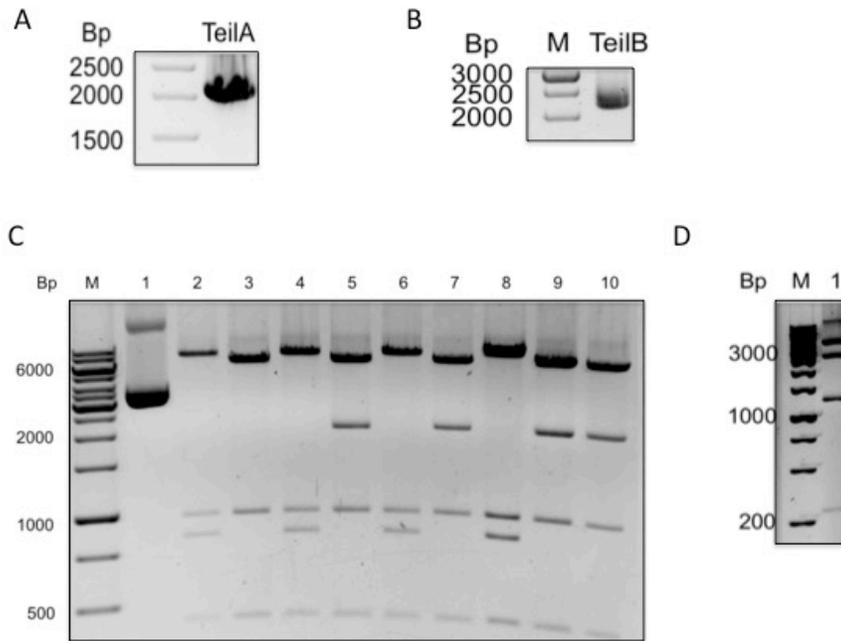


Abbildung 13: Klonierung des *Rpgr*-ORF15^{mut}

A: Agarosegel des vorderen Teils des *Rpgr* (Teil A). Die erwartete Größe nach Klonierung des vorderen Teils des Gens liegt bei 2125 bp. B: Agarosegel des hinteren Teils des *Rpgr* (Teil B). Die Größe der Bande liegt bei den erwarteten 2305 Bbp. C: Kontrollverdau des pet19b Vektors mit integriertem *Rpgr*-ORF15^{mut}. Der Verdau erfolgte mit NdeI. Die erwarteten Bandengrößen liegen bei: 6364, 2041, 967 und 432 bp. D: Kontrollverdau mit ApaLI. 1: Klon1. Die erwarteten Bandengrößen liegen bei: 5379, 2686, 1243, 288 bp. M: Marker, Bp: Basenpaare.

3.1.2 Generierung eines Zellkultur-Modells

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde eine HEK293-Zelllinie hergestellt, die einen Teil des mutierten RPGR-Gens stabil exprimiert und im folgenden als Zellkultur-Modell verwendet wurde. Zur Herstellung der Zelllinie wurde zuvor der hintere Teil des *Rpgr*-ORF15^{mut} in einen pcDNA3-Vektor kloniert (Abb. 14), der eine Genitocin-Resistenz besitzt. Die Zielsequenz besteht demnach aus der mutierten ORF15-Spleißvarante des Gens, die den repetitiven Teil und die sich kurz dahinter befindenden I-SceI-Schnittstelle umfasst.

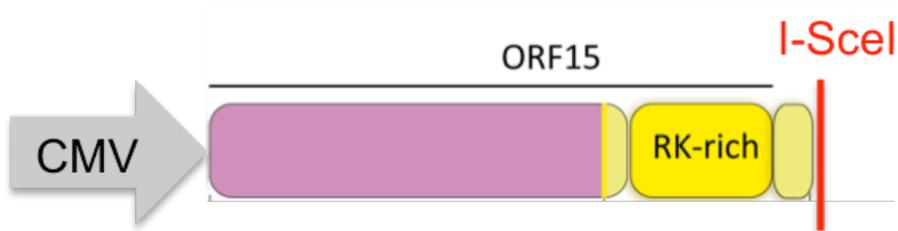


Abbildung 14: Schematische Darstellung des ORF15^{mut}

Hinterer Teil des *Rpgr*-Gens, der in HEK293-Zellen stabil integriert wurde. Roter Balken zeigt die I-SceI-Schnittstelle an. RK-reicher Teil steht für die Arginin- und Lysin-reiche Sequenz des mutierten Genprodukts. CMV: Cytalomegavirus Promotor.

HEK293-Zellen wurden mit diesem Vektor transfiziert, im Anschluss wurde das Nährmedium mit dem Antibiotikum Geneticin versetzt. Unter Verwendung des Antibiotikums bildeten sich einzelne Zellkolonien, die in separate Zellkulturplatten überführt wurden. Diese wurden mittels PCR und Sequenzierung auf die Anwesenheit des Zielgens geprüft und anschließend kultiviert.

3.1.3 Herstellung eines spezifischen RPGR-ORF15^{mut} Antikörper

Um die Proteinsynthese des mutierten RPGR-ORF15 zeigen zu können, wurde ein spezifischer Antikörper produziert. Dieser wurde mit Hilfe eines Online-Tools der Firma Life Technologies ausgewählt. Die Sequenz erkennt ausschließlich die ORF15-Spleißvariante des Proteins (Abb. 15).

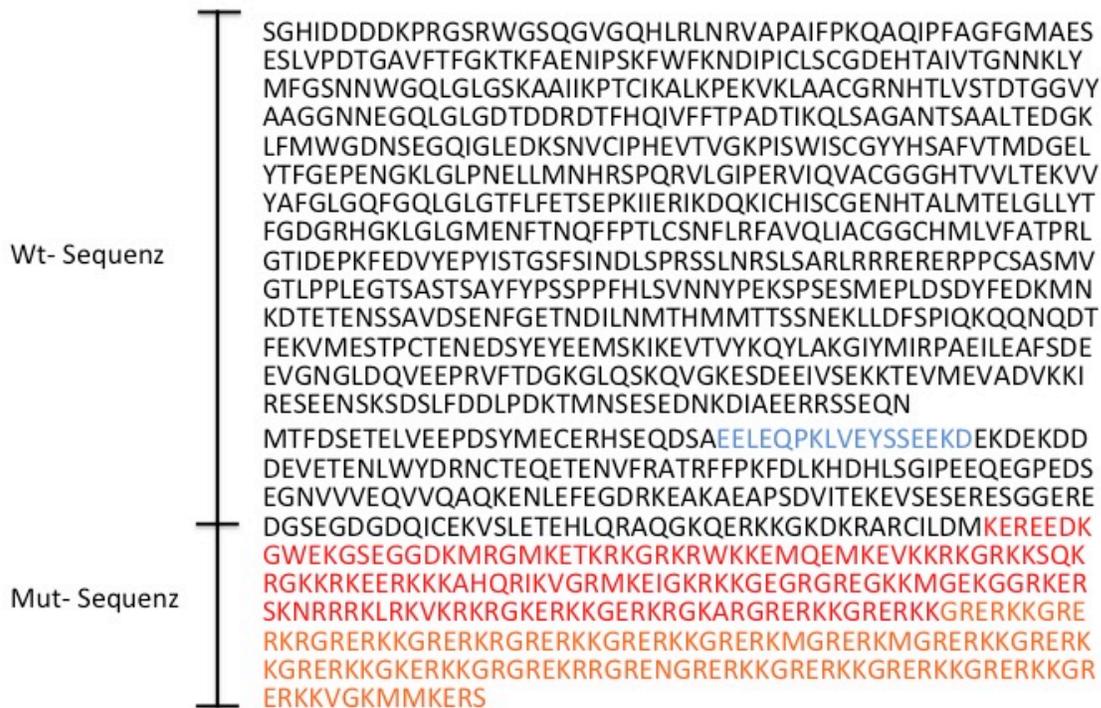


Abbildung 15: Aminosäuresequenz RPGR-ORF15^{mut}

Der obere Teil zeigt die wildtyp-Sequenz des RPGR-ORF15, der untere Teil die mutierte Sequenz. Der Absatz beschreibt den Beginn des Exon-Orf15. Die Bindungsstelle für den RPGR-Antikörper ist in blau dargestellt. Der rot markierte Bereich zeigt die RK-reiche Sequenz, die in orange dargestellte Sequenz zeigt die repetitive Region (GREK).

Nachdem die Firma Life Technologies den Antikörper produziert hatte, wurde er sowohl histologisch (siehe Anhang) als auch im Westernblot getestet (Abb. 16). Hierfür wurden HEK293-Zellen mit dem Vektor *Rpgr-ORF15^{mut}* transfiziert und nach 48 Stunden geerntet. Mithilfe der daraus erlangten Gesamtproteine wurde ein Westernblot mit dem ORF15-Antikörper durchgeführt. Hierbei zeigte sich im Vergleich zu untransfizierten HEK293-Zellen eine einzelne, klar zu erkennende Proteinbande (Abb.16).

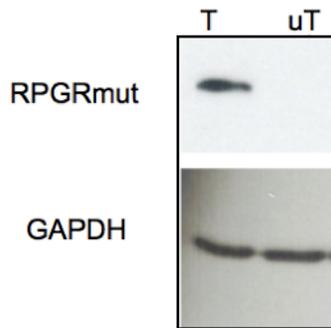


Abbildung 16: Westernblot nach *Rpgr*-ORF15^{mut} Transfektion von HEK293-Zellen

T: Beschreibt die mit dem Vektor *Rpgr*-ORF15^{mut} transfizierten Zellen. uT: untransfizierte Zellen als negativ-Kontrolle. GAPDH diente als Kontrolle des Westernblots.

3.2 Strategien der Gentherapie

Wie einleitend beschrieben wurden für die Entwicklung einer die XLRP betreffenden Gentherapie zwei verschiedene Strategien verfolgt.

Bei der RNAi soll das Genprodukt des mutierten *Rpgrs* nicht gebildet werden. Die entsprechende mRNA wird durch das Einfügen einer siRNA abgebaut, die komplementär zur Ziel-mRNA ist. Somit kann die Proteinbiosynthese nicht stattfinden. In dieser Arbeit wurden vier verschiedene siRNAs getestet. Hierfür wurde das in Kap 3.1 beschriebene Zellkultur-Modell verwendet.

Das *genome editing* wurde mittels der Hominigendonuklease I-SceI durchgeführt, deren Schnittstelle sich direkt hinter der ORF15-Region des *Rpgr*-Gens im B6J.Sv129-*Rpgr*^{tm1stie}-Mausmodell befindet. Die auf den Doppelstrangbruch folgenden Reparaturmechanismen NHEJ und HR wurden zunächst mittels des Zellkultur-Modells (Kap. 3.1) getestet, im Anschluss erfolgte die Durchführung *in vivo*.

3.3 RNA-Interferenz

3.3.1 Quantitative Analyse der *knockdown* Effizienz durch siRNA

Mittels des Onlinetools www.sirnawizard.com wurden vier verschiedene siRNAs ausgewählt, die zum Bereich des *Rpgr*-ORF15 komplementär sind. Drei der siRNAs binden vor der repetitiven Sequenz im Exon ORF15, die vierte siRNA bindet in der repetitiven Region (Abb.17).

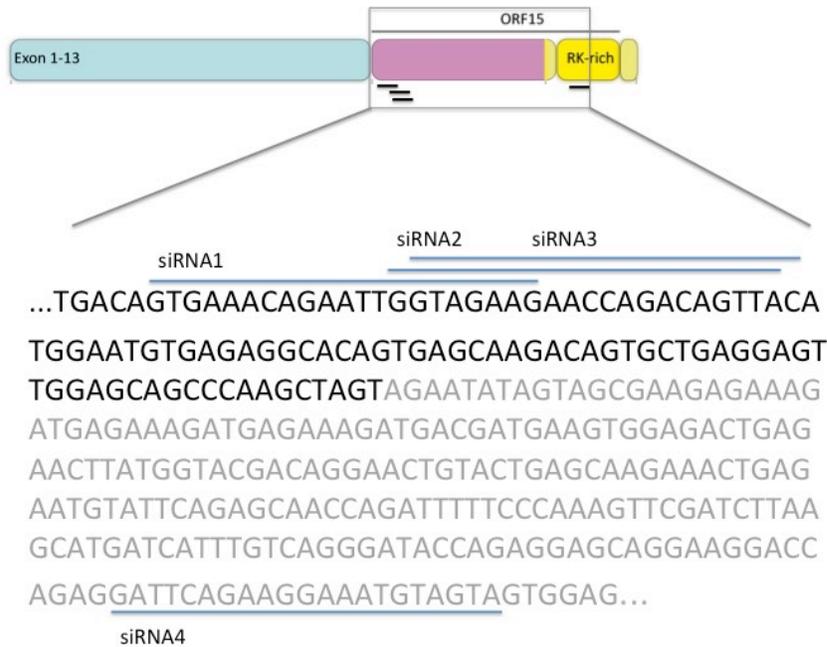


Abbildung 17: Bindestellen der verwendeten siRNAs

SiRNA 1,2 und 3 liegen vor der repetitiven Sequenz des ORF15. SiRNA 4 liegt im repetitiven Bereich (grau) des mutierten Gens.

Die siRNAs wurden in Form von shRNAs in den Vektor psih7SKGFPzeo kloniert. Neben den vier siRNAs wurde außerdem pro siRNA eine Kontrolle in Form von einer *scrambled* siRNA (scsiRNA) kloniert. Diese Kontrollen besitzen die gleiche Anzahl und die gleichen Nukleotide wie die siRNA, jedoch in anderer Reihenfolge. Die Sequenzen für die vier verschiedenen siRNAs und die jeweilige *scrambled*-Kontrolle wurden wie in Tabelle 13 beschrieben gewählt.

Tabelle 13: Sequenzen der verwendeten siRNAs

siRNA	Target-Sequenz (5' → 3')	Scrambled-Sequenz (5' → 3')	GC-Gehalt (%)
1	GTGAAACAGAATTGGTAGAAG	AGAGATATGAGGCAGATGTAA	38,10
2	GGTAGAAGAACCAGACAGTTA	AACAAGGAGAACGGCAGTTAT	42,86
3	GTAGAAGAACCAGACAGTTAC	GACTTCACAAAGGGACGTAAA	42,86
4	GATTCAGAAGGAAATGTAGTA	GTAAGAGCGAATAGTGTAATA	33,33

Abbildung 18, A zeigt exemplarisch einen Kontrollverdau mit NcoI der shRNA4 im psih7SKGFPzeo-Vektor. Der Vektor h7SK besitzt neben dem 7SK RNA-polymerase-III-Promotor einen CMV-Promotor und ein grün fluoreszierendes Protein (*gfp*) (Abb. 18, B).

HEK293-Zellen wurden mit den vier verschiedenen shRNAs und deren scshRNAs transfiziert und nach 24 Stunden ausgewertet. Mit Hilfe des GFP konnten die positiv transfizierten HEK293-Zellen über FACS angereichert werden. Zunächst wurde unter dem Fluoreszenz-Mikroskop kontrolliert, ob die Transfektion erfolgreich war (Abb. 18, C).

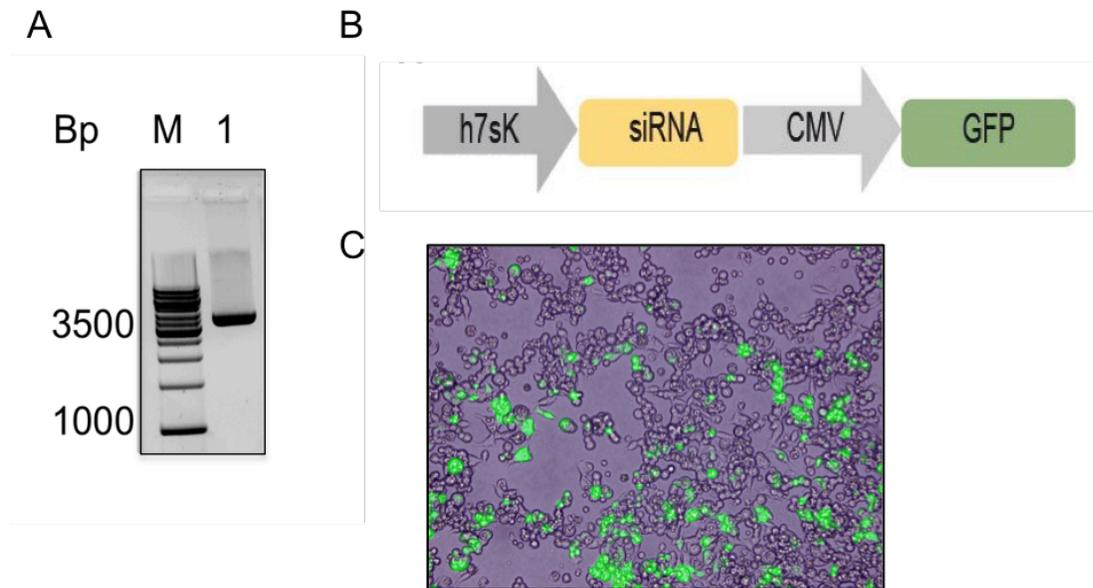


Abbildung 18: RNA-Interferenz

A: Kontrollverdau siRNA4. Linearisiert mit NcoI: 3591 bp erwartet. Bp: Basenpaare, M: Marker, 1: Klon1. B: Schematische Darstellung der siRNA-Expressionskassette. H7sK (human 7SK RNA polymerase III promotor) beschreibt den siRNA-Promotor. SiRNA steht für die vier verschiedenen siRNAs, die verwendet wurden. Das Reportergen *gfp* wird durch einen CMV (Cytomegalovirus) Promotor exprimiert. C: HEK293-Zellen, 24 h nach Transfektion mit siRNA2. Grün fluoreszierende Zellen sind transfizierte Zellen.

In Abbildung 19 sind die Ergebnisse der FACS-Messung der siRNA2 exemplarisch dargestellt. 15.4 % der Zellen wurden als GFP-positiv erkannt, vergleichbar mit der Sichtkontrolle aus Abbildung 18, C. Die Effizienzen lagen für alle transfizierten siRNAs bei 15 bis 30 % (Tabelle 14). Für die weitere Analyse der Expression des *Rpgr* mittels qPCR wurden die GFP-positiven Zellen angereichert.

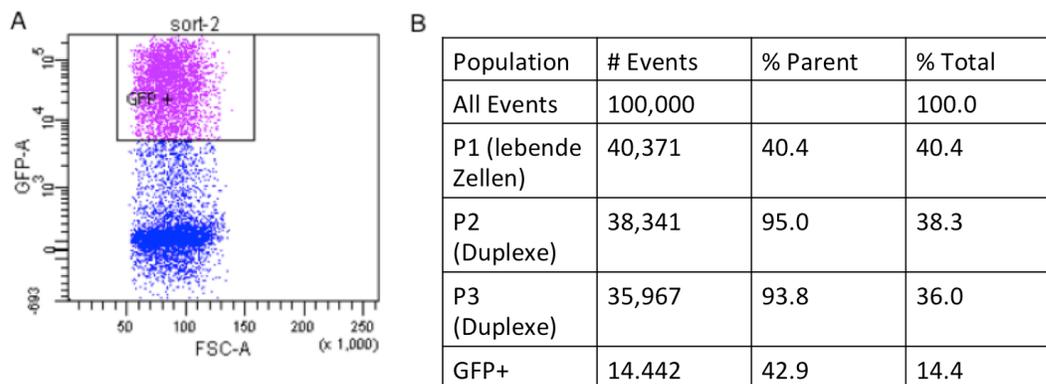


Abbildung 19: Sort report siRNA2

A: FSC-A: forward scatter, beschreibt die Größe der detektierten Zellen, GFP-A zeigt die grüne Fluoreszenz an. Die eingerahmten Zellen (GFP+, lila) wurden durch das FACS-Gerät angereichert. B: P1 bis P3 gibt die verschiedenen Gates an, hier werden lebende Zellen gated und Duplexe ausgeschlossen. Events: Zellen/Zelltrümmer die insgesamt vom FACS-Gerät gezählt wurden. % Parent: Anteil der Zellen, die mit dem vorherigen Gate übereinstimmen. % Total: Anteil der Zellen im Gate ausgehend von den Events insgesamt.

Tabelle 14: Transfektionseffizienz nach siRNA-Transfektion nach FACS-Analyse

siRNA	Transfektionseffizienz (GFP positiv in %)
1	15.4, 22.1, 14.6
Sc 1	21.1, 13.4, 20.3
2	16.3, 15.4, 21.6
Sc 2	20.9, 11.4, 12.1
3	15, 27.4, 15.7
Sc 3	20, 15.4, 26.6
4	14.8, 23.1, 24.2
Sc 4	17.8, 20.2, 22.4

Nach der RNA-Isolation aus den GFP-positiven Zellen wurde eine RNA-Qualitätskontrolle durchgeführt. Exemplarisch ist in Abbildung 20, A die RNA-Qualitätskontrolle der RNA aus mit siRNA4 transfizierten Zellen dargestellt. Die überprüfte RNA wurde in cDNA umgeschrieben, dann erfolgte die Auswertung mittels qPCR. Dies geschah mit Hilfe der ddCT-Analyse gegen das Referenz-Gen GAPDH. Für jede siRNA erfolgten drei Transfektionen. Jede RNA wurde dreimal umgeschrieben und jede qPCR zweimal durchgeführt. Um Nebenbanden ausschließen zu können, wurden alle qPCR-Produkte mittels Gelelektrophorese überprüft, wie in Abbildung 20, B exemplarisch dargestellt.

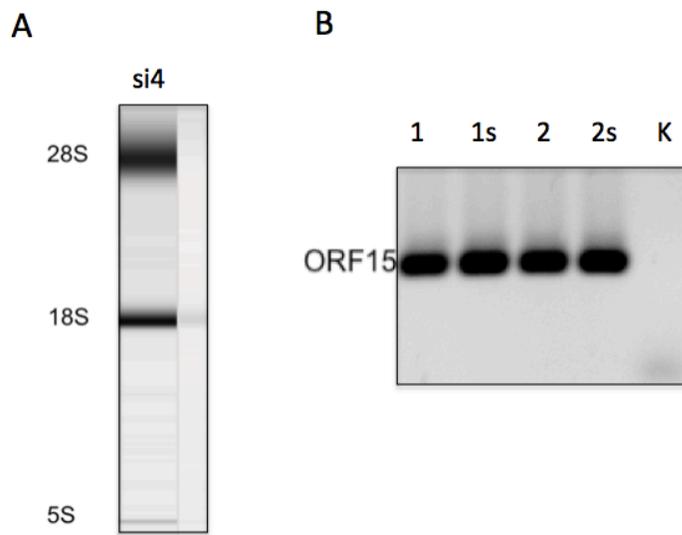


Abbildung 20: RNA-Isolation und qPCR

A: RNA-Qualitätskontrolle mittels QiAxcel. Qualitätskontrolle der RNA aus HEK293-ORF15mut mit siRNA4 transfiziert und nach GFP positiven Zellen gesortet. Die drei Banden stellen die unterschiedlichen ribosomalen Untereinheiten 5S, 18S und 28S dar. B: Überprüfung des qPCR-Ergebnisses durch Gelelektrophorese. QPCR-Ergebnis über ORF15 Bereich nach Transfektion von HEK293-ORF15_{mut}-Zellen mit siRNA1 (1), scsiRNA1 (1s), siRNA2 (2), scsiRNA2 (2s). K stellt die PCR-Kontrolle mittels ddH₂O anstelle der cDNA dar.

Die relative Genexpression lag für die Zellen, die mit siRNA2 transfiziert worden waren mit 44 % (+-4) am niedrigsten, gefolgt von siRNA 3 mit 62 % (+-10) und siRNA 1 mit 82 % (+-3) (Abbildung 21, A). SiRNA4, die als einzige in der repetitiven Region der mRNA bindet, zeigte keine Wirkung. Die Genexpression lag mit 102 % (+- 3) im Normalbereich (vgl. Abbildung 21, A). Wie in Abbildung 21, A dargestellt, wurden außerdem siRNA 1 und 2 und auch siRNA 2 und 3 kombiniert um herauszufinden, ob sich die Wirkung der sich an unterschiedlichen Sequenzen anlagernden siRNAs multipliziert. Diese zeigten jedoch mit 58% und 67 % im Vergleich zu

siRNA 2 eine Verschlechterung. Um ausschließen zu können, dass die siRNA nach weiteren 24 Stunden eine gesteigerte Wirkung zeigt, wurde siRNA2 für 48 Stunden zu den HEK293-Zellen gegeben, bevor die Auswertung erfolgte. Die relative Genexpression lag hier bei 45 %, ähnlich der Expression nach 24 Stunden.

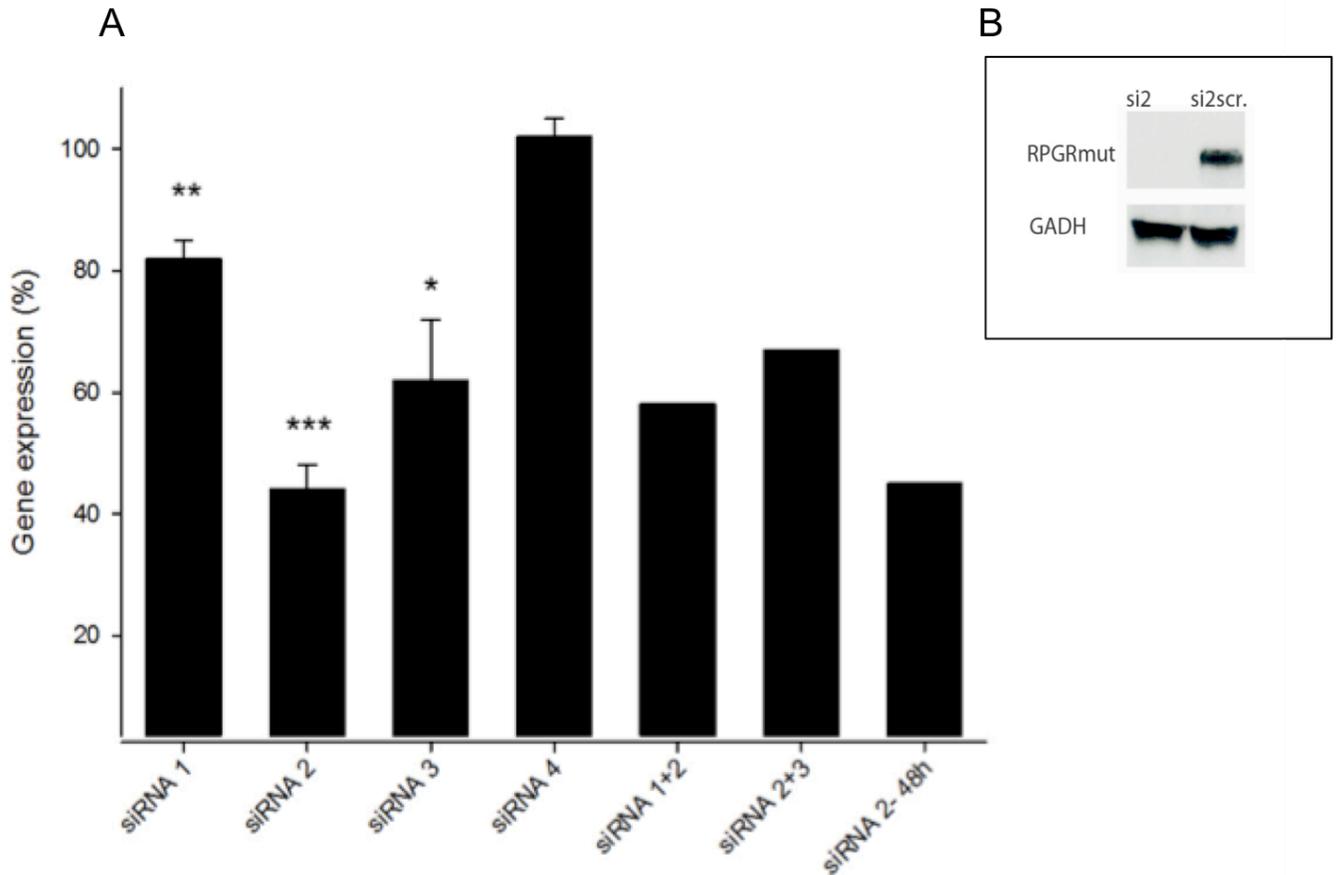


Abbildung 21: Ergebnisse der Transfektionen mit siRNAs.

A: Relative Genexpression nach Behandlung mit den verschiedenen siRNAs. Zellen wurden mit den vier verschiedenen shRNAs spezifisch für das Exon ORF15 transfiziert. Als Kontrolle wurden *scrambled* shRNAs transfiziert. Die Daten wurden auf die Kontrollen normalisiert. Die Expression wurde mittels qPCR evaluiert. GAPDH diente als interne Kontrolle. Fehler: SEM, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. B: Westernblot nach siRNA2 und *Rpgr-ORF15^{mut}* Transfektion von HEK293T-Zellen. Si2scr. Beschreibt die mit der *scrambled*-Kontrolle der siRNA transfizierten Zellen. GAPDH diente als Kontrolle.

3.3.2 Nachweis des *knockdowns* auf Proteinebene

Um die Expression des *Rpgr-ORF15^{mut}* auf Proteinebene zu kontrollieren, wurden HEK293T-Zellen mit dem Vektor pcDNA3+-RPGR^{mut} transfiziert. Die Zellen produzieren demnach das

mutierte RPGR-ORF15, homolog zur B6J.Sv129-Rpgr^{tm1stie}-Mauslinie. Die Zellen wurden außerdem mit siRNA2 und in einem weiteren Ansatz mit siRNA2s transfiziert, da diese in der quantitativen Analyse das vielversprechendste Ergebnis lieferte. Die transfizierten Zellen wurden nach vier Tagen geerntet. Im Anschluss wurden die Proteine isoliert und ein Westernblot durchgeführt. Hierfür diente das Housekeeping-Gen GAPDH als Kontrolle. Um das mutierte RPGR-ORF15 zu detektieren, wurde ein neu generierter Antikörper (siehe Kapitel 3.3) genutzt. Wie in Abbildung 21, B zu sehen ist, konnte in den Zellen, die mit siRNA2 transfiziert wurden, von dem spezifischen Antikörper kein mutiertes RPGR-ORF15 detektiert werden. Die Kontrolle hingegen, die mit der *scrambled* siRNA2 durchgeführt wurde, zeigt ein gut erkennbares Signal für das mutierte RPGR. Die Menge an detektiertem GAPDH ist in beiden Ansätzen vergleichbar.

3.4 Genome editing

Für die Durchführung des *genome editings* muss zuerst ein DSB in einer Zelle erzeugt werden. Hierfür wurde die Homingendonuklease I-SceI verwendet. Im Anschluss kann in der Zelle NHEJ ausgelöst werden, welches in verschiedenen, einige Basenpaar großen Deletionen und Insertionen resultiert. Wird der Zelle eine homologe Sequenz in Form eines Donor-Templates angeboten, kann es zur HR kommen, die einen präzisen Einbau von Nukleotiden ermöglicht (Abb. 22).

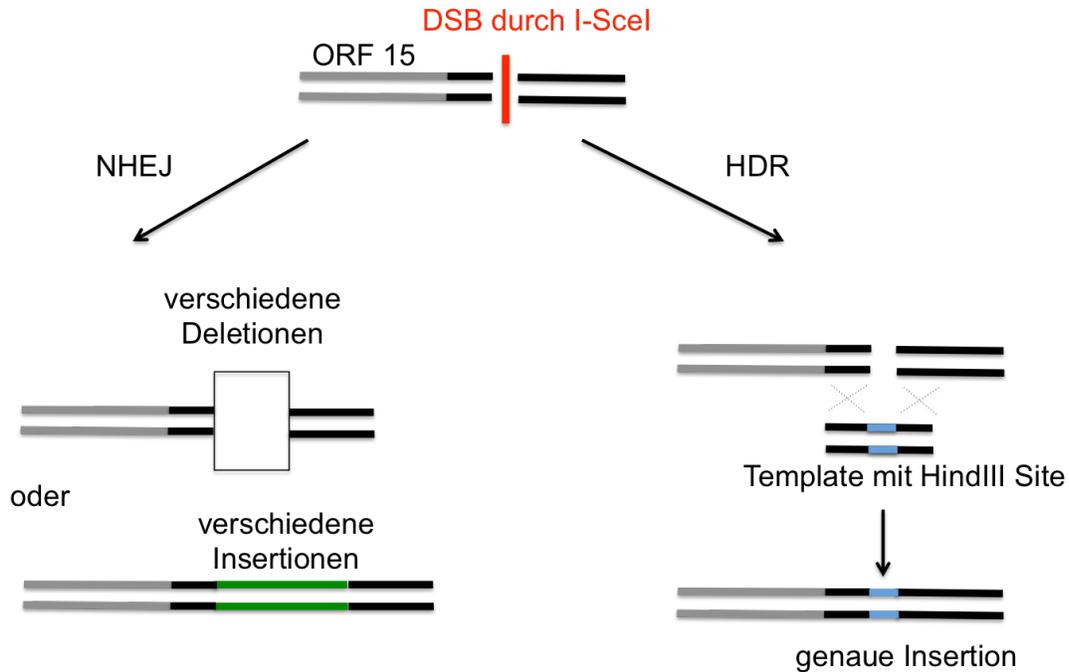


Abbildung 22: Genome editing nach DSB

Non-homologous end joining (links) im Vergleich zu *homology directed repair* (rechts) nach DSB durch I-SceI.

Neben der für I-SceI kodierenden Sequenz mit einem CMV- Promotor sollte in das Plasmid eine *gfp*-Kassette eingefügt werden (Abb. 23, A). Als Backbone diente ein pcDNA5firt-Vektor, in dem sich bereits ein bicistronischer T2A-Linker an ein *gfp* gekoppelt befand. Dieser Linker sorgt für die Herstellung zwei getrennter Proteine. Für die Klonierung aus dem Vektor pVAX-I-SceI wurde eine In-Fusion-PCR über den CMV-Promotor und I-SceI gemacht. Der pcDNA5firt-Vektor wurde ebenfalls mittels In-Fusion-PCR vorbereitet. Im Anschluss erfolgte die Ligation im Verhältnis 1:2 Vektor zu Insert.

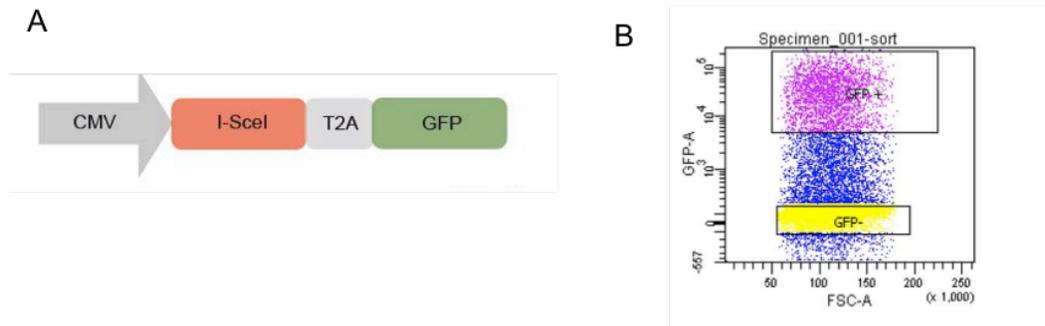


Abbildung 23: Genome editing.

A: I-SceI-GFP Expressionskassette. I-SceI ist durch ein bicistronisches T2A Linker-peptid an *gfp* gekoppelt. CMV dient als Promotor. B: FACS der GFP positiven (lila) und GFP negativen (gelb) Zellen. Als Kontrolle wurden neben den GFP positiven auch die negativen Zellen gated und aufgenommen.

3.4.1 Nachweis des *non-homologous end joining* in Zellkultur

Um nachzuweisen, ob die Homingendonuklease I-SceI im *Rpgr*-ORF15^{mut} Gen mit inserierter I-SceI Schnittstelle schneidet, wurde der SURVEYOR-Assay durchgeführt. Mit Hilfe dieses Assays ist es möglich, *non-homologous end joining* nachzuweisen. Für die Transfektion mit I-SceI wurden das Zellkultur-Modell (Kap. 3.1.2) verwendet. Neben dem I-SceI beinhaltet die Expressionskassette eine *gfp* cDNA-Sequenz zur Anreicherung der transfizierten Zellen (Abb. 23, A). 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und mittels FACS sortiert. Neben den GFP positiven Zellen wurden auch die GFP negativen Zellen aufgefangen und als Kontrolle verwendet (Abbildung 23, B).

Im Anschluss erfolgte die DNA-Isolierung (Abb. 24, A). Mittels PCR wurde der Bereich, in dem die I-SceI-Schnittstelle zu finden ist, amplifiziert. Außerdem wurde ein SURVEYOR-Assay durch T7-Endonuklease (T7E1)-Verdau (Kap. 2.3.11) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch die QiAxcel-Software. Das Resultat in Abbildung 24, B zeigt einen Anteil von 55 % NHEJ bei den GFP positiven Zellen. Die unsortierten Zellen zeigen 7 % NHEJ (Abbildung 24, B).

A Transfektion des Zellkultur-Modells B

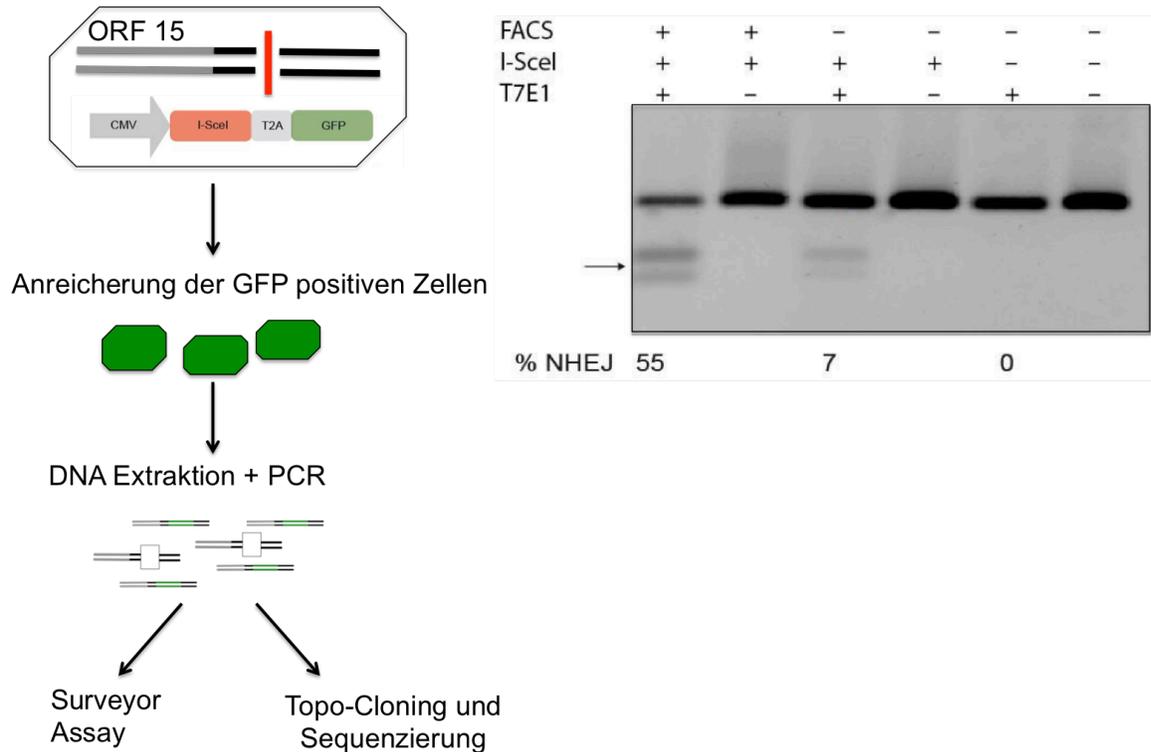


Abbildung 24: NHEJ *in vitro*.

A: Schematische Darstellung des Versuchs. Nach Transfektion des Zellkultur-Modells mit CMV-I-SceI-T2A-GFP erfolgte die Anreicherung der GFP-positiven Zellen. Im Anschluss wurde die DNA extrahiert und eine PCR über den ORF15-Bereich durchgeführt. Dann erfolgte der SURVEYOR-Assay und das TOPO-Cloning mit anschließender Sequenzierung der Klone. B: HEK293-ORF15^{mut}-Zellen wurden teilweise durch FACS angereichert (FACS +), mit I-SceI transfiziert (I-SceI +) und durch T7E1 verdaut (T7E1 +). NHEJ Anteil liegt bei 55%, 7% und 0%.

Um herauszufinden, was in den transfizierten Zellen im Detail auf DNA-Ebene durch die Zugabe von I-SceI passiert, wurde ein Screening mittels TOPOTM Cloning durchgeführt. Hierbei wurde das PCR-Produkt des SURVEYOR-Assays in einen pT-Vektor kloniert und 60 Klone gepickt. Diese wurden mittels Sanger-Sequenzierung genauer untersucht (Abb. 25). Dabei ergab sich, dass ca. die Hälfte der Klone keine Veränderungen im Bereich der I-SceI-Schnittstelle aufwiesen. Die restlichen Klone zeigten kleine Deletionen (bis 8 bp) und sehr große Insertionen (bis 152 bp).

		I-SceI ▼
Unverändert	31/60 (51,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAACCTAGGGGATAACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Deletion	4/60 (6,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAACCTAGGGGA - -ACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Deletion	6/60 (10,0%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAACCTA - - - - TAACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Deletion	3/60 (5,0%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAAC (-6bp) ATAACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Deletion	1/60 (1,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAA (-7bp) ATAACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Deletion	1/60 (1,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAACCTAGGGAT (-8bp) AATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Deletion	1/60 (1,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAACCTAG - - - - AACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Deletion	1/60 (1,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAAC - - - - -ATAACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Deletion	1/60 (1,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAACCTAG (-5bp)ACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
		I-SceI ▼
Ursprungssequenz		3'-CAGAAAAGCCATTACTAACCTAGGGATAA.....CAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Insertion	1/60 (1,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAACCTAGGGGATAA (+55bp) CAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Insertion	1/60 (1,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAACCTAGGGGATAA (+57bp) CAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Insertion	1/60 (1,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAACCTAGGGAT.....(+43).AACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Insertion	1/60 (1,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAACCTAGGGGATAA.....G.....CAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Insertion	1/60 (1,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAACCTAGGGGATAA(+58bp)..CAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Insertion	1/60 (1,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAACCTAGGGGATAA(+34bp)..CAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Insertion	1/60 (1,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAACCTAGGGGATA...TA.....ACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Insertion	1/60 (1,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAACCTAGGGGA (+152bp)AACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Insertion	1/60 (1,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAACCTAGGGGATAA (+48bp)CAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Insertion	1/60 (1,7%)	3'-CAGAAAAGCCATTACTAAC(+105bp)CTAGGGGATAACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'

Abbildung 25: Sequenzanalyse nach NHEJ

Ergebnisse des TOPOTM-Cloning der transfizierten HEK293-ORF15^{mut}-Zellen, mit I-SceI transfiziert, nach Anreicherung der GFP positiven Zellen und anschließender PCR über I-SceI Schnittstelle. Blau: Schnittstelle, rot: Deletionen, grün: Insertionen.

3.4.2 Nachweis der homologen Rekombination in Zellkultur

Nachdem das Zellkultur-Modell mit I-SceI und einem spezifischen Donor-Template transfiziert wurde, wurde eine spezifische PCR mit anschließendem HindIII-Verdau durchgeführt (Abb. 26, A), um herauszufinden, ob HR stattfindet. Hierfür wurde zunächst ein Donor-Template hergestellt, welches homolog zu der Gensequenz rund um die I-SceI-Schnittstelle im *Rpgr-ORF15^{mut}* ist. Dieses Template besitzt anstatt der I-SceI-Schnittstelle eine HindIII Schnittstelle (Abb. 26, B). Dieser Austausch dient der Detektion der HR. Somit wird außerdem sichergestellt, dass das Template nicht durch I-SceI verdaut wird. Der Nachweis der HR erfolgte ebenfalls an dem mit I-SceI transfizierten Zellkultur-Modell aus Kapitel 3.1.2. Neben der Endonuklease wurde das Donor-Template transfiziert. Auch hier wurde 48 Stunden inkubiert und im Anschluss durch FACS angereichert und die DNA isoliert. Nach erfolgter PCR um die I-SceI- bzw. HindIII-Schnittstelle erfolgte der Verdau mit HindIII. Das Ergebnis zeigt, dass ca. 32 % homologe Rekombination stattgefunden hat (Abbildung 26, C).

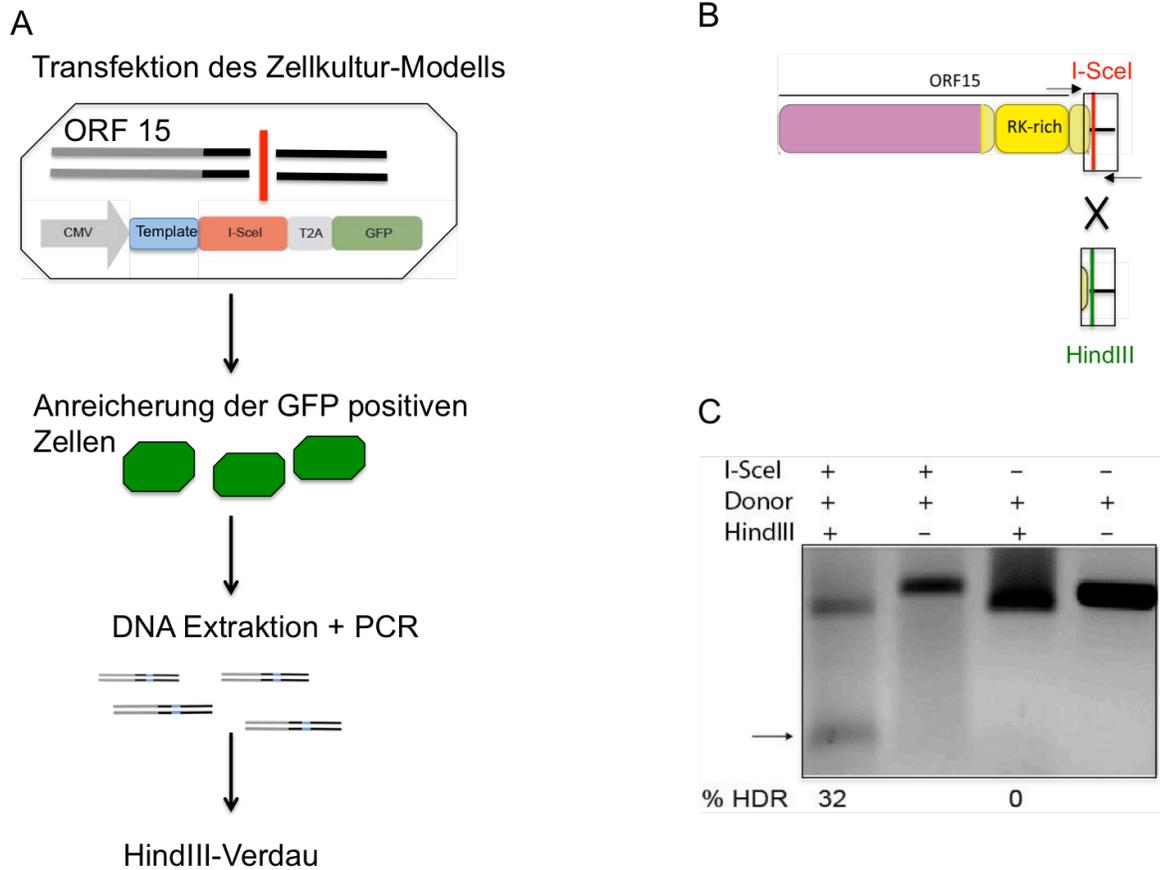


Abbildung 26: Homologe Rekombination *in vitro*.

A: Schematische Darstellung des Versuchs. Nach der Transfektion des Zellkultur-Modells erfolgte die Anreicherung der GFP-positiven HEK293-Zellen. Dann wurde die DNA extrahiert und eine spezifische PCR durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde mit HindIII verdaut um die HR nachzuweisen. B: HR Donor Template. Das Template ist homolog zum ORF15^{mut}, bis auf die HindIII-Schnittstelle. Pfeile stehen für die PCR-Primer. C: HindIII-Verdau. Transfektion von HEK293-ORF15^{mut}-Zellen mit I-SceI und Donor-Template. In Lane 1: PCR-Produkt der Zellen die mit I-SceI und Donor-Template transfiziert und mit HindIII verdaut wurden, zeigt 32% HR. Lane 2 bis 4 stellen Kontrollen dar.

Abschließend kann gesagt werden, dass NHEJ und HR relativ effizient *in vitro* am *Rpgr*-Lokus durchgeführt wird.

3.4.3 Herstellung der Plasmide für die AAV-Produktion

Um das *genome editing in vivo* an der Maus testen zu können, wurden AAVs hergestellt, die in der Lage sind, I-SceI und das Reportergen *gfp* exprimieren zu lassen. Hierfür erfolgte die Klonierung in einen SSV9-Vektor. Dieser beinhaltet zwei *inverted terminal repeats* (ITRs), zwischen die die durch das Virus einzuschleusende DNA kloniert werden muss. Es wurden drei verschiedene AAV-Konstrukte kloniert (Abb. 27). Neben dem in den Zellkulturversuchen verwendeten I-SceI-Konstrukt (CMV-I-SceI-T2A-GFP), welches einen CMV-Promotor besitzt,

wurde ein weiteres I-SceI-Konstrukt mit einem Rhodopsin-Kinase-Promotor (RK) hergestellt (RK-I-SceI-T2A-GFP). Der CMV-Promotor sorgt für die Expression in sämtlichen transduzierten Zellen. Der RK-Promotor hingegen ist ein Photorezeptor-spezifischer Promotor. Des Weiteren wurde für die homologe Rekombination ein AAV-Konstrukt hergestellt, das neben der Homingendonuklease und dem Reporter ein Template besitzt. Das Template liegt dabei vor dem Promotor (Abb. 27, RK-all-in-one). Bei diesen Klonierungen wurde darauf geachtet, dass das Gesamt-Konstrukt nicht größer ist als 4,7 kB, was in etwa der Kapazität der AAVs entspricht.

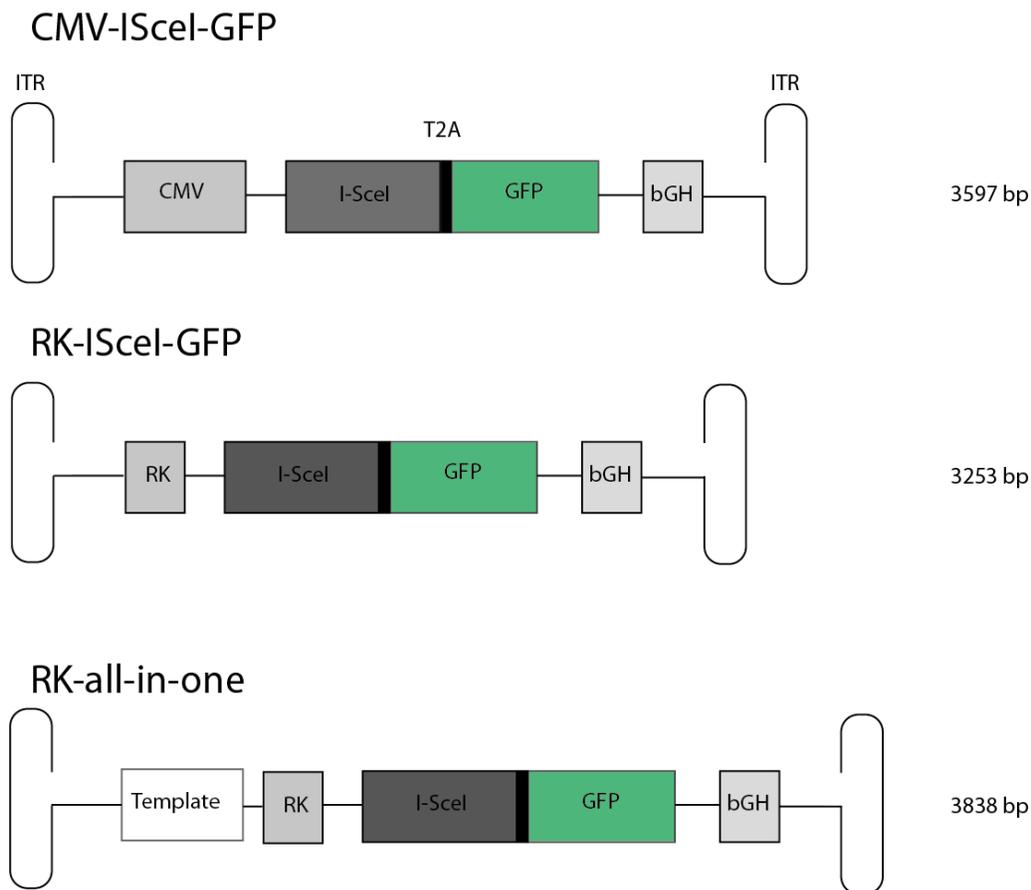


Abbildung 27: Schematische Darstellung der verwendeten SSV9-Vektoren

Dargestellt sind die verschiedenen AAV-Konstrukte, die für das *in vivo genome editing* verwendet wurden. ITR: *inverted terminal repeats*.

3.4.4 *In vivo genome editing*

Für die *in vivo genome editing* Versuche wurde zwei Monate alten B6J.Sv129-Rpgr^{tm1Sti}-Mäusen 1 µl der Vektorlösung subretinal injiziert. Die *in vivo*-Versuche wurden von Dr. Brigitte Müller und Bärbel Schäfer durchgeführt. Es wurden zunächst die Vektoren AAV2/5-CMV-ISceI-GFP

(Titer: 3.8×10^{11} vg/ml) und AAV2/8-RK-ISceI-GFP (Titer: 1.8×10^{11} vg/ml) verwendet, um NHEJ zu induzieren.

Acht Wochen nach Injektion wurden die Augen entnommen, die Retinae isoliert und die Zellen dissoziiert. Im Anschluss erfolgte die Anreicherung der GFP positiven Zellen mittels FACS (Abb. 28, 29).

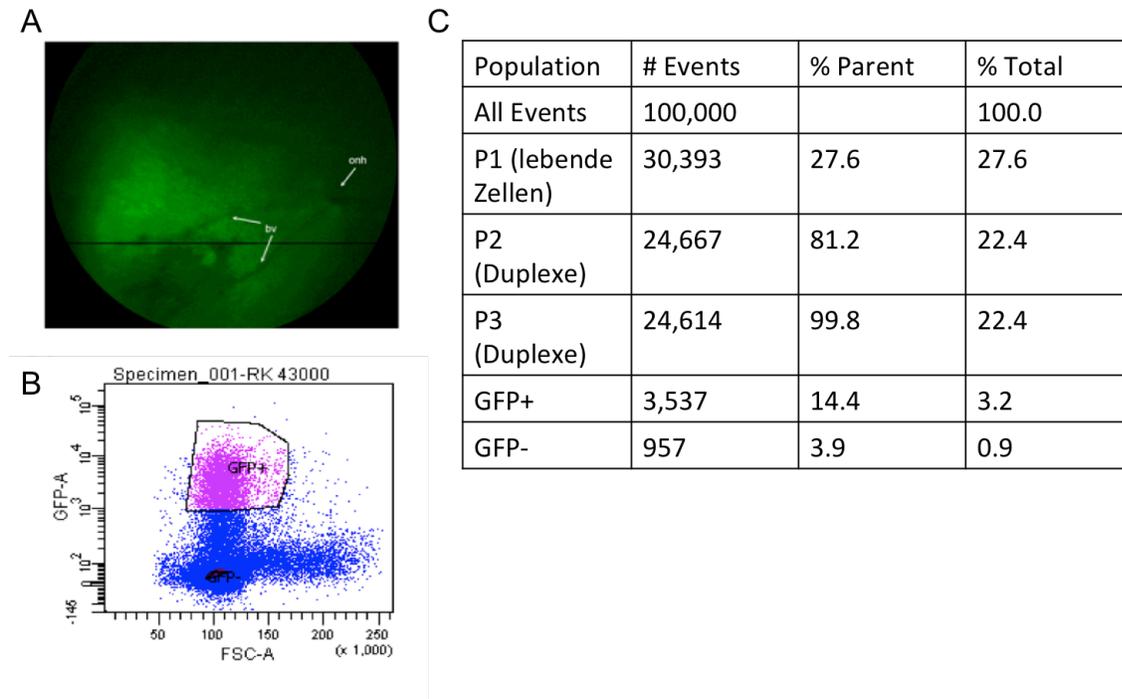


Abbildung 28: Retina, der mit AAV2/8.RK-I-SceI-T2A-GFP transduzierten Augen.

A: Fundus nach subretinaler Injektion mit AAV2/8.RK-I-SceI-T2A-GFP. Grüne Fluoreszenz zeigt positive Transduktion durch den AAV-Vektor. Onh: *optic nerv head*, Bv: *blood vessel*. B: FSC-A: *forward scatter*, beschreibt die Größe der detektierten Zellen, GFP-A zeigt die grüne Fluoreszenz an. Die eingerahmten Zellen (GFP+, lila) wurden durch das FACS angereichert. C: P1 bis P3 gibt die verschiedenen Gates an, hier werden lebende Zellen gegatet und Duplexe ausgeschlossen. Events: Zellen/Zellrümmer, die insgesamt vom Gerät gezählt wurden. % Parent: Anteil der Zellen, die mit dem vorherigen Gate übereinstimmen. % Total: Anteil der Zellen im Gate ausgehend von den Events insgesamt.

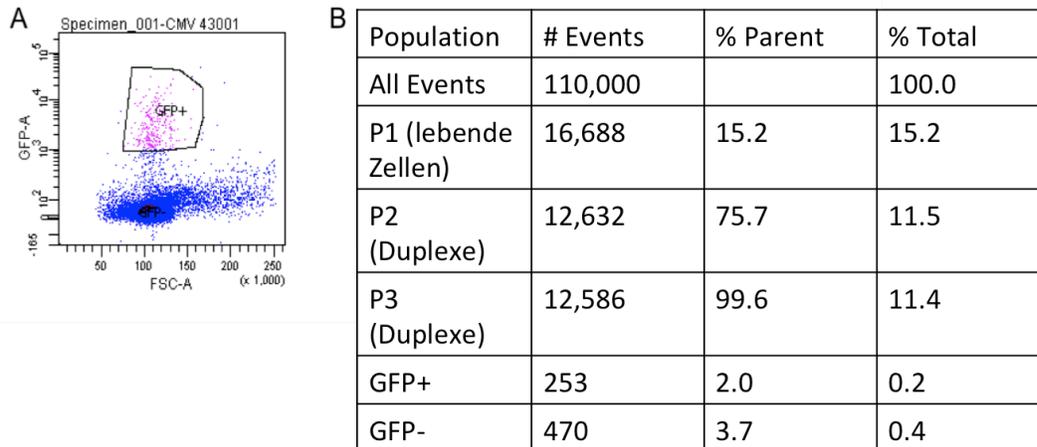


Abbildung 29: Sortireport nach subretinaler Injektion von AAV 2/5.CMV-I-SceI-T2A-GFP

A: FSC-A: *forward scatter*, beschreibt die Größe der detektierten Zellen, GFP-A zeigt die grüne Fluoreszenz an. Die eingekreisten Zellen (GFP+, lila) wurden durch das FACS angereichert. B: P1 bis P3 gibt die verschiedenen Gates an, hier werden lebende Zellen gated und Duplexe ausgeschlossen. Events: Zellen/Zelltrümmer, die insgesamt vom Gerät gezählt wurden. % Parent: Anteil der Zellen, die mit dem vorherigen Gate übereinstimmen. % Total: Anteil der Zellen im Gate ausgehend von den Events insgesamt.

Die Auswertung mittels FACS ergab einen prozentualen Anteil von 14,4 für die mit AAV 2/8 transduzierten Zellen (Abb. 28) und einen Anteil von 2,0 % für die mit AAV 2/5 transduzierten Zellen (Abb. 29). Die GFP positiven Photorezeptoren wurden angereichert und im Anschluss die genomische DNA isoliert. Es folgte der SURVEYOR-Assay um NHEJ nachzuweisen.

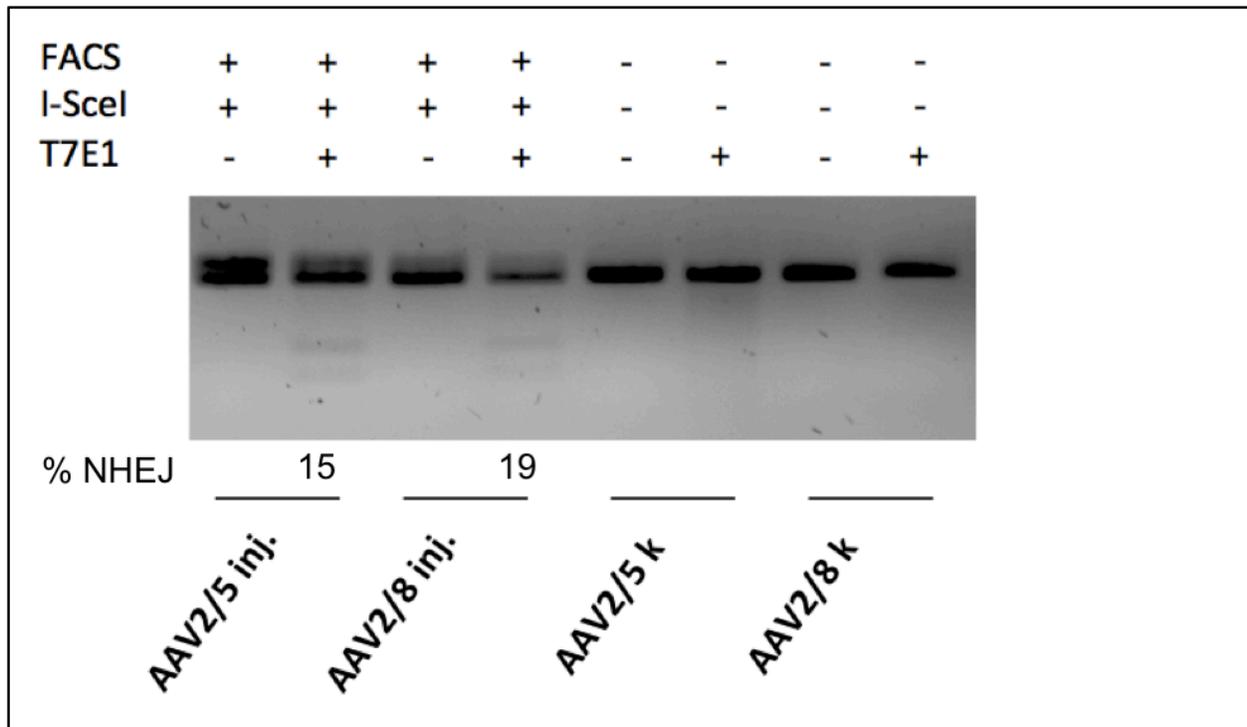


Abbildung 30: SURVEYOR-Assay der injizierten Augen

Lane 1 bis 4 zeigen PCR-Produkte der durch FACS angereicherten Zellen. Lane 1 und 3 zeigen negativ-Kontrollen, ohne T7E1-Verdau. Lane 5 bis 8 zeigen PCR-Produkte des jeweiligen untransduzierten Kontrollauges, mit und ohne T7E1-Verdau.

Der SURVEYOR-Assay zeigt eine NHEJ-Aktivität von 15 % für die mit AAV2/5 und 19 % für die mit AAV2/8 injizierten Augen (Abb. 30). Als Negativ-Kontrolle dienten PCR-Produkte des jeweils nicht injizierten Auges des Versuchstieres. Im Anschluss wurde genauer untersucht, welche Veränderungen sich auf Gen-Ebene durch das NHEJ vorfinden lassen. Dazu wurde, wie zuvor in den Zellkulturversuchen, das TOPOTM Cloning durchgeführt und mittels Sanger-Sequenzierung untersucht (Abb. 31). Es wurden 47 Klone der mit AAV2/8.RK-I-SceI-T2A-GFP transduzierten Retina untersucht, 45 zeigten keine Veränderung der Sequenz. Es konnte eine Insertion von 44 Bp und eine Punktmutation gezeigt werden. Von der mit AAV2/5.CMV-I-SceI-T2A-GFP transduzierten Retina wurden 111 Klone sequenziert, 100 zeigten hierbei keine Veränderung. Es wurden insgesamt fünf Insertionen und sieben Deletionen detektiert. Die größte Insertion besteht aus 72 Bp, die auf eine Mutation folgen. Die Deletionen liegen zwischen zwei und vier Bp. Außerdem traten drei verschiedene Mutationen auf.

AAV2/8.RK-I-SceI-T2A-GFP		
Unverändert 45/47	(95,8%)	3'-CAGAAAAGCCCATTAACCTAGGGATAACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Insertion 1/47	(2,1%)	3'-CAGAAAAGCCCATTAACCTAG (+44) ATAACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Punktmut. 1/47	(2,1%)	3'-CAGAAAAGCCCATTAACCTAGGGATAACAGGGTAATCTAAAATCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'

AAV 2/5.CMV-I-SceI-T2A-GFP		
Unverändert 100/111	(90,1%)	3'-CAGAAAAGCCCATTAACCTAGGGATAACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Mutation/Insertion 1/111	(0,9%)	3'-CAGAAAACAATCCCCAAAAGTAAGTAAAATAAT(+72) TCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Insertion 3/111	(2,7%)	3'-CAGAAAAGCCCATTAACCTAGGGATAAACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Insertion 1/111	(0,9%)	3'-CAGAAAAGCCCATTAACCTAGGGGATAACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Deletion 3/111	(2,7%)	3'-CAGAAAAGCCCATTAACCTAGGGATAA(-2)GGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Deletion 3/111	(2,7%)	3'-CAGAAAAGCCCATTAACCTAGGGATAA(-4) GTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Deletion 1/111	(0,9%)	3'-CAGAAAAGCCCATTAACCTAG (-4) AACAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Punktmut. 1/111	(0,9%)	3'-CAGAAAAGCCCATTAACCTAGGGATAACAGGGTAATCAAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Mutation 1/111	(0,9%)	3'-CAGAAAAGCCCATTAACCTAGGGAAAACACAGCCGTCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'

Abbildung 31: Sequenzanalyse nach NHEJ *in vivo*

Ergebnisse des TOPO™ Cloning der transduzierten Photorezeptoren mit AAV2/8.RK-I-SceI-T2A-GFP und AAV2/5.CMV-I-SceI-T2A-GFP, nach Anreicherung der GFP positiven Zellen und anschließender PCR über I-SceI-Schnittstelle. Blau: Schnittstelle, rot: Deletionen/Mutationen, grün: Insertionen.

Des Weiteren sollte geprüft werden, ob die homologe Rekombination durch Zugabe eines homologen Donortemplates *in vivo* im Auge induziert werden kann. Hierzu wurde der Vektor AAV2/8.Template.RK-I-SceI-T2A-GFP transduziert. Es wurde 1 µl Vektorlösung (Titer: 5×10^{10} vg/ml) bei zwei Monate alten B6J.Sv129-Rpgr^{tm1Sti}-Tieren injiziert. Acht Wochen nach Injektion erfolgte die Auswertung des Versuchs. Die Augen wurden entnommen, die Zellen der Retina dissoziiert. In diesem Fall wurde nach Photorezeptoren gesortet, da kein positives GFP-Signal zu erkennen war. Nach Extraktion der genomischen DNA erfolgte eine PCR. Im Anschluss wurde das TOPO™ Cloning durchgeführt. Die Sequenzanalyse zeigte, dass in zwei von 50 Fällen homologe Rekombination stattgefunden hat. Hierbei zeigt die Sequenzanalyse den Austausch der I-SceI-Erkennungssequenz durch eine HindIII-Erkennungssequenz wie sie im Donor-Template vorliegt (Abb. 32).

Ursprungssequenz	3'-CAGAAAAGCCCATTAACCTAGGGATAA.....CAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'
Nach HDR	3'-CAGAAAAGCCCATTAACCTAGGGATAAAAGCTTCAGGGTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCCAGACAACCTTGT-5'

Abbildung 32: Sequenzanalyse nach HR

Ursprungssequenz gibt die in den Zellen der Retina der B6J.Sv129-Rpgr^{tm1Sti}-Mäuse vorhandene Gensequenz an. Die I-SceI-Erkennungssequenz ist in blau markiert. Nach HDR zeigt die Sequenz nach Behandlung mit AAV2/8.Template.RK-I-SceI-T2A-GFP an. In rot ist die HindIII-Erkennungssequenz angegeben.

3.4.5 Vergleich der DNA-Reparatur *in vitro* und *in vivo*

Vergleicht man die Ergebnisse des SURVEYOR-Assays *in vitro* in Zellkultur und *in vivo* in den Photorezeptoren der Maus, wird deutlich, dass die Reparatur durch NHEJ in HEK293-Zellen mit 55 % zu maximal 19 % deutlich aktiver ist als *in vivo* (Tabelle 15). Diese Beobachtung lässt sich auch für die HR machen, die *in vivo* mittels PCR, HindIII-Verdau und anschließender Gelelektrophorese nicht zu detektieren war, jedoch in der Sequenzanalyse gezeigt werden konnte. Betrachtet man die Sequenzanalyse nach TOPO-Cloning, werden ebenfalls Unterschiede zwischen *in vitro* und *in vivo* deutlich (Tabelle 15). *In vivo* sind einige neue Mutationen aufgetreten, bei denen es sich nicht um Insertionen oder Deletionen handelt, die Sequenz jedoch verändert wurde. Sowohl in Zellkultur, als auch in den Photorezeptoren handelt es sich um eher kleine Deletionen und große Insertionen. Allgemein treten Deletionen etwas häufiger auf als Insertionen.

Tabelle 15: Vergleich DNA-Reparatur *in vitro* und *in vivo*

	In vitro	In vivo
NHEJ	55 %	19 %
HDR	32 %	Sehr gering
(Punkt-)Mutationen	0	4
Deletionen	Max. -8	Max. -4
Insertionen	Max. +152	Max. +72
Anzahl Deletionen	30,0 %	4,4 %
Anzahl Insertionen	16,7 %	3,8 %

4. Diskussion

Der Begriff Retinitis Pigmentosa umfasst eine Vielzahl von genetischen Ursachen, die zu Netzhautdegenerationen führen. Die X-chromosomale Retinitis Pigmentosa kann durch unterschiedliche Mutationen in verschiedenen Genen hervorgerufen werden. Hierbei ist eines der am häufigsten betroffenen Gene das *RPGR*. Da es eine hoch repetitive Sequenz besitzt, ist dieser Teil des Gens, genannt ORF15, sehr anfällig für Mutationen jeglicher Art und gilt daher als *mutational hotspot*. Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es keine Behandlungsmöglichkeit für die XLRP. Es wird jedoch mit Hochdruck an Therapieansätzen geforscht. Hier ist vor allem die Gentherapie in den Fokus gerückt. Das Auge ist ein hervorragendes Model für die Entwicklung solcher Therapien (Yanik *et al.*, 2017). Die Retina im Besonderen ist leicht zugänglich für therapeutische Anwendungen und ermöglicht eine gute Sichtkontrolle durch nichtinvasive Methoden (Petit, Khanna, Punzo, 2016).

Ziel dieser Arbeit war es, Grundlagen für einen gentherapeutischen Ansatz zur Behandlung der XLRP zu schaffen. Hierbei wurde neben einer klassischen gentherapeutischen Strategie, der RNA-Interferenz, auch das *genome editing* näher untersucht.

4.1 Strategien der Gentherapie

Ziel der Gentherapie ist es ein Gen, oder Teile dessen in die Zielzelle zu bringen, in der sie einen therapeutischen Nutzen ausüben (Stieger, Lorenz, 2010). Es existieren verschiedene Möglichkeiten der gentherapeutischen Anwendung. Vor allem bei Krankheiten, die das menschliche Auge betreffen, sind im Bereich der Genaddition große Fortschritte zu verzeichnen. Bei der Genaddition wird eine „gesunde“ Kopie des mutierten Gens mit Hilfe von Viren in die Zielzellen gebracht. Hier soll die neu eingebrachte Kopie die Aufgabe des mutierten Gens übernehmen. Dies kann nur in solchen Fällen gelingen, in der die Mutation zu einem Verlust der Funktion des Proteins führt. Einige Ansätze haben es bereits in die klinische Phase gebracht: RPE65-Leber congenital amaurosis, MERTK-associated autosomal recessive retinitis pigmentosa und das Usher Syndrom sind nur einige Beispiele (Boye *et al.*, 2013).

Ist die krankheitsauslösende Mutation hingegen dominant negativ, muss das betroffene Gen stillgelegt werden, da es ein „schadhaftes“ Protein produziert. Hier kommt die RNA-Interferenz ins Spiel. Durch das Anlagern kurzer, komplementärer siRNAs an die Ziel-mRNA wird diese

degradiert, wodurch kein Protein entsteht. Beispielsweise konnte im GCAP1-Mausmodell mittels RNAi nachgewiesen werden, dass es möglich ist, die Degeneration der Photorezeptoren aufzuhalten (Jiang, Frederick, Baehr, 2014). SiRNAs wurden schon in einigen klinischen Studien verwendet, darunter die Behandlung der Altersbedingten Makuladegeneration (AMD), das Diabetische Makulaödem (DME) und das Glaukom (Ozcan *et al.*, 2015).

Die neuste Methode der Gentherapie ist das *genome editing*. Im Gegensatz zu den anderen Therapien wird hier die Mutation an ihrem Ursprung angegangen - in der DNA-Sequenz des zu behandelnden Organismus. Mit Hilfe von „Genschere“ werden Doppelstrangbrüche in der DNA erzeugt, die zu einer Anregung der zelleigenen Reparaturmechanismen führen. Im Vergleich zu den anderen Gentherapie-Strategien bietet das *genome editing* die Möglichkeit, die Retina auf genomischer Ebene in ihren Wildtyp-Status zu führen. Hierdurch werden Probleme umgangen, die sowohl die Genaddition als auch die RNA-Interferenz mit sich führen. Dabei handelt es sich vor allem um die Menge an Protein, die durch einen künstlich eingebrachten Promotor entsteht, der nicht durch die Zelle reguliert wird. So wird durch die Genaddition ständig das eingebrachte Gen abgelesen und das Protein hergestellt. Durch das Stilllegen eines Gens mittels RNAi wird hingegen kein Protein produziert, daher geht die eigentliche Funktion des Proteins verloren.

4.1.1 RNA-Interferenz

Bei der RNAi handelt es sich um eine effektive Methode, Gene stillzulegen, die für dominante Dystrophien der Retina verantwortlich sind (Jiang, Frederick, Baehr, 2014). Ihre Fähigkeit, Gene stillzulegen, hat sie auch zu einem effektiven Werkzeug in der Grundlagenforschung gemacht. Es ermöglicht, die Funktion von Genen zu bestimmen (de Fougères *et al.*, 2007).

Die passenden siRNAs für die Stilllegung des *Rpgr*-ORF15 wurden mit Hilfe des *online-tools* siRNA Wizard der Firma Invivogen ermittelt. Für die Wahl der siRNAs wurde der Bereich des Gens verwendet, der nur in der ORF15-Isoform exprimiert wird, damit die fünf anderen Isoformen des Gens nicht beeinträchtigt werden. Drei der vier siRNAs liegen vor der repetitiven Sequenz des *Rpgr*, womit erreicht werden sollte, dass die mRNA, die die repetitive Sequenz enthält, degradiert wird. Um die Anlagerung der siRNA an die repetitive Sequenz zu testen,

wurde auch hier eine weitere siRNA entworfen. Da jedoch bekannt ist, dass die siRNAs, genau wie ihr natürliches Konterfei, die miRNAs in der Lage sind, *missmatches* zu tolerieren (Ozcan *et al.*, 2015), wurden Probleme mit dieser vierten siRNA erwartet. Demnach könnte die siRNA ebenso im hinteren Teil des ORF15 an die mRNA binden, wodurch der vordere Teil noch translatiert wird.

Neben den vier shRNAs, die in den Zielzellen zu siRNAs prozessiert werden, erfolgte die Klonierung jeweils einer *scrambled*-Variante der shRNA als Kontrolle. Hierbei handelt es sich um die gleiche Anzahl (21 nt) und die gleichen Nukleotide wie in der jeweiligen siRNA. Lediglich die Reihenfolge der Nukleotide ist verändert. Die *scrambled*-siRNAs sind jedoch nicht völlig willkürlich gewählt, auch sie wurden mit Hilfe des siRNA Wizards von Invivogen ausgesucht. Dabei wird darauf geachtet, dass sich die *scrambled*-siRNA nicht homolog zu einer anderen mRNA-Sequenz im Zielorganismus verhält (Horizon, 2014). Ansonsten könnte es zu Veränderungen in den Zielzellen kommen.

Es wurde für alle verwendeten siRNAs eine Länge von 21 Nukleotiden gewählt, da bei der Auswahl der siRNA-Sequenz eine Länge von 19 bis 21 Nukleotiden empfohlen wird. Alle vier siRNAs besitzen ein Guanin am 5' Ende der Sequenz. SiRNAs mit einem Guanin am 5' Ende und einem Adenin oder Uracil am 3' Ende werden favorisiert (Vermeulen *et al.*, 2005), da sie eine niedrige interne Stabilität am 5' Ende besitzen, die statistisch gesehen von Vorteil ist. Ein weiteres Kriterium für die Wahl eines Purins am 5' Ende der Sequenz ist die Tatsache, dass die Expression der RNAs von einem RNA-Polymerase-III-Promotor nur effizient ist, wenn ein Purin am Anfang steht (Vermeulen *et al.*, 2005). SiRNA 2 und 4 besitzen am 3' Ende ein Adenin. Bei siRNA 1 liegt hier ein Guanin, bei siRNA 3 ein Cytosin. Auf Grund der Sequenz war es an dieser Stelle nicht möglich, ein Thymin oder Adenin zu wählen. Bei allen verwendeten siRNAs liegt der GC-Gehalt zwischen 33 und 43 %, denn es wird empfohlen, einen GC-Gehalt zwischen 30 und 55 % zu wählen, da ein hoher GC-Anteil das Entwinden des Doppelstrangs inhibiert (Birmingham *et al.*, 2007). Durch den siRNA Wizard wird zudem darauf geachtet, Sequenzen, die mehrfach im Organismus auftauchen auszusortieren, indem ein BLAST gegen eine mRNA-Datenbank durchgeführt wird. Hierbei werden Sequenzen aussortiert, deren Gemeinsamkeit mit einer anderen mRNA über 13 aufeinanderfolgenden Nukleotiden liegt. Natürlich vorkommende miRNAs besitzen so genannte Seed-Regionen (Position 13-18), die Targetsequenzen erkennen

und zu diesen perfekt homolog sind (Ozcan *et al.*, 2015). Bisher konnten 62 Seed Regionen in Mensch, Maus und Ratte identifiziert werden. Diese gilt es beim Design der siRNA ebenfalls auszuschließen (Birmingham *et al.*, 2007). Für den *hairpin loop* der shRNA wird ein *loop* von 7 Nukleotiden mit der Sequenz TCAAGAG verwendet.

Wie bei einigen anderen gentherapeutischen Tools treten auch bei der Verwendung der siRNAs Probleme durch *off-targeting*-Effekte auf. Eine mögliche Ursache liegt in der Toleranz von *missmatches* (Snøve, Holen, 2004). Daher ist es wichtig, die siRNA genau auszuwählen, sodass die Wahrscheinlichkeit reduziert wird, dass andere Sequenzen ebenfalls erkannt werden.

Nach erfolgreicher Klonierung der vier siRNAs und der dazugehörigen scsiRNAs erfolgte die quantitative Analyse der *knockdown*-Effizienz durch qPCR. Zuvor wurden HEK293-ORF15^{mut}-Zellen transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und per FACS die GFP positiven Zellen angereichert. Durch die FACS-Anreicherung wird das Ergebnis der qPCR nicht durch untransfizierte Zellen verfälscht, da die Transfektionseffizienz zwischen 12 und 27 % lag und demnach große Unterschiede aufweist. Die quantitative Analyse der vier verschiedenen siRNAs ergab einen signifikanten Unterschied für die ersten drei siRNAs im Vergleich zu den mit scsiRNA transfizierten Kontrollen. SiRNA 2 zeigt dabei mit einer *knockdown*-Effizienz von ca. 60 % die größte Veränderung der Genexpression. SiRNA3 zeigt eine *knockdown*-Effizienz von ca. 40 %, obwohl sie nahezu die identische Sequenz wie siRNA2 erkennt. Die Erkennungssequenz ist lediglich um eine Base verschoben. Die Sequenzen unterscheiden sich jedoch in der Hinsicht, dass siRNA2 am 3' Ende ein Adenin besitzt, siRNA3 hingegen ein Cytosin. Ein Adenin an dieser Position stellt wie bereits erwähnt einen Vorteil dar (Vermeulen *et al.*, 2005). SiRNA4 zeigt im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Unterschied in der Genexpression. Ein möglicher Grund hierfür stellt die Bindung der repetitiven Sequenz dar. SiRNA 4 bindet im vorderen Teil der repetitiven Sequenz. Da jedoch bekannt ist, dass siRNAs, *missmatche* tolerieren (Ozcan *et al.*, 2015), bindet siRNA4 eventuell auch am Ende der repetitiven Sequenz, wodurch der davor liegende Teil des Gens nicht vom *knockdown* betroffen ist.

In dieser Arbeit wurde SiRNA2 sowohl mit siRNA1 als auch mit siRNA3 kombiniert. Hierbei wurde darauf abgezielt, dass die Chance steigt, falls eine siRNA nicht an die Ziel-mRNA in einer Zelle bindet, die andere siRNA binden kann. Um die *knockdown*-Effizienz zu erhöhen, kann es

demnach nötig sein, verschiedene siRNAs zu kombinieren (Matsumoto, Niimi, Kohyama, 2012; Sriram *et al.*, 2013). Des Weiteren können *off-target*-Effekte minimiert werden, wenn siRNAs kombiniert werden, da die Konzentration der einzelnen siRNAs sinkt (Birmingham *et al.*, 2007). Bei der Kombination der verschiedenen siRNAs ergab sich jedoch keine Verbesserung der *knockdown*-Effizienz. Da siRNA 2 und 3 eine ähnliche Sequenz binden, könnte die Entstehung von Duplexen diesen Effekt erklären.

Anhand von siRNA2 sollte außerdem untersucht werden, ob die Länge des Experiments einen Einfluss auf die *knockdown*-Effizienz hat. Daher wurde die Zeit zwischen Transfektion und Ernte der Zellen von 24 (Milstein *et al.*, 2013) auf 48 Stunden erhöht. Hier zeigte sich jedoch keine Veränderung der Genexpression.

Um die Ergebnisse der quantitativen Analyse im Hinblick auf das Gesamtprotein zu bestätigen, wurde ein Westernblot durchgeführt. Hierbei wurde neben der siRNA2 das gesamte *Rpgr*-ORF15^{mut} in HEK293-Zellen transfiziert. Dabei stellte sich heraus, dass im Gegensatz zur Kontrolle, in der mit scsiRNA2 transfiziert wurde, kein RPGR-ORF15^{mut} gebildet wird. Demnach konnte in HEK293-Zellen eine effektive siRNA für den *knockdown* des RPGR-ORF15^{mut} gefunden werden. Da eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der *knockdown*-Quantifizierung mittels qPCR an HEK293-ORF15^{mut}-Zellen und den mit gesamt *Rpgr*-ORF15^{mut} transfizierten Zellen vorliegt, sollte im weiteren Vorgehen eine Zelllinie hergestellt werden, die das gesamte *Rpgr*-ORF15^{mut} exprimiert.

Durch die Stilllegung des *RPGR*-ORF15 würde dessen wichtige Rolle im CC der Photorezeptoren verloren gehen. Ein weiterer Schritt in Richtung einer erfolgreichen Gentherapie wäre die Genaddition eines funktionsfähigen *RPGR*-ORF15, zusätzlich zur Stilllegung des mutierten Gens. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine *Rpgr*-ORF15-Variante, die eine um 654bp verkürzte repetitive Sequenz enthält, einen Wildtyp Phänotyp in der Maus hervorruft (Hong *et al.*, 2005). Mäuse, die kein RPGR produzieren, weisen eine Degeneration der Photorezeptoren auf (Hong *et al.*, 2005). Die verkürzte Variante könnte demnach zusammen mit einer siRNA in einen AAV verpackt werden. In Kombination mit der RNAi müsste eine hinzugefügte funktionsfähige RPGR-ORF15-Variante außerdem Codon-optimiert sein. Dies bedeutet, dass an der Stelle, die normalerweise von der siRNA erkannt wird, andere Nukleotide eingebaut werden, die jedoch für die gleiche Aminosäure codieren, wie das ursprüngliche Gen.

Im RPGR-Hundemodell konnte die Funktion des *RPGR*-ORF15 außerdem mit Hilfe des humanen *RPGRs* verpackt in einem AAV Vektor des Serotyps 2/5 wieder hergestellt werden (Beltran *et al.*, 2014). Des weiteren wurde, um der Problematik der Instabilität der Purin-reichen Sequenz des ORF15 entgegen zu wirken, eine Codon-Optimierte Version des Gens entwickelt, die *in vitro* eine verbesserte Stabilität zeigte (Fischer *et al.*, 2017). Die Addition birgt jedoch die Gefahr der Überproduktion des Zielgens, da hier keine „normale“ Regulierung der Proteinbiosynthese durch die Zelle stattfindet. Außerdem kann es zu Interaktionen zwischen dem rekombinanten und dem mutierten Protein kommen.

Ein großer Nachteil des *silencing* in Kombination mit der Genaddition ist, dass nicht die wt-Situation in der jeweiligen Zelle wiederhergestellt werden kann. Die Transkription des mutierten Gens wird immer noch durch die Zelle ausgeführt. Die Verwendung von siRNAs in sich teilenden Zellen ist nicht optimal, da bei jeder Zellteilung der siRNA-Gehalt sinkt (Kim, Rossi, 2007). Da die Retina aus postmitotischem Gewebe besteht, kann diese Problematik hier wahrscheinlich vernachlässigt werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Wirkung der siRNA auch in postmitotischem Gewebe mit der Zeit nachlässt und der Organismus so einer erneuten Behandlung unterzogen werden müsste.

4.1.2 *Genome editing*

Durch die Entdeckung des CRIPR-Cas9 Systems im Jahr 2012 durch Emanuelle Charpentier und Jennifer Doudna ist das *genome editing* in den Fokus gerückt. Bis zu diesem Zeitpunkt war es weitaus schwieriger, eine „Genschere“ zu entwickeln, die eine spezifische Sequenz in der DNA ohne *off-target*-Effekte erkennt und schneidet. Der entscheidende Unterschied zwischen dem CRISPR/Cas9-System und den bis dahin verwendeten Nukleasen ist die Erkennung der Ziel-DNA. Während die DNA-Bindung bei Meganukleasen, ZFNs und TALENs durch Protein-DNA-Interaktion zustande kommt, erfolgt die Bindung des Cas9 Proteins über eine *guideRNA* (Cox, Platt, Zhang, 2015b). Hierbei ist es also nicht notwendig, Proteine so zu verändern, dass sie bestimmte Sequenzen erkennen, was mit langwierigen und teuren Verfahren einhergeht. Stattdessen genügt die Herstellung einer kurzen *guideRNA*. Durch die Vereinfachung der Erzeugung von DSB durch das CRISPR/CAS9-System hat die HR an Status gewonnen und wird für viele Anwendungen verwendet, beispielsweise bei der Herstellung von Tiermodellen (Yanik *et al.*, 2017).

Für das *genome editing* wurde die Homingendonuklease I-SceI verwendet, um DSB im *Rpgr* zu erzeugen. Diese Nuklease wurde gewählt, da das Mausmodell, dessen Behandlung Kern dieser Experimente ist, eine integrierte I-SceI Schnittstelle besitzt. I-SceI ist der Gold-Standard unter den Nukleasen, was vor allem an ihrer hohen Spezifität und der niedrigen Toxizität liegt. Die Programmierung der Meganukleasen stellt ein großes Problem in der Anwendung an beliebigen Sequenzen dar. Die Erkennungssequenz einer Meganuklease zu verändern ist nur durch Proteinengineering möglich und mit hohem Aufwand verbunden, wodurch ihr Einfluss im Bereich des *genome editings* stark zurück gegangen ist (Yanik *et al.*, 2017). Neue Methoden wurden jedoch entwickelt, um dieses Problem zu lösen. Dabei wird die DNA-Binderegion eines *transcription activator-like effector* (TALE) verwendet, der an den Teil einer Meganuklease gekoppelt ist, der sequenzunabhängig ist (Kleinstiver *et al.*, 2014). Demnach soll so eine sehr spezifische, jedoch kompakte Nuklease entstehen, eine so genannte megaTAL (Boissel *et al.*, 2014). Neben den bereits erwähnten Vorteilen besitzen die Homingendonukleasen einen weiteren Vorzug. Dieser liegt in der Kürze der kodierenden Basenpaarsequenz. I-SceI beispielsweise wird durch ca. 700 bp kodiert. Dies spielt eine wichtige Rolle bei der Verpackung der Nuklease in ein Transportvehikel, das benötigt wird, um in die Zielzelle zu gelangen. Hierbei werden bei Behandlungen im Auge vor allem rAAVs eingesetzt. Diese besitzen eine maximale Cargo-Kapazität von ca. 5 kb, wobei die optimale Beladung zwischen 4.1 und 4.9 kb liegt (Dong, Fan, Frizzell, 1996). Bei der Verwendung einer Meganuklease ist es demnach möglich, neben der kodierenden Sequenz für die Nuklease mit dem passenden Promotor nicht nur das Template, welches für die homologe Rekombination benötigt wird, in einen einzigen Vektor zu verpacken, sondern auch weitere Tools, beispielsweise ein Reportergen wie das hier verwendete *gfp*.

Nachdem ein DSB in der Zielzelle erzeugt wurde, können die freien Enden der DNA durch das *non-homologous end joining* religiert werden. Das NHEJ findet während des gesamten Zellzyklusses statt (Lieber, 2008). Durch das NHEJ kann es zu einer Vielzahl unterschiedlicher Ergebnisse der DNA-Religierung kommen, wodurch die Sequenz demnach nicht in ihren ursprünglichen Zustand überführt wird (Lieber, 2008). Dies kommt zustande, da das Zusammenspiel der Nukleasen, Polymerasen und Ligasen unterschiedlich ausfallen kann (Lieber, 2008). In dieser Arbeit wurde ein DSB durch I-SceI in HEK293-ORF15^{mut}-Zellen erzeugt und eine Sequenzanalyse durchgeführt. Die Analyse (Abbildung 25) zeigt, dass eine hohe Variabilität im Bereich der I-SceI-Schnittstelle besteht. Die durch das NHEJ entstandenen Deletionen bei 60

untersuchten Klonen liegen zwischen zwei und acht Nukleotiden, wobei sich die Position der Deletionen von Klon zu Klon unterscheiden. Die Insertionen zeigen eine noch größere Variabilität. Eine maximale Insertion von 152 Nukleotiden konnte hier gezeigt werden, die geringste Insertion lag bei einem Basenpaar. Die Sequenzanalyse veranschaulicht die Ungenauigkeit des NHEJ in HEK293-Zellen. Durch diese kann es zu schwerwiegenden Mutationen kommen, die bei der Verwendung des NHEJ als Mittel der Gentherapie berücksichtigt werden müssen. Die untersuchten Zellen wurden vor der Sequenzanalyse mittels FACS angereichert. Dies wurde durch das Einfügen eines Reportergens (*gfp*) möglich. Der Vergleich zu den nicht angereicherten Zellen zeigt deutlich den Vorteil, der durch die Anreicherung entsteht. Die unsortierten Zellen, unter denen sich auch nicht-transfizierte befinden, zeigt im SURVEYOR-Assay 7 % NHEJ. Im Vergleich dazu zeigen die angereicherten Zellen mit 55 % NHEJ einen ca. acht-fach erhöhten NHEJ-Anteil.

Im Vergleich zum Fehlerbehafteten NHEJ ist die HR eine sehr genaue Methode der DNA-Reparatur. In der Zelle findet die HR normalerweise nur in der S- und G2-Phase des Zellzyklus statt, da hier die Schwesterchromatide als Template dienen (Lieber, 2008; Cox, Platt, Zhang, 2015a). Da es sich bei der Retina um postmitotisches Gewebe handelt, somit keine Zellteilung stattfindet, wird davon ausgegangen, dass das *genome editing* hier vor einem Problem steht. Die DNA-Reparaturmechanismen der Retina sind jedoch noch weitgehend unerforscht. Um die DSB-Reparatur in Stäbchen nachzuweisen, wurden in einer Studie DSB induziert und deren Reparatur beobachtet. Hierbei stellte sich heraus, dass innerhalb eines Tages die Hälfte der DSB korrigiert wurde (Frohns *et al.*, 2014). Dies ist möglicherweise auf die Tatsache zurückzuführen, dass Stäbchen von Mäusen eine besondere Verteilung des Heterochromatins im Zellkern besitzen (Solovei *et al.*, 2013). Da diese Struktur beim Menschen nicht zu finden ist, sollte dies berücksichtigt werden. In einer weiteren Studie konnte festgestellt werden, dass die DSB-Reparatur in der Mausretina nicht dem „normalen“ Weg folgt. Die Proteine H2AX und 53BP1 spielen eine wichtige Rolle bei der Erkennung von DSB. Deren Kolokalisation konnte jedoch nur zu einem sehr geringen Anteil bei induzierten DSB entdeckt werden (Müller *et al.*, 2018). Es wird daher davon ausgegangen, dass andere Proteine eine Rolle bei der DSB-Erkennung in den Retinazellen spielen (Müller *et al.*, 2018). Neben dem NHEJ wurde zunächst untersucht, ob auch die HR in HEK293-ORF15^{mut}-Zellen stattfindet. Mit Hilfe eines Donor-Templates, in dem die I-SceI-Schnittstelle durch eine HindIII-Schnittstelle ersetzt wurde, konnte die homologe

Rekombination nachgewiesen werden. Hierbei wurden die Zellen neben dem I-SceI-T2A-GFP Vektor mit einem Vektor transfiziert, der das Template beinhaltet. Es erfolgte die Anreicherung der positiv transfizierten Zellen mittels FACS. Nach PCR und Verdau mit HindIII konnte ein Anteil von 32 % HR gezeigt werden. Da HEK-Zellen jedoch keine postmitotischen Zellen darstellen, kann hierdurch keine Aussage über die Effizienz in Photorezeptoren getroffen werden. Im Folgenden wurden daher AAV-Konstrukte hergestellt, die HR *in vivo* im Auge induzieren können.

Um herauszufinden, ob *genome editing* mittels NHEJ und/oder HR in den Photorezeptoren der Maus möglich ist, musste zuerst ein passendes Vehikel gewählt werden, um die *genome editing*-Tools in die Zielzellen zu bringen. Es gibt verschiedene Systeme, die es ermöglichen, Gene in die Retina zu bringen. Dazu zählen AAVs, Lentiviren, Supercharged Proteins und Nanopartikel. Lentiviren und AAVs sind hierbei die am besten untersuchten Systeme, die bereits in einigen klinischen Studien Verwendung finden. Bei der Entscheidung für das richtige Vehikel müssen die Langlebigkeit des zu exprimierenden Gens, die Immunantwort des Zielorganismus sowie die Kapazität des Systems betrachtet werden. In den *in vivo* Experimenten wurde der Gentransfer mittels rAAVs aus verschiedenen Gründen gewählt. Zum einen deuten Studien darauf hin, dass die HR durch die Anwesenheit von AAVs stimuliert wird (Gaj, Epstein, Schaffer, 2015). Des Weiteren wird auch postmitotisches Gewebe transduziert (Baba *et al.*, 2012). Es wurden außerdem verschiedene rekombinante AAV Serotypen (rAAV) hergestellt, die auf die Transduktion unterschiedlicher Zellen spezialisiert sind. Neben dem Serotyp 2 sind auch die Serotypen 5, 8 und 9 in der Lage, die Zellen der Retina zu transduzieren (Yanik *et al.*, 2017). Im Gegensatz zu Lentiviren integrieren AAVs nicht in das Genom der Zielzelle. Dies ist im Fall des *genome editings* auch nicht erwünscht, da eine einmalige Reparatur in der Zelle ausreicht. Daher ist das AAV dem Lentivirus hier vorzuziehen. Im Vergleich zum AAV sind Lentiviren in der Lage, DNA-Sequenzen bis zu 8 kB aufzunehmen (Trapani, Puppo, Auricchio, 2014). Aufgrund der geringen Größe des verwendeten I-SceI-Konstrukts, konnte dieser Vorteil jedoch außer Acht gelassen werden.

Das *in vivo genome editing* stellt eine Lösung der Probleme der klassischen Gentherapie dar. Diese haben vor allem mit der Menge und begrenzten Zeit der Expression des Transgens zu tun (Yanik *et al.*, 2017). Ziel des *genome editings* ist es, den Wildtyp-Status der behandelten Zellen

zu erreichen. In dieser Arbeit konnte zum ersten mal *in vivo genome editing* durch die Homingendonuklease I-SceI im *Rpgr*-ORF15-Lokus nachgewiesen werden. Hierzu wurden acht Wochen alten Mäusen AAV-Vektoren subretinal injiziert. Die Vektoren beinhalten neben der Homingendonuklease – und für die HR Versuche das Template – das Reporter-gen *gfp*. Für die *in vivo*-Anwendung in den Photorezeptoren der Maus wurde sowohl der PR-spezifische Rhodopsinkinase (RK) Promotor gewählt als auch der ubiquitär exprimierende CMV-Promotor. Anhand des SURVEYOR-Assays konnte NHEJ im Bereich zwischen 15 und 19 % nach Anreicherung der transduzierten Zellen nachgewiesen werden. Die Transduktionseffizienz in den Photorezeptoren fiel unterschiedlich aus, ist jedoch auf Grund der FACS-Anreicherung der transduzierten Zellen für die Auswertung der DNA-Reparatur unerheblich. Die FACS-Analyse zeigte einen Anteil von 14.4 % positiv transduzierter Zellen, die mit AAV2/8.RK-I-SceI-T2A-GFP behandelt wurden. Der Anteil der transduzierten Zellen mit AAV2/5.CMV-I-SceI-T2A-GFP liegt nur bei 2.0 %. Hierfür gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Zum einen ist die Effizienz der Behandlung abhängig von der Durchführung der subretinalen Injektion. Zum anderen liegen unterschiedliche AAV-Subtypen vor, die die Effizienz beeinflussen. Ein weiterer Faktor ist die Verwendung der zwei verschiedenen Promotoren, die ebenfalls eine Auswirkung auf die Effizienz der Transduktion haben kann. Neben diesen Faktoren spielt auch der Titer der AAVs eine wichtige Rolle. Dieser ist jedoch, bei dem AAV2/5.CMV-I-SceI-T2A-GFP-Konstrukt um den Faktor 2.1 höher als bei dem effizienteren AV2/8.RK-I-SceI-T2A-GFP-Konstrukt. Es konnte gezeigt werden, dass der zelleigene Reparaturmechanismus NHEJ in PR prinzipiell durchgeführt wird. Somit kann diese Studie als Referenz für weitere *genome editing*-Studien mit neuen Technologien dienen, wie beispielsweise dem CRISPR/Cas9-System.

In HEK293-Zellen konnte 48 % NHEJ durch Sequenzanalyse gezeigt werden und 55 % durch den SURVEYOR-Assay. *In vivo* zeigte die Sequenzanalyse 10 % veränderte Sequenzen (durch AAV2/5.CMV-I-SceI-T2A-GFP) im Vergleich zu 19 % durch den SURVEYOR-Assay. Somit zeigen die verschiedenen Methoden zur NHEJ-Erkennung vergleichbare prozentuale Veränderungen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Die *in vivo*-Sequenzanalyse des NHEJ zeigt, dass sowohl Deletionen als auch Insertionen auftreten. Es konnten bisher keine größeren deletierten Bereiche gefunden werden, die über vier Basenpaare hinaus gehen. Die *in vitro*-Sequenzanalyse zeigte Deletionen von höchstens acht Basenpaaren. Auch die Insertionen sind vergleichbar, sowohl *in vivo* als auch in Zellkultur konnten große Insertionen gezeigt werden. Der

Vergleich mit der Literatur zeigt, dass die Größe der Indels je nach Gensequenz zu variieren scheint. Suzuki *et al.* zeigten Sequenzanalysen nach DSB durch CRISPR/Cas9 an verschiedenen Genen in unterschiedlichen Geweben. Teilweise konnten große Deletionen und große Insertionen nachgewiesen werden (z.B. Muskelgewebe, *Rosa26*-Gen) (Suzuki *et al.*, 2016). In primären Neuronen der Maus hingegen zeigten sich große Insertionen und kleine Deletionen im *Tubb3*-Gen (Tubulin Beta 3) (Suzuki *et al.*, 2016). Eine weitere Studie, die einen DSB durch CRISPR/Cas9 in der Mausretina im *Nrl*-Gen (*Neural retina-specific leucine zipper protein*) untersuchte, zeigte in über 80 % eine Insertion eines Adenins, die restlichen Indels waren nicht größer als zwei Nukleotide (Yu *et al.*, 2017). Neben den unterschiedlichen Genen könnte auch die Verwendung der verschiedenen Nukleasen eine Rolle bei der Variabilität der Indels spielen. Ein Unterschied zwischen den *in vitro* und *in vivo* Sequenzanalysen sind auftretende Mutationen, bei denen die Sequenz scheinbar willkürlich ausgetauscht wurde. Dies konnte nur *in vivo* gezeigt werden, nicht jedoch in den Zellkulturversuchen. Weitere Sequenzanalysen, vor allem der Photorezeptoren, die mit dem AAV2.8-RK-I-SceI-T2A-GFP-Vektor behandelt wurden, stehen noch aus.

Das Ziel, den Wildtyp-Status der Zielzellen zu erreichen, kann nicht mittels NHEJ erreicht werden, da dieser Reparaturmechanismus fehlerbehaftet ist. Hierzu sollte die homologe Rekombination verwendet werden. Wie bereits beschrieben, steht diese Technik bei der Verwendung in post-mitotischem Gewebe bisher vor Problemen. Daher galt es herauszufinden, ob die HR in den Photorezeptoren der Retina überhaupt stattfindet. Dies konnte durch die subretinale Injektion des Vektors AAV2/8.Template.RK-I-SceI-T2A-GFP in das B6J.Sv129.RPGR^{tm1stie}-Mausmodell belegt werden. Hierbei wurde neben der Homingendonuklease ein Template in den Vektor integriert, der die HR ermöglicht. Nach Anreicherung der transduzierten Zellen und Sequenzanalyse konnte in einigen Klonen die HR nachgewiesen werden. Die Effizienz gilt es in weiteren Ansätzen zu verbessern, da der Titer der verwendeten Vektorlösung sehr niedrig ausfiel.

Der Nachweis der DNA-Reparatur durch NHEJ und HDR *in vivo* im *Rpgr* belegt die Zugänglichkeit der I-SceI-Schnittstelle in der untersuchten Gensequenz. Die Organisation des Chromatins spielt eine wichtige Rolle für die Zugänglichkeit des Gens durch die Nuklease und die Reparatur-Proteine (Misteli and Soutoglou, 2009; Kuhar *et al.*, 2016). Da sich die

Chromatinstruktur während des Zellzyklus in der S-Phase auflockert, wird die Zugänglichkeit hier erhöht (Bell *et al.*, 2011). Die Photorezeptoren durchlaufen jedoch keinen Zellzyklus, somit ist die Zugänglichkeit des *Rpgr* ein kritischer Punkt für das *genome editing*, der mittels der hier gezeigten *in vivo* Versuche ausgeräumt werden konnte.

4.2 Ausblick

Die erfolgreiche Herabregulierung des *Rpgr*-ORF15^{mut} durch die siRNA2 stellt einen ersten Erfolg als Grundlage für die Behandlung des hier verwendeten Mausmodells dar. Diese siRNA kann auch dafür verwendet werden, die Auswirkungen des Fehlens des RPGR-ORF15 auf die Photorezeptoren der Maus genauer zu analysieren. Bei der Verwendung der siRNA zur Behandlung der XLRP müssen allerdings weitere Tests durchgeführt werden, bevor in die *in vivo*-Phase eingegangen wird. Neben der Verwendung der siRNA, die ausschließlich dafür sorgt, dass kein RPGR-ORF15 produziert wird, müsste eine Genaddition entwickelt werden, um das wt-Protein für die Zelle zugänglich zu machen. Hierbei muss darauf geachtet werden, dass dieses Kodon-optimiert ist, damit es nicht von der verwendeten siRNA stillgelegt wird. Im Anschluss sollten sowohl die RNAi als auch die Genaddition in Kombination und einzeln im Tiermodell getestet werden.

Die Behandlung von Patienten mit XLRP, die Mutationen im Exon ORF15 des *RPGR*-Gens besitzen, könnte mit Hilfe des *genome editings* ermöglicht werden. Hierdurch kann der *mutational hotspot* des Gens durch die Wildtyp-Sequenz ersetzt werden. Mit einem einzigen gentherapeutischen Ansatz können dann Patienten mit unterschiedlichen Mutationen erreicht werden. Es gilt jedoch zunächst ein geeignetes Tool für die Behandlung zu testen. Um dieses Ziel zu erreichen, wird momentan verschiedenen Ansätzen nachgegangen. Dazu gehört die Verwendung von TALE-Nukleasen, die aus einem programmierbaren DNA-Bindeprotein und einer Nuklease bestehen. Auch das CRISPR-Cas9-System wird im Bereich des ORF15-Lokus getestet. Da diese *genome-editing*-Tools jedoch aufgrund ihrer Größe nicht ohne weiteres in einen einzigen AAV-Vektor passen, gilt zuerst mittels verschiedenen AAV-Konstrukten ein duales Vektor-System mit einem einfachen Vektorsystem zu vergleichen. In dieser Arbeit wurden bereits die Grundsteine gelegt. So wurden Vektoren entwickelt und bereits eingesetzt, die

neben der Homingendonuklease und des Reporters ein Template für die HR beinhalten (All-in-one-AAV). Außerdem wurde das Template, zusammen mit einem BFP als Reporterprotein einzeln in einen Vektor kloniert, der zusammen mit den bereits verwendeten einzelnen AAV-I-SceI-Konstrukten getestet werden kann. So wird ein Vergleich zwischen dualem und einfachem Vektorsystem ermöglicht. Zur Zeit stehen wir der Problematik der geringen Effizienz der HR gegenüber. Es gibt jedoch Ansätze, die sich hiermit auseinandersetzen. Diese beziehen sich auf die Beeinflussung der Proteine, die in die zelleigenen Reparaturmechanismen involviert sind. So kann möglicherweise durch die Herabregulierung der im NHEJ-*pathway* verwendeten Proteine die HR hochgesetzt werden.

5. Zusammenfassung

Die X-chromosomale Retinitis Pigmentosa (XLRP) wird häufig durch Mutationen im Exon ORF15 des Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (*RPGR*)-Gens verursacht. Die Gentherapie mittels RNA-Interferenz (RNAi) und das *gene targeting* sind mögliche Behandlungsstrategien. Diese Strategien wurden in Zellkultur und teilweise an einem XLRP Mausmodell getestet. Das XLRP Mausmodell beinhaltet eine pathologische Mutation, zwei stille Mutationen im ORF15 Exon sowie eine I-SceI-Erkennungssequenz. Eine HEK293-ORF15^{mut}-Zelllinie, die die identischen Mutationen zum B6J.SV129-Rpgr^{tm1stie}-Mausmodell besitzt, wurde generiert und für die Zellkulturversuche verwendet. Die Plasmide für vier verschiedene siRNAs (*short interfering RNAs*) wurden hergestellt und in HEK293-ORF15^{mut}-Zellen transfiziert. GFP positive Zellen wurden 24 Stunden später durch FACS angereichert. Die RNA wurde isoliert und durch quantitative PCR (qPCR) bezüglich Herabregulierung der ORF15-Genexpression analysiert. Ein Westernblot mit einem spezifischen *Rpgr*-ORF15^{mut}-Antikörper wurde durchgeführt, um die Ergebnisse auf Proteinebene zu validieren. Nach Klonierung der I-SceI-Sequenz vor das Reportergen *gfp* (Grün fluoreszierendes Protein) wurde dieses in HEK293-ORF15^{mut}-Zellen teilweise unter Zugabe eines Templates transfiziert, GFP positive Zellen wurden durch FACS angereichert und die Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur durch den SURVEYOR-Assay, Verdau durch HindIII und Sequenzanalysen nachgewiesen. Durch subretinale Injektion wurden AAV-Vektoren, die die *genome-editing*-Tools beinhalten im B6J.SV129-Rpgr^{tm1stie}-Mausmodell getestet. Die Analyse erfolgte identisch zu den Zellkulturversuchen.

Durch die shRNA-Transfektion kam es zu einer maximalen Herabregulierung von 57 % des *Rpgr*-ORF15^{mut}-Transkripts in der qPCR-Analyse. Der Westernblot zeigte keine Proteinproduktion in HEK293-Zellen. Die Transfektion der HEK293-ORF15^{mut}-Zelllinie mit dem I-SceI-GFP-Plasmid zeigte 55 % NHEJ-Aktivität nach FACS-Anreicherung und maximal 19 % NHEJ *in vivo* nach subretinaler Injektion. Die homologe Rekombination zeigte eine Effizienz von 32 % in Zellkultur und konnte auch *in vivo* nachgewiesen werden. RNA-Interferenz und *genome editing* sind erfolgsversprechende Strategien für die Verwendung im ORF15-Lokus in Zellkultur. Die RNA-Interferenz gilt es im Zusammenspiel mit der Genaddition in Zellkultur und *in vivo* zu testen. Erste Ergebnisse zeigen einen Erfolg hinsichtlich des *genome editings* in Photorezeptoren der Maus. Die Effizienz der homologen Rekombination muss noch verbessert werden.

6. Summary

X-linked Retinitis Pigmentosa (XLRP) is most often caused by mutations in the exon ORF15 of the retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) gene. Gene therapy using RNA-interference (RNAi) and gene targeting may be used as treatment approaches. In this project, these strategies were tested in a cell culture model and partly in a XLRP mouse model.

The XLRP mouse model contains a pathologic mutation, two silent mutations in the ORF15 exon and an I-SceI recognition site. A HEK293-ORF15^{mut} cell line, containing the mutations identical to the B6J.SV129-Rpgr^{tm1stie} mouse, was generated and used for cell culture experiments. Four different siRNAs (short interfering RNAs) were created and transfected into the HEK293-ORF15^{mut} cell line. GFP positive cells were sorted 24 hours later by FACS. RNA was isolated and analyzed by quantitative PCR (qPCR) for downregulation of RPGR-ORF15 expression. A Western blot with a specific RPGR-ORF15 antibody was done to validate the results regarding protein level. I-SceI cDNA sequence was cloned into a bicistronic expression cassette together with the GFP cDNA. The plasmid was transfected into the HEK293-ORF15^{mut} cell line, partly together with a Template. GFP positive cells were sorted 48 hours later by FACS and double strand break (DSB) repair events were analyzed using the SURVEYOR assay, HindIII digestion and Sanger sequencing analysis. AAV-vectors containing the genome editing tools were tested in the B6J.SV129-Rpgr^{tm1stie} mouse model by subretinal injection. The analysis was done identical to the experiments in cell culture.

ShRNA transfection caused 57% downregulation of the RPGR-ORF15 transcript in HEK293-ORF15mut cells by the most efficient variant measured by qPCR. No protein production was detected by Westernblot in HEK293 cells. Following transfection of the HEK293-ORF15mut cell line with the I-SceI-GFP plasmid, up to 55% showed NHEJ compared to 19% NHEJ *in vivo* after subretinal injection. Homology directed repair efficiency was up to 32% in cell culture and was also detectable *in vivo*.

RNA-interference and genome editing are both promising strategies at the ORF15 locus in cell culture. RNA-interference should be tested in combination with gene addition in cell culture and *in vivo*. First results were successful regarding genome editing in murine photoreceptors *in vivo*. The efficiency of homology directed repair needs to be improved.

7. Literaturverzeichnis

Anasagasti, A., Irigoyen, C., Barandika, O., López de Munain, A. and Ruiz-Ederra, J. (2012) ‘Current mutation discovery approaches in Retinitis Pigmentosa’, *Vision Research*. Pergamon, 75, pp. 117–129.

Baba, Y., Satoh, S., Otsu, M., Sasaki, E., Okada, T. and Watanabe, S. (2012) ‘In vitro cell subtype-specific transduction of adeno-associated virus in mouse and marmoset retinal explant culture.’, *Biochimie*. Elsevier Masson SAS, 94(12), pp. 2716–22.

Baehr, W. (2014) ‘Membrane protein transport in photoreceptors: the function of PDE δ : the Proctor lecture.’, *Investigative ophthalmology & visual science*. Association for Research in Vision and Ophthalmology, 55(12), pp. 8653–66.

Bartel, D. P. (2009) ‘MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions’, *Cell*, 136(2), pp. 215–233.

Baxter, S., Lambert, A. R., Kuhar, R., Jarjour, J., Kulshina, N., Parmeggiani, F., Danaher, P., Gano, J., Baker, D., Stoddard, B. L. and Scharenberg, A. M. (2012) ‘Engineering domain fusion chimeras from I-OnuI family LAGLIDADG homing endonucleases.’, *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 40(16), pp. 7985–8000.

Bell, O., Tiwari, V. K., Thomä, N. H. and Schübeler, D. (2011) ‘Determinants and dynamics of genome accessibility’, *Nature Reviews Genetics*, 12(8), pp. 554–564.

Beltran, W. A., Cideciyan, A. V., Lewin, A. S., Hauswirth, W. W., Jacobson, S. G. and Aguirre, G. D. (2014) ‘Gene augmentation for X-linked retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR.’, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 5(2), p. a017392.

Bhargava, R., Sandhu, M., Muk, S., Lee, G., Vaidehi, N. and Stark, J. M. (2018) ‘C-NHEJ without indels is robust and requires synergistic function of distinct XLF domains.’, *Nature communications*. Nature Publishing Group, 9(1), p. 2484.

Birmingham, A., Anderson, E., Sullivan, K., Reynolds, A., Boese, Q., Leake, D., Karpilow, J. and Khvorova, A. (2007) 'A protocol for designing siRNAs with high functionality and specificity', *Nature Protocols*. Nature Publishing Group, 2(9), pp. 2068–2078.

Boissel, S., Jarjour, J., Astrakhan, A., Adey, A., Gouble, A., Duchateau, P., Shendure, J., Stoddard, B. L., Certo, M. T., Baker, D. and Scharenberg, A. M. (2014) 'MegaTALs: A rare-cleaving nuclease architecture for therapeutic genome engineering', *Nucleic Acids Research*, 42(4), pp. 2591–2601.

Boye, S. E., Boye, S. L., Lewin, A. S. and Hauswirth, W. W. (2013) 'A comprehensive review of retinal gene therapy.', *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. American Society of Gene & Cell Therapy, 21(3), pp. 509–19.

Brandsma, I. and Gent, D. C. (2012) 'Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act.', *Genome integrity*. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, 3(1), p. 9.

Breuer, D. K., Yashar, B. M., Filippova, E., Hiriyan, S., Lyons, R. H., Mears, A. J., Asaye, B., Acar, C., Vervoort, R., Wright, A. F., Musarella, M. A., Wheeler, P., MacDonald, I., Iannaccone, A., Birch, D. et al. (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), pp. 1545–54.

Brzezinski, J. A. and Reh, T. A. (2015) 'Photoreceptor cell fate specification in vertebrates.', *Development (Cambridge, England)*. Company of Biologists, 142(19), pp. 3263–73.

Campbell, N. A., Reece, J. B. and Markl, J. (2006) 'Biologie'. Pearson Studium.

Colella, P., Ronzitti, G. and Mingozzi, F. (2018) 'Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy.', *Molecular therapy. Methods & clinical development*. American Society of Gene & Cell Therapy, 8, pp. 87–104.

Collins, M. and Thrasher, A. (2015) 'Gene therapy: progress and predictions.', *Proceedings. Biological sciences*. The Royal Society, 282(1821), p. 20143003.

Cox, D. B. T., Platt, R. J. and Zhang, F. (2015) 'Therapeutic genome editing: prospects and challenges', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 21(2), pp. 121–131.

Daiger, S. P., Bowne, S. J. and Sullivan, L. S. (2007) 'Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa.', *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*. NIH Public Access, 125(2), pp. 151–8.

Daiger, S. P., Sullivan, L. S. and Bowne, S. J. (2013) 'Genes and mutations causing retinitis pigmentosa.', *Clinical genetics*. Health Research Alliance manuscript submission, 84(2), pp. 132–41.

Deng, Y., Wang, C. C., Choy, K. W., Du, Q., Chen, J., Wang, Q., Li, L., Chung, T. K. H. and Tang, T. (2014) 'Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: Principles, challenges, and new strategies', *Gene*, 538(2), pp. 217–227.

Dillin, A. (2003) 'The specifics of small interfering RNA specificity.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 100(11), pp. 6289–91.

Dong, J.-Y., Fan, P.-D. and Frizzell, R. A. (1996) 'Quantitative Analysis of the Packaging Capacity of Recombinant Adeno-Associated Virus', *Human Gene Therapy*, 7(17), pp. 2101–2112.

Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001) 'Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.', *Nature*, 411(6836), pp. 494–498.

Entwicklung der Gentherapie Stellungnahme der Senatskommission für Grundsatzfragen der Genforschung = Development of gene therapy (2007). Wiley-VCH-Verl.

Fakhr, E., Zare, F. and Teimoori-Toolabi, L. (2016) 'Precise and efficient siRNA design: a key point in competent gene silencing', *Cancer Gene Therapy*. Nature Publishing Group, 23(4), pp. 73–82.

Falk, N., Lösl, M., Schröder, N. and Gießl, A. (2015) ‘Specialized Cilia in Mammalian Sensory Systems.’, *Cells*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 4(3), pp. 500–19.

Fellmann, C. and Lowe, S. W. (2014) ‘Stable RNA interference rules for silencing.’, *Nature cell biology*. NIH Public Access, 16(1), pp. 10–8.

Fischer, M. D., McClements, M. E., Camara, C. M. De, Bellingrath, J., Dauletbekov, D., Ramsden, S. C., Hickey, D. G., Barnard, A. R. and Maclaren, R. E. (2017) ‘Codon-Optimized RPGR Improves Stability and Efficacy of AAV8 Gene Therapy in Two Mouse Models of X-Linked Retinitis Pigmentosa’, *Molecular Therapy*. Elsevier Ltd., 25(8), pp. 1854–1865.

de Fougères, A., Vornlocher, H.-P., Maraganore, J. and Lieberman, J. (2007) ‘Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics’, *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(6), pp. 443–453.

Frohns, A., Frohns, F., Naumann, S. C., Layer, P. G. and Löbrich, M. (2014) ‘Inefficient double-strand break repair in murine rod photoreceptors with inverted heterochromatin organization.’, *Current biology : CB*. Elsevier, 24(10), pp. 1080–90.

Gaj, T., Gersbach, C. A., Barbas, C. F. and III (2013) ‘ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering.’, *Trends in biotechnology*. NIH Public Access, 31(7), pp. 397–405.

Gaj, T., Epstein, B. E. and Schaffer, D. V (2015) ‘Genome Engineering Using Adeno-associated Virus: Basic and Clinical Research Applications.’, *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 24(3), pp. 1–7.

Hong, D.-H., Pawlyk, B. S., Shang, J., Sandberg, M. A., Berson, E. L. and Li, T. (2000) ‘A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)- deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3)’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), pp. 3649–3654.

Hong, D.-H., Pawlyk, B. S., Adamian, M., Sandberg, M. a and Li, T. (2005) ‘A single, abbreviated RPGR-ORF15 variant reconstitutes RPGR function in vivo.’, *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(2), pp. 435–41.

Hong, D. H., Pawlyk, B., Sokolov, M., Strissel, K. J., Yang, J., Tulloch, B., Wright, A. F., Arshavsky, V. Y. and Li, T. (2003) 'RPGR isoforms in photoreceptor connecting cilia and the transitional zone of motile cilia', *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(6), pp. 2413–2421.

Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L. and Wong, R. O. L. (2014) 'Functional architecture of the retina: Development and disease', *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd, 42, pp. 44–84.

Horizon (2014) 'Effective controls for RNA interference (RNAi) experiments using siRNA', *Tech Note*.

Hosch, J., Lorenz, B. and Stieger, K. (2011) 'RPGR: role in the photoreceptor cilium, human retinal disease, and gene therapy.', *Ophthalmic genetics*, 32, pp. 1–11.

Huang, W. C., Wright, A. F., Roman, A. J., Cideciyan, A. V, Manson, F. D., Gewaily, D. Y., Schwartz, S. B., Sadigh, S., Limberis, M. P., Bell, P., Wilson, J. M., Swaroop, A. and Jacobson, S. G. (2012) 'RPGR-associated retinal degeneration in human X-linked RP and a murine model.', *Investigative ophthalmology & visual science*. Association for Research in Vision and Ophthalmology, 53(9), pp. 5594–608.

Jacobson, S. G., Cideciyan, A. V, Ratnakaram, R., Heon, E., Schwartz, S. B., Roman, A. J., Peden, M. C., Aleman, T. S., Boye, S. L., Sumaroka, A., Conlon, T. J., Calcedo, R., Pang, J.-J., Erger, K. E., Olivares, M. B. et al. (2012) 'Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years.', *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*. NIH Public Access, 130(1), pp. 9–24.

Jacoby, K., Metzger, M., Shen, B. W., Certo, M. T., Jarjour, J., Stoddard, B. L. and Scharenberg, A. M. (2012) 'Expanding LAGLIDADG endonuclease scaffold diversity by rapidly surveying evolutionary sequence space.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 40(11), pp. 4954–64.

Jiang, L., Frederick, J. M. and Baehr, W. (2014) 'RNA interference gene therapy in dominant retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy mouse models caused by GCAP1 mutations.',

Frontiers in molecular neuroscience. Frontiers Media SA, 7, p. 25.

Jorgensen, R. (1990) 'Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes.', *Trends in biotechnology*, 8(12), pp. 340–4.

Joung, J. K. and Sander, J. D. (2013) 'TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing.', *Nature reviews. Molecular cell biology*. NIH Public Access, 14(1), pp. 49–55.

Katz, S. S., Gimble, F. S. and Storici, F. (2014) 'To nick or not to nick: comparison of I-SceI single- and double-strand break-induced recombination in yeast and human cells.', *PloS one*. Public Library of Science, 9(2), p. e88840.

Kim, D. H. and Rossi, J. J. (2007) 'Strategies for silencing human disease using RNA interference', *Nature Reviews Genetics*, 8(3), pp. 173–184.

Kiser, P. D., Golczak, M., Maeda, A. and Palczewski, K. (2012) 'Key enzymes of the retinoid (visual) cycle in vertebrate retina.', *Biochimica et biophysica acta*. NIH Public Access, 1821(1), pp. 137–51.

Kleinstiver, B. P., Wang, L., Wolfs, J. M., Kolaczyk, T., McDowell, B., Wang, X., Schild-Poulter, C., Bogdanove, A. J. and Edgell, D. R. (2014) 'The I-TevI nuclease and linker domains contribute to the specificity of monomeric TALENs.', *G3 (Bethesda, Md.)*. Genetics Society of America, 4(6), pp. 1155–65.

Klug, W. s., Cummings, M. R. and Spencer, C. A. (2007) *Genetik*. 8.

Kuhar, R., Gwiazda, K. S., Humbert, O., Mandt, T., Pangallo, J., Brault, M., Khan, I., Maizels, N., Rawlings, D. J., Scharenberg, A. M. and Certo, M. T. (2016) 'Novel fluorescent genome editing reporters for monitoring DNA repair pathway utilization at endonuclease-induced breaks', *Nucleic Acids Research*, 42(1), p. e4.

Lee, J.-J. and Seo, S. (2015) 'PDE6D binds to the C-terminus of RPGR in a prenylation-dependent manner.', *EMBO reports*. European Molecular Biology Organization, 16(12), pp. 1581–2.

Leuschner, P. J. F., Ameres, S. L., Kueng, S. and Martinez, J. (2006) 'Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells', *EMBO reports*, 7(3), pp. 314–320.

Lieber, M. R. (2008) 'The mechanism of human nonhomologous DNA end joining.', *The Journal of biological chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 283(1), pp. 1–5.

Lieber, M. R. (2010) 'The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway.', *Annual review of biochemistry*. NIH Public Access, 79, pp. 181–211.

Maeder, M. L. and Gersbach, C. A. (2016) 'Genome Editing Technologies for Gene and Cell Therapy.', *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 24(3), pp. 430–446.

Mali, P., Esvelt, K. M. and Church, G. M. (2013) 'Cas9 as a versatile tool for engineering biology.', *Nature methods*. NIH Public Access, 10(10), pp. 957–63.

Matsumoto, Y., Niimi, N. and Kohyama, K. (2012) 'Characterization of fibrosis-promoting factors and siRNA-mediated therapies in C-protein-induced experimental autoimmune myocarditis', *Cellular Immunology*, 279(1), pp. 70–77.

Megaw, R. D., Soares, D. C. and Wright, A. F. (2015) 'RPGR: Its role in photoreceptor physiology, human disease, and future therapies.', *Experimental eye research*. Elsevier Ltd, (June), pp. 1–10.

Meindl, A., Dry, K., Herrmann, K., Manson, E., Ciccodicola, A., Edgar, A., Carvalho, M. R. S., Achatz, H., Hellebrand, H., Lennon, A., Migliaccio, C., Porter, K., Zrenner, E., Bird, A., Jay, M. et al. (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), pp. 35–42.

Meister, G. and Tuschl, T. (2004) 'Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA', *Nature*, 431(7006), pp. 343–349.

Milstein, S., Nguyen, M., Meyers, R. and de Fougères, A. (2013) 'Measuring RNAi knockdown using qPCR.', *Methods in enzymology*, 533, pp. 57–77.

Misteli, T. and Soutoglou, E. (2009) 'The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance.', *Nature reviews. Molecular cell biology*. NIH Public Access, 10(4), pp. 243–54.

Moure, C. M., Gimble, F. S. and Quijoch, F. A. (2008) 'Crystal structures of I-SceI complexed to nicked DNA substrates: snapshots of intermediates along the DNA cleavage reaction pathway.', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 36(10), pp. 3287–96.

Müller, B., Ellinwood, N. M., Lorenz, B. and Stieger, K. (2018) 'Detection of DNA Double Strand Breaks by γ H2AX Does Not Result in 53bp1 Recruitment in Mouse Retinal Tissues.', *Frontiers in neuroscience*. Frontiers Media SA, 12, p. 286.

Nikonov, S. S., Kholodenko, R., Lem, J. and Pugh, E. N. (2006) 'Physiological Features of the S- and M-cone Photoreceptors of Wild-type Mice from Single-cell Recordings', *The Journal of General Physiology*, 127(4), pp. 359–374.

Ozcan, G., Ozpolat, B., Coleman, R. L., Sood, A. K. and Lopez-Berestein, G. (2015) 'Preclinical and clinical development of siRNA-based therapeutics.', *Advanced drug delivery reviews*. NIH Public Access, 87, pp. 108–19.

Pang, J., Lauramore, A., Deng, W., Li, Q., Doyle, T. J., Chiodo, V., Li, J. and Hauswirth, W. W. (2008) 'Comparative analysis of in vivo and in vitro AAV vector transduction in the neonatal mouse retina: effects of serotype and site of administration.', *Vision research*, 48(3), pp. 377–85.

Pannunzio, N. R., Li, S., Watanabe, G. and Lieber, M. R. (2014) 'Non-homologous end joining often uses microhomology: implications for alternative end joining.', *DNA repair*. NIH Public Access, 17, pp. 74–80.

Patnaik, S. R., Raghupathy, R. K., Zhang, X., Mansfield, D., Shu, X., Hospital, I. R. and Pa, G. (2015a) 'The Role of RPGR and Its Interacting Proteins in Ciliopathies', 2015.

Patnaik, S. R., Raghupathy, R. K., Zhang, X., Mansfield, D., Shu, X., Hospital, I. R. and Pa, G. (2015b) 'The Role of RPGR and Its Interacting Proteins in Ciliopathies', *Journal of Ophthalmology*, 2015.

Pawlyk, B. S., Bulgakov, O. V, Sun, X., Adamian, M., Shu, X., Smith, A. J., Berson, E. L., Ali, R. R., Khani, S., Wright, A. F., Sandberg, M. A. and Li, T. (2015) 'Photoreceptor rescue by an abbreviated human RPGR gene in a murine model of x-linked retinitis pigmentosa', *Gene Therapy*, (August 2015), pp. 196–204.

Petit, L., Khanna, H. and Punzo, C. (2016) 'Advances in Gene Therapy for Diseases of the Eye.', *Human gene therapy*. Mary Ann Liebert, Inc., 27(8), pp. 563–79.

Pingoud, A. and Silva, G. H. (2007) 'Precision genome surgery', *Nature Biotechnology*, 25(7), pp. 743–744.

Pingoud, A. and Wende, W. (2011) 'Generation of Novel Nucleases with Extended Specificity by Rational and Combinatorial Strategies', *ChemBioChem*, 12(10), pp. 1495–1500.

Prieto, J., Redondo, P., Merino, N., Villate, M., Montoya, G., Blanco, F. J. and Molina, R. (2016) 'Structure of the I-SceI nuclease complexed with its dsDNA target and three catalytic metal ions.', *Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications*. International Union of Crystallography, 72(Pt 6), pp. 473–9.

Provis, J. M., Dubis, A. M., Maddess, T. and Carroll, J. (2013) 'Adaptation of the central retina for high acuity vision: cones, the fovea and the avascular zone.', *Progress in retinal and eye research*. NIH Public Access, 35, pp. 63–81.

Radhakrishnan, S. K., Jette, N. and Lees-Miller, S. P. (2014) 'Non-homologous end joining: emerging themes and unanswered questions.', *DNA repair*. NIH Public Access, 17, pp. 2–8.

Randlett, O., Norden, C. and Harris, W. A. (2011) 'The vertebrate retina: A model for neuronal polarization in vivo', *Developmental Neurobiology*. Wiley-Blackwell, 71(6), pp. 567–583.

Rieke, F. (2000) 'Mechanisms of single-photon detection in rod photoreceptors.', *Methods in*

enzymology, 316, pp. 186–202.

Schierling, B., Dannemann, N., Gabsalilow, L., Wende, W., Cathomen, T. and Pingoud, A. (2012) ‘A novel zinc-finger nuclease platform with a sequence-specific cleavage module’, *Nucleic Acids Research*, 40(6), pp. 2623–2638.

Slijkerman, R. W. N., Song, F., Astuti, G. D. N., Huynen, M. a, van Wijk, E., Stieger, K. and 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*. Elsevier Ltd, 48, pp. 137–59.

Snøve, O. and Holen, T. (2004) ‘Many commonly used siRNAs risk off-target activity’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 319(1), pp. 256–263.

Solovei, I., Wang, A. S., Thanisch, K., Schmidt, C. S., Krebs, S., Zwerger, M., Cohen, T. V., Devys, D., Foisner, R., Peichl, L., Herrmann, H., Blum, H., Engelkamp, D., Stewart, C. L., Leonhardt, H. et al. (2013) ‘LBR and Lamin A/C Sequentially Tether Peripheral Heterochromatin and Inversely Regulate Differentiation’, *Cell*, 152(3), pp. 584–598.

Sriram, S., Robinson, P., Pi, L., Lewin, A. S. and Schultz, G. (2013) ‘Triple combination of siRNAs targeting TGFβ1, TGFβR2, and CTGF enhances reduction of collagen I and smooth muscle actin in corneal fibroblasts.’, *Investigative ophthalmology & visual science*. Association for Research in Vision and Ophthalmology, 54(13), pp. 8214–23.

Stewart, G. S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A. K., Kolas, N. K., Miller, E. S., Nakada, S., Ylanko, J., Olivarius, S., Mendez, M., Oldreive, C., Wildenhain, J., Tagliaferro, A., Pelletier, L., Taubenheim, N. et al. (2009) ‘The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage.’, *Cell*. Elsevier, 136(3), pp. 420–34.

Stieger, K. and Lorenz, B. (2010) ‘Gene therapy for vision loss -- recent developments.’, *Discovery medicine*, 10(54), pp. 425–433.

Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J., Kim, E. J., Hatanaka, F., Yamamoto, M., Araoka, T., Li, Z., Kurita, M., Hishida, T., Li, M., Aizawa, E., Guo, S. et al.

(2016) 'In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration', *Nature*, 540(7631), pp. 144–149.

Swaroop, A., Kim, D. and Forrest, D. (2010) 'Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 11(8), pp. 563–576.

Symington, L. S. and Gautier, J. (2011) 'Double-Strand Break End Resection and Repair Pathway Choice', *Annual Review of Genetics*, 45(1), pp. 247–271.

Tee, J. J. L., Smith, A. J., Hardcastle, A. J. and Michaelides, M. (2016) 'RPGR- associated retinopathy: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options', *British Journal of Ophthalmology*, p. bjophthalmol-2015-307698.

Thompson, D. A., Khan, N. W., Othman, M. I., Chang, B., Jia, L., Grahek, G., Wu, Z., Hiriyan, S., Nellisery, J., Li, T., Khanna, H., Colosi, P., Swaroop, A. and Heckenlively, J. R. (2012) 'Rd9 is a naturally occurring mouse model of a common form of retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR-ORF15', *PLoS ONE*, 7.

Trapani, I., Puppo, A. and Auricchio, A. (2014) 'Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies', *Progress in Retinal and Eye Research*. Elsevier Ltd, 43, pp. 108–128.

Vermeulen, A., Behlen, L., Reynolds, A., Wolfson, A., Marshall, W. S., Karpilow, J. and Khvorova, A. (2005) 'The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency.', *RNA (New York, N.Y.)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 11(5), pp. 674–82.

Vervoort, R., Lennon, A., Bird, A. C., Tulloch, B., Axton, R., Miano, M. G., Meindl, A., Meitinger, T., Ciccodicola, A. and Wright, A. F. (2000) 'Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa', 25(august), pp. 462–466.

Wang, D. and Gao, G. (2014) 'State-of-the-art human gene therapy: part II. Gene therapy strategies and clinical applications.', *Discovery medicine*. NIH Public Access, 18(98), pp. 151–61.

Wässle, H. (2004) 'Parallel processing in the mammalian retina', *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group, 5(10), pp. 747–757.

Wright, A. F., Chakarova, C. F., Abd El-Aziz, M. M. and Bhattacharya, S. S. (2010) 'Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 11(4), pp. 273–284.

Wright, A. F. and Shu, X. (2006) 'Focus on Molecules: RPGR'.

Yan, H., Toczylowski, T., McCane, J., Chen, C. and Liao, S. (2011) 'Replication protein A promotes 5'→3' end processing during homology-dependent DNA double-strand break repair.', *The Journal of cell biology*. The Rockefeller University Press, 192(2), pp. 251–61.

Yanik, M., Müller, B., Song, F., Gall, J., Wagner, F., Wende, W., Lorenz, B. and Stieger, K. (2017) 'In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies', *Progress in Retinal and Eye Research*, 56, pp. 1–18.

Yildiz, O. and Khanna, H. (2012) 'Ciliary signaling cascades in photoreceptors.', *Vision research*. NIH Public Access, 75, pp. 112–6.

Yu, W., Mookherjee, S., Chaitankar, V., Hiriyanna, S., Kim, J.-W., Brooks, M., Ataeijannati, Y., Sun, X., Dong, L., Li, T., Swaroop, A. and Wu, Z. (2017) 'Nrl knockdown by AAV-delivered CRISPR/Cas9 prevents retinal degeneration in mice', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 8, p. 14716.

Yuan, J., Adamski, R. and Chen, J. (2010) 'Focus on histone variant H2AX: to be or not to be.', *FEBS letters*. NIH Public Access, 584(17), pp. 3717–24.

Zaneveld, J., Wang, F., Wang, X. and Chen, R. (2013) 'Dawn of ocular gene therapy: implications for molecular diagnosis in retinal disease.', *Science China. Life sciences*. NIH Public Access, 56(2), pp. 125–33.

8. Anhang

Abbildung 31 zeigt die Immunfärbung eines Kryostatschnitts einer Mausretina mit dem spezifischen RPGR-ORF15 Antikörper.

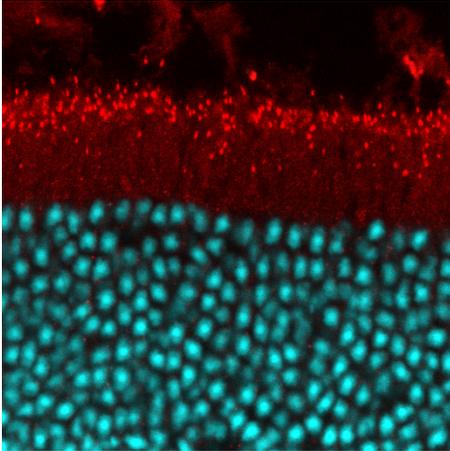


Abbildung 1: Immunfärbung Mausretina (wt) mit RPGR-ORF15-Antikörper (rot). CC der Photorezeptoren (rot) zw. OS und IS, blau gefärbt sind die Zellkerne in der ONL.