

# DISSERTATION

an der

JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIESSEN

ZUR ERLANGUNG

DES AKADEMISCHEN GRADES

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN (*Dr. rer. nat.*)

Titel:

Entwicklung eines humanisierten Mausmodells  
für X-chromosomale Retinitis Pigmentosa,  
hervorgerufen durch eine Punktmutation im  
*Rpgr* Gen

vorgelegt am Fachbereich Biologie und Chemie

von

Dipl.-Biol. Jutta Schlegel

geb. Hosch

aus Frankfurt am Main

25. Oktober 2011

1. Gutachter: Prof. Dr. Alfred Pingoud

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Birgit Lorenz

*"Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen."*

Albert Einstein

*In Gedenken an*  
*Prof. Dr. Friedrich Hosch (1847-1905)*  
*Professor der Ophthalmologie*

# Danksagung

Herrn Prof. Alfred Pingoud danke ich für die Übernahme meiner Betreuung als mein Doktorvater, seine wissenschaftliche Unterstützung und die Anregungen zu meiner Doktorarbeit.

Frau Prof. Birgit Lorenz danke ich sehr herzlich für die Vergabe des Themas, ihre freundliche Unterstützung und das rege Interesse an meiner Arbeit. Ich bin sehr dankbar dafür, dass ich so viele Kongressreisen unternehmen durfte und sie mich mit so vielen wichtigen Persönlichkeiten bekannt gemacht hat.

Ganz besonders danke ich natürlich PD Dr. Dr. Knut Stieger, der mir zu jeder Zeit und in allen wissenschaftlichen Belangen ein überaus engagierter, nachsichtiger und fürsorglicher "*Lehrmeister*" war und ist. Danke für alles, ich hoffe ich konnte die Erwartungen erfüllen!

Mein Dank gilt auch allen Mitgliedern des Labors für molekulare Ophthalmologie und dessen Leiter Dr. Markus Preising für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Gar nicht genug danken kann ich Annabella Janise, die das Herz und die gute Seele unseres Labors ist. Mit ihrem Fleiß und ihrer Hingabe, ihrer Kompetenz und Präzision wird sie mir stets ein Vorbild sein.

Ebenso gilt mein Dank Tobias Wimmer, der meine Arbeit vom ersten Tag an in kollegialer Freundschaft begleitet hat und mit mir Freud und Leid ebenso geteilt hat, wie die Begeisterung und Freude an unserer Arbeit.

Ein großer Dank auch an Dr. Stefan Günther für die großzügige Bereitstellung seines Tierstallkontingents und seine Geduld und anhaltende Unterstützung.

Meiner Familie und Schwiegerfamilie danke ich für ihre Unterstützung und ihr Verständnis während meines gesamten Studiums und der Zeit dieser Arbeit.

Zum Schluss aber dennoch an erster Stelle geht mein Dank an meinen wunderbaren Mann Patrice, der nun schon so viele Jahre mit mir durchs Leben geht und in allen Lebenslagen mein Fels in der Brandung ist und meine bessere Hälfte.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>iv</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>ix</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Auge der Wirbeltiere . . . . .	1
1.2 Die Retina . . . . .	2
1.3 Die Photorezeptoren . . . . .	3
1.4 Cilien . . . . .	4
1.5 RPGR und seine Rolle im Photorezeptor Connecting Cilium . . . . .	6
1.5.1 RPGR Interaktionspartner und Intraflagellärer Transport (IFT)	8
1.5.2 RPGR Mutationen . . . . .	11
1.6 Retinitis Pigmentosa . . . . .	14
1.7 XLRP und die Beteiligung von RPGR an retinalen Erkrankungen . .	15
1.8 Tiermodelle . . . . .	17
1.8.1 Mausmodelle . . . . .	17
1.8.2 Hundemodelle . . . . .	21
1.9 Therapie . . . . .	22
1.10 Zielsetzung . . . . .	24
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>26</b>
2.1 Materialien . . . . .	26
2.1.1 Enzyme und Marker . . . . .	26
2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien . . . . .	26
2.1.3 Puffer und Medien . . . . .	26
2.1.4 Primer / Oligonukleotide . . . . .	26
2.1.5 Plasmide . . . . .	30
2.1.6 Bakterienstämme . . . . .	30
2.1.7 Mausstämme . . . . .	30
2.1.8 Geräte . . . . .	33
2.2 Molekularbiologische Methoden . . . . .	34

2.2.1	PCR . . . . .	34
2.2.2	Mutagenese PCR . . . . .	35
2.2.3	Restriktionsverdau . . . . .	35
2.2.4	Ligation . . . . .	36
2.2.5	Kultivierung und Herstellung elektrokompetenter XL-1 blue bzw. EL350 . . . . .	37
2.2.5.1	XL-1 blue . . . . .	37
2.2.5.2	EL350 . . . . .	37
2.2.6	Elektroporation . . . . .	38
2.2.7	Mini-Prep . . . . .	39
2.2.8	Reverse Transkription . . . . .	39
2.3	Präparationsmethoden . . . . .	40
2.3.1	Aufreinigung von Schwanzspitzenbiopsien . . . . .	40
2.3.2	Töten der Tiere . . . . .	40
2.3.3	Präparation der Augen . . . . .	41
2.3.4	Fixierung und Einbettung der Augen . . . . .	41
2.3.4.1	Bouin Fixierung für Paraffineinbettung . . . . .	41
2.3.4.2	Fixierung für Cryoschnitte . . . . .	41
2.3.4.3	<i>Yellow-Fix</i> Fixierung EM Schnitte . . . . .	42
2.3.5	Schnittpräparation . . . . .	42
2.3.5.1	Paraffinschnitte . . . . .	42
2.3.5.2	Cryoschnitte . . . . .	43
2.3.6	HE Färbung . . . . .	43
2.3.7	RNA Extraktion . . . . .	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	Projektstrategie . . . . .	45
3.2	Targetingvektor . . . . .	47
3.2.1	Einführung der Minihomologieregionen . . . . .	48
3.2.2	Klonierung aus BAC in pKOIIV2 Backbone, Herstellung von pTV-1 . . . . .	49
3.2.3	Einführung der Neomycin-Kassette in pTV-1, Herstellung von pTV-2 . . . . .	51
3.2.4	Einführung der Zielsequenz in pL452 . . . . .	54

3.2.5	Einführung der Mutationen in pL452 5a+b . . . . .	54
3.2.6	Klonierung von pL452 5a+b in pTV-2, Herstellung von pTV-3	56
3.3	Transfektion und homologe Rekombination . . . . .	58
3.4	Screening-Strategie . . . . .	59
3.4.1	PCR Test auf korrekte Rekombination des Vektors in den ES- Zellen . . . . .	59
3.4.2	Nachweis der pathologischen Mutation del2793A in den ES Zellen . . . . .	62
3.4.3	Nachweis der Mutation sub3071A-T zur Verhinderung des Stop-Codon . . . . .	62
3.4.4	Nachweis der Mutation sub2650T-C zur Einführung der XbaI Schnittstelle . . . . .	63
3.4.5	Nachweis der eingeführten I-SceI Erkennungssequenz . . . . .	63
3.5	Blastozystenimplantation und Erzeugung chimärer Tiere . . . . .	66
3.6	Genotypisierung der chimären Tiere . . . . .	67
3.7	Cre-Deletion . . . . .	69
3.8	Zuchtschema . . . . .	73
3.9	Initiale Phänotypisierung . . . . .	75
3.9.1	Nachweis der Mutationen auf RNA Ebene . . . . .	75
3.9.2	Histologische Untersuchung der Retinae . . . . .	77
3.9.3	Semidünnschnitte der Retinae . . . . .	78
3.9.4	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Retinae . . . . .	78
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>82</b>
4.1	Strategie zur Herstellung der transgenen Maus . . . . .	83
4.2	Phänotypischer Vergleich . . . . .	84
4.3	Ausblick . . . . .	94
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>99</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>XIII</b>
	<b>Publikationen und Präsentationen</b>	<b>XIV</b>

# Abkürzungsverzeichnis

♀	weiblich
♂	männlich
$\mu$ l	mikro Liter
$\mu$ m	mikro Meter
$\mu$	mikro
°C	Grad Celsius
3'	Position der OH-Gruppe
5'	Position des Phosphatrests
A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serum-Albumin
CC	Connecting Cilium
cDNA	komplementäre DNA
CEP290	Cilia-Centrosomal Protein (NPHP6)
Contr.	Kontrolle
Cre	Cyclization recombination
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
del	Deletion
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTA	Diphtherie-Toxin A
E	Glutaminsäure
EM	Elektronenmikroskopie
ERG	Elektroretinogramm
ES	Embryonale Stammzelle
Ex	Exon

FAF .....	Fundusautofluoreszenz
G .....	Glycin
GCL .....	ganglion cell layer
GEF .....	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
GTPase .....	Guanosintriphosphat hydrolysierendes Enzym
GV-SOLAS .....	Gesellschaft für Tierversuchskunde
HE .....	Hämatoxylin-Eosin
HEPES .....	(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
IFT88 .....	Transport Polypeptid 88
IgG .....	ImmunglobulinG
IgY .....	ImmunglobulinY
INL .....	Inner Nuclear Layer
IPL .....	Inner Plexiform Layer
IS .....	Inner Segment
K .....	Lysin
kb .....	Kilobasen
kDa .....	kilo Dalton
Konz. ....	Konzentration
LB .....	Luria Broth
loxP .....	locus of crossover in P1
mA .....	milli Ampere
MCS .....	Multiple Cloning Side
min .....	Minute
ml .....	milli Liter
MLE .....	Membrana Limitans Externa
mM .....	milli molar
MPI .....	Max-Planck-Institut
mRNA .....	messenger RNA
mut .....	mutiert
Neo .....	Neomyzin
NFL .....	nerve fiber layer
NMD .....	non-sense mediated decay
NPHP5 .....	Nephrocystin-5
NPM .....	Nucleophosmin
Nr. ....	Nummer

OD .....	Optische Dichte
ONL .....	outer nuclear layer
OPL .....	outer plexiform layer
ORF15 .....	Open Reading Frame 15
pA .....	Polyadenylierungssignal
PAGE .....	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PB .....	Phosphatpuffer
PBS .....	phosphate buffered saline
PBS-T .....	PBS mit 0,1% Tween
PCR .....	Polymerase- Kettenreaktion
PDE6D .....	delta-Untereinheit der cyclic GMP Phosphodiesterase
PFA .....	Paraformaldehyd
R .....	Arginin
Ran .....	Ras-like GTPase
RCC1 .....	Regulator of Chromatin Condensation
RLD .....	RCC1-like Domäne
RNA .....	Ribonukleinsäure
RP .....	Retinitis Pigmentosa
RPE .....	Retinales Pigment Epithel
RPGR .....	Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator
RPGRIP1 .....	RPGR- Interacting Protein 1
Rpm .....	rounds per minute
SDS .....	Natriumdodecylsulfat
Sequ. ....	Sequenzierung
siRNA .....	small interfering RNA
SMC .....	structural maintenance of chromosome
sub .....	Substitution
TAE .....	Tris-Acetat-EDTA
TE .....	Tris-EDTA
TEMED .....	Tetramethylethylendiamin
V .....	Volt
wt .....	wildtyp
XLPR .....	X-linked progressive retinal atrophy
XLRP .....	X-gebundene Retinitis Pigmentosa

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Detaillierte anatomische Darstellung des menschlichen Auges	1
1.2	Anatomie der Retina	3
1.3	Schema des <i>Connecting Cilium</i>	4
1.4	Axonem des <i>Connecting Cilium</i>	6
1.5	Alternatives Splicen von RPGR	8
1.6	Intraflagellarer Transport (IFT)	9
1.7	Interaktionspartner in der IFT Maschinerie	11
1.8	Mutationen im ORF15	13
1.9	Funduskopie- und Autofluoreszenzaufnahmen	16
1.10	Tiermodelle mit <i>Rpgr</i> Mutationen	20
1.11	Hundemodelle.	22
3.1	Rekombinationsschema.	46
3.2	pKOIIV2 Vektor.	49
3.3	Klonierung von pTV-1.	50
3.4	Vektorkarte von pTV-1.	51
3.5	Klonierung von pTV-2.	53
3.6	Vektorkarte von pTV-2.	53
3.7	Klonierung von pL452 5a+b.	55
3.8	Vektorkarte pL452 5a+b -4	56
3.9	Klonierung von pTV-3.	57
3.10	Vektorkarte von pTV-3.	58
3.11	PCR Screening Strategie.	60
3.12	Rekombination der Neomycin-Kassette.	61
3.13	Test-PCR ES-Zellen.	61
3.14	BamHI Verdau.	62
3.15	Nachweis der pathologischen Mutation.	63
3.16	XbaI Restriktionsschnittstelle.	64
3.17	Restriktionsverdau mit XbaI	64
3.18	I-SceI Schnittstelle.	65

3.19 Tests auf Cre-Rekombination. . . . .	71
3.20 A-del heterozygot. . . . .	72
3.21 XbaI heterozygot. . . . .	73
3.22 Verpaarungsschema der Zuchtlinie 160. . . . .	74
3.23 Verpaarungsschema der Zuchtlinie 320. . . . .	75
3.24 Nachweis auf RNA-Ebene. . . . .	76
3.25 Sequenzierung cDNA. . . . .	77
3.26 Paraffinschnitte . . . . .	79
3.27 Semidünnschnitte . . . . .	80
3.28 Elektronenmikroskopie . . . . .	81
4.1 Vergleich XLPRa Hund und XLRP Maus. . . . .	87

# Tabellenverzeichnis

2.1	Restriktionsenzyme . . . . .	27
2.2	Weitere verwendete Enzyme . . . . .	27
2.3	Folgende Größenmarker wurden verwendet. . . . .	28
2.4	Chemikalien/Verbrauchsmaterialien (1/2) . . . . .	28
2.5	Chemikalien/Verbrauchsmaterialien (2/2) . . . . .	29
2.6	Eingesetzte Antibiotika. . . . .	29
2.7	Verwendete Präparations-Kits. . . . .	30
2.8	Verwendete Primer . . . . .	31
2.9	Verwendete Sequenzierungsprimer . . . . .	32
2.10	Verwendete Plasmide. . . . .	33
2.11	Verwendete Bakterienstämme . . . . .	33
2.12	Geräte (1/2). . . . .	33
2.13	Geräte (2/2). . . . .	34
2.14	PCR Protokoll . . . . .	35
2.15	HE Färbung. . . . .	44
3.1	Proteineigenschaften . . . . .	47
3.2	Gesamtauswertung des Screening der 14 ES Zell Klone . . . . .	66
3.3	Chimäre Tiere. . . . .	68
3.4	Screening der chimären Tiere. . . . .	69
3.5	Screening Cre-Rekombinase 160. . . . .	71
3.6	Screeningergebnisse Zuchtlinie 320. . . . .	72
4.1	Mausmodelle mit <i>Rpgr</i> Mutationen. . . . .	88

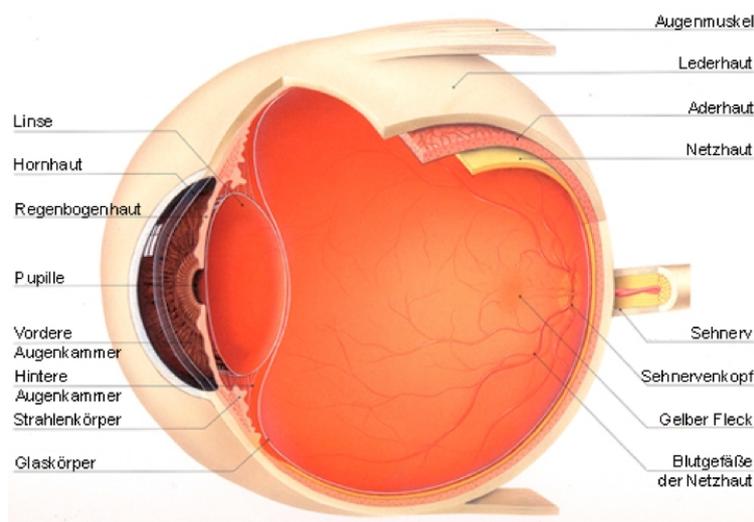
# 1

## Einleitung

### 1.1 Das Auge der Wirbeltiere

---

Das Auge der Wirbeltiere ist ein hoch spezialisiertes Sinnesorgan, mit dem optische Reize aufgefangen und in sinnesphysiologische elektrische Signale umgewandelt werden. Um dies möglich zu machen, besitzt das Auge sowohl einen optischen Apparat als auch einen sensorischen Teil (siehe Abb. 1.1). Im vorderen Teil des Auges wird das Licht durch die Hornhaut und die Linse gebrochen und trifft im hinteren Teil auf die Netzhaut (Retina), wo die Umwandlung in elektrische Signale erfolgt.



**Abbildung 1.1:** Detaillierte anatomische Darstellung des menschlichen Auges.

Quelle: Augenteam.de

## 1.2 Die Retina

---

Die Retina entsteht entwicklungs-physiologisch aus einer Ausstülpung des Zwischenhirns, ist also neuronalen Ursprungs und in verschiedenen Zellschichten organisiert. Diese Schichten gliedern sich wie folgt (siehe Abb. 1.2):

1. Die Nervenfaserschicht (*Nerve Fiber Layer, NFL*), aufgebaut aus den Axonen der Ganglienzellen.
2. Die Ganglienzellschicht (*Ganglion Cell Layer, GCL*), sie enthält die Zellkörper der Ganglienzellen.
3. Die innere plexiforme Schicht (*Inner Plexiform Layer, IPL*), die die Axone und Dendriten der Bipolarzellen enthält, sowie die Dendriten der Amakrin- und Ganglienzellen.
4. Die innere Körnerschicht (*Inner Nuclear Layer, INL*), bestehend aus den Zellkörpern der Bipolar-, Amakrin- und Horizontalzellen.
5. Die äußere plexiforme Schicht (*Outer Plexiform Layer, OPL*), die die Dendriten der Bipolar- und Horizontalzellen beinhaltet, ebenso wie die Synapsen der Photorezeptoren.
6. Die äußere Körnerschicht (*Outer Nuclear Layer, ONL*), die aus den Zellkörpern der Photorezeptoren besteht. An die ONL schließt sich die Schicht der Innen- (*Inner Segments, IS*) und Außensegmente (*Outer Segments, OS*) der Photorezeptoren an.
7. Die äußere Grenzmembran (*Membrana Limitans Externa, MLE*), die von Ausläufern der Müllerzellen gebildet wird.
8. Die Außensegmente sind dem retinalen Pigmentepithel (RPE) benachbart.

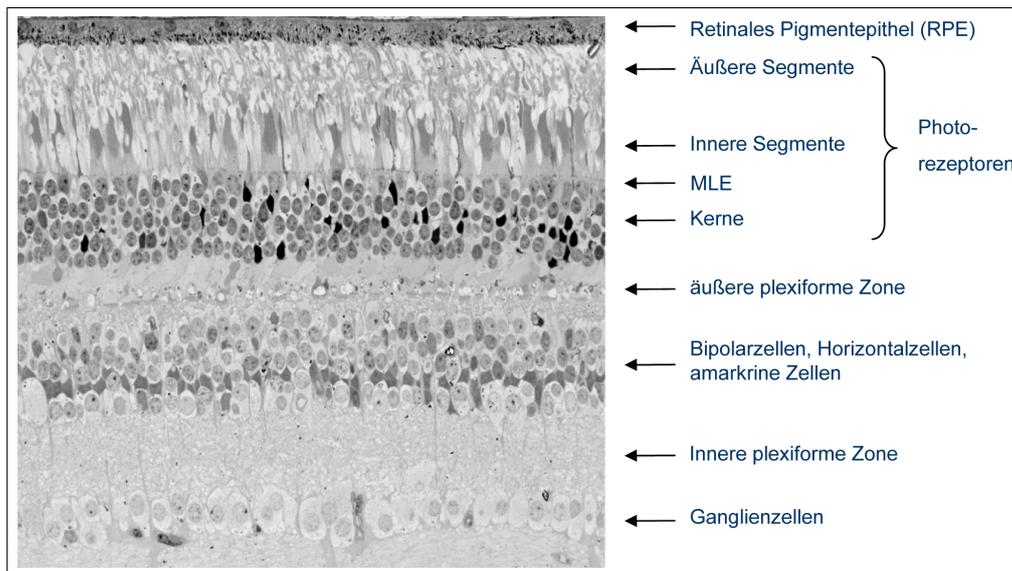


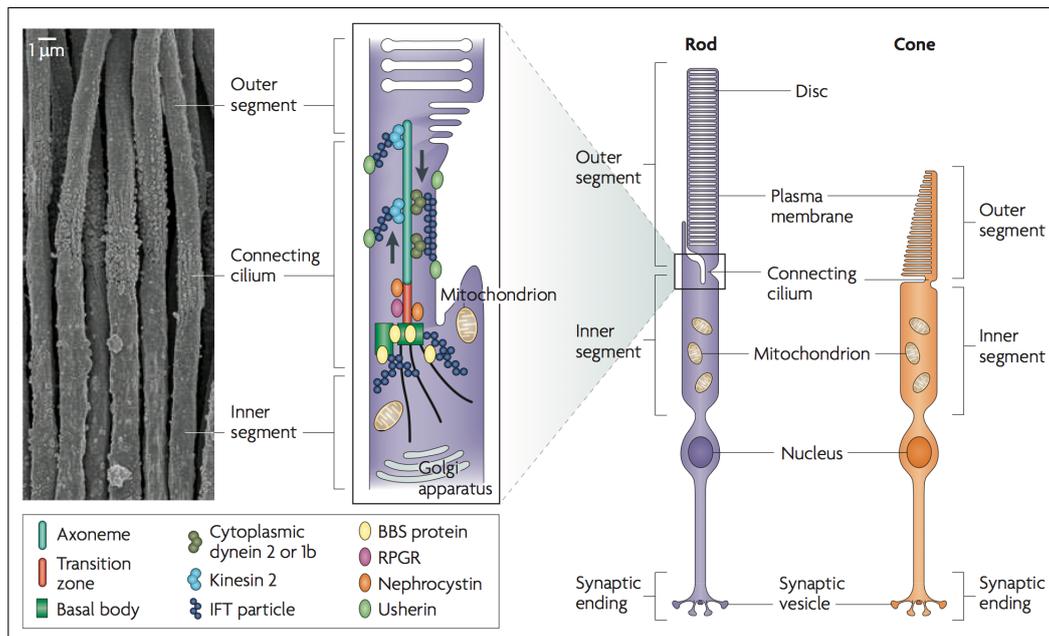
Abbildung 1.2: Histologischer Schnitt durch die Retina.

Quelle: Augenklinik Giessen

## 1.3 Die Photorezeptoren

Bei den Photorezeptoren der Säugetiere werden zwei Gruppen unterschieden, die Zapfen (*cones*) und die Stäbchen (*rods*). Beide Zelltypen setzen sich aus einem Außensegment (OS), einem Innensegment (IS), dem Zellkörper und einer synaptischen Endigung zusammen. Die Außensegmente bestehen aus Einstülpungen der Plasmamembran, den so genannten Discs. Bei den Stäbchen liegen die Discs als Stapel freischwimmender Scheibchen vor, während es sich bei den Zapfen um fingerförmige Ausstülpungen mit Kontakt zur Plasmamembran handelt. Die Membranen der Discs enthalten die verschiedenen Sehpigmente: Rhodopsin bei den Stäbchen und jeweils eines der drei Zapfenopsine bei den Zapfen.

Primaten besitzen anders als die meisten Säugetiere drei verschiedene Zapfentypen, die mit Hilfe ihrer Opsine Licht unterschiedlicher Wellenlänge absorbieren. Die Lichtabsorption und die anschließende Phototransduktionskaskade finden in den Membranen der Außensegmente statt. Alte Discs werden am äußersten Ende der Außensegmente abgestoßen und von dem



**Abbildung 1.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme und schematische Darstellung des Photorezeptors und des Connecting Cilium (CC).** Dargestellt sind die einzelnen Komponenten des *intraflagellar transport* (IFT) im CC. Abbildung übernommen aus [92].

angrenzenden Pigmentepithelzellen phagozytiert, während an der Basis der Photorezeptoren stetig neue Discs gebildet werden. Das Innensegment der Photorezeptorzelle beinhaltet alle Zellorganellen und liegt benachbart zum Zellkern. An das IS schließt sich die synaptische Endigung an, die die Verbindung zu den Bipolarzellen herstellt. Innen- und Außensegment werden durch das so genannte *Connecting Cilium* (CC) miteinander verbunden (siehe Abb. 1.3).

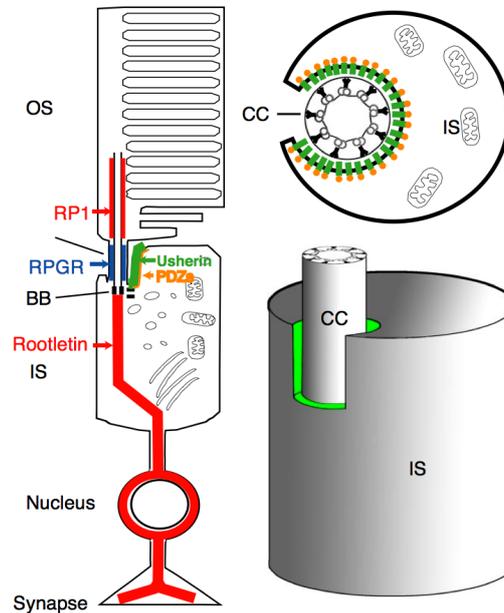
## 1.4 Cilien

Cilien sind dynamische Organellen, die von der Oberfläche einer Vielzahl verschiedener Zellen ausgehen. Sie bestehen aus zwei funktionellen Teilen, dem unter der Zelloberfläche lokalisierten Basal-Körper und dem Axonem (siehe Abb. 1.4). Anhand der Struktur des Axonems werden Cilien in zwei Klassen eingeteilt, primäre (nicht-motile) und sekundäre (motile) Ci-

lien [19]. Da die Proteine, die der Struktur und Aufrechterhaltung der Cilien dienen, organell-spezifisch sind, führen Mutationen in den Genen ciliärer Proteine zu einer Gruppe von Krankheiten die unter dem Begriff Ciliopathien zusammen gefasst werden. Ist hierbei nur ein Organ betroffen, spricht man von einer isolierten Ciliopathie, während die Störung mehrerer Organe als syndromische Ciliopathie bezeichnet wird [65]. Bei den Photorezeptoren der Vertebraten (Zapfen und Stäbchen) handelt es sich um stark polarisierte sensorische Zellen, die ein primäres Cilium enthalten, das als *Connecting Cilium* (CC) bezeichnet wird [24]. Das CC verbindet den lichtempfindlichen Teil des Photorezeptors, das Außensegment (OS), mit dem strukturell sehr andersartigen Inneren Segment (IS), das die höchste Mitochondriendichte aufweist und in dem die Proteinproduktion stattfindet. Bedeutend ist, dass das CC die einzige Verbindung zwischen den Zellkompartimenten darstellt und somit ein unerlässlicher Transportkanal für Proteine und andere vom OS benötigte Moleküle ist [30].

Da das OS fortwährend durch das Abstoßen der Discs in das Retinale Pigment Epithel (RPE) und die Bildung neuer Discs an seiner Basis erneuert wird, ist ein ununterbrochener Transport durch das CC essentiell [96]. Ein Komplex aus unterschiedlichsten Interaktionspartnern ist an diesem Transportmechanismus beteiligt, wobei bislang noch nicht der gesamte Apparat aufgeklärt ist [70]. Das CC enthält ein mikrotubuli-basiertes Axonem, das aus dem Basalkörper am distalen Ende des IS entspringt und bis in das OS reicht [30] [45]. Seine Kernstruktur bildet die typische 9+0 Mikrotubuliformation (siehe Abb. 1.4). Das CC spielt eine entscheidende Rolle im directionalen Transport von Proteinen zum OS des Photorezeptors, da alle benötigten Komponenten für die Synthese des OS mittels intraflagellarem Transport (IFT) durch das CC transportiert werden müssen [40], [71], [24]. Da IS und OS des Photorezeptors eine unterschiedliche Proteinkomposition haben, dient das CC außerdem als Barriere gegen eine diffusions-getriebene Umverteilung [80]. Opsin und andere Phototransduktionsproteine werden mittels anterogradem Transport durch das CC transferiert, während Arrestin und Transducin durch bidirectionale Bewegung transportiert wer-

den [49].



**Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung eines Photorezeptorlängsschnitts mit in blau eingezeichnetem RPGR (links) und eines Querschnitts durch das Connecting Cilium (rechts). Das Rückgrat des CC wird durch das sog. Axonem gebildet, in dem Mikrotubuli Duplets in der für primäre Cilien typischen 9+0 Struktur kreisförmig angeordnet sind. Abbildung übernommen aus [46]

## 1.5 RPGR und seine Rolle im Photorezeptor Connecting Cilium

Das Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR) Protein stellt eine wichtige Komponente des Ciliums dar und ist im CC und im OS des Vertebraten-Photorezeptors konzentriert [68] [93] [32] [33] [30]. RPGR interagiert mit diversen IFT Proteinen (siehe Abb. 1.6), weshalb vermutet wird, dass es eine Rolle beim Transport durch das CC und bei der Disc Morphogenese spielt [3]. Durch die massive Expression von RPGR in allen Cilien enthaltenden Zellen sind Mutationen in den korrespondierenden Genen mit verschiedenen syndromischen Ciliopathien, wie dem Bardet-Biedl Syndrom,

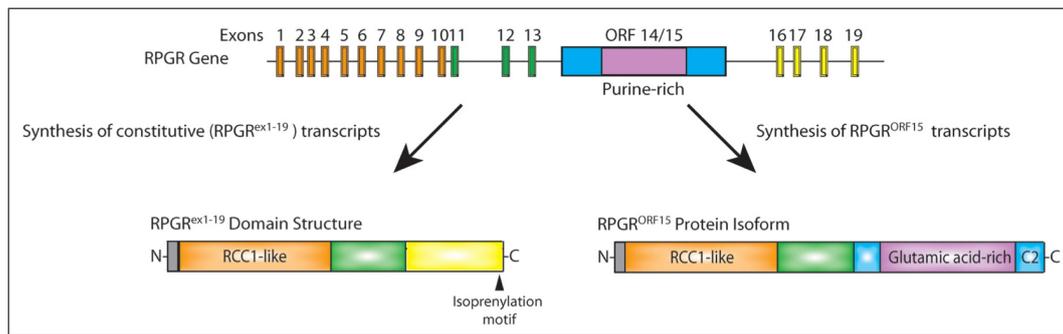
dem Joubert Syndrom, dem Senior-Loken Syndrom und dem Usher Syndrom assoziiert [3]. Interessanterweise ist bei all diesen Syndromen die Retina in die Pathologie involviert.

Mutationen im *RPGR* Gen können darüber hinaus auch eine isolierte Ciliopathie der Photorezeptorzellen verursachen, die X-gebundene Retinitis Pigmentosa (XLRP). 70% aller XLRP Fälle gehen auf Mutationen im *RPGR* Gen zurück, was 15% aller RP Fälle entspricht [28]. Das *RPGR* Gen ist in der chromosomalen Region Xp21.1 lokalisiert, umfasst 172 Kilobasen und wurde ursprünglich mit 19 Exons beschrieben [50]. Das kodierte Protein wird in vielen Cilien tragenden Geweben des Körpers exprimiert. Vervoort und Mitarbeiter identifizierten jedoch ein zusätzliches alternativ "gesplicetes" C-terminales Exon, den sog. *Open Reading Frame 15* (ORF15) siehe Abb. 1.5, welcher bislang nur in den Photorezeptoren in größeren Mengen gefunden wurde [88].

Zusätzlich zu diesen beiden Hauptvarianten des Genprodukts existieren noch verschiedene alternativ "gesplicete" Varianten [30]. Der Grund für dieses komplexe Expressionsprofil von *RPGR* ist bislang noch nicht aufgeklärt [30]. Sequenzanalysen unterschiedlicher alternativer Splicevarianten zeigen starke strukturelle Ähnlichkeit der N-terminalen Hälfte des Genprodukts mit dem Regulator of Chromatin Condensation (RCC1), der als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) der Ras-like GTPase Ran agiert [69]. Aus diesem Grund wird der amino N-terminale Teil des *RPGR* Proteins als RCC1-like Domäne (RLD) bezeichnet [69] [50] [56] [93].

Bei dem ubiquitär exprimierten *RPGR* Gen, das die Exone 1-19 (*RPGR<sup>ex1-19</sup>*) enthält, kodiert der 5' terminale Teil der mRNA (Exon 1-11) die RLD, wohingegen der 3' terminale Teil (Exon 12-19) für eine Domäne kodiert, die reich an sauren Aminosäuren ist und in ein Isoprenylierungs-Ankersignal endet.

Das *RPGR<sup>ex1-19</sup>* Gen kodiert für 815 Aminosäuren, während die photorezeptor-spezifische *RPGR* mRNA des terminalen ORF15 für 1152 Aminosäuren kodiert [88]. Zusätzlich zu den Exons 1-14, die es mit *RPGR<sup>ex1-19</sup>* teilt, enthält es ein für 567 Aminosäuren kodierendes terminales Exon mit



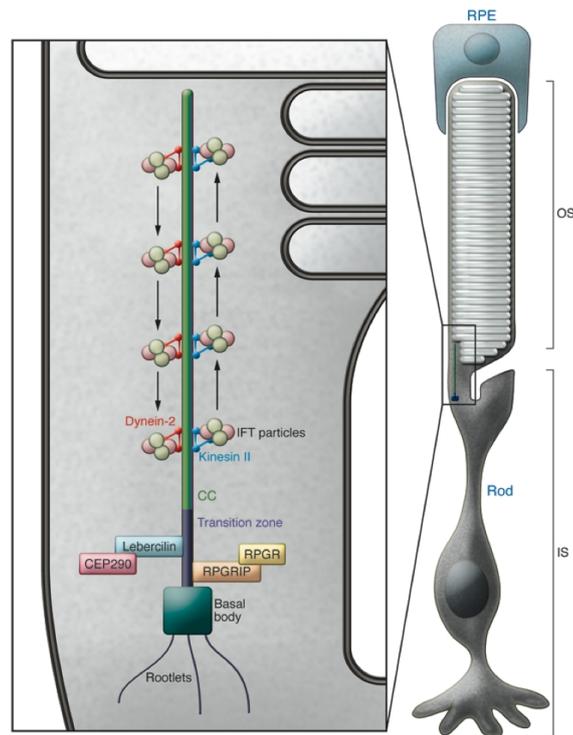
**Abbildung 1.5: Splicevarianten von RPGR:** Alternatives SPLICEN führt zur Expression von organspezifischen RPGR Transkripten und Protein Isoformen. Abbildung verändert nach [94].

einer repetitiven glutamatreichen Domäne (siehe Abb. 1.5). Die Rolle von RPGR Proteinen in dieser Transportmaschinerie ist noch nicht völlig aufgeklärt, aber einige Studien deuten darauf hin, dass es eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung eines effizienten IFT spielt [65].

### 1.5.1 RPGR Interaktionspartner und Intraflagellärer Transport (IFT)

Ein wichtiger Interaktionspartner von RPGR ist das RPGR- Interacting Protein 1 (RPGRIP1) (siehe Abb. 1.6) [68] [25]. Es konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne von RPGR (RLD) mit dem C-terminalen Teil von RPGRIP1 interagiert, welches ausschließlich im Photorezeptor exprimiert wird und zwischen der äußeren Wand des Mikrotubulidupletts und der Plasmamembran lokalisiert ist [99] [33]. Bei Mausmodellen mit RPGRIP1 Defizit liegt RPGR im Photorezeptor delokalisiert vor [99], während bei Mausmodellen bei denen RPGR fehlt das RPGRIP1 nicht delokalisiert ist [99]. Diese Beobachtung indiziert, dass RPGRIP1 als ein Mikrotubuli - gebundenes Protein das lösliche RPGR an das ciliäre Axonem des Photorezeptors und der Centriolen verankert [77].

Den ersten Beweis für die Beteiligung von RPGR an der IFT Funktion lieferte ein Mausmodell, das eine Mutation im Gen für das intraflagellare Trans-

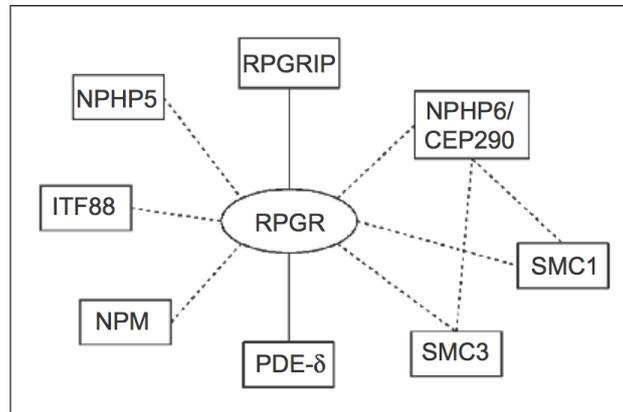


**Abbildung 1.6:** Schematische Darstellung der Transportmaschinerie des intraflagellären Transports (IFT) im CC. Zellprodukte werden vom Inneren in das Äußere Segment über eine Dynein/ Kinesin vermittelte Bewegung transportiert. Abbildung übernommen aus [73]

port Polypeptid 88 (IFT88) enthält (siehe Abb. 1.7). IFT88 wird für die Konstruktion und Aufrechterhaltung des OS und die Lebensfähigkeit des Photorezeptors benötigt [62]. Immunopräzipitationsstudien bestätigten die Theorie der RPGR Interaktion mit IFT88 und außerdem einigen Mikrotubuli. So wurde gezeigt, dass RPGR eine Komponente der Centriolen, der ciliären Axoneme und des microtubulären Transports ist [37] [24] [93]. Zusätzlich zu den offensichtlichen Funktionen im IFT interagiert RPGR mit anderen Partnern, wodurch es zu einem multifunktionellen Protein wird (siehe Abb. 1.7). Zum Beispiel interagiert auch die RCC1-like Domäne (RLD) des RPGR mit der delta-Untereinheit der cyclic GMP Phosphodiesterase (PDE6D) der Stäbchen, die die Ablösung der Phosphodiesterase vom OS der Stäbchen Diskmembran reguliert [42] [18]. Darüber hinaus ist das Protein Nucleo-

phosmin (NPM) mit RPGR assoziiert (siehe Abb. 1.7), das als multifunktionales Protein an der zentrosomalen Teilung beteiligt ist. NPM agiert möglicherweise auch als Chaperon bei der Bildung von RPGR<sup>ORF15</sup> enthaltenden Proteinkomplexen [77]. Das Cilia-Centrosomal Protein CEP290 (NPHP6) interagiert ebenfalls mit RPGR im CC (siehe Abb. 1.7) und reguliert den intrazellulären Transport durch die Erfüllung verschiedener mikrotubuli-basierter Transportfunktionen [15] [21]. CEP290 zeigt nicht nur Homologie zu den chromosom-assoziierten SMC (structural maintenance of chromosome) Proteinen (siehe Abb. 1.7), es ist außerdem mit ihnen im CC assoziiert [37]. Zudem wurde gezeigt, dass zwei SMC Proteine (SMC1 und SMC3) direkt mit der RPGR-RLD Domäne im Photorezeptor-Axonem interagieren. Bei diesen handelt es sich um ATP-bindende Proteine, die an der ATP-abhängigen Chromosomenbewegung während der Zellteilung beteiligt sind [85], und die im CC des Photorezeptors mit ziliären Mikrotubuli assoziiert sind [11]. Durch Co-immunopräzipitations-Assays mit retinalen Extrakten konnte gezeigt werden, dass der Multiproteinkomplex, in den RPGR<sup>ORF15</sup> involviert ist, auch ein Protein enthält, das als Nephrocystin-5 bekannt ist. Nephrocystin-5 ist durch das Gen IQCB1 kodiert, das auch NPHP5 genannt wird [58]. NPHP steht für Nephronophthisis und bezeichnet eine Ciliopathie, die von zystischen Nieren, retinaler Degeneration und Fehlbildungen des Neuralrohrs gekennzeichnet ist [58]. Es ist bekannt, dass bei allen Individuen mit Mutationen im NPHP5 RP auftritt, was seine Wichtigkeit für die ziliäre Funktion unterstreicht [58]. Bislang wurde allerdings noch keine direkte Interaktion zwischen Nephrocystin-5 und RPGR<sup>ORF15</sup> nachgewiesen [58]. Ein weiterer Interaktionspartner ist die GTPase RAB8A, von der bekannt ist, dass sie den Rhodopsintransport in den Photorezeptoren reguliert [52] und deren Beteiligung an der Ziliogenese und der Erhaltung der Zilien gerade bewiesen wurde [53]. Es wird angenommen, dass die intrazelluläre Lokalisation und Funktion von RAB8A durch die Interaktion mit RPGR moduliert wird, und dass ein Verlust dieser Interaktion für die Photorezeptordegeneration bei XLRP verantwortlich ist [53].

Neben der Maus dient auch der Zebrafisch als Modellorganismus zur Cha-



**Abbildung 1.7:** Darstellung der einzelnen am IFT beteiligten Proteine und ihrer Interaktionspartner in der transitional zone des Photorezeptors. Abbildung übernommen aus [34]

rakterisierung der Funktion von RPGR, da Transkripte, wie sie bei Zebrafischen zu finden sind, dem humanen  $RPGR^{ORF15}$  und  $RPGR^{ex1-19}$  ähnlich sind. Mit verschiedenen *knock-down* und *rescue* Experimenten wurden die Funktion von RPGR im IFT und mögliche Mutationseffekte im Zebrafisch untersucht [78]. Die Ergebnisse zeigen, dass RPGR essentiell für zilienabhängige Entwicklungsprozesse beim Zebrafisch ist und dass RPGR Mutationen verschiedene Effekte zur Folge haben können. Der komplette Verlust der RPGR-Funktion während der Zebrafischentwicklung führt zur Lethalität der Tiere [26]. Da eine Störung der Photorezeptorentwicklung festgestellt werden konnte wird vermutet, dass die N-terminale Domäne von RPGR (kodiert durch Exon 1-13) essentiell für die Erhaltung des Ziliums ist, aber nicht für die Ziliogenese oder die Photorezeptorentwicklung [26].

## 1.5.2 RPGR Mutationen

Es wird vermutet, dass Mutationen im *RPGR* Gen zu einem eingeschränkten Opsin Transport in das Außensegment (OS) führen. Da Opsine bis zu 90% aller Proteine im OS ausmachen, könnte ihre Mislokalisierung eine fehlende oder zumindest nicht funktionelle OS Bildung zur Folge haben. Interessanterweise sind 80% aller Sequenzänderungen des *RPGR* Gens in der

ORF15 Region lokalisiert, weshalb diese Region als *mutational hot-spot* des RPGR bezeichnet wird [88] [72]. Die übrigen Mutationen sind weit über die gesamte kodierende Region verteilt, mit Ausnahme von Exon 1 und den Exons 16-19. Die Wildtyp ORF15 Domäne ist gekennzeichnet durch ein repetitives Motiv aus Glutaminsäure (E) und Glycin (G), welches als unvollständige Wiederholung von EEEGEGEGE beim Menschen und EE-GE-GE bei der Maus vorliegt. Dieses Motiv ist evolutionär zwischen den Spezies konserviert [77]. Mutationen im ORF15 Exon führen nicht zu einem *non-sense mediated decay* (NMD), da dieses Exon an terminaler Position liegt. NMD verhindert die Translation von Proteinen, wenn die mRNA einen vorzeitigen Kettenabbruch kodiert, das heißt ein so genanntes vorzeitiges Stop Codon enthält. Das ist allerdings nur der Fall, wenn die Mutationen nicht im terminalen Exon auftreten. Aus diesem Grund verursachen die *frame-shift* und/oder *out-of-frame* Deletionen, die häufig im ORF15 vorkommen, eine von drei möglichen Veränderungen des Proteins (siehe Abb. 1.8) [88] [75] [12]. Zum einen kann der *frame-shift* einen vorzeitigen Stop verursachen, wodurch das Protein in verkürzter Form hergestellt wird, wobei das GE Motiv oder der hintere Teil des Proteins nicht enthalten sind. Möglich sind auch Mutationen im Gen, die eine neue C-terminale Aminosäurekette generieren. Ein 1bp *shift* erzeugt ein Motiv aus Arginin (R) und Lysin (K) Wiederholungen (RGKRRKEKG), während ein 2bp *shift* ein Motiv aus Glycin und Arginin (GGRGGRRRG) erzeugt [76]. Diese Aminosäureketten enthalten hauptsächlich basische Aminosäuren, wodurch sich einige der charakteristischen biochemischen Eigenschaften des Proteins wie etwa der isoelektrische Punkt (von 4 zu 7-9) grundlegend ändern (siehe Tab. 3.1) [88] [76].

Eine Korrelation zwischen der Lokalisation der Mutation im ORF15 und dem Phänotyp scheint sehr wahrscheinlich (siehe Abb. 1.8) [75] [98]. Es wird vermutet, dass eine Mutation, die am 3' Ende des ORF15 lokalisiert ist und so eine verkürzte Proteinsequenz verursacht, zu einem milder ausgeprägten Phänotyp führt [76] [20] [22]. Im Gegensatz dazu führt eine Mutation, die in 5' Richtung auf der mRNA lokalisiert ist und eine verlängerte Ami-

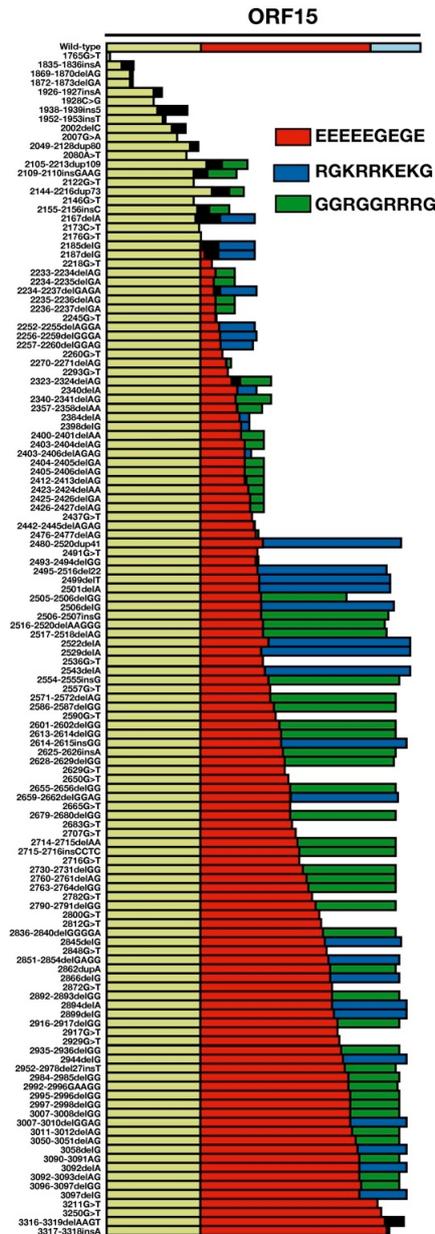


Abbildung 1.8: Darstellung des C-terminalen Bereiches bei Patienten mit Mutationen im ORF15. Vermutet wird eine Korrelation zwischen Mutationsort und Schwere des resultierenden Phänotyps. Abbildung übernommen aus [76]

nosäurekette verursacht möglicherweise zu einem schwerer verlaufenden Phänotyp [12] [88] [8]. Interessanterweise zeigen beide Photorezeptortypen Anzeichen der Erkrankung bevor sie völlig ausgereift sind. Außerdem wird

beobachtet, dass die Stäbchen sehr viel früher zugrunde gehen als die Zapfen [75]. Der Grund für die Unterschiede in der Überlebensrate ist noch ungeklärt. Bislang bleiben auch die Interpretation genetischer Mutationen und ihre Korrelation mit phänotypischen Symptomen schwierig, da die Funktion des photorezeptor-spezifischen ORF15 Exons noch nicht vollständig bekannt ist.

## 1.6 Retinitis Pigmentosa

---

Retinitis Pigmentosa (RP) umfasst eine heterogene Gruppe von retinalen Störungen, die die Degeneration von Photorezeptoren verursachen, wodurch es zu fortschreitender Erblindung kommt. Insgesamt sind bislang über 100 Gene bekannt, deren Mutationen RP auslösen können, wovon 30 allein für nicht syndromische Formen verantwortlich gemacht werden. Aufgrund der heute möglichen molekulargenetischen Befunde können mehr als 30 verschiedene Formen von RP unterschieden werden. Die Bezeichnung Retinitis Pigmentosa ist also als historisch begründeter klinischer Sammelbegriff für verschiedene erbliche Erkrankungen der Retina mit ähnlicher symptomatischer Ausprägung zu verstehen, der zunächst keine Aussage über die genaue Krankheitsursache zulässt. Die weltweite Prävalenz für RP beträgt 1:4000, wobei die Krankheit sowohl autosomal-dominant (30-40%), autosomal-rezessiv (50-60%) als auch X-chromosomal (5-15%) vererbt werden kann [28]. Gekennzeichnet ist die RP durch Nachtblindheit, Gesichtsfeldausfälle und eine schleichende Verschlechterung der Sehfähigkeit bis hin zur vollständigen Erblindung. Beim klassischen Verlauf einer RP beginnt die Einschränkung des Gesichtsfeldes von der Peripherie in Richtung Zentrum, was von den Betroffenen selbst oft erst spät bemerkt wird, da fehlende Seheindrücke zum Teil vom Gehirn kompensiert werden [47]. In späten Stadien der Krankheit kann die Makula ebenfalls von den Ausfällen betroffen sein, was zur Erblindung des Betroffenen führt [28] [51] [64] [7].

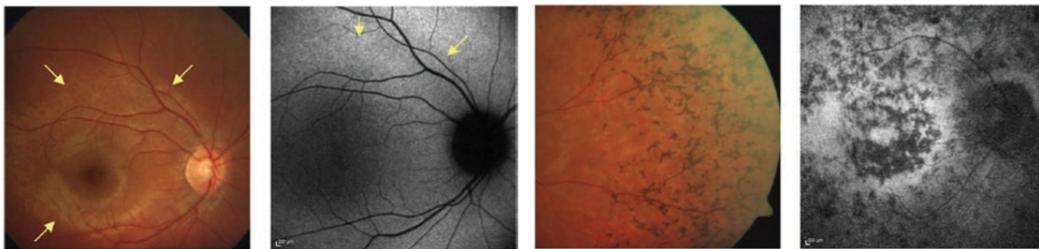
## 1.7 XLRP und die Beteiligung von RPGR an retinalen Erkrankungen

---

Die X-chromosomale Form der RP (XLRP) wird in 80% der Fälle durch Mutationen im *RPGR* Gen verursacht [75] [76]. *RPGR* Mutationen können jedoch auch seltene Zapfen-Stäbchen Dystrophien hervorrufen, und stellen mit etwa 20% die wohl häufigste genetische Ursache für RP dar [20]. Viele RP Fälle, bei denen kein Vererbungsschema nachgewiesen werden konnte, hängen ebenfalls mit Mutationen im *RPGR* Gen zusammen. Außerdem wurden seltene Formen von X-chromosomaler Zapfen-Dystrophie [95] ebenso wie atrophische Makuladegenerationen [7] und RP assoziierte Hörstörungen [100], die auf *RPGR* Mutationen zurückgehen, beschrieben. Der Phänotyp ist üblicherweise gekennzeichnet durch das Einsetzen von Nachtblindheit mit Gesichtsfeldeinschränkung. Da Stäbchen und Zapfen von dieser Pathologie betroffen sind, wird Sehschärfe (Zapfenfunktion), Gesichtsfeld (Stäbchen- und Zapfenfunktion) und Nachtsicht (Stäbchenfunktion) bereits in der ersten Dekade des Lebens reduziert, wobei im Elektroretinogramm (ERG) weniger als 10% der Normalaktivität gemessen werden [47]. Bis zu 90% der XLRP Patienten können anhand der Veränderungen in Fundus (siehe Abb. 1.9) und ERG identifiziert werden [6]. Außer im ERG zeigen sich auch in anderen klinischen Untersuchungen wie der Goldmann Perimetrie, der Funduskopie, der Dunkeladaptation und der Fundusautofluoreszenz (FAF) Auffälligkeiten (siehe Abb.1.9). Die FAF ist bedingt durch die Akkumulation von Lipofuscin im RPE, was bei Anregung mit einem kurzwelligen (blauen) Laser zu einem Fluoreszenzsignal führt. Die Akkumulation von Lipofuscin, welches Retinoid-Metabolite enthält, unterscheidet sich bei bestimmten Erkrankungen, XLRP eingeschlossen [89]. Das abnormale FAF Signal bei Anlagenträgern ist wahrscheinlich auf die mosaikartigen Muster zurückzuführen, die das Expressionsmuster des *RPGR* Defekts widerspiegeln. Dieses Muster tritt bedingt durch die X-gebundene Geninaktivierung auf, was bei einigen Anlageträgern in der FAF besser zu

beobachten ist als in der Funduskopie [90].

Bei betroffenen Männern ist ein Ring erhöhter Autofluoreszenz rund um die Makula zu sehen. Dieser wird als Bereich absterbender Photorezeptoren angesehen, wie er auch bei anderen Formen von Stäbchen-Zapfen Dystrophien zu beobachten ist [41] [57]. Die Bildung von so genannten Knochenkörperchen ist ein typisches Zeichen für XLRP, ebenso wie die Verengung von retinalen Gefäßen und die konzentrische Einengung des Gesichtsfeldes [57]. Bisher existieren keine histopathologischen Daten der Retinae betroffener Patienten, es konnten lediglich zwei weibliche Konduktorinnen untersucht werden. Bei einer solchen Konduktorin führte die Deletion eines Nucleotids im ORF15 zu einem *frame-shift*, der eine Verkürzung des RPGR Proteins zur Folge hatte. Es traten lokale Degenerationen von Stäbchen und Zapfen auf, außerdem ein ausgeprägter wenn auch nicht vollständiger Verlust von Stäbchen im parafovealen Bereich [4]. Bei der zweiten Konduktorin wurde eine Mutation in Exon 11 des *RPGR* Gens festgestellt. Histologische Untersuchungen zeigten delokalisierte rot/grün- und blau- Zapfenopsine in einigen Zapfen. Zudem war auch Rhodopsin in einigen Stäbchen delokalisiert [2].



**Abbildung 1.9: Funduskopie und Fundusautofluoreszenz (FAF) von Patienten mit XLRP aufgrund von Mutationen im *RPGR* Gen.** Von links nach rechts: Bild 1 zeigt die Funduskopie eines 7 Jahre alten Patienten. Die Pfeile markieren den sog. *Tapetalen Reflex* der makulären Gegend, der in Bild 2 (FAF) verstärkt zu sehen ist. Die Bilder 3 und 4 zeigen Aufnahmen von Patienten in fortgeschrittenem Krankheitsstadium, mit Knochenkörperchen und pathologischen Veränderungen der FAF. Abbildung verändert nach [34].

## 1.8 Tiermodelle

---

Für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien in der Humanmedizin ist der Einsatz von Tiermodellen bis heute unerlässlich. Die Struktur und Funktion der meisten Gene sind bei Mensch und Säugetier homolog und genetische Erkrankungen treten oft gleichermaßen auf [91]. Zudem haben die vollständige Sequenzierung der Genome von Mensch, Hund, Katze, Maus und einer wachsenden Zahl an Organismen sowie die Fortschritte in der Genomik zu einem tieferen Verständnis der Genfunktionen beigetragen [91]. Um einen geeigneten Modellorganismus aus der Vielzahl an möglichen Spezies auszuwählen, ist es erforderlich, verschiedene Parameter zu beachten. Abgesehen von der morphologischen Eignung eines Tieres als Krankheitsmodell müssen auch technische Aspekte berücksichtigt werden. Vor allem die Haltungsbedingungen größerer Tiere sowie lange Generationszyklen können sich als problematisch erweisen, aber auch eine geringe Größe einiger Tiere kann von Nachteil sein [81] [91]. Mäuse dienen seit langem als bevorzugtes Modell, da sie relativ einfach zu halten sind und durch ihre kurzen Reproduktionszyklen eine große Zahl an Nachkommen produzieren. Der entscheidende Vorteil der Maus liegt aber in der Möglichkeit gezielt Genmanipulationen durchführen zu können, um transgene Tiere zu erzeugen. Im folgenden Abschnitt werden die bislang verfügbaren Tiermodelle für RPGR bedingte Störungen beschrieben.

### 1.8.1 Mausmodelle

Bei den bisher vorhandenen Modellen wurden sehr verschiedene Veränderungen am *Rpgr* Gen vorgenommen, wodurch sich unterschiedliche Auswirkungen ergeben (siehe Abb. 1.10). Im Jahr 2000 haben Hong und Kollegen durch die Deletion von Exon 4-6 ein *knock-out* Mausmodell etabliert, um die Funktion von *Rpgr* und den Effekt seiner Abwesenheit im CC zu untersuchen [32]. Es zeigte sich, dass bei diesen Mäusen die Zapfenopsin-Lokalisation in den Disks des OS verändert ist. Da die Opsine bis zu 90%

aller Proteine in den Disks der Außensegmente ausmachen, verursacht ihre Delokalisation eine Einschränkung der Funktionalität der Photorezeptoren, die auf die fehlende OS Bildung zurück geht. Diese *knock-out* Mauslinie wurde in Verbindung mit einer *Rpgr*1 *knock-out* Mauslinie dazu genutzt, die Interaktion von *Rpgr* mit *Rpgr*1 im CC nachzuweisen (siehe Abb. 1.10).

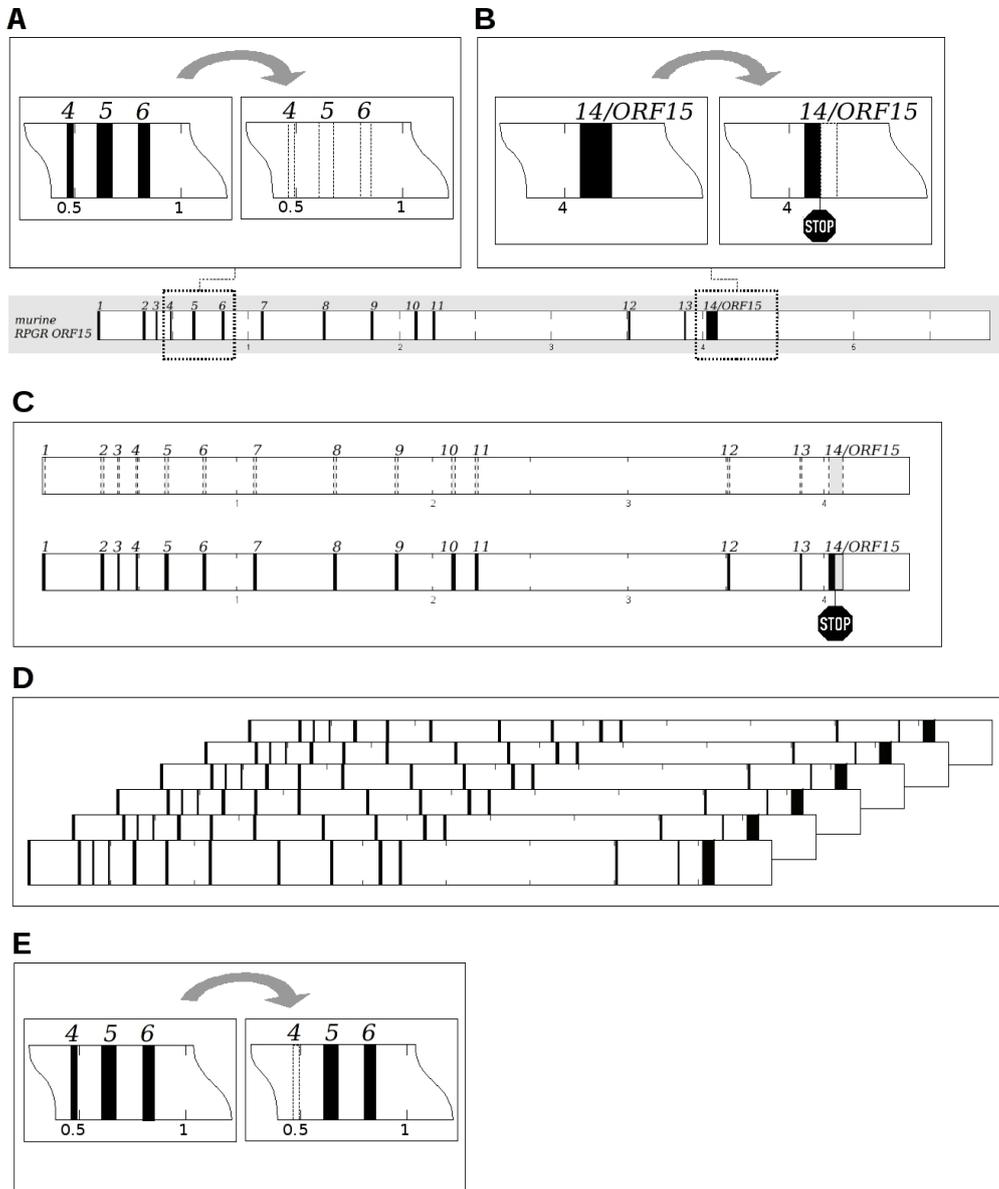
Dieselbe Gruppe entwickelte noch weitere Mausmodelle, von denen eines eine *in-frame* Deletion in der repetitiven purin-reichen Region von *Rpgr*<sup>ORF15</sup> enthält, was zu einer verkürzten mRNA aufgrund eines vorzeitigen Stop-Codons führt (siehe Abb. 1.10) [29]. Dieses Mausmodell wurde auf der Basis eines *knock-out* Hintergrundes durch pronukleäre Injektion hergestellt. Das veränderte Protein verursacht eine schnellere Photorezeptordegeneration als bei der ursprünglichen *knock-out* Variante, was darauf hindeutet, dass verkürzte Formen von *Rpgr* sogenannte *toxic gain-of-function* Veränderungen auslösen und auf diese Weise zu einem schweren Krankheitsverlauf führen können [29].

Das andere Modell aus dem Jahre 2005 wurde abermals auf der Basis eines *knock-out* Modells erzeugt (siehe Abb. 1.10). Ziel war es zu zeigen, ob ein *rescue* der Photorezeptorzellen möglich ist, indem eine verkürzte Variante von *Rpgr*<sup>ORF15</sup> exprimiert wird, und ob die *Rpgr* Funktion durch die retina-spezifische ORF15 Variante ersetzt werden kann [31]. Durch diese Studie konnte gezeigt werden, dass die Länge der repetitiven Region im *Rpgr*<sup>ORF15</sup> verkürzt werden kann, während die Funktion erhalten bleibt.

Ein weiteres Mausmodell wurde von Brunner und Kollegen generiert, bei dem das wildtyp (*wt*) *Rpgr* Gen in einem wildtyp *Rpgr* Hintergrund überexprimiert wurde. Hierzu wurden variierende Kopienzahlen des genomischen *Rpgr* Fragments durch pronucleäre Injektion eingeführt (siehe Abb. 1.10) [13]. Das überexprimierte Protein verursachte schwere Fertilitätsstörungen, die auf eine beeinträchtigte Spermatogenese zurückgehen. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Schwere der Störung mit der Kopienzahl des eingebrachten *Rpgr* korreliert ist. Dieser Effekt hoher *Rpgr* Proteinkonzentrationen auf die Spermienflagellen verdeutlicht die Wichtigkeit der

Rolle von Rpgr und seiner korrekten Menge in der normalen Zilienfunktion.

Bei einem zweiten Mausmodell, das von derselben Arbeitsgruppe entwickelt wurde, wurde eine *splice-site* Mutation eingeführt, die durch *defective splicing* zu einer *in-frame* Deletion von Exon 4 führt (siehe Abb. 1.10) [14]. Die Deletion von Exon 4 führt hierbei also nicht zu einer Veränderung des Leserasters, aber zu einer Verkürzung der RLD um 21 Aminosäuren [39]. Es wird ein verkürztes Protein produziert, dessen Funktionalität jedoch ungewiss ist. Es wurden Fehllokalisationen sowohl von Rhodopsin als auch von Zapfenopsin beobachtet. Diese Mutation wurde sowohl in pigmentierte BL/6J Mäuse als auch in unpigmentierte (albino) BALB/c Mäuse eingebracht, wobei beide Mauslinien einen milden, aber unterschiedlichen Phänotyp ausprägten. Die BL/6J Mäuse entwickelten einen milden Phänotyp mit Stäbchen-Beteiligung, während die BALB/c Mäuse von einer frühen Zapfen-Stäbchen-Degeneration betroffen waren.



**Abbildung 1.10: Mausmodelle mit *Rpgpr* Mutationen:** **A:** *Knock-out* Mausmodell mit Deletion von Exon 4-6. **B:** Mausmodell mit *in-frame* Deletion in ORF15 und dadurch hervorgerufenem vorzeitigem Stop-Codon **C:** Mausmodell mit verkürzter Splice-Variante von ORF15. **D:** Mausmodell mit Überexpression des Rpgpr Proteins **E:** Mausmodell mit einer *in-frame splice-site* Mutation die einen Verlust von Exon 4 hervorruft und dadurch ein verkürztes Protein. Abbildung verändert nach [34].

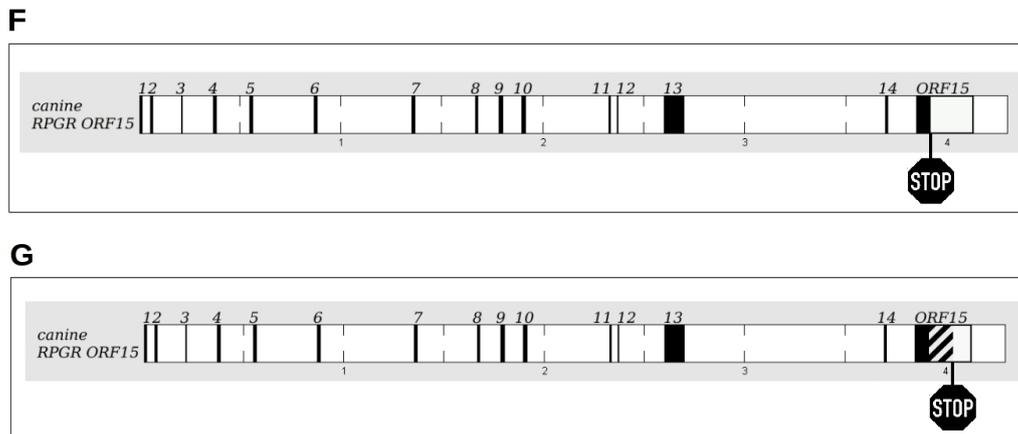
## 1.8.2 Hundemodelle

Abgesehen von den gentechnisch erzeugten Mausmodellen ist das einzige natürlich vorkommende Tiermodell für XLRP der Hund. Bestimmte Hunderrassen, die Mutationen im *RPGR* Gen enthalten, wurden identifiziert und charakterisiert. Die beim Hund auftretende Erkrankung wird als *X-linked progressive retinal atrophy* (XLPRA) bezeichnet und ist mit XLRP zu vergleichen (siehe Abb. 1.11). Hierbei sind zwei Phänotypen zu unterscheiden, die XLPRA1 und die XLPRA2 [98].

XLPRA1 wird durch die Deletion von 5 Nukleotiden verursacht, die zu einem vorzeitigen Stop-codon führt, wodurch dem Protein der C-terminale Teil fehlt. Diese Mutation wurde beim Sibirischen Husky und beim Samoje den gefunden [1] [97] [98]. Die Photorezeptoren entwickeln sich normal und sind funktionell, wobei die retinale Funktion bis zu einem Alter von 6 Monaten und darüber hinaus normal bleibt. Später jedoch nimmt die Amplitude der ERG Antwort bei dunkeladaptierten Zapfen und Stäbchen ab [97]. Morphologisch bleiben die Photorezeptoren bis zum jungen Erwachsenenalter der Tiere erhalten, bevor die Stäbchen die ersten Anomalien zeigen und die Degeneration der Außensegmente beginnt. Veränderungen bei den Zapfen treten erst spät im Krankheitsverlauf auf und sind relativ gering, wobei eine große Anzahl an Zapfen erhalten bleibt [98].

XLPRA2 wird durch die Deletion von zwei Nukleotiden hervorgerufen, die möglicherweise zu einer sog. *toxic gain of function* Veränderung der Proteinsequenz führt, das heißt zu einem Protein, welches durch seine veränderten Eigenschaften in der Zelle Schaden anrichtet. Diese Mutation wurde bei Mischlingshunden beobachtet. Bereits die Photorezeptorentwicklung ist erheblich gestört. Bei diesen Hunden können Unregelmäßigkeiten im ERG schon im Alter von 5-6 Wochen beobachtet werden, wobei die Amplitude der Antworten gering ist und auch die Wellenlänge abnormal [98]. Die Außensegmente sind desorganisiert und die Photorezeptorzellen degenerieren schon im Alter von 4 Monaten, wobei das Endstadium der Degeneration im Alter von 2 Jahren erreicht ist [98].

Der Hauptunterschied dieser beiden Tiermodelle besteht nicht nur in der Zeitspanne der Degeneration, sondern auch in der ungleichen Morphologie der Photorezeptoren. Während die verbleibenden Photorezeptoren bei XLPRA1 normal und unauffällig sind, ist dies bei der XLPRA2 nicht der Fall. Bei diesen Tieren ist bereits die Retinogenese gestört und auch die überlebenden Photorezeptoren zeigen strukturelle Veränderungen [98]. Da die Mutationen beim Hund denen des Menschen ähneln, war die Analyse der Netzhäute erkrankter Tiere und auch die der weiblichen Anlagenträger essentiell für die Gewinnung neuer Informationen über die zugrunde liegenden Mechanismen [9]. Für die Entwicklung einer geeigneten Gentherapie beim Menschen werden diese Tiere unverzichtbar sein.



**Abbildung 1.11: Bislang bekannte Hundemodelle:** **F:** Natürlich auftretendes Hundemodell für XLRP mit einer Deletion von 5 Nucleotiden im ORF15. **G:** Natürlich auftretendes Hundemodell mit einer Deletion von 2 Nucleotiden die einen frühzeitigen Stop hervorruft. Abbildung verändert nach [34].

## 1.9 Therapie

In den vergangenen 150 Jahren seit der ersten Beschreibung der RP hat es eine Vielzahl von Therapieversuchen gegeben. Bis heute werden verschiedene Ansätze, wie etwa Elektrostimulation, durchblutungsfördernde Maßnahmen bis hin zu riskanten Operationen verfolgt, um den Verlauf der

Erkrankung zu verlangsamen oder zu stoppen. Keine dieser Maßnahmen kann wissenschaftlich belegte Erfolge verbuchen und viele Heilungsversuche werden in Unkenntnis der zugrundeliegenden pathologischen Mechanismen unternommen [10].

Erst durch die molekularbiologische Aufklärung der Krankheitsursache können Konzepte für eine wirkungsvolle Behandlung entworfen werden. Da bei einer RP eine Vielzahl von auslösenden Mutationen Ursache der Erkrankung sein kann, müssen verschiedene individuelle Ansätze, die spezifisch auf die einzelnen Mutationsformen ausgelegt sind, entworfen und erprobt werden. Hierbei verspricht die Gentherapie gerade im Rahmen der retinalen Erkrankungsformen ein großes Potential und wird in Zukunft vermehrt zur Behandlung von erblichen Erkrankungen eingesetzt werden [83]. Bislang existieren jedoch noch keine Therapiemöglichkeiten für Patienten, die an XLRP aufgrund einer Mutation im *RPGR* Gen erkrankt sind. Aber die jüngsten Erfolge bei der genterapeutischen Behandlung von Patienten mit erblichen Netzhautdegenerationen geben Anlass zur Hoffnung auf Heilung bei RPGR bezogenen retinalen Degenerationen [16].

Für genterapeutische Anwendungen ist das Auge als Zielorgan auf vielfache Weise gut geeignet. Zum einen handelt es sich beim Auge um ein exponiertes Organ [84], das von außen leicht zugänglich ist. Zum anderen ist das Auge aufgrund der Blut-Retina-Schranke ein immunprivilegiertes Organ, wodurch eine systemische Reaktion bei Medikamentengabe weniger wahrscheinlich ist [17]. Für eine mögliche Gentherapie stehen verschiedene Strategien zur Verfügung. Welche Form der Therapie als geeignet erscheint, hängt vom bestehenden Krankheitsmechanismus ab [82]. Bezogen auf das Auge können die möglichen genterapeutischen Strategien in die drei Kategorien *gene addition*, *gene silencing* und *gene alteration* unterteilt werden [17]. Das Verfahren der *gene addition* ist bei Null-Mutationen sinnvoll, bei denen kein Genprodukt gebildet wird.

Bei einer fehlenden bzw. nicht funktionellen Gensequenz wird mittels Gentransfer die korrekte Version in den Zielorganismus eingeschleust und das Genprodukt kann daraufhin exprimiert werden. Wird aufgrund einer Gen-

mutation ein für die Zelle schädliches Genprodukt hergestellt, kann *gene silencing* als mögliche Therapie zum Einsatz kommen. [63] Beim *gene silencing* handelt es sich um ein Verfahren, bei dem mittels RNA-Interferenz die mRNA Sequenz eines toxischen Genproduktes degradiert wird und so kein schädliches Protein mehr produziert werden kann. Besonders bei heterozygot angelegten Mutationen bietet sich das *gene silencing* an, da die nicht betroffene Genkopie ein funktionelles Produkt liefern kann und es nicht zu einem vollständigen Funktionsverlust kommt. Ist ein mutiertes Gen jedoch homozygot oder im Falle einer X-chromosomalen Codierung nur in einfacher Kopie vorhanden (hemizygot), so kann eine sog. *gene alteration* sinnvoll sein. Hierbei wird im Genom die fehlerhafte Gensequenz gegen eine korrekte ausgetauscht. Dazu wird die korrekte Sequenz in die Zielzellen eingeschleust und über einen Mechanismus, der als Homologe Rekombination bezeichnet wird, in das Genom integriert. Ziel ist eine vollständige Reparatur der fehlerhaften Gensequenz.

Die Verfügbarkeit von Tiermodellen mit entsprechenden Mutationen ist eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung therapeutischer Strategien. Um ein geeignetes Modell darzustellen, ist es von entscheidender Wichtigkeit, dass die Tiermodelle eng an der humanen Pathologie orientiert sind und die beim Menschen auftretende Situation widerspiegeln.

## 1.10 Zielsetzung

---

Das Ziel dieser Arbeit ist die Herstellung einer transgenen Mauslinie, die eine Punktmutation im terminalen Exon (ORF15) des *Rpgr* Gens trägt. Aufgrund der eingeführten Punktmutation soll eine retinale Degeneration ausgelöst werden, wie sie bei Menschen mit X-chromosomaler Retinitis Pigmentosa auftritt.

Hierzu muss zunächst ein Zielvektor hergestellt werden, der neben der chromosomalen Sequenz und der pathologischen Mutation weitere stille Mutationen zur späteren Analyse enthält. Dieser wird mittels Elektroporation in embryonale Stammzellen eingebracht, wo er durch homologe Rekombinati-

on in das Genom integriert wird. Nach erfolgtem Screening der Stammzellkolonien wird die ausgewählte Kolonie in Blastozysten injiziert und die daraus resultierenden Chimären von einer Ammenmaus ausgetragen. Die chimären Tiere werden ebenfalls auf das Vorhandensein der Mutationen überprüft und durch Verpaarung mit Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen die Neomycin-Kassette aus dem Genom deletiert. Die folgenden Generationen werden in einen BL/6J Stammhintergrund zurück gekreuzt.

Der zweite Teil der Arbeit besteht in einer initialen Charakterisierung der generierte Mauslinie. Hierbei werden anhand histologischer Untersuchungen die Dicke der einzelnen retinalen Schichten, die Anzahl der Zellkerne, sowie die Ultrastruktur der Photorezeptoren mittels Elektronenmikroskopie morphologisch untersucht.

# 2

## Material und Methoden

### 2.1 Materialien

---

#### 2.1.1 Enzyme und Marker

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden nach den Angaben des Herstellers mit den dazu gehörigen Puffern eingesetzt. Auflistung in alphabetischer Reihenfolge, siehe Tab. 2.1. Weitere Enzyme und Marker sind in den Tabellen 2.2 und 2.3 aufgeführt.

#### 2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in den Tabellen 2.4 und 2.5 aufgeführt. Die verwendeten Präparationskits sind in Tab. 2.7 aufgelistet.

#### 2.1.3 Puffer und Medien

Die verwendeten Bakterienkulturen wurden in LB-Medium mit entsprechender Antibiotikazugabe kultiviert (siehe Tab. 2.6). Hierzu wurde Luria Broth Base nach Herstellerangaben in dH<sub>2</sub>O gelöst und autoklaviert.

#### 2.1.4 Primer / Oligonukleotide

Alle verwendeten Primer (siehe Tab. 2.8) wurden von der Firma Metabion bezogen und zu einer Gebrauchskonzentration von 10 mmol/l verdünnt.

Enzym	Erkennungssequenz	Hersteller
BamHI	5' ...G↓GATCC...3' 3' ...CCTAG↑G...5'	New England BioLabs, Frankfurt am Main
BglII	5' ...A ↓GATCT...3' 3' ...TCTAG↑A...5'	Fermentas, St. Leon-Rot
EcoRI	5' ...G↓AATTC...3' 3' ...CTTAA↑G...5'	New England BioLabs, Frankfurt am Main
EcoRV	5' ...GAT↓ATC...3' 3' ...CTA↑TAG...5'	New England BioLabs, Frankfurt am Main
HincII	5' ...GTY↓RAC...3' 3' ...CAR↑YTG...5'	New England BioLabs, Frankfurt am Main
HindIII	5' ...A↓AGCTT...3' 3' ...TTCGA↑A...5'	New England BioLabs, Frankfurt am Main
NdeI	5' ...CA↓TATG...3' 3' ...GTAT↑AC...5'	New England BioLabs, Frankfurt am Main
NotI	5' ...GC↓GGCCG...3' 3' ...CGCCGG↑CG...5'	Fermentas, St. Leon-Rot
PvuI	5' ...CGAT↓CG...3' 3' ...GC↑TAGC...5'	Fermentas, St. Leon-Rot
SacII	5' ...CCGC↓GG...3' 3' ...GG↑CGCC...5'	New England BioLabs, Frankfurt am Main
SalI	5' ...G↓TCGAC...3' 3' ...CAGCT↑G...5'	New England BioLabs, Frankfurt am Main
XbaI	5' ...T↓CTAGA...3' 3' ...AGATC↑T...5'	New England BioLabs, Frankfurt am Main
XmnI	5' ...C↓CCGGG...3' 3' ...GGGCC↑C...5'	New England BioLabs, Frankfurt am Main

**Tabelle 2.1:** ↓ und ↑ zeigen die Schnittstelle; Y = C oder T, R = A oder G

Enzym	Hersteller
T4 Ligase	New England BioLabs, Frankfurt am Main
GoTaq	Promega, Mannheim
Phusion	New England BioLabs, Frankfurt am Main
PrimeScript	Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich
PrimeScript cDNA Synthesis Kit	Takara, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

**Tabelle 2.2:** Weitere verwendete Enzyme

Marker	Hersteller
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas, <i>St. Leon-Rot</i>
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas, <i>St. Leon-Rot</i>

**Tabelle 2.3:** Folgende Größenmarker wurden verwendet.

Chemikalie/Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
APS	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Auftragspuffer	Fermentas, <i>St. Leon-Rot</i>
Bisacrylamid	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Bouin	<i>eigene Herstellung</i>
BSA	PAA, <i>Marburg</i>
Dumont #55 Forceps	F.S.T, <i>Bad Oeynhausen</i>
Eosin	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Ethanol	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Ethidiumbromid	Sigma, <i>München</i>
Fluorescent Mounting Medium	Dako, <i>Hamburg</i>
GenAgarose LE	Genaxxon, <i>Ulm</i>
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas, <i>St. Leon-Rot</i>
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas, <i>St. Leon-Rot</i>
Glycin	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Glyzerin	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Hämalaunlösung	Roth, <i>Karlsruhe</i>
HCl	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Kanülen	Braun, <i>Melsugen</i>
KCl	Roth, <i>Karlsruhe</i>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Luria Broth Base	Invitrogen, <i>Karlsruhe</i>
NaCl	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth, <i>Karlsruhe</i>

**Tabelle 2.4:** Chemikalien/Verbrauchsmaterialien (1/2)

<b>Chemikalie/Verbrauchsmaterial</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Nitrocellulose Transfer Membrane Protran	Whatman
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Serva, Heidelberg
PB	eigene Herstellung
PBS	eigene Herstellung
Pikrinsäure	AppliChem, Darmstadt
Reaktionsgefäße 1,5ml, 2ml	Greiner, Frickenhausen
RNAlater	Ambion, Darmstadt
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
Select Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Spritzen 1ml, 3ml	Braun, Melsungen
Sucrose	Serva, Heidelberg
TAE	eigene Herstellung
TE	eigene Herstellung
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tissue-Tek	Sakura, Staufen
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Vannas Spring Scissors – 2.5mm Blades	F.S.T, Bad Oeynhausen
Xylol	Roth, Karlsruhe
Yellow Fix	AG Bergmann JLU

**Tabelle 2.5:** Chemikalien/Verbrauchsmaterialien (2/2)

<b>Antibiotika</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Ampicilin	100µg/ml	Sigma, München
Kanamycin	10µg/ml	Sigma, München
Chloramphenicol	34µg/ml	Sigma, München
Tetracyclin	10µg/ml	Sigma, München

**Tabelle 2.6:** Eingesetzte Antibiotika.

DNA-Präparation Kits	Hersteller
Resuspension Buffer S1	Macherey-Nagel, Düren
Lysis Buffer S2	Macherey-Nagel, Düren
Neutralization Buffer S3	Macherey-Nagel, Düren
QIAGEN Plasmid Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QIAfilter Plasmid Midi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAamp RNA Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren

**Tabelle 2.7:** Verwendete Präparations-Kits.

### 2.1.5 Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind in Tab. 2.10 aufgeführt.

### 2.1.6 Bakterienstämme

Für Klonierungen und Transformationen wurden die in Tab. 2.11 aufgeführten Bakterienstämme verwendet.

Bei den EL350 handelt es um einen speziellen *E.coli* Stamm, der unter anderem das Rekombinationsgen Cre (*causes recombination*) enthält, das unter der Kontrolle eines temperatur-sensitiven Promotors steht [44]. Die Synthese von Cre kann durch eine 15 minütige Inkubation der Bakterienkultur bei 42°C induziert werden. Werden in die auf diese Weise behandelten Bakterien anschließend DNA-Fragmente elektroporiert, findet eine homologe Rekombination der Fragmente in den Bakterien statt.

### 2.1.7 Mäusestämme

Bei den verwendeten embryonalen Stammzellen handelt es sich um eine Hybrid-Zelllinie mit dem Stammhintergrund C57Bl6/SV129. Alle späteren Verpaarungen und Kreuzungen wurden mit Tieren mit BL/6J Hintergrund durchgeführt.

Verwendung	Sequenz	Name
Minihomologieregion	GAGGAAAGAATAGCGGCCGCATTGG	RPGR-1a
Minihomologieregion	TGGTGAAAAGGAGGGTCGACATGAT	RPGR-1b
Minihomologieregion	GGTTAGCCTCAGATCTATGCCTACA	RPGR-2a
Minihomologieregion	CACACACTAGTACTATTTAAAGCACAGAGAA	RPGR-2b
Minihomologieregion	TTCAATGTCTCCTGTCGACTGTAAT	RPGR-3a
Minihomologieregion	CACCTTATCATACTGCGAATTCTACTCT	RPGR-3b
Minihomologieregion	GCACCAAAGGGGATCCTTTAAGAAT	RPGR-4a
Minihomologieregion	ATGCTCTTCCCGCGGAATTCCTTAG	RPGR-4b
ORF15 in pL452	CAGCCGAGATTCTGGAAGCA	RPGR-5a
ORF15 in pL452	CCTTTGGTGACACACCTTATC	RPGR-5b
1. Mutation A-del	GAGGGATGAAGGAAACCAAGAGAA	RPGR-6a
1. Mutation A-del	TCATTTGTCTCCTCCTTCACTCCT	RPGR-6b
2. Mutation XbaI	GGTGAGTCTAGAAACAGAGCATTTA	RPGR-10a
2. Mutation XbaI	TTCTCACAGATTTGATCCCCGTCAC	RPGR-10b
3. Mutation A-T	GGAGGAAATTGAGGAAGGTGAAGAG	RPGR-9a
3. Mutation A-T	TCCTGTCTTGCTCCTCTCCTCCT	RPGR-9b
4. Mutation EcoRV	ATCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCC	RPGR-24a
4. Mutation EcoRV	ATCTGGCCAAGGGCTGCAGTGTCAAAT	RPGR-24b
repetitive Region	GGGCTTTTCTGAGTATGTGCCAT	RPGR-19a
repetitive Region	GAACAGGAGGAGGAAATTGAGGAAGGT	RPGR-19b
I-SceI Stelle	CCTGTATCCCTAGGTTAGTAATGG	RPGR-25a
I-SceI Stelle	GTAATCTAAAATGCCAATGGAGTCC	RPGR-25b
Test auf Rekombination	TTCTGAGGGGATCAATTCTCTAGAGCTCGC	RPGR-34a
Test auf Rekombination	AGATCTGACGCCCTCTTCTGGTGTCTTCTGAAG	RPGR-34b

Tabelle 2.8: Verwendete Primer

Name	Sequenz
RPGR-F1	GTAAATCAACCTTTGATCAT
RPGR-F2	TCTGAGGGTGACGGGGATCA
RPGR-F3	AGAGAAAGTGAAGAGAACTC
RPGR-F4	GATGCAGGAGATGAAAGAAGTG
RPGR-F5	GATAATGAAAGTCAGGAAG
RPGR-F6	TATATTCATTCCAGTCTGTT
RPGR-F7	AAAGAAGTGACAGTGTACAAAC
RPGR-F8	GCCGCTGAGGAAAAGAATACCGGAG
RPGR-F9	ATCCTTCACTTAACAGTCTCTGAAGG
RPGR-F10	AAAAAAGAAGTGAGTGCTTCAGTATT
RPGR-F11	TGAGACCCTCCTTAGTAAGCACA
RPGR-F12	TCAGAACTATAAGAAATTACACTCATGGGC
RPGR-F13	GCTTTAAGCTCTATTTTGCATATTAAGTCT
RPGR-F14	TGTGATTTCCCAACTTAGATAAATG
RPGR-F15	AGAAATAAGTTCTAGCAGCTGGGCC
RPGR-F16	ACAAGGTACAGTCAAAAGAGCATTTAT
RPGR-F17	AGTTTACTGGTCATTACTGGGGT
RPGR-F18	CCCCTTGTTTCAGAGGACGTATA
RPGR-F19	AACTGCTGGCATGGCTCTCAGGTT
RPGR-F20	ATTCTCTCTAAGAAGGAGCATGAGATGGCC
RPGR-F21	GGCATTCTGCACGCTTCAAAAGC
RPGR-F22	GCTCAGTAGAAGTCATTGGGATCAGTAACAT
RPGR-F23	ATCCTTCACTTAACAGTCTCTGAAGG
RPGR-F24	ATCCTCACAACTCCGTGTTCTT
RPGR-F25	GGATCTGCATTCCACCACTG
RPGR-F26	GCTGAGTGACGCCCTTATA
RPGR-R0	TGAGCTGAGGAGGAATCAAGAC
RPGR-R1	TCTCCCTCCCCTCCTTCT
RPGR-R2	CCTCTTCTTCACTTCTTTCATC
RPGR-R3	CGTACCATAAGTTCTCAGTC
RPGR-R5	CCAAGTATGTAGCACCAATTCATT
RPGR-R6	GCGGATACATATTTGAATGT
RPGR-R7	ATTGCTGATAAATCTGGAGC
RPGR-R8	ATAACTACGATACGGGAGGG

Tabelle 2.9: Verwendete Sequenzierungsprimer

Plasmid	Bezugsquelle
pBACe3.6	ImaGenes, Berlin
PL452	MPI für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim
pKOIIV2	MPI für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim

Tabelle 2.10: Verwendete Plasmide.

Bakterienstamm	Bezugsquelle
<i>E.coli</i> XL-1 blue	Eigenherstellung
One Shot TOP10 electrocomp. <i>E.coli</i>	Invitrogen, Karlsruhe
EL350	MPI für Herz- und Lungenforschung, Bad Nauheim

Tabelle 2.11: Verwendete Bakterienstämme

## 2.1.8 Geräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tab. 2.12 aufgeführt.

Gerät	Hersteller
BioDocAnalyze	Biometra, Göttingen
BioPhotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Blotter	Biometra, Göttingen
Eismaschine	Scotsman, Berlin
Elektrophorese Powersupply	Biometra, Göttingen
Fluoreszenz Mikroskop	Keyence, Essen
Funduskop (Micron III)	Phoenix Research Laboratories, U.S.A.
Gelkammer Whatman	Biometra, Göttingen
Inkubator	Binder, Tuttlingen
Magnetrührer	IKA, Staufen

Tabelle 2.12: Geräte (1/2).

Mikroskop	VWR, Darmstadt
Mikrotom	Leica, Wetzlar
Multiporator	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Operationsmikroskop	Zeiss, Göttingen
Paraffineinbether	Leica, Wetzlar
Paraffin-Streckbad	Medax, Neumünster
PCR-Cycler T Professional Basic Gradient	Biometra, Göttingen
Schüttler Certomat H	Sartorius, Göttingen
Sterilbank	Invitrogen, Karlsruhe
Thermoblock	Biometra, Göttingen
Waage	Ohaus, Zürich
Wärmeplatte	Medax, Neumünster
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach
Zentrifuge AK15	Sigma, München
Zentrifuge 1-15 PK	Sigma, München

Tabelle 2.13: Geräte (2/2).

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

---

### 2.2.1 PCR

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Amplifikation von spezifischen DNA Fragmenten. Vor Beginn der Amplifikation steht eine initiale Denaturierung bei 95°C. Dabei trennen sich die beiden Stränge der Ausgangs-DNA. Ein Reaktionszyklus gliedert sich in einen Denaturierungsschritt des DNA Doppelstranges in Einzelstränge bei 95°C, einen Annealingschritt mit Bindung der Oligonukleotidprimer an die DNA-Vorlage bei primerspezifischen Temperaturen und einen Elongationsschritt, in dem die einzelsträngige DNA unter dNTP-Verbrauch und Primerverlängerung durch die Polymerase zu Doppelsträngen komplettiert wird.

Für die Mutagenese PCR wird jeweils die Phusion Polymerase eingesetzt, für alle analytischen PCRs die Takara Polymerase. Beide Polymerasen besitzen Proof-reading Aktivität.

Standard-Ansatz für 10 $\mu$ l:		Standard-PCR-Programm:	
dH <sub>2</sub> O	7,0 $\mu$ l	98°C	0:10 min
Puffer	2,0 $\mu$ l	72°C	} $\times$ 45 0:10 min
dNTP	0,8 $\mu$ l	72°C	
Primer a	0,1 $\mu$ l	98°C	
Primer b	0,1 $\mu$ l	72°C	0:15 min
DNA	0,5 $\mu$ l	72°C	5:00 min
Polymerase	0,1 $\mu$ l	4°C	10:00 min

**Tabelle 2.14:** Exemplarische Auflistung der PCR-Bedingungen.

## 2.2.2 Mutagenese PCR

Um zielgerichtete Mutationen in eine Plasmid-DNA einzuführen, benötigt man spezielle Mutagenese-Primer, die die gewünschte Mutation enthalten und eine *Proof-Reading Polymerase*. Im Unterschied zu einer PCR, die zur Amplifikation dient, sind die Sequenzen der Mutagenese-Primer so gewählt, dass die Fragmente während der Elongation in entgegengesetzte Richtungen verlängert werden. Die einzubringende Veränderung der Nukleotidsequenz befindet sich am Ende eines der Primer. Bei einer solchen PCR wird das gesamte Plasmid amplifiziert, weshalb die Plasmidgröße einen limitierenden Faktor darstellt, da sich bei sehr großen PCR Produkten die Fehleranfälligkeit erhöht.

## 2.2.3 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau beruht auf einem Prinzip, das ursprünglich bei Bakterien gefunden wurde. Dabei bindet ein Enzym an einen spezifischen DNA-Abschnitt von wenigen Nukleotiden, den es als spezifische Schnittstelle erkennt und spaltet die DNA an dieser Stelle, sodass ein Strangbruch entsteht. Die Enden der entstandenen Bruchstelle sind in ihrer Länge und Basenabfolge spezifisch für das jeweilige Enzym. In dieser Arbeit wurde der Restriktionsverdau sowohl präparativ, das heißt zur Erzeugung von Klonierungsfragmenten, als auch analytisch also zur Fragmentanalyse eingesetzt. Die

erwendeten Enzyme wurden nach Herstellerangaben eingesetzt und sind in Tab. 2.1 aufgelistet. Bei der Durchführung von Doppelverdauen mit inkompatiblen Puffern wurde die DNA zwischen den einzelnen Inkubationsschritten über eine *NucleoSpin Extract II* Säule aufgereinigt.

## 2.2.4 Ligation

Für die Ligation von DNA - Fragmenten wurde die T4 DNA Ligase verwendet. Sie katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Phosphat und dem 3'-Hydroxyl-Ende von doppelsträngigen DNA - Fragmenten mit kompatiblen Enden. Für die Reaktion wird ein Ansatz aus Vektor und Insert (Konzentrationsverhältnis je nach Bedarf) hergestellt, Ligase und Puffer nach Herstellerangaben zugegeben und auf das gewünschte Gesamtvolumen aufgefüllt. Inkubiert wird für 60 min. bei Raumtemperatur. Bei den Klonierungen von PCR Produkten mit dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) wird nach den Angaben des Herstellers das DNA-Fragment mit dem Vektor ligiert. Hierbei muss zunächst ein A-Überhang an das PCR-Produkt angefügt werden, das die verwendete Polymerase im Gegensatz zur Taq-Polymerase selbst keinen A-Überhang anhängt.

Ansatz:

x $\mu$ l Vektor	1-7 $\mu$ l PCR-Produkt
x $\mu$ l Insert	1 $\mu$ l Taq-Puffer mit MgCl <sub>2</sub>
2 $\mu$ l Puffer	dATP (finale Konz. 0,2 mM)
1 $\mu$ l Ligase	5 Units Taq
mit H <sub>2</sub> O auf 20 $\mu$ l auffüllen	mit H <sub>2</sub> O auf 10 $\mu$ l auffüllen
Inkubation bei RT für 60 min.	Inkubation bei 70°C für 20 min.

## 2.2.5 Kultivierung und Herstellung elektrokompetenter XL-1 blue bzw. EL350

### 2.2.5.1 XL-1 blue

Zur Herstellung elektrokompetenter XL-1 blue wird zunächst über Nacht eine 5ml Flüssigkultur mit Tetrazyklin (1:1000) bei 37°C angesetzt. Am nächsten Tag wird ein Volumen von 100ml LB-Medium mit 10µl Tetrazyklin versetzt und mit 100µl XL-1 blue Vorkultur angeimpft. Sobald die Kultur eine OD600 zwischen 0,6 und 0,8 erreicht hat, werden die Bakterien sofort für 30 min. auf Eis abgekühlt und durch Zentrifugation (10 min.; 4°C; 2000 rpm) pelletiert. Das Pellett wird in 50ml eiskaltem 1mM HEPES resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Danach wird das Pellett in 25ml eiskaltem 1mM HEPES resuspendiert und abzentrifugiert. Im nächsten Schritt wird das Pellett in 25ml eiskalter 10%iger Glycerinlösung resuspendiert und 15 min. bei 2000rpm und 0°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellett in 10ml eiskalter Glycerinlösung resuspendiert. Dieser Schritt wird einmal wiederholt. Das erhaltene Pellett wird in 1ml Glycerinlösung resuspendiert und zu 50µl aliquotiert in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.5.2 EL350

Zur Herstellung elektrokompetenter EL350 wird über Nacht eine 5ml Vorkultur mit LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika angelegt. Wichtig hierbei ist, dass die Inkubationstemperatur 32°C nicht überschreiten darf. Am nächsten Tag wird ein Volumen von 25ml LB-Medium mit 500µl Vorkultur angeimpft und weiterhin bei 32°C inkubiert. Sobald die Kultur eine OD600 von 0,6 erreicht hat, werden die Kolben sofort im Eisbad abgekühlt und die Bakterien durch 5 min. Zentrifugation bei 4°C mit 5000 rpm pelletiert. Sollte die EL350 allerdings bereits ein Plasmid enthalten, das durch homologe Rekombination verändert werden soll, wird vor der Zentrifugation wie folgt vorgegangen: Sobald die 25ml Kultur eine OD600 von 0,6 erreicht hat,

wird die Kultur für exakt 15 min. bei 42°C im Wasserbad geschwenkt. Danach wird der Kolben sofort in ein Eisbad überführt und weitere 1-2 min. gleichmäßig geschwenkt, bis die Kultur vollständig abgekühlt ist. Dann werden die Bakterien 5 min. bei 4°C mit 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellett durch vorsichtiges Schwenken in 1ml eiskaltem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Dabei wird das Zentrifugenröhrchen ständig im Eisbad belassen, um ausreichende Kühlung sicherzustellen. Sobald das Pellett vollständig resuspendiert ist, wird mit ddH<sub>2</sub>O auf 10ml aufgefüllt, invertiert und erneut zentrifugiert (5 min.; 4°C; 5000 rpm). Dieser Schritt wird insgesamt dreimal durchgeführt, um die Bakterien vollständig zu entsalzen. Nachdem der Überstand zum letzten mal verworfen wurde, wird das Pellett in der restlichen Flüssigkeit die im Röhrchen verblieben ist resuspendiert. Jeweils 50µl der konzentrierten Suspension werden direkt in die Elektroporation eingesetzt.

### 2.2.6 Elektroporation

Nach erfolgter Ligation von Vektor und Insert wird das entstandene Konstrukt mittels Elektroporation in elektrokompente Bakterien transformiert. Bei der Elektroporation wird die Bakteriensuspension (50µl) zusammen mit der DNA-Lösung des Vektorkonstruktes (2µl) einem kurzen elektrischen Impuls ausgesetzt. Auf diese Weise werden in der Zellwand Poren erzeugt, durch die die DNA in die Zelle eindringen kann. Bei der Durchführung der Elektroporation ist darauf zu achten, dass alle benötigten Komponenten (Küvetten, Reaktionsgefäße, elektrokompente Bakterien) stets auf Eis gelagert und ununterbrochen gut gekühlt sind. Nach erfolgter Elektroporation wird die Bakteriensuspension mit 700µl auf 37°C vorgewärmtem LB-Medium ohne Antibiotika aus der Küvette gespült und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wird für 1 Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. In dieser Zeit können sich die transformierten Bakterien teilen und die aufgenommenen Resistenzgene exprimieren. Anschließend werden 100µl der Suspension auf eine vorgewärmte Agarplatte (37°C), die

das entsprechende Antibiotikum enthält ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.2.7 Mini-Prep

Am nächsten Tag werden die gewachsenen Kolonien mit einer Pipettenspitze von der Platte genommen (gepickt) und in 5ml Flüssigkultur (LB-Medium mit Antibiotikum) überführt und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag kann aus der Flüssigkultur die Plasmid-DNA isoliert werden. Dazu werden 1,5ml in ein Reaktionsgefäß gegeben und abzentrifugiert (5 min.; 5000 rpm). Der Überstand wird verworfen und das Pellett in 100µl Resuspension Buffer S1 resuspendiert. Nach vollständiger Resuspension werden 100µl Lysis Buffer S2 zugegeben und einmal invertiert. Danach werden 100µl Neutralization Buffer S3 zugegeben und erneut invertiert. Die ausgefallenen Zelltrümmer werden abzentrifugiert (10 min.; 10000 rpm) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Jetzt werden 700µl eiskalter Ethanol (absolut) dazu gegeben und für 30 min. bei 4°C und ca. 18000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, 200µl Ethanol (70%) zugegeben und für 5 min. mit 5000 rpm zentrifugiert. Danach wird der Überstand erneut verworfen und das Pellett an der Luft vollständig getrocknet. Nachdem der Alkohol restlos verdunstet ist, wird das Pellett mit 30µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.2.8 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription dient dazu, die vorher isolierte RNA in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben, um diese dann in einer anschließenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifizieren zu können. Protokoll nach Herstellerangaben:

1  $\mu$ l Random 6mers

1  $\mu$ l dNTP Mixture

5  $\mu$ l RNA Template (16  $\mu$ g/ml)

3  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O

5 min. bei 65°C inkubieren und sofort auf Eis abkühlen.

Dann:

10  $\mu$ l Template Mix

4  $\mu$ l 5x Buffer

0,5  $\mu$ l RNase Inhibitor

1  $\mu$ l PrimeScript Rtase

4,5  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O

10 min. bei 30°C

60 min. bei 42°C

15 min. bei 70°C

## 2.3 Präparationsmethoden

---

### 2.3.1 Aufreinigung von Schwanzspitzenbiopsien

Zur Aufreinigung der DNA aus den Schwanzbiopsien wird das Gewebe zunächst lysiert und dann die DNA mit Isopropanol gefällt. Dazu wird das Gemisch aus Alkohol und Lysispuffer eine Stunde lang bei Raumtemperatur geschüttelt und dann das gefällte DNA-Fädchen mit einer gebogenen Kanüle aus dem Alkohol geholt. Die DNA wird in 100  $\mu$ l TE Puffer aufgenommen und durch eine Inkubation über 3 Tage bei 56°C gelöst.

### 2.3.2 Töten der Tiere

Die Tiere werden in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz und nach den Richtlinien der GV-SOLAS (Gesellschaft für Tierversuchskunde) durch zervikale Dislokation getötet. Hierbei werden Schädel und Wirbelsäule so

gegeneinander verschoben, dass das Rückenmark durchtrennt, sowie Nerven- und Blutbahnen vollständig unterbrochen werden. Nach erfolgter Feststellung der Todesanzeichen können die Organe entnommen werden.

### **2.3.3 Präparation der Augen**

Zur Enukleation der Augen werden Ober- und Unterlid mit einer Pinzette zurückgeschoben, während mit einer abgerundeten Schere das Auge in der Orbita (Augenhöhle) vom Sehnerv getrennt wird. Das Auge wird kurz in PBS gespült, um eventuell vorhandene Haare oder Blut zu entfernen.

### **2.3.4 Fixierung und Einbettung der Augen**

#### **2.3.4.1 Bouin Fixierung für Paraffineinbettung**

Für die Einbettung der Augen in Paraffin wird der komplette Augapfel für 24 Stunden bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss in 5ml Bouin-Lösung fixiert. Nach 24 Stunden wird das Auge in 70%igem Ethanol entfärbt. Hierzu wird der Augapfel vier Tage lang jeweils zweimal am Tag in frischen Ethanol eingelegt, bis die von der Pikrinsäure verursachte Gelbfärbung vollständig ausgewaschen ist. Die Fixierung mit Bouin-Lösung gewährleistet eine sehr gute Erhaltung der Zellmorphologie und der Gewebeanlagen. Nach erfolgter Entfärbung wird das Auge im Einbettungsautomaten über Nacht über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Danach wird das Präparat in ein Paraffinblöckchen eingegossen, wobei auf die richtige Lage des Auges zu achten ist, um die gewünschte Schnittebene zu erhalten.

#### **2.3.4.2 Fixierung für Cryoschnitte**

Zur Anfertigung von Cryoschnitten wurden die Augen wie in Abschnitt 2.3.3 entnommen und dann mit speziellem Präparierbesteck (Vannas Spring Scissors – 2.5mm Blades und Dumont #55 Forceps) die vordere Augenkammer an der Pars plana abgetrennt. Die Linse wird vorsichtig aus dem Aug-

apfel entfernt und der Augenbecher für 15 Minuten in 4% PFA Lösung fixiert. Dann wird der Augenbecher für 1 Stunde in eine 10%ige Sucroselösung eingelegt, dann für eine Stunde in eine 20%ige Sucroslösung und schließlich über Nacht in eine 30%ige Sucroslösung. Die Sucrose durchdringt das Gewebe vollständig, wodurch ein Gefrierschutz entsteht. Zur Weiterverarbeitung wird der Augenbecher viermal so eingeschnitten, dass eine Kleeblattstruktur entsteht und für 30 Minuten in ein Einfriermedium (*Tissue-Tek*) eingelegt.

#### 2.3.4.3 *Yellow-Fix* Fixierung EM Schnitte

Für die Anfertigung von elektronenmikroskopischen Schnitten werden die Augen wie in Abschnitt 2.3.3 beschrieben entnommen und dann für 5 Stunden bei 4°C in *Yellow-Fix* fixiert. Das *Yellow-Fix* wurde von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Bergmann (Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie; JLU) zur Verfügung gestellt, wo auch die weitere Präparation der Augen und die Aufnahme der EM Bilder durchgeführt wurde.

### 2.3.5 Schnittpräparation

#### 2.3.5.1 Paraffinschnitte

Die Paraffinblöckchen werden zunächst auf eine passende Größe geschnitten, auf Eis gekühlt und in das Rotationsmikrotom eingespannt. Der Geweblock wird beim Schneiden senkrecht auf das Messer zubewegt, wobei diese Bewegung mit einem Handrad angetrieben wird. Bei jeder Umdrehung erfolgt ein Vorschub des Präparates in Richtung Messer. Die angefertigte Schnittdicke beträgt  $7\mu\text{m}$ , wobei das Auge in sagittaler Ebene geschnitten wird. Die Schnitte gelangen vom Messer direkt in ein kaltes Wasserbad, von wo sie mit einem Pinsel auf einen unbeschichteten Objektträger aufgenommen und in ein beheiztes Wasserbad überführt werden. Im 40°C warmen Wasser strecken sich die Schnitte und können auf einen beschichteten Objektträger aufgezogen werden. Es werden jeweils 3 Schnitte auf einen

Objektträger aufgezogen. Der Objektträger wird anschließend für mindestens 30 min. auf einer Wärmeplatte (45°C) getrocknet.

### 2.3.5.2 Cryoschnitte

Das in *Tissue-Tek* eingebettete Gewebe (siehe 2.3.4.2) wird unter dem Bino-kular auf einem Objektträger ausgebreitet und dann flach auf einem gefrorenen Blöckchen aus *Tissue-Tek* aufgefroren. Dieses Blöckchen wird mit einer Rasierklinge getrimmt und im Cryostat bei einer Temperatur von -18°C auf-geblockt und geschnitten. Die Schnitte werden auf Superfrost Objektträger aufgezogen, wobei die Schnittdicke 16µm beträgt.

### 2.3.6 HE Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine Standardfärbung in der Histologie, die auch als Übersichtsfärbung bezeichnet wird. Bei Hämat-oxilin, dem Ausgangsstoff für die Hämalaunlösung sauer nach Mayer, han-delt es sich um einen Naturfarbstoff, der erst zu Hämatein oxidiert werden muss (Reifung). Durch anschließende Beizung mit einem Alaun entsteht der eigentliche Farbstoff Hämalaun, der die Zellkerne blau färbt. Da die Färbung in stark saurem Milieu erfolgt, muss der pH-Wert anschließend auf mehr als 3 eingestellt werden um die blaue Färbung zu erhalten. Dazu werden die Schnitte unter fließendem Leitungswasser gebläut. Eosin ist ein gelblich-roter Fluoreszenzfarbstoff, schwach sauer und gut wasserlöslich. Eosin färbt unter anderem Zytoplasma, Kollagenfasern und Erythrozyten. Durchführung: Paraffinschnitte für 30 min. bei 65°C trocknen und wie in Tabelle 2.15 entparaffinisieren.

Schritt	Chemikalie	Zeitspanne
1.	Xylol I	5 min.
2.	Xylol II	5 min.
3.	Xylol III	5 min.
4.	Ethanol 99%	3 min.
5.	Ethanol 96%	3 min.
6.	Ethanol 80%	3 min.
7.	Ethanol 70%	3 min.
8.	Ethanol 50%	3 min.
9.	dH <sub>2</sub> O	3 min.
10.	1:2 Hämatoxylin	3 min.
11.	Leitungswasser	10 min.
12.	dH <sub>2</sub> O	kurz spülen
13.	Eosin	30 sek.
14.	dH <sub>2</sub> O	kurz spülen
15.	Ethanol 50%	3 min.
16.	Ethanol 70%	3 min.
17.	Ethanol 80%	3 min.
18.	Ethanol 96%	3 min.
19.	Ethanol 99%	3 min.
20.	Ethanol 99%	3 min.
21.	Xylol I	5 min.
22.	Xylol II	5 min.
23.	Xylol III	5 min.
24.	Eindecken	3 h trocknen

Tabelle 2.15: HE Färbung.

### 2.3.7 RNA Extraktion

Für die RNA Isolierung aus den gewonnenen Augen (siehe Abschnitt 2.3.3) werden die Augäpfel kurz in PBS gespült, unter dem Operationsmikroskop in der Pars plana mit einer Kanüle eingestochen und an der Ora serrata mit einer Präparierschere die Vorderkammer abgetrennt. Jetzt können Linse und Glaskörper entfernt und die Neuroretina aus dem Bulbus gelöst werden. Dann wird die gewonnene Neuroretina bis zur Aufreinigung mit dem *QIAamp RNA Blood Mini Kit* in *RNA-Later* gelagert.

# 3

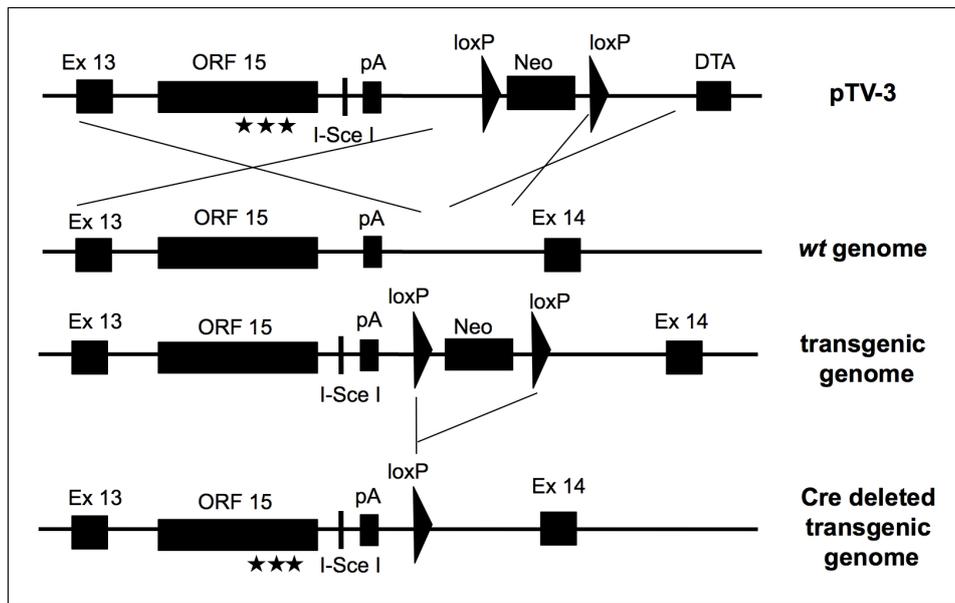
## Ergebnisse

### 3.1 Projektstrategie

---

Die meisten Mutationen im  $RPGR^{ORF15}$  Gen treten in einer bestimmten repetitiven Region des terminalen Exons ORF15, einem *mutational hot-spot*, auf [88]. Im Rahmen dieses Projektes soll eine transgene Mauslinie mit einer Punktmutation im  $Rpgr^{ORF15}$  generiert werden. Diese Punktmutation soll durch homologe Rekombination eines Targeting-Vektors in murine ES Zellen eingebracht werden (siehe Abb. 3.1). Wegen der Sequenzunterschiede zwischen humaner und muriner DNA werden zwei weitere Punktmutationen eingeführt.

Eine dieser beiden Punktmutationen führt zur Anwesenheit einer neu geschaffenen XbaI Restriktionsschnittstelle im Genom, welche zum späteren Screening der veränderten ES Zellen und anschließend der Tiere eingesetzt werden soll. Die zweite Punktmutation wird inseriert, um die Bildung eines vorzeitigen Stopcodons aufgrund des Frameshift zu verhindern und eine möglichst lange Kette von veränderten Aminosäuren zu erhalten. Außerdem wird die DNA in 3' Richtung des  $Rpgr$ -Gens so verändert, dass eine Schnittstelle für eine Homingendonuclease (I-SceI) entsteht. Durch diese Schnittstelle soll zukünftig eine neuartige Therapiemethode für Patienten mit XLRP entwickelt werden. Bei den in der nachfolgenden Tabelle dargestellten Proteineigenschaften handelt es sich um hypothetische Eigenschaften simulierter Proteine (siehe Tab. 3.1). Diese beruhen auf Berechnungen,



**Abbildung 3.1:** Rekombinationsschema des Targeting Vektors mit der genomischen DNA der Maus und die anschließende Cre-Deletion der "geflochten" Neomycin Kasette. Im unteren Teil des Schemas ist die transgene Genomsequenz dargestellt, die die eingeführten Mutationen und eine verbliebene loxP Stelle.

die sich aus der jeweiligen theoretischen Zusammensetzung der Aminosäuren ergeben, und wurden mit dem bioinformatischen Programm Vector NTI (*Invitrogen*) erstellt.

Um die gewünschten Mutationen mittels homologer Rekombination in das Genom zu integrieren, wird zunächst ein Targeting Vector kloniert (siehe Abschnitt 3.2). Dieser enthält die entsprechende Gensequenz (rekombiniert aus einem Bacterial artificial chromosome BAC), die Mutationen und zwei Selektionskassetten. Der Vektor wird durch Elektroporation in ES Zellen der Maus transfiziert und homolog rekombiniert. Fehlerhaft rekombinierte Zellen werden durch eine auf dem Vektor befindliche DTA-Kassette (Diphtherie-Toxin Kasette) selektiert. Ist die Rekombination korrekt, enthalten die ES Zellen eine Neomycinresistenz-Kassette, die der späteren Selektion auf einer Neomycin Platte dient. Die derart veränderten ES Zellen werden durch PCR, Restriktionsverdau (*Xba*I) und Sequenzierung analysiert (siehe Abschnitt 3.4). Nach dem Screening der ES Klone wird ein als positiv iden-

Veränderte Eigenschaft	Humanes RPGR		Murines Rpgr	
	Wildtyp	del 2501A	Wildtyp	del 2793A
Länge der Aminosäurekette	1152 AS	1087 AS	1171 AS	1165 AS
Molare Masse	127 kDa	123 kDa	131 kDa	132 kDa
Isoelektrischer Punkt	pH 4,23	pH 9,28	pH 4,41	pH 9,27
Saure Aminosäuren	343	214	378	213
Basische Aminosäuren	117	250	145	267

**Tabelle 3.1: Proteineigenschaften:** Dargestellt sind die Eigenschaften des humanen und murinen Proteins. Es werden jeweils wildtyp und mutiertes Protein miteinander verglichen.

tifizierter Klon in Blastozysten injiziert und anschließend in ein Ammentier implantiert und ausgetragen (siehe Abschnitt 3.5). Hierbei entstehen chimäre Tiere bei denen festgestellt wird, ob sie Zellpopulationen der veränderten ES Zellen enthalten. Einzelne positive männliche Tiere werden zur Deletion der Neomycin-Kassette aus dem Genom mit weiblichen Cre-Deletermäusen gekreuzt (siehe Abschnitt 3.7). Die daraus resultierenden Nachkommen werden ebenfalls genauestens genotypisiert. Aufgrund des X-chromosomalen Erbgangs sind die männlichen Nachkommen dieser Kreuzung jedoch gesund und die Weibchen lediglich Anlagenträger. Es muss weiter gezüchtet werden, um erkrankte männliche Tiere zu generieren, die dann mit weiblichen Anlagenträgern gekreuzt werden können, um erkrankte Nachkommen zu erzeugen (siehe Abschnitt 3.8). Anschließend erfolgt die weitere Züchtung der Mäuse zum Aufbau einer stabilen Mauslinie und eine initiale Analyse und Beschreibung des Genotyps und der Morphologie.

## 3.2 Targetingvektor

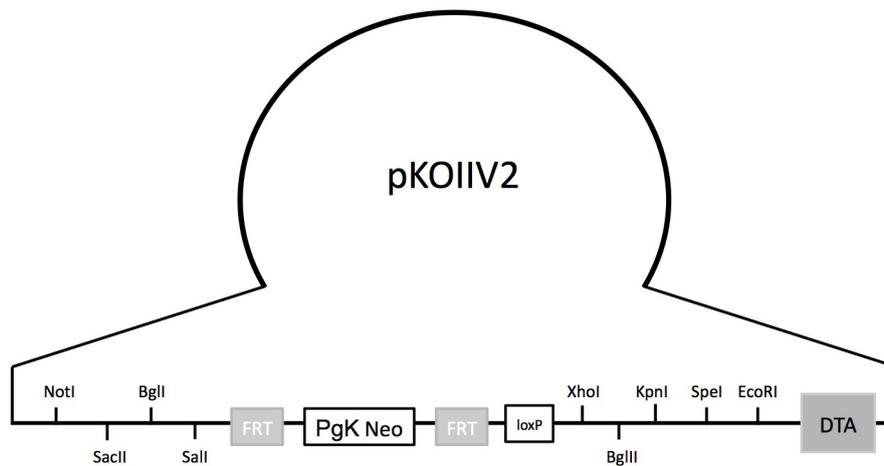
Die Basis des Targeting-Vektors stellt der genomische DNA-Abschnitt dar, in den der Vektor später integriert werden soll. Dieser DNA-Abschnitt kann

in Form eines BAC (bacterial artificial chromosome) kommerziell erworben werden und liegt als Plasmid vor. Per homologer Rekombination in Bakterien wird die gewünschte Region mittels *gap repair* in den linearisierten Standardvektor pKOIIV2 eingeführt (siehe Abb. 3.3). Dieser Vektor enthält eine Diphtherie-Toxin Kasette, die später zur negativen Selektion der veränderten ES Zellen benötigt wird, um Klone zu eliminieren, die den Vektor fehlerhaft *off-target* integriert haben. Zur späteren positiven Selektion wird eine Neomycin-Kasette ebenfalls mittels homologer Rekombination eingefügt, die später zur Selektion der Stammzellklone dienen soll. Die erforderlichen Punktmutationen zur zielgerichteten Veränderung des Gens werden zunächst in den Vektor pL452 (siehe Abb. 3.8) mittels Mutagenese-PCR eingebracht. Dieser Zwischenschritt ist nötig, da der eigentliche Targeting-Vektor mit einer Größe von etwa 18 kb zu groß ist, um damit eine Mutagenese-PCR durchführen zu können. Die Vektorsequenz, die die Mutationen enthält, wird mittels Restriktionsverdau aus dem Plasmid isoliert und über die entsprechenden Schnittstellen in der MCS (Multiple Cloning Site) in den Targeting-Vektor ligiert.

### 3.2.1 Einführung der Minihomologieregionen

Bevor die Minihomologieregionen in den pKOIIV2 Vektor eingeführt werden können, wird zunächst die Neomycin-Kasette mittels Restriktionsverdau entfernt. Hierzu wird das Plasmid mit den Restriktionsenzymen Sall und XhoI verdaut (siehe Abb. 3.2). An die Stelle der Neomycin-Kasette werden die Minihomologieregionen kloniert.

Die Minihomologieregionen wurden erzeugt, indem zunächst mit dem Primerpaar RPGR-1a+b ein PCR Produkt mit einer Größe von 650bp mit der im BAC enthaltenen DNA hergestellt wird (siehe Abb. 3.3). Das PCR Produkt enthält die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme NotI und Sall und dient im Folgenden als 5' Homologieregion. Sowohl PCR Produkt als auch pKOIIV2 Plasmid werden mit NotI und Sall verdaut, anschließend ligiert und in elektrokompente *E.coli* (XL-1 blue) transformiert. Nach erfolg-

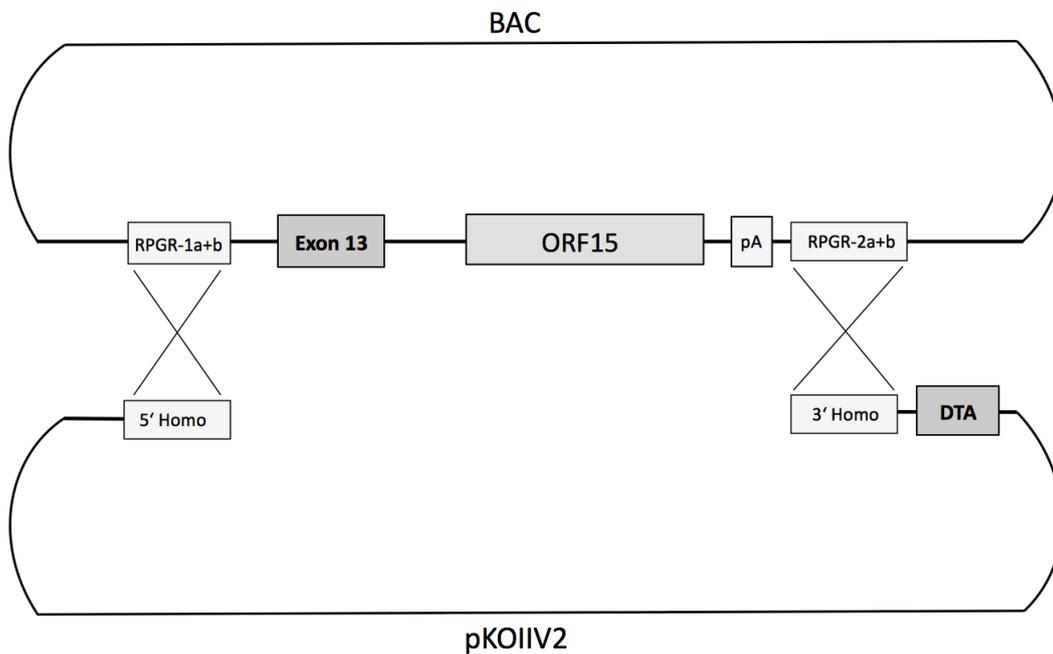


**Abbildung 3.2: Backbone des Targeting Vektors:** Für die Herstellung des Targeting Vektors wurde der pKOIIV2 Vektor ausgewählt, der eine DTA Kassette enthält und später als Vektor Backbone des Targeting Vektors dienen soll.

reicher Klonierung und anschließender Aufreinigung des Plasmids wurde die zweite Homologieregion auf die gleiche Weise eingeführt. Mit dem Primerpaar RPGR-2a+b wurde ein PCR Produkt mit einer Größe von 450bp mit der im BAC enthaltenen DNA hergestellt, das als 3' Homologieregion dient. Dieses PCR Produkt enthält die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme BglI und Sall. Mit diesen Enzymen werden das PCR Produkt und das pKOIIV2 Plasmid verdaut und anschließend ligiert. Das entstandene Plasmid wird ebenfalls in die XL-1 blue *E.coli* eingebracht (siehe Abb. 3.3).

### 3.2.2 Klonierung aus BAC in pKOIIV2 Backbone, Herstellung von pTV-1

Die Minihomologieregionen sollen dazu dienen, die Zielsequenz des *Rpgr* Gens mittels homologer Rekombination durch *gap repair* in den pKOIIV2 Vektorbackbone einzuführen. Dazu wird das Plasmid (pKOIIV2 mit 5' und 3' Homologieregion) mit dem Restriktionsenzym BglII verdaut, um es zu linearisieren (siehe Abb. 3.3). Das linearisierte Plasmid wird in induzierte EL350 *E.coli* eingebracht, in die zuvor das BAC-Plasmid transformiert wur-

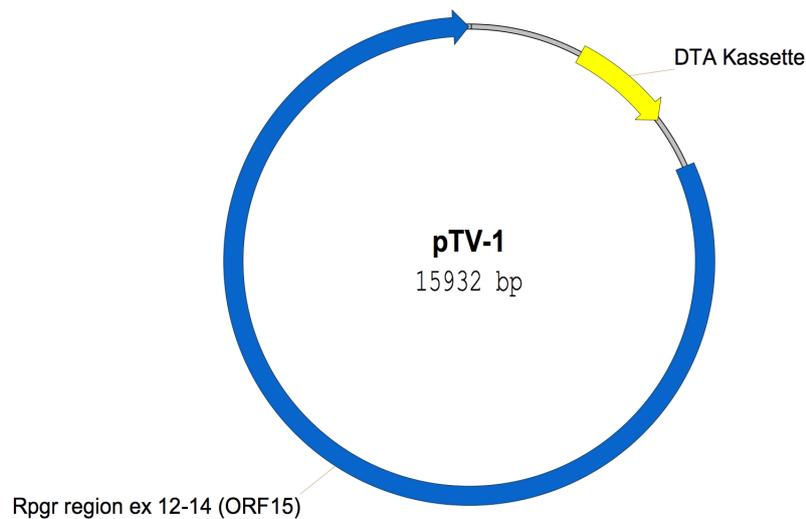


**Abbildung 3.3: Klonierung von pTV-1:** Um die Zielregion aus dem BAC in den pKOIIV2 Backbone rekombinieren zu können, wurden zunächst sogenannte Mini-homologieregionen in den Vektor kloniert. Mit Hilfe dieser homologen Sequenzen kann eine homologe Rekombination in induzierten EL350 Bakterien stattfinden, wodurch die Zielsequenz des *Rpgr*<sup>ORF15</sup> in den Vektor integriert wird.

de. Durch die Induzierung werden die Rekombinationsmechanismen der EL350 aktiviert und es kommt zur homologen Rekombination (siehe Abschnitt 2.2.5.2).

Der fertige Vektor pTV-1 (siehe Abb. 3.4) enthält den Backbone des pKOIIV2 Plasmids mit DTA Kasette und die genomische Sequenz von *Rpgr* aus dem BAC.

Für die spätere Selektion der transfizierten Stammzellklone ist außerdem eine Neomycin-Resistenzkassette nötig. Aus diesem Grund muss eine solche Resistenzkassette in den Vektor eingefügt werden.

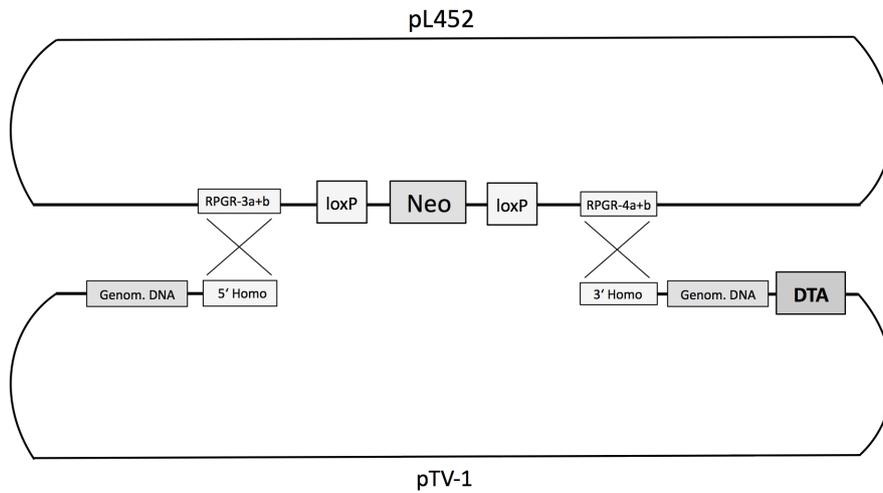


**Abbildung 3.4: Vektorkarte von pTV-1:** Die Vektorkarte zeigt den entstandenen Vektor, der als pTV-1 bezeichnet wird. Er enthält die DTA Kasette im Backbone und die *Rpgr* Zielsequenz.

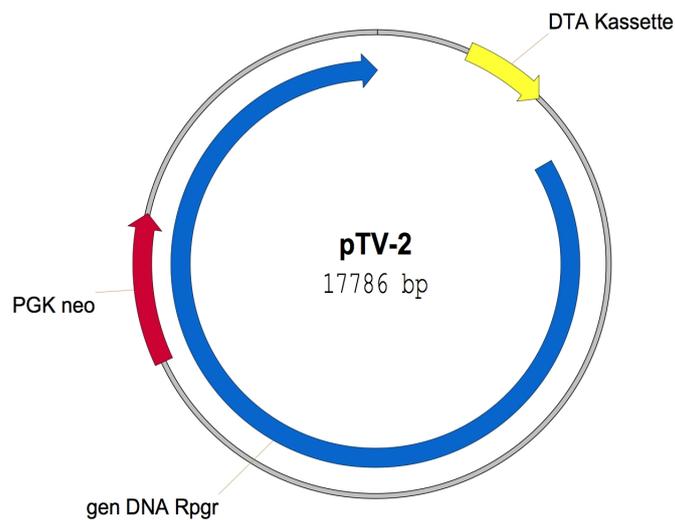
### 3.2.3 Einführung der Neomycin-Kassette in pTV-1, Herstellung von pTV-2

Die Einführung einer von loxP Stellen flankierten Neomycin-Kassette in pTV-1 erfolgt mit Hilfe des Vektors pL452, der eine solche Neomycin-Kassette enthält. Zu diesem Zweck werden ebenso wie bei der Rekombination von pKOIIV2 und BAC zwei PCR Fragmente erzeugt, die als Homologieregionen in den Vektor eingeführt werden. Diese Homologieregionen sollen dazu dienen, die Neomycin-Kassette mittels homologer Rekombination in den pTV-1 Vektor einzuführen. Mit dem Primerpaar RPGR-3a+b wird ein PCR Produkt mit einer Größe von 500 bp erzeugt, wobei der Vektor pTV-1 als Template DNA dient. Dieses PCR Produkt enthält die Restriktionsschnittstellen der Enzyme Sall und EcoRI und dient im Folgenden als 5' Homologieregion. Sowohl PCR Produkt als auch pL452 Plasmid werden mit Sall und EcoRI verdaut, anschließend in die 5' Multiple Cloning Site (MCS) von pL452 ligiert und in elektrokompente *E.coli* (XL-1 blue) transformiert. Nach erfolgreicher Klonierung und anschließender Aufreinigung des Plas-

mid, wird die zweite Homologieregion auf die gleiche Weise eingeführt. Mit dem Primerpaar RPGR-4a+b wird ein PCR Produkt mit einer Größe von 500 bp mit der im pTV-1 enthaltenen DNA hergestellt, das als 3' Homologieregion dient. Dieses PCR Produkt enthält die Restriktionsschnittstellen für die Enzyme BamHI und SacII. Mit diesen Enzymen werden das PCR Produkt und das pL452-3a+b Plasmid verdaut und anschließend in die 3' MCS von pL452-3a+b, der bereits die 5' Homologieregion enthält, ligiert. Das entstandene Plasmid wird ebenfalls in die XL-1 blue *E.coli* eingebracht, aufgereinigt und im Folgenden mit pL452 3+4 bezeichnet. Für die homologe Rekombination wird das Plasmid pL452 3+4 mit den Restriktionsenzymen KpnI und SacII geschnitten, um es zu linearisieren. Der Backbone des Plasmids wird mit XmnI verdaut, um eine spontane Religation zu verhindern. Die entstandenen Plasmidfragmente werden in induzierte EL350 *E.coli* eingebracht, die bereits das pTV-1 Plasmid enthalten. Durch die Induzierung werden die Rekombinationsmechanismen der EL350 aktiviert und es kommt zur homologen Rekombination (siehe Abschnitt 2.2.5.2), wobei die von loxP Stellen flankierte Neomycin-Kassette in das pTV-1 Plasmid integriert wird (siehe Abb. 3.5). Das entstandene Plasmid wird im Folgenden mit pTV-2 bezeichnet (siehe Abb. 3.6).



**Abbildung 3.5: Klonierung von pTV-2:** Da bei der Rekombination der Zielsequenz mit pKOIIV2 die Neomycin-Kassette aus dem Vektor entfernt wurde, muss diese in einem eigenen Klonierungsschritt wieder in den Backbone eingeführt werden. Hierzu werden zunächst Minihomologieregionen in den Vektor pL452 einkloniert und die Rekombination der "gefloxten" Neomycin-Kassette mit pTV-2 möglich zu machen. Der entstandene Vektor enthält nun eine DTA-Kassette, eine "gefloxte" Neomycin-Kassette und die *Rpgr* Zielsequenz und wird als pTV-2 bezeichnet.



**Abbildung 3.6: Vektorkarte von pTV-2:** Eingezeichnet sind die Neomycin-Kassette und die *Rpgr* Zielsequenz.

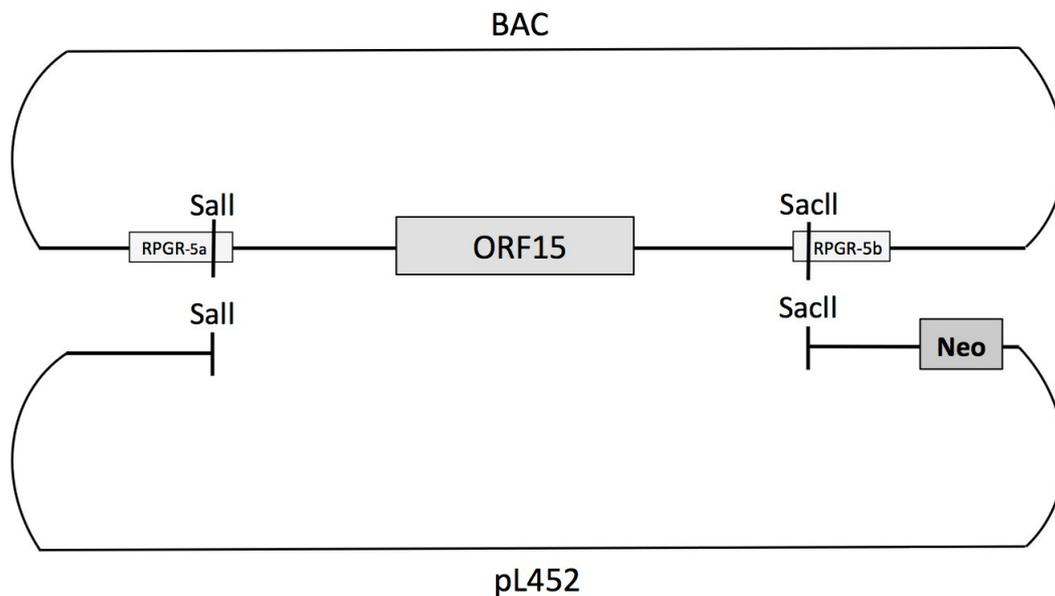
### 3.2.4 Einführung der Zielsequenz in pL452

Die Einführung der spezifischen Mutationen in die Sequenz des *Rpgr*<sup>ORF15</sup> erfolgte mittels Mutagenese PCR (siehe Abschnitt 2.2.2). Hierzu wird ein kleinerer Vektor als pTV-2 benötigt, da bei diesem Verfahren das gesamte Plasmid amplifiziert wird und somit die Größe des Plasmids einen limitierenden Faktor darstellt. Dieser kleinere Vektor wird erzeugt, indem die genomische Zielsequenz des *Rpgr* Gens mittels PCR aus dem BAC Plasmid amplifiziert wird. Hierzu werden die Primer RPGR-5a+b benutzt, wobei ein PCR Fragment mit einer Größe von 3400bp entsteht, das die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme SallI und SacII enthält. Dieses PCR Produkt wird ebenso wie das Plasmid pL452 mit diesen beiden Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend die Fragmente ligiert. Das erhaltene Plasmid wird in XL-1 blue *E.coli* eingebracht und aufgereinigt. Er wird im Folgenden mit pL452 5a+b bezeichnet (siehe Abb. 3.7).

### 3.2.5 Einführung der Mutationen in pL452 5a+b

Insgesamt werden 4 Mutationen in die Sequenz eingeführt. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Mutationen und Klonierungsschritte beschrieben. Die erste eingeführte Sequenzveränderung ist die pathologische Mutation, bei der es sich um die Deletion eines Adenin an der Position 2793 (del2793A) im *Rpgr* Gen handelt. Hierzu wird mit dem Primerpaar RPGR-6a+b und dem Plasmid pL452 5a+b eine Mutagenese PCR durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.2) und das Produkt in XL-1 blue *E.coli* eingebracht. Das aufgereinigte Plasmid wird sequenziert um die eingeführte Mutation nachzuweisen (siehe Abb. 3.15). Es wird im Folgenden mit pL452 5a+b-1 bezeichnet. Die Auswirkung der pathologischen Mutation im Genom der späteren Maus besteht in einer Verschiebung des Leserahmens bei der Translation des Proteins.

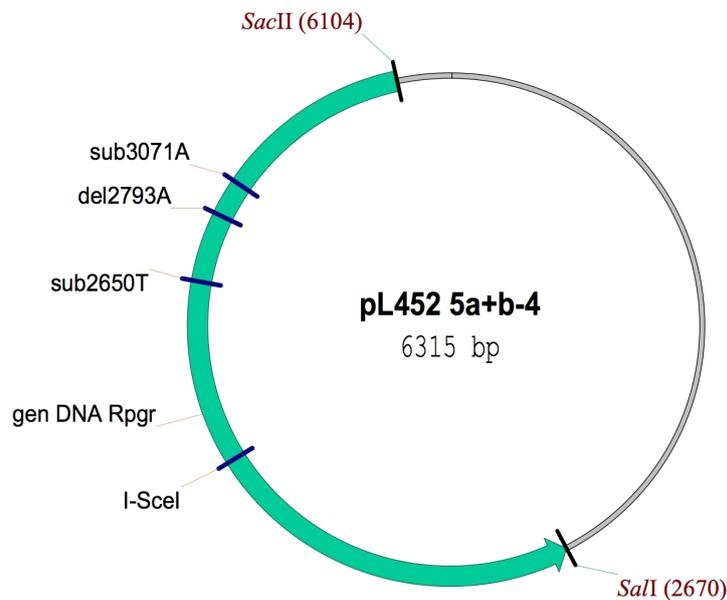
Die Verschiebung aufgrund der Mutation 2793delA führt bei der Maus allerdings zur Bildung eines verfrühten Stopcodons, wodurch die terminale Aminosäurekette des Proteins verkürzt würde. Um dieses Stopcodon zu



**Abbildung 3.7: Klonierung von pL452 5a+b:** Um die gewünschten Sequenzveränderungen mittels Mutagenese PCR in die Zielsequenz einführen zu können, wird diese in den pL452 Vektor kloniert. Dazu wird die Zielsequenz mittels PCR aus dem BAC amplifiziert und mit Hilfe der Restriktionsenzyme Sall und SacII in pL452 kloniert.

verhindern, wird eine zweite Mutation eingeführt, die durch einen Basenaustausch die Bildung des Stoppsignals verhindert, ohne die Proteininformation zu verändern, eine sog. *silent mutation*. Für die nächste Mutagenese PCR wird pL452 5a+b-1 als Ausgangsplasmid eingesetzt und mit dem Primerpaar RPGR-9a+b die zweite Mutation eingeführt. Hierbei handelt es sich um eine Substitution von Adenin durch Thymin an der Position 3071 im RPGR Gen. Diese Mutation wird ebenfalls mittels Sequenzierung in dem neu entstandenen Plasmid pL452 5a+b-2 nachgewiesen.

Durch die dritte eingeführte Mutation entsteht eine XbaI Schnittstelle im RPGR Gen der Maus, die der späteren Genotypisierung der ES Zell Klone und der Tiere dienen soll. Hierbei handelt es sich um einen Basenaustausch an der genomischen Position 2650 des RPGR Gens, wobei Thymin gegen Cytosin ausgetauscht wird. Mit Hilfe dieser zusätzlichen Schnittstelle kann später der Genotyp der ES Zellen und der Tiere mittels Restriktionsverdau



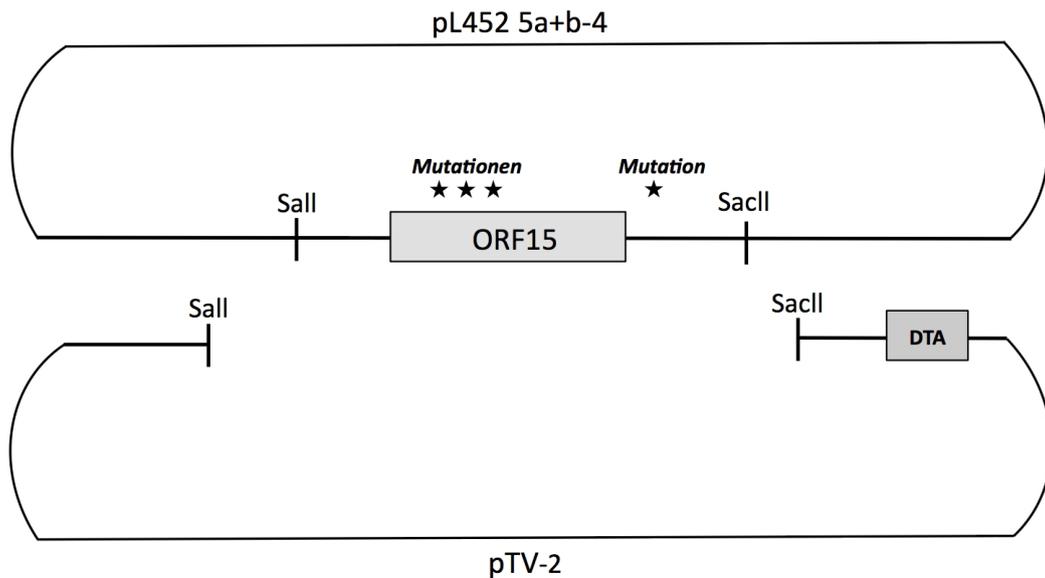
**Abbildung 3.8:** Vektorkarte pL452 5a+b-4: In die Vektorkarte des Vektors pL452 5a+b-4 sind alle eingeführten Mutationen eingezeichnet, sowie die für die spätere Klonierung erforderlichen Restriktionsschnittstellen SalI und SacII.

und Sequenzierung ermittelt werden (siehe Abschnitt 3.4.4). Das entstandene Plasmid wird als pL452 5a+b-3 bezeichnet. Bei der vierten Mutation handelt es sich um die Einführung der Erkennungssequenz für eine Homingendonuclease (I-SceI), die das Mausmodell für eine spätere neuartige Therapieentwicklung mittels Homingendonuclease (I-SceI) zugänglich machen soll. Die Mutation wird ebenfalls mittels Sequenzierung des neuen Plasmids pL452 5a+b-4 nachgewiesen (siehe Abb. 3.8).

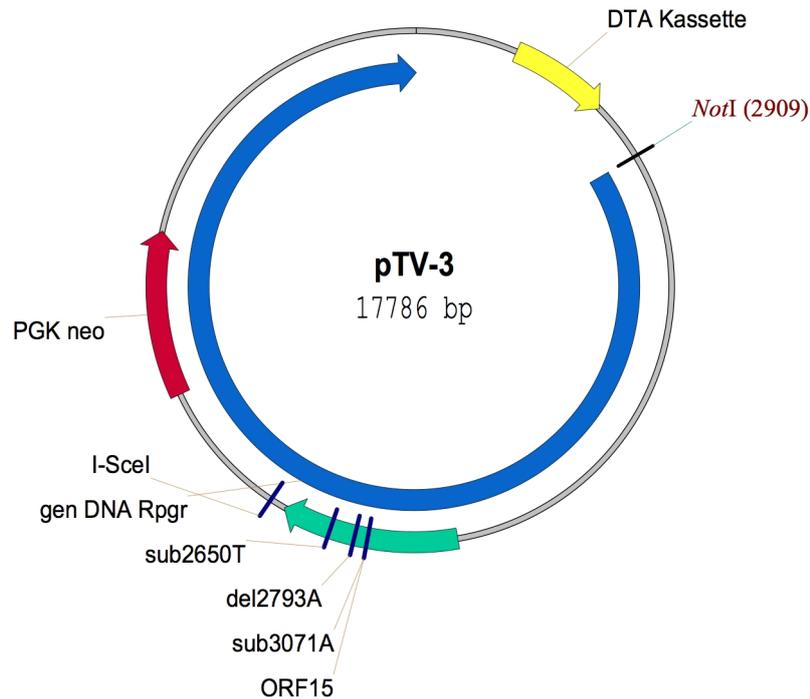
### 3.2.6 Klonierung von pL452 5a+b in pTV-2, Herstellung von pTV-3

Zur Herstellung des Targeting-Vektors pTV-3 werden die Plasmide pL452 5a+b-4 und pTV-2 mit den Restriktionsenzymen SalI und SacII geschnitten und die entstandenen Fragmente ligiert (siehe Abb. 3.9). Das erhaltene Plasmid wird in XL-1 blue *E.coli* eingebracht und anschließend aufgereinigt. Bei dem entstandenen Plasmid handelt es sich um den fertigen Targeting-

Vektor, der alle Mutationen und Selektionskassetten enthält. Dieser wurde vollständig sequenziert, um mögliche Basenpaarverluste auszuschließen (siehe Abb. 3.10).



**Abbildung 3.9: Klonierung von pTV-3:** Um den Targeting Vektor herzustellen wird mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen Sall und SacII die Zielsequenz mit den Mutationen in den pTV-2 Vektor kloniert, der die DTA und Neomycin Selektionskassette enthält.



**Abbildung 3.10: Vektorkarte von pTV-3:** Vektorkarte des fertigen Targeting Vektors mit der Zielsequenz, den eingeführten Mutationen und der Neomycin-Kassette. Eingezeichnet ist außerdem die NotI Restriktionsschnittstelle, die der späteren Linearisierung des Vektors dient.

### 3.3 Transfektion und homologe Rekombination in murinen ES Zellen

Die Transfektion der murinen ES Zellen wurde im Labor der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Braun am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim durchgeführt. Nach der Transfektion werden die ES Zellen auf neomycin-haltigen Platten kultiviert, um die Klone zu selektieren, die den Targeting-Vektor integriert haben. Bei einer fehlerhaften "off-target" Integration des Vektors werden die betroffenen Klone durch die Integration der DTA-Kassette und die daraus resultierende Expression des Diphtherietoxins selektiert. Bei der verwendeten ES Zelllinie handelt es sich um Zellen, die aus einem männlichen Tier hervor gegangen sind. In jeder

ES Zelle ist also nur eine Kopie des X-Chromosoms vorhanden, was dazu führt, dass der Vektor nur an einer Stelle im Genom integriert haben muss, um vollständige Transgenität zu erreichen. Von den gewachsenen Klonen wurden 384 (4 x 96) gepickt und zur DNA-Aufreinigung angezogen. Die erhaltenen Zellkolonien wurden geteilt, um aus einem Teil die DNA aufzureinigen, während der andere Teil bis zur späteren Implantation in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde. Da die Kolonien maximal 4 Wochen in Stickstoff gelagert werden können ist darauf zu achten, dass das Screening der Klone innerhalb dieses Zeitraums abgeschlossen wird.

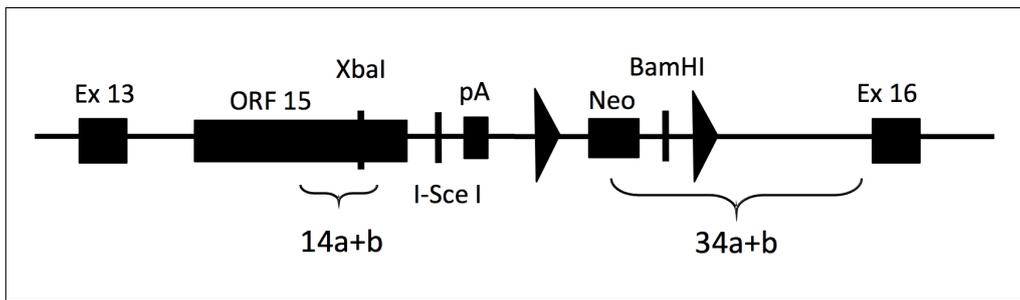
## 3.4 Screening-Strategie

---

Zur Überprüfung der korrekten Rekombination des Targeting-Vektors mit der genomischen DNA in den murinen ES Zellen werden die erhaltenen Klone mithilfe mehrerer PCR Verfahren getestet. Die PCR Produkte werden mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung analysiert, um geeignete Klone zur Implantation auszuwählen. Dazu werden die Primerpaare so gewählt, dass das PCR Produkt die Mutation beinhaltet bzw. nur bei korrekter Rekombination ein PCR-Produkt entsteht (siehe Abb. 3.11).

### 3.4.1 PCR Test auf korrekte Rekombination des Vektors in den ES-Zellen

Zunächst werden alle Klone mit einem Primerpaar (34a+b) getestet, bei dem einer der Primer in der Sequenz der Neomycin-Kassette bindet, während die Bindestelle des anderen Primers außerhalb der Sequenz des Targeting-Vektors, also in der chromosomalen DNA der transfizierten ES-Zelle liegt. Bei korrekter Rekombination erhält man ein PCR Produkt von 4500bp. War die Rekombination unvollständig oder wurde der Vektor an der falschen Stelle im Genom integriert, so entsteht kein PCR Produkt. Als Positivkontrolle für diese PCR dient ein Plasmid, das zusätzlich zu der genomischen Sequenz aus dem BAC eine Neomycin-Kassette enthält. Für die Klonierung



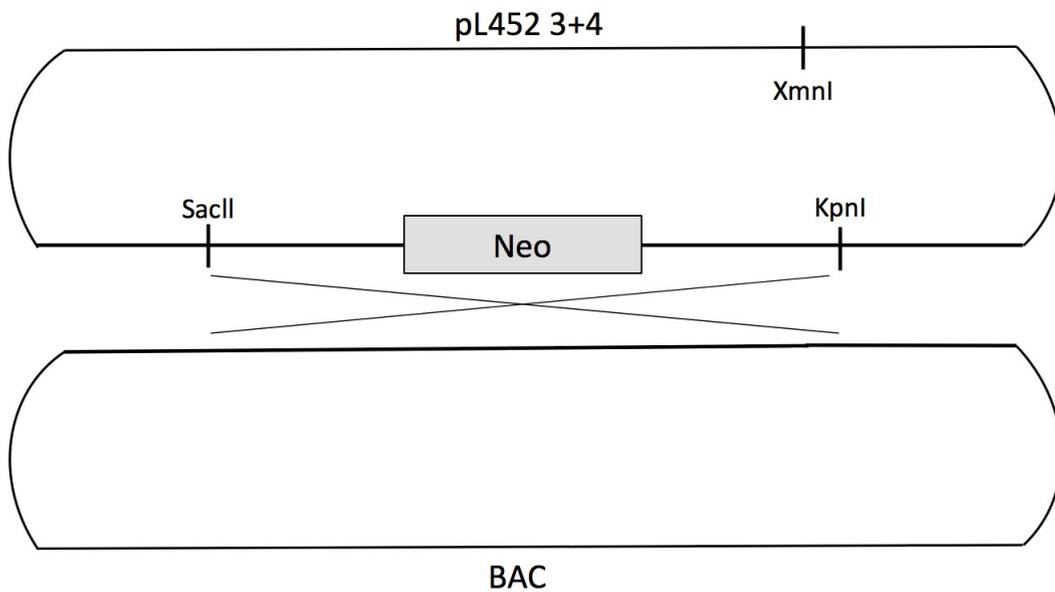
**Abbildung 3.11: PCR Screening Strategie:** Zur Testung der ES Zellen und der Tiere auf Transgenität wurde eine PCR Screening Strategie entwickelt. Mit Hilfe des Primerpaares 34a+b wird das erhaltene Rekombinationsergebnis überprüft. Das erwartete PCR Produkt bildet die Rekombinationsstelle ab und entsteht ausschließlich bei korrekter Rekombination. Durch die Sequenzierung des PCR Produktes das mit den Primern 14a+b erzeugt wird, können die ES Zellen und später auch die Tiere auf ihren Genotyp hin untersucht werden.

dieses Plasmids wird der Vektor pL452 3+4 mit den Restriktionsenzymen SacII, KpnI und XmnI verdaut, um die Neomycin-Kassette herauszuschneiden und gleichzeitig den verbleibenden Vektor-Backbone zu zerschneiden. Die auf diese Weise herausgeschnittene Neomycin-Kassette wird in elektrokompetente, induzierte EL350 *E.coli* eingebracht, die bereits das BAC Plasmid enthalten. Mit Hilfe der beiden Homologieregionen 3a+b und 4a+b findet eine Rekombination der Neomycin-Kassette mit der BAC Sequenz statt (siehe Abb. 3.12).

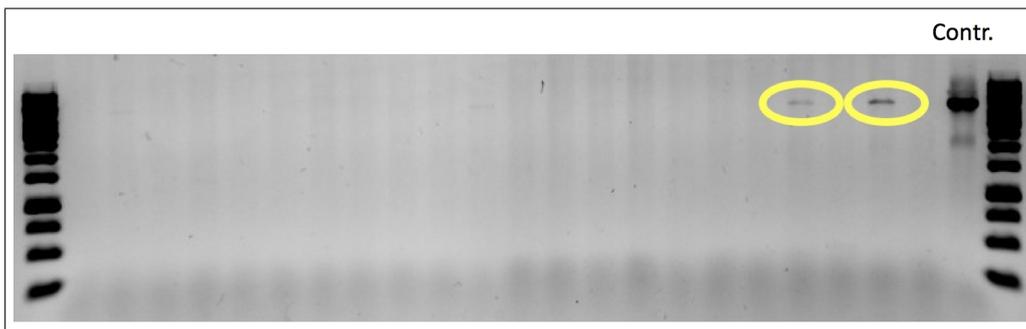
Die verwendeten PCR Bedingungen sind in Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Bei 14 der 384 getesteten Klone konnte das korrekte PCR Produkt nachgewiesen werden. Beispielhaft ist dies in Abbildung 3.13 dargestellt.

Mit den ermittelten 14 Klonen wird die PCR wiederholt, um das PCR Produkt in einen Restriktionsverdau einzusetzen. Durch die Integration des Targeting-Vektors enthält die Sequenz eine zusätzliche BamHI Schnittstelle, die durch den Verdau des PCR Produktes nachgewiesen werden soll, um die korrekte Integration des Targeting-Vektors zu bestätigen.

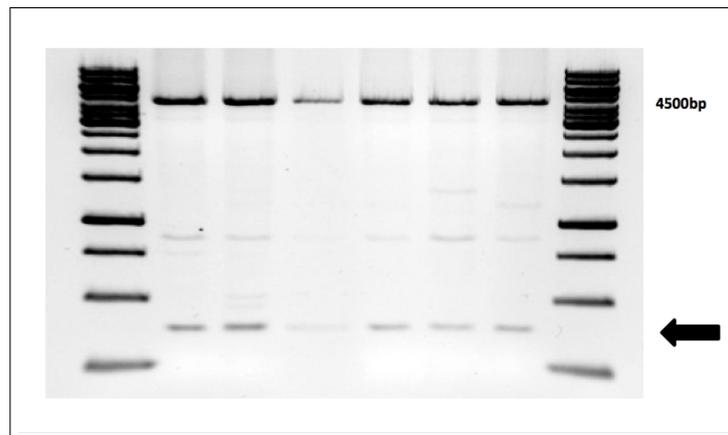
Abbildung 3.14 zeigt das Ergebnis des BamHI Verdau. Durch den Verdau entsteht ein zusätzliches Produkt von 300bp.



**Abbildung 3.12: Klonierung der Positivkontrolle:** Die für die PCR Screening Strategie erforderliche Positivkontrolle wird erzeugt, indem die Neomycin-Kassette aus dem Vektor pL452 3+4 mit Hilfe der enthaltenen Minihomologieregionen in den BAC rekombiniert wird. Auf diese Weise wird ein PCR Produkt mit den Primern 34a+b möglich, da die Primerbindungsstellen nun zusammen in einem Plasmid enthalten sind.



**Abbildung 3.13: Test auf Rekombination:** Agarosegel mit den Produkten aus der PCR mit den Primern 34a+b und der DNA der ES Zellklone. Farblich markiert sind die erhaltenen PCR Produkte der transgenen Zellklone, in der Laufspur ganz rechts befindet sich die Positivkontrolle. Das erwartete PCR Produkt hat eine Größe von 4500 bp.



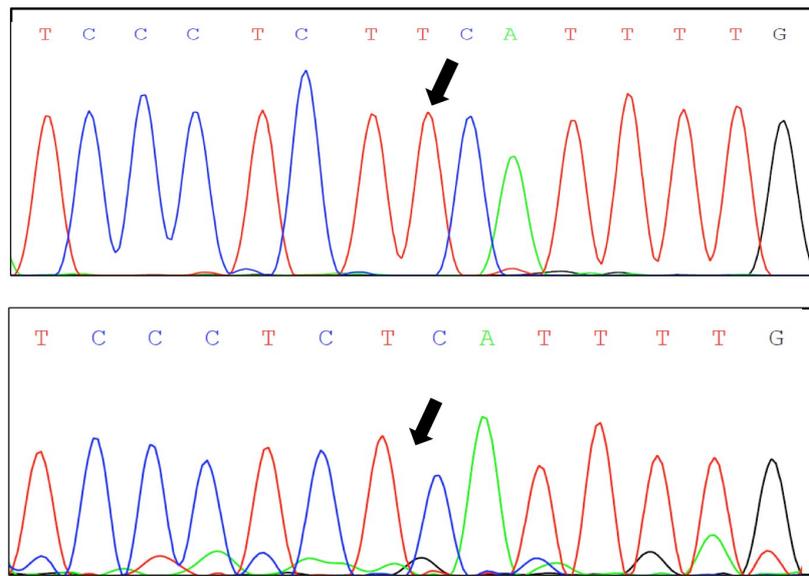
**Abbildung 3.14: Restriktionsverdau mit BamHI:** Ergebnis des BamHI Verdau des PCR Produkts mit 34a+b. Durch den Verdau wird in der korrekten Sequenz ein Fragment mit einer Größe von 300bp abgespalten. Der Verdau dient als zusätzlicher Test für die korrekte Integration des Targeting-Vektors.

### 3.4.2 Nachweis der pathologischen Mutation del2793A in den ES Zellen

Die in das Genom eingeführte pathologische Mutation del2793A wird durch die Sequenzierung des PCR Produktes der Primer 14a+b nachgewiesen. Das PCR Produkt mit einer Größe von 500bp wird dazu auf dem Gegenstrang sequenziert, weshalb sich die Deletion des Adenins als eine Thymin-Deletion darstellt (siehe Abb. 3.15).

### 3.4.3 Nachweis der Mutation sub3071A-T zur Verhinderung des Stop-Codon

Um zu verhindern, dass durch den von der Deletion verursachten Frameshift ein Stop-Codon in der genomischen DNA entsteht, wurde an Position 3071 ein Basenaustausch von Adenin zu Thymin vorgenommen. Um diesen nachzuweisen wird ein PCR Produkt mit den Primern F2+F24 mit einer Größe von 1601bp angefertigt und sequenziert.



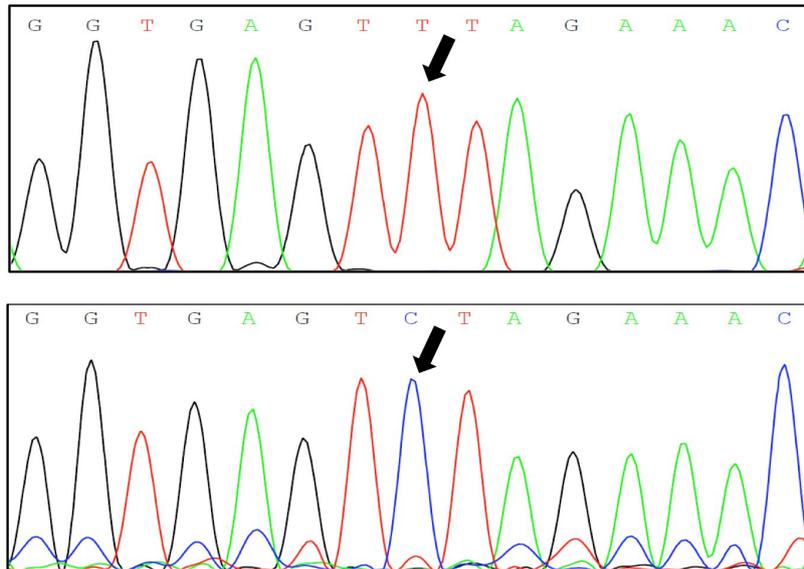
**Abbildung 3.15:** Vergleich der Sequenzierungshistogramme von *wt* (oberes Bild) und Mutation (unteres Bild) an der Stelle der pathologischen Mutation. Der Pfeil markiert die Stelle der Deletion. Es wurde der Gegenstrang sequenziert, weshalb sich die Mutation als Thymin-Deletion darstellt.

#### 3.4.4 Nachweis der Mutation sub2650T-C zur Einführung der XbaI Schnittstelle

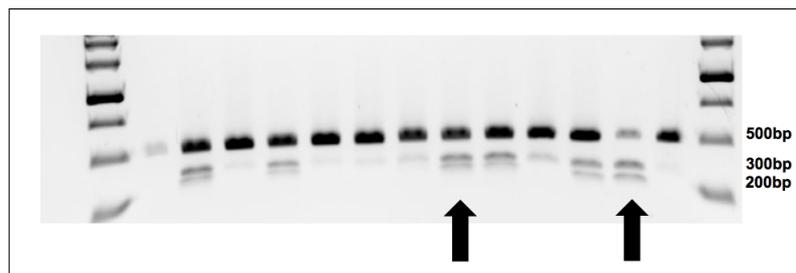
Zur späteren Genotypisierung der Mäuse wird eine zusätzliche XbaI Restriktionsschnittstelle in das Genom eingeführt, um alle später geborenen Mäuse auf schnelle und einfache Weise mittels PCR und Restriktionsverdau genotypisieren zu können. Hierzu wird wiederum das PCR Produkt der Primer 14a+b benutzt und sowohl sequenziert, als auch mit XbaI verdaut. Abbildung 3.16 zeigt das Sequenzierungsergebnis des DNA-Abschnitts mit der zusätzlichen XbaI Restriktionsschnittstelle. Das Ergebniss des XbaI Verdaus ist in Abbildung 3.17 dargestellt.

#### 3.4.5 Nachweis der eingeführten I-SceI Erkennungssequenz

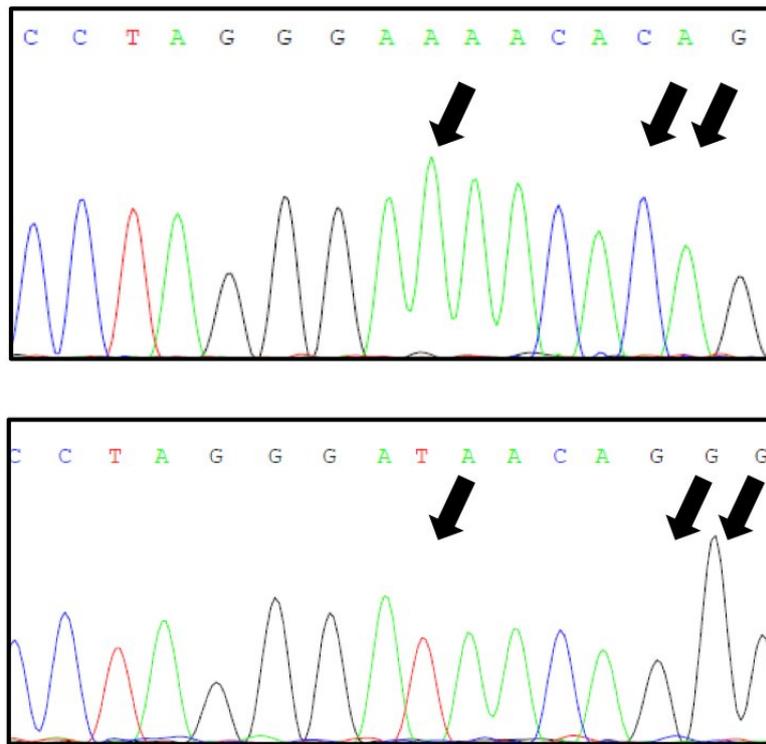
Da die erzeugte transgene Mauslinie als Therapiemodell dienen soll, wird zusätzlich zu der pathologischen und den analytischen Mutationen eine



**Abbildung 3.16:** Vergleich der Sequenzierungshistogramme von *wt* (oberes Bild) und Mutation (unteres Bild) an der Stelle der neu eingeführten *Xba*I Restriktionsschnittstelle. Der Pfeil markiert die Stelle der Sequenzveränderung, an der Thymin gegen Cytosin ausgetauscht wird.



**Abbildung 3.17: Restriktionsverdau mit *Xba*I:** Die Abbildung zeigt den Restriktionsverdau mit *Xba*I der PCR Produkte der ES Zell Klone. Das PCR Produkt von 500bp wird durch den Verdau in Fragmente von 300bp und 200bp geschnitten. Die durch die Pfeile markierten Klone (160 und 320) haben bei allen durchgeführten Tests das erwartete Ergebnis erbracht und werden für die Blastozysteninjektion vorgesehen.



**Abbildung 3.18:** Vergleich der Sequenzierungshistogramme von *wt* (oberes Bild) und Mutation (unteres Bild) an der Stelle der neu eingeführten I-SceI Schnittstelle. Die Pfeile markieren die Stellen der Sequenzveränderungen, durch die die Erkennungssequenz für die Endonuklease entsteht.

I-SceI Erkennungssequenz eingeführt. Diese soll in späteren Therapiestudien von einer in das Auge eingebrachten Homingendonuklease erkannt und geschnitten werden. Durch den Strangbruch, der durch die Endonuklease erzeugt wird, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit einer homologen Rekombination im Genom. Der Nachweis der Erkennungssequenz findet über die Sequenzierung des PCR Produktes der Primer F5+37c statt. Das Produkt hat eine Größe von 1571bp (siehe Abb. 3.18).

Zusammengefasst hat das Screening der ES Zell Klone folgendes Ergebnis erbracht:

Auf der Basis der Ergebnisse aus Tabelle 3.2 werden die Klone 160 und 320 zur Blastozysteninjektion ausgewählt, da bei ihnen alle Mutationen mit al-

Klon Nr.	PCR 34a+b	BamHI	PCR 14a+b	Xbal	Sequ. 34 a	Sequ. 34 b	Sequ. 14 a	Sequ. 14 b
1	+	?	X	X	X	X	X	X
3	+	+	+	-	-	-	-	-
91	+	+	+	+	+	-	-	-
109	+	+	+	-	+	-	-	-
123	+	+	+	+	-	-	+	-
131	+	+	+	-	+	+	-	-
133	+	+	+	-	-	+	-	-
138	+	+	+	+	+	-	+	+
160	+	+	+	+	+	+	+	+
164	+	+	+	+	-	+	+	+
167	+	+	+	-	+	-	-	-
169	+	+	+	+	+	?	+	-
320	+	+	+	+	+	+	+	+
356	+	+	+	-	-	-	-	-

**Tabelle 3.2: Gesamtauswertung des Screening der 14 ES Zell Klone.** Die gelb markierten Klone 160 und 320 wurden für die Blastozystenimplantation ausgewählt. ([+] positiv, [-] negativ, [×] kein Ergebnis, [?] nicht auswertbar)

len Nachweisverfahren zweifelsfrei nachgewiesen werden konnten.

### 3.5 Blastozystenimplantation und Erzeugung chimärer Tiere

Die folgenden Arbeitsschritte der Stammzell-Kultivierung und Blastozysteninjektion wurden im Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Braun am Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in Bad Nauheim durchgeführt. Die eingefrorenen Zellen der beiden ausgewählten Klone 160 und 320 werden aufgetaut und kultiviert, bis sie erneut geteilt werden, um aus einer Hälfte die DNA zu isolieren. Mit dieser DNA Isolation wird das Screening noch einmal durchgeführt, um sicher zu stellen, dass keine Verwechslung der Klone stattgefunden hat. Sobald genug Zellen in der Kultur herangewachsen sind, findet die Blastozysteninjektion statt.

Bei den verwendeten embryonalen Stammzellen handelt es sich um eine Hybrid-Zelllinie mit dem Stammhintergrund C57BL/6/SV129. Die Fellfarbe der Mäuse mit diesem Stammhintergrund ist agouti, während die verwendeten Blastozysten einen BL/6J Hintergrund haben und diese Mäuse

ein schwarzes Fell haben. Die aus der Blastozystenimplantation hervorgehenden Chimären weisen ein Muster ihrer Fellfarbe auf, das teilweise erste Hinweise auf ihre Genetik geben kann. Das Ziel der Blastozystenimplantation ist, dass die eingebrachten ES Zellen den mesodermalen Teil des Embryos bilden, aus dem sich später die Keimbahn entwickelt, um das Transgen in die nächste Generation vererben zu können. Die Blastozyste soll zur Einnistung in den Uterus und zur Placentaentwicklung dienen. Ein chimäres Tier mit agouti-farbenem Fell weist auf eine Embryonalentwicklung aus den eingebrachten ES Zellen hin, wohingegen ein rein schwarzes Tier auf eine Embryonalentwicklung aus der Blastozyste ohne Beteiligung der implantierten ES Zell Klone schließen lässt. Bei Tieren mit mosaikartiger Fellfarbenverteilung ist zu befürchten, dass das Transgen nicht in allen Organen enthalten ist und somit auch die Keimbahntransmission gestört sein könnte. Für die weitere Zucht sind also agoutifarbene Tiere zu bevorzugen, wobei das umfassende Screening-Protokoll des ES Zell Screenings ebenfalls mit der DNA der chimären Tiere durchgeführt wird. Die injizierten Blastozysten werden in eine scheinträchtige Amme (BALB/c) implantiert, die die chimären Tiere austrägt und aufzieht, bis sie im Alter von 4 Wochen entwöhnt sind und nach Geschlechtern getrennt werden können.

### 3.6 Genotypisierung der chimären Tiere

---

Für die Genotypisierung der chimären Tiere werden Schwanzspitzenbiopsien der Tiere genommen, sobald diese ein Alter von 4 Wochen erreicht haben und von der Amme entwöhnt sind. Die ES Zellen wurden jeweils in mehrere Blastozysten injiziert, die dann in den Uterus implantiert wurden. Bei ES Zell Klon 160 wurden sechs Jungtiere geboren, während die Wurfgröße bei ES Zell Klon 320 neun Tiere betrug. Mit der aus den Schwanzspitzenbiopsien erhaltenen DNA wird das gesamte Screening-Protokoll durchgeführt, um den Genotyp der chimären Tiere zu ermitteln. Die Verteilung der Fellfarben innerhalb der zwei Würfe war wie folgt:

Bei beiden Würfen wurde jeweils auch ein weibliches Tier geboren, was auf

Tier	Farbe	Geschlecht
160-1	chimär	weiblich (♀)
160-2	agouti	männlich (♂)
160-3	agouti	männlich (♂)
160-4	chimär	männlich (♂)
160-5	chimär	männlich (♂)
160-6	schwarz	männlich (♂)

Tier	Farbe	Geschlecht
320-7	agouti	weiblich (♀)
320-8	agouti	männlich (♂)
320-9	agouti	männlich (♂)
320-10	agouti	männlich (♂)
320-11	agouti	männlich (♂)
320-12	agouti	männlich (♂)
320-13	agouti	männlich (♂)
320-14	agouti	männlich (♂)
320-15	agouti	männlich (♂)

**Tabelle 3.3: Chimäre Tiere.** Aufgelistet sind alle chimären Tiere der beiden Zuchtlinien.

eine Entwicklung des Embryos aus der Blastozyste zurück zu führen ist. Interessant hierbei ist, dass die Fellfarbe der Tiere (chimär und agouti) darauf hin deutet, dass eine Vermischung der Blastozyste mit den ES Zellen stattgefunden hat. In diesen Fällen ist davon auszugehen, dass diese Vermischung nur partiell stattgefunden hat, also wahrscheinlich nur der ectodermale Teil der Blastozyste mit den ES Zellen vermischt wurde und so das Geschlecht der Tiere unbeeinträchtigt geblieben ist. Beim Screening ist nun zu beachten, dass die zu testende DNA aus der Schwanzspitze, also ebenfalls aus der Haut isoliert wird. So lässt es sich erklären, warum bei Tier 320-7 die Integration des Vektors nachgewiesen werden konnte, obwohl das Tier noch ein zweites unverändertes X-Chromosom besitzt. Es zeigt sich also, dass die Fellfarbe nur einen sehr schwachen Anhaltspunkt über den Genotyp des chimären Tieres liefern kann und eine umfassende Genotypisierung unumgänglich ist. Aber auch bei vollständigem Nachweis aller Mutationen ist eine Keimbahntransmission des Transgens nicht gesichert und kann erst durch die Analyse der nächsten Generation bewiesen werden. Die Auswertung des vollständigen Screenings ist in Tabelle 3.4 dargestellt. Bei den chimären Tieren 160-2 und 320-9 konnten alle Mutationen nachgewiesen werden, weshalb mit diesen Tieren weiter gezüchtet wird.

Klon Nr.	PCR 34a+b	BamHI	PCR 14a+b	Xbal Ver.	Sequ. 34 a	Sequ. 34 b	Sequ. 14 a	Sequ. 14 b	Xbal Stelle	del A	sub A-T	Scel
160-1	+	+	+	?	?	?	?	?	?	?	?	?
160-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
160-3	+	+	+	+	?	?	?	?	?	?	?	?
160-4	+	+	+	+	?	?	+	+	X	X	?	?
160-5	+	+	+	+	?	?	+	+	X	?	?	?
160-6	X	X	+	?	X	X	?	?	?	?	?	?

320-7	+	+	+	X	+	+	+	+	+	X	?	?
320-8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	X	?	?
320-9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
320-10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
320-11	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+	+	?
320-12	+	+	+	+	+	+	+	+	?	+/	?	?
320-13	+	+	+	+	+	+	+	+	X	X	?	?
320-14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	?	?
320-15	+	+	+	+	+	+	+	+	X	X	?	?

**Tabelle 3.4: Gesamtauswertung des Screening der chimären Tiere der Linien 160 und 320.** Die gelb markierten Chimären 160-2 und 320-9 wurden für die Verpaarung mit Cre-Rekombinase exprimierenden Tieren ausgewählt.  
 ([+] positiv,[-] negativ,[x] kein Ergebnis,[?] nicht auswertbar)

### 3.7 Cre-Deletion

Wie bereits in Abschnitt 3.2.3 erwähnt, ist die Neomycin-Kassette von zwei loxP Stellen umgeben (gefloxt). Die Neomycin-Kassette wurde für die Positivselektion der ES Zell Klone benötigt, ist nun aber in der weiteren Züchtung funktionslos geworden. Um mögliche negative Effekte der Kassette im Genom zu vermeiden, soll die Neomycin-Kassette mittels Cre-Deletion aus dem Genom entfernt werden. Das Cre-loxP System ist ein Mechanismus, der ursprünglich bei dem Bakteriophagen P1 entdeckt wurde, zu dessen Reproduktionsapparat er gehört. Der Bakteriophage nutzt die Cre-lox Rekombination um sein Genom vor der Replikation zu zirkularisieren. Aus dem Mechanismus der Cre-Rekombination wurde eine Technologie entwickelt, die es ermöglicht, gezielt DNA Sequenzen in lebenden Organismen zu entfernen [74]. Hierzu wird der zu entfernende Abschnitt von zwei loxP Sequenzen eingerahmt, wobei auf die Orientierung der loxP Stellen zu achten ist. Nur wenn beide loxP Stellen in gleicher Richtung orientiert sind, wird die gefloxt Sequenz herausgeschnitten. Dazu erkennt das Enzym Cre-Rekombinase die loxP Stellen und katalysiert ihre Bindung. Bei den loxP Stellen handelt es sich um spezifische 34bp große Sequenzen, die eine Kern-

sequenz von 8bp enthalten, an der die Rekombination stattfindet. Bei den 13 flankierenden Basenpaaren handelt es sich um invertierte Repeats.

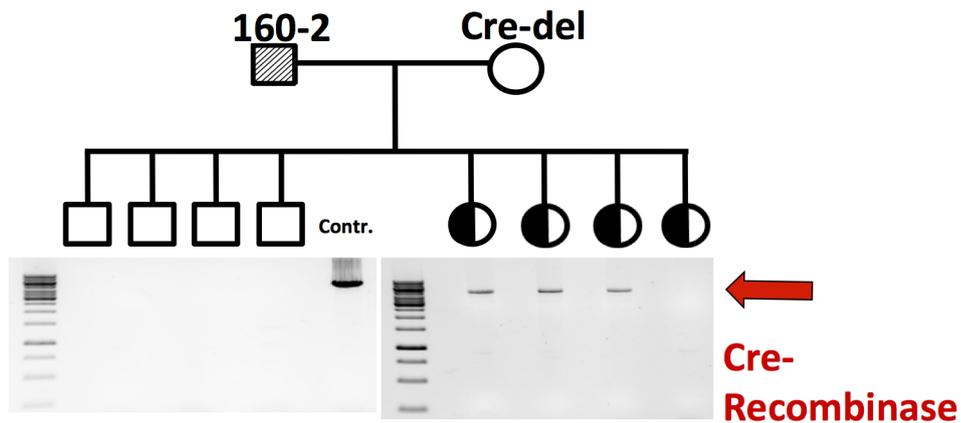
Um diese Technik auch für die Erzeugung transgener Mäuse nutzbar zu machen, wurden transgene Mäuse entwickelt die das Enzym Cre-Rekombinase exprimieren [55]. Durch die Verpaarung dieser Mäuse mit den Trägern der geflochten Sequenzen, können gezielt Deletionen hervorgerufen werden. Um mögliche negative Effekte der Neomycin-Kassette im Genom der neu erzeugten Mauslinie zu vermeiden, wird die Neomycin-Kassette mit Hilfe der Cre-Rekombinase aus dem Genom entfernt. Dazu werden die chimären Tiere 160-2 und 320-9 mit jeweils einem Cre-Rekombinase exprimierenden Weibchen verpaart. Bei den Nachkommen aus den erhaltenen Würfen wird zusätzlich zum gesamten Screening außerdem mittels PCR auf die Expression der Cre-Rekombinase getestet.

Da die chimären Männchen 160-2 und 320-9 ihr verändertes X-Chromosom nur an einen weiblichen Nachkommen weiter geben können, wird für die nächste Verpaarung ein weibliches Tier ausgesucht, das die Cre-Rekombinase exprimiert bzw. bei dem nachgewiesen werden konnte, dass es keine Neomycin - Kassette mehr in seinem Genom enthält. Für die Tiere aus der Verpaarung mit 160-2 ergaben sich die in Tabelle 3.5 dargestellten Ergebnisse. Die Tiere 31- 34 sind weiblich, die Tiere 35-38 männlich. Da durch die Deletion der Neomycin-Kassette der Primer 34a nicht mehr binden kann, wird kein PCR Produkt mit 34a+b erhalten. Dies kann einen ersten Hinweis auf die Abwesenheit der Neomycin-Kassette geben. In Abbildung 3.19 ist das PCR Ergebnis zum Test auf Rekombination mit dem Targeting-Vektor dargestellt. Die 4 männlichen Nachkommen haben ein unverändertes X-Chromosom von ihrer Cre-exprimierenden Mutter, während die 4 weiblichen Nachkommen auch das veränderte X-Chromosom enthalten und somit heterozygot für die Mutationen sind. Nur bei einem der Weibchen wurde die Neomycin-Kassette deletiert, weshalb kein PCR Produkt entsteht. Bei den Sequenzierungen der anderen PCR Produkte zeigt sich die Heterogenität durch ein Doppelsignal der Sequenzierung (siehe Abb. 3.20 und Abb. 3.21 ). Die Tiere 1950-1954 sind weiblich, die Tiere 1955 und 1956 männlich.

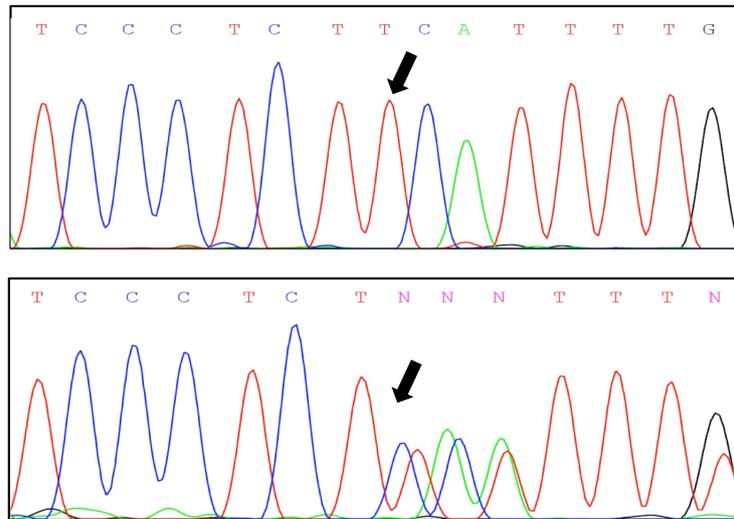
Es handelt sich bei den aufgelisteten Tiere um Tiere der 320er Linie (siehe Tab. 3.6).

Klon Nr.	PCR 34a+b	BamHI	PCR 14a+b	Xbal	Ver.	Sequ. 34 a	Sequ. 34 b	Sequ. 14 a	Sequ. 14 b	Xbal Stelle	del A	sub A-T	Scel
Cre-del 31	+	?	+	+	?	?	+	+	+	+/-	+	?	+
Cre-del 32	+	?	+	+	?	?	+	+	+	+/-	+	?	+
Cre-del 33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+
Cre-del 34	X	X	+	+	?	?	+	+	+	+/-	+	+	+
Cre-del 35	X	X	+	X	X	X	+	+	+	+/-	?	+	X
Cre-del 36	X	X	+	X	X	X	+	+	+	X	?	X	X
Cre-del 37	X	X	+	X	X	X	+	+	+	X	?	X	X
Cre-del 38	X	X	+	X	X	X	+	+	+	X	?	X	X

**Tabelle 3.5: Gesamtauswertung des Screening der Tiere der Zuchtlinie 160 nach der Verpaarung mit Cre-Rekombinase exprimierenden Tieren.** Das gelb markierte Tier 34 wurde für die weitere Zucht ausgewählt. ([+] positiv, [-] negativ, [+/-] heterozygot, [x] kein Ergebnis, [?] nicht auswertbar)



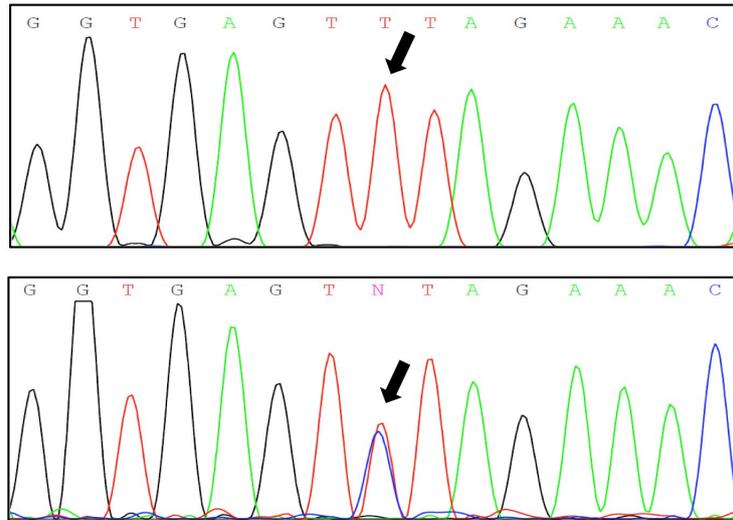
**Abbildung 3.19: Tests auf Cre-Rekombination:** PCR Ergebnis des Tests auf Cre-Rekombination und daraus folgende Deletion der Neomycin-Kassette aus dem Genom. Dazu wurde die PCR mit den Primern 34a+b durchgeführt, wobei bei erfolgter Entfernung der Neomycin-Kassette aus dem Genom kein PCR Produkt entsteht.



**Abbildung 3.20: Sequenzierungsergebnis für die pathologische Mutation A-del beim Wildtyp (oberes Bild) im Vergleich zum heterozygoten Tier (unteres Bild).** Da während der PCR durch das Vorhandensein zweier X-Chromosomen zwei verschiedene Produkte entstehen, kommt es durch den "frame-shift" im PCR Produkt des mutierten X-Chromosoms bei der Sequenzierung zu einem versetzten Doppelsignal.

Klon Nr.	PCR 34a+b	BamHI	PCR 14a+b	Xbal Ver.	Sequ. 34 a	Sequ. 34 b	Sequ. 14 a	Sequ. 14 b	Xbal Stelle	del A	sub A-T	Scel
Cre-del 1950	X	X	+	+	X	X	+	+	+/-	+	+	+
Cre-del 1951	X	X	+	+	X	X	+	+	+/-	+	+	+
Cre-del 1952	X	X	+	+	X	X	+	+	+/-	+	+	+
Cre-del 1953	X	X	+	+	X	X	+	+	X	?	+	+
Cre-del 1954	X	X	+	X	X	X	+	+	X	?	X	X
Cre-del 1955	X	X	+	X	X	X	+	+	X	?	X	X
Cre-del 1956	X	X	+	X	X	X	+	+	X	?	X	X

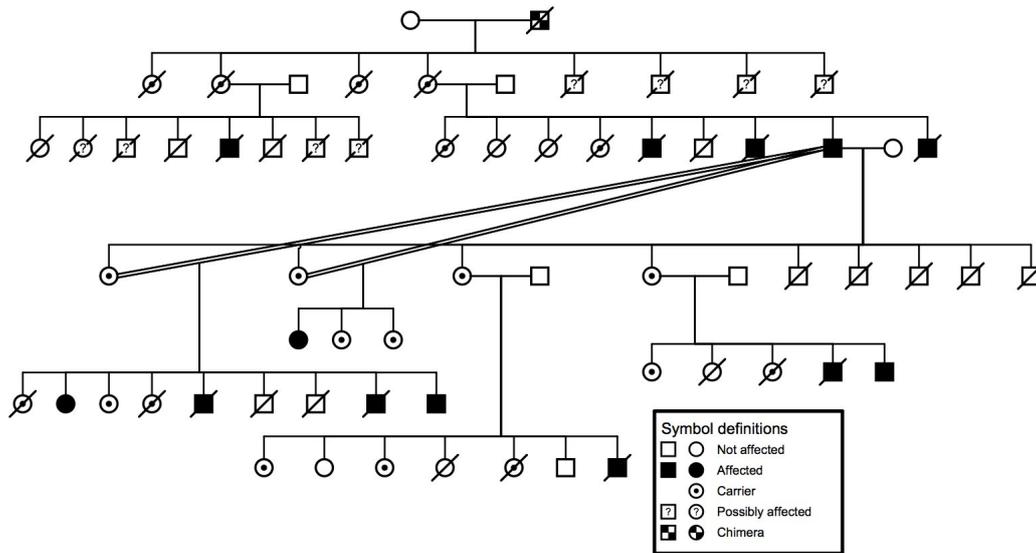
**Tabelle 3.6: Gesamtauswertung des Screening der Tiere der Linien 320 nach der Verpaarung mit Cre-Rekombinase exprimierenden Tieren.** Das gelb markierte Tier 1951 wurde für die weitere Zucht ausgewählt.  
 ([+] positiv, [-] negativ, [+/-] heterozygot, [x] kein Ergebnis, [?] nicht auswertbar)



**Abbildung 3.21: Vergleich der Sequenzierungshistogramme von wt (oberes Bild) und Mutation (unteres Bild) an der Stelle der neu eingeführten XbaI Restriktionsschnittstelle.** Da hier ein Basenaustausch stattgefunden hat und keine Deletion, betrifft das Doppelsignal nur die ausgetauschte Base.

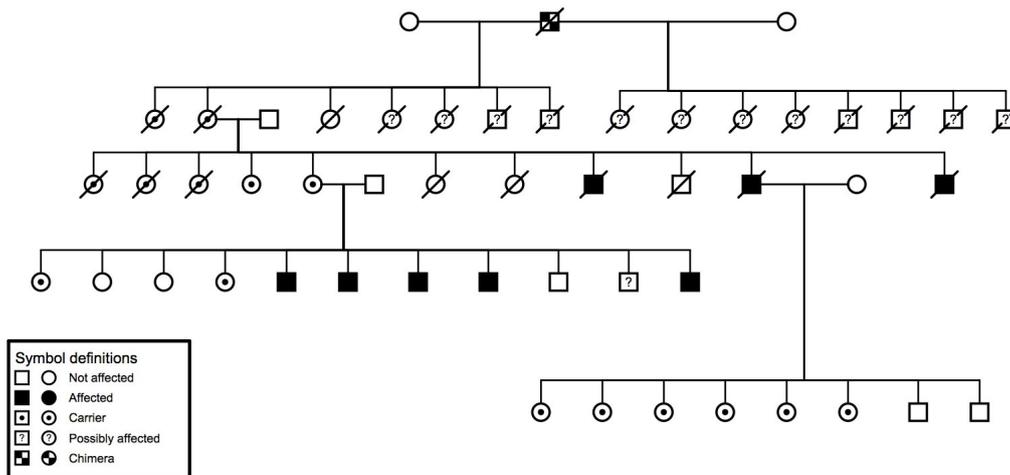
### 3.8 Zuchtschema

Für die weitere Züchtung der Mauslinien 160 und 320 werden Tiere ausgewählt, bei denen alle Mutationen eindeutig nachgewiesen wurden. Das erste Zuchttier für die nächste Generation ist ein Weibchen, bei dem sowohl die Mutationen heterozygot nachgewiesen wurden als auch die Expression der Cre-Recombinase bzw. die Abwesenheit der Neomycin-Kassette. Ein solches Weibchen aus jeder Linie wird mit einem nicht verwandten Wildtyp Männchen verpaart, wobei die erste Generation an Mäusen entsteht, aus der reinerbige betroffene Männchen hervor gehen können. Eines dieser betroffenen Männchen jeder Linie wird wiederum für die weitere Zucht ausgewählt und mit einem nicht verwandten Wildtyp Weibchen verpaart. Bei dieser Art der Verpaarung können in der nächsten Generation keine betroffenen Männchen auftreten, da die männlichen Tiere das X-Chromosom von der Wildtyp Mutter erben. Es können demzufolge ausschließlich heterozygote Weibchen auftreten und Männchen, die nicht von den Mutatio-



**Abbildung 3.22: Verpaarungsschema der Zuchtlinie 160 für die Generationen P bis F4:** Die im Stammbaum dargestellte Inzuchtverpaarung wurde durchgeführt, um die Zahl der betroffenen Tiere zu erhöhen.

nen betroffen sind. Um die Anzahl an Tieren für die initiale Charakterisierung zu vergrößern, wurden zusätzlich Inzuchtverpaarungen mit einem betroffenen Männchen und dessen heterozygoten Nachkommen durchgeführt. Abbildungen 3.22 und 3.23 zeigen die Verpaarungsschemata der Linien 160 und 320. Durch die Inzuchtverpaarungen entstehen auch homozygote Weibchen, bei denen beide X-Chromosomen die Mutationen tragen. Diese Tiere sind für die phänotypischen Untersuchungen interessant, für die Zucht sind sie jedoch nur eingeschränkt geeignet, da man bei einer Verpaarung mit Beteiligung dieser Tiere keine mutationsfreien Wurfgeschwister erhält. Will man mit diesen Tieren züchten, um die Geburt von Mutationsträgern zu garantieren, muss parallel durch weitere Verpaarungen die Erzeugung von nicht betroffenen Tieren sicher gestellt werden, da diese stets als gleichaltrige Kontrolltiere benötigt werden.



**Abbildung 3.23: Verpaarungsschema der Zuchtlinie 320:** Bei der Mauslinie 320 wurden in der Generation F2 parallel zwei Verpaarungen angesetzt. Zum einen wurde ein heterozygoten Weibchen mit einem nicht verwandten wildtyp Männchen verpaart, zum anderen aber auch ein betroffenes Männchen mit einem nicht verwandten wildtyp Weibchen.

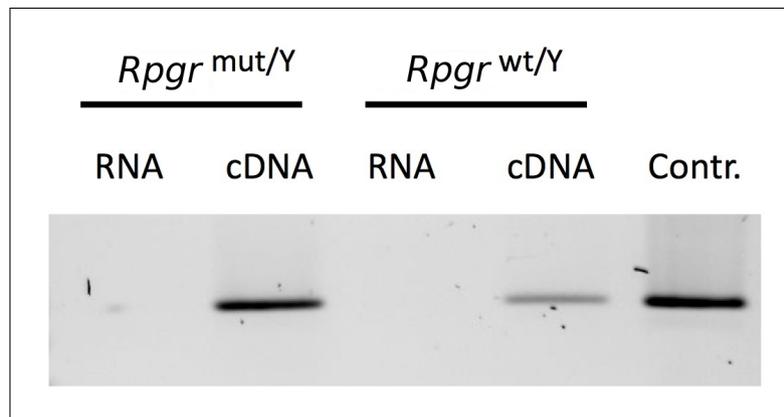
## 3.9 Initiale Phänotypisierung

### 3.9.1 Nachweis der Mutationen auf RNA Ebene

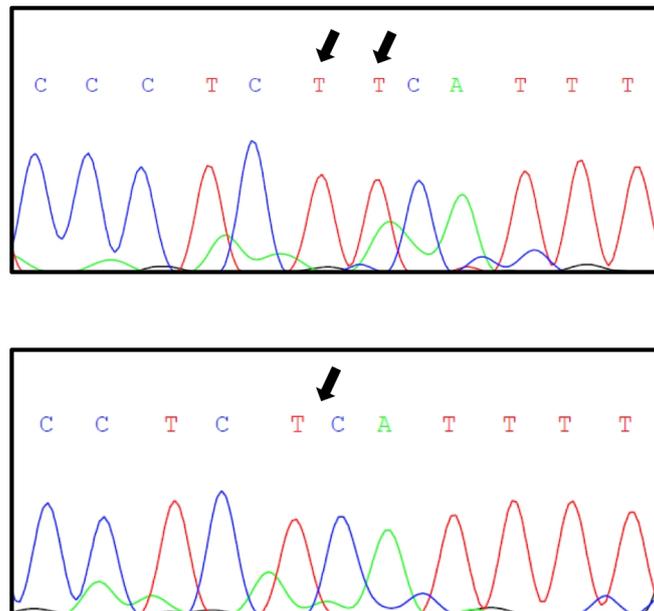
Um sicher zu stellen, dass die eingeführten Mutationen im Auge exprimiert werden, wird aus Mäuse-Retinae RNA aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.3.7). Diese wird über eine Reverse Transkription in cDNA umgewandelt (siehe Abschnitt 2.2.8) und die erhaltene cDNA anschließend in eine PCR eingesetzt. Um mögliche Kontaminationen der RNA-Extraktion mit genomischer DNA nachzuweisen, wird RNA in die PCR eingesetzt, die nicht in cDNA umgewandelt wurde. Da RNA nicht mittels PCR amplifiziert werden kann, ist von einer Kontamination auszugehen sobald ein Produkt nachgewiesen wird. Für den Nachweis der Expression mittels Sequenzierung des PCR Produktes aus der PCR mit cDNA ist es unumgänglich, eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, da sonst keine eindeutige Sequenzierung möglich ist.

In Abbildung 3.24 ist das Ergebnis einer solchen PCR exemplarisch darge-

stellt. In die PCR wurden jeweils RNA und daraus hergestellte cDNA von einem betroffenen Tier und einem *wt* Tier eingesetzt. Als PCR-Kontrolle wird der Targeting Vektor eingesetzt. Aus dem erhaltenen Ergebnis geht hervor, dass die isolierte RNA frei von Kontaminationen genomischer DNA ist. Durch die Sequenzierung des erhaltenen PCR Produkts kann die Expression des Transgens nachgewiesen werden. Das Ergebnis der Sequenzierung ist in Abbildung 3.25 dargestellt. Die Expression des Transgens im Auge konnte anhand dieser Ergebnisse nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.24: Nachweis der Expression der eingeführten Mutationen:** Zum Nachweis der Mutationen auf RNA-Ebene wird mit der RNA und der daraus hergestellten cDNA eine PCR durchgeführt und das PCR Produkt sequenziert. Das Einsetzen der RNA in die PCR dient dazu nachzuweisen, dass keine Verunreinigung mit genomischer DNA vorliegt und der Nachweis somit rein auf RNA-Ebene geführt wird.



**Abbildung 3.25:** Vergleich der Sequenzierungshistogramme von *wt* (oberes Bild) und Mutation (unteres Bild) an der Stelle der pathologischen Mutation. Sequenziert wurde ein PCR Produkt einer PCR mit cDNA um die Expression der Mutation auf RNA-Ebene nachzuweisen.

### 3.9.2 Histologische Untersuchung der Retinae

Zur histologischen Untersuchung der Retinae werden die Augen wie in Abschnitt 2.3 beschrieben präpariert. Dabei werden Tiere unterschiedlichen Alters untersucht, um den Verlauf der Degeneration zu dokumentieren. Untersucht werden Tiere im Alter von 6, 12 und 21 Wochen. In Abbildung 3.26 sind die Ergebnisse der histologischen Untersuchung an Paraffinschnitten gezeigt, die mittels HE Färbung gefärbt wurden. Anhand der angefertigten Paraffinschnitte lässt sich eine leichte Verdünnung der Retina bei den betroffenen Tieren im Vergleich zu den nicht mutierten Wurfgeschwistern feststellen. Die Abnahme der Gesamtdicke nimmt mit fortschreitendem Alter zu und ist auf eine Verdünnung aller retinalen Schichten zurückzuführen.

Bereits im Alter von 6 Wochen ist eine Desorganisation der Äußeren Segmente zu beobachten (siehe Abb. 3.26 A), die sich mit zunehmendem Alter

der Tiere verstärkt. Während bei den gesunden Tieren die Photorezeptoren in Reihen angeordnet sind, ist bei den erkrankten Tieren die Auflösung einer solchen Anordnung zu erkennen. Die Reihen der Photorezeptoren lassen keine klare Ordnung mehr erkennen, wobei sowohl Äußere als auch Innere Segmente verändert sind (siehe Abb. 3.26 B und C). Zudem finden sich delokalisierte Nuclei in der Schicht der Inneren Segmente. Beim Vergleich der untersuchten Tiere zeigt sich eine deutliche Zunahme der Anzahl dieser Nuclei mit zunehmendem Alter der Tiere.

Gleichzeitig ist eine Auflösung der *Membrana Limitans Externa* bei den erkrankten Tieren zu beobachten, die sich ebenfalls mit zunehmendem Alter verstärkt. Die Nuclei in der ONL, die zunächst noch in Reihen vergleichbar dem Wildtyp angeordnet sind, verlieren ihre Organisation in Verlauf der Erkrankung. Im Alter von 21 Wochen ist eine Aufhebung der gesamten Organisation der Photorezeptorzellen (erkennbar an OS, IS und ONL) deutlich sichtbar. Die Ganglienzellen weisen keine Veränderungen auf.

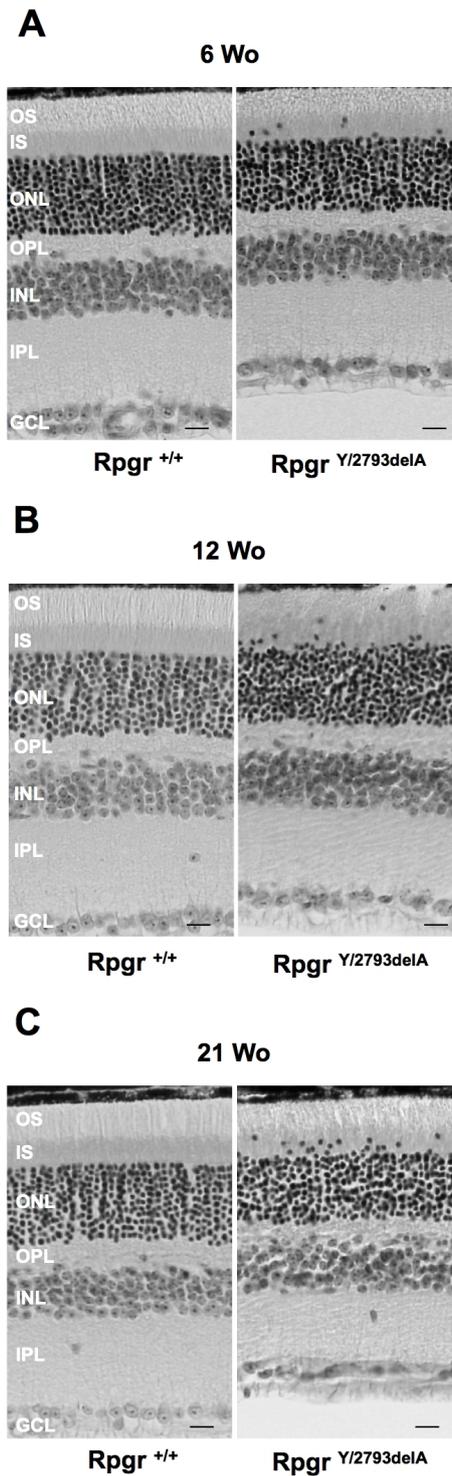
### 3.9.3 Semidünnschnitte der Retinae

Zur genaueren morphologischen Untersuchung der bereits bei den Parafinschnitten beobachteten Veränderungen der Außen- und Innen Segmente, sowie der ONL werden Semidünnschnitte der Retinae angefertigt. Dabei werden Wurfgeschwister im Alter von 12 Wochen untersucht.

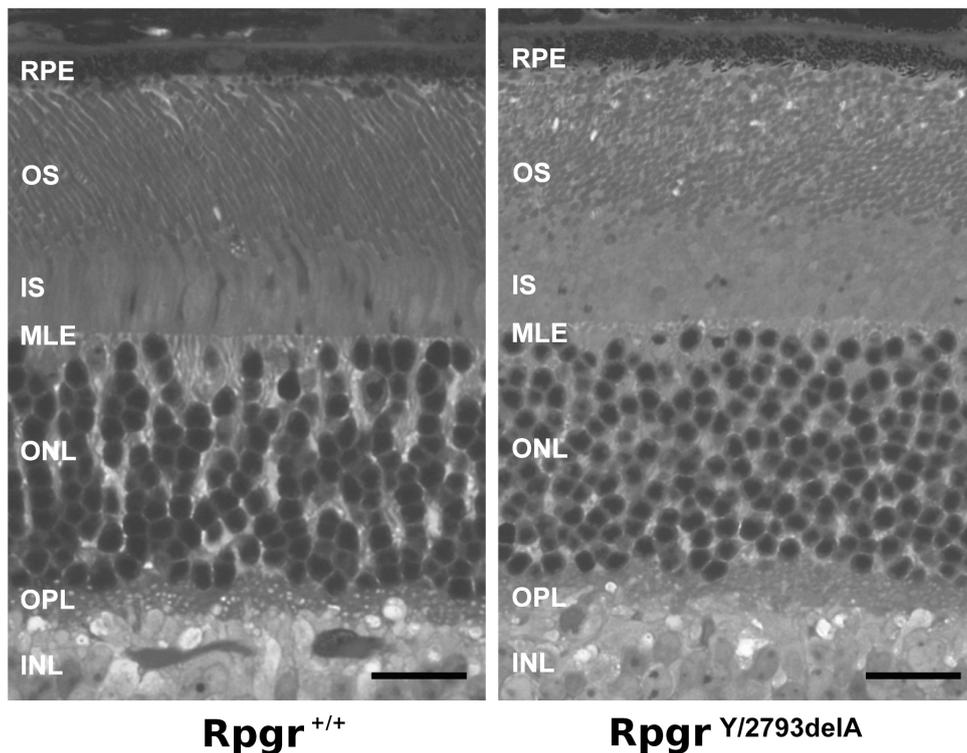
Zu beobachten sind eine vollständige Auflösung der strukturellen Ordnung der Photorezeptoren, die alle Zellkompartimente (OS, IS und ONL) betrifft und eine Verdickung der Schicht der Inneren Segmente (siehe Abb. 3.27).

### 3.9.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Retinae

Um die ultrastrukturellen Veränderungen der Retinae genauer beurteilen zu können, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Dazu wurden Retinae von Wurfgeschwistern im Alter von 12 Wochen untersucht. Verglichen wurde die Struktur der Innensegmente (IS) und der Außensegmente (OS) zwischen betroffenem Tier und *wt* Tier in verschiedenen



**Abbildung 3.26:** Mittels HE Färbung angefärbte Paraffinschnitte der Retinae von Mäusen unterschiedlichen Alters. Verglichen werden jeweils zwei Wurfgeschwister (wildtyp und erkrankt) im Alter von 6 (A), 12 (B) und 21 (C) Wochen. Bei den erkrankten Tieren sind ektopische Nuclei in der Schicht der Inneren Segmente lokalisiert.

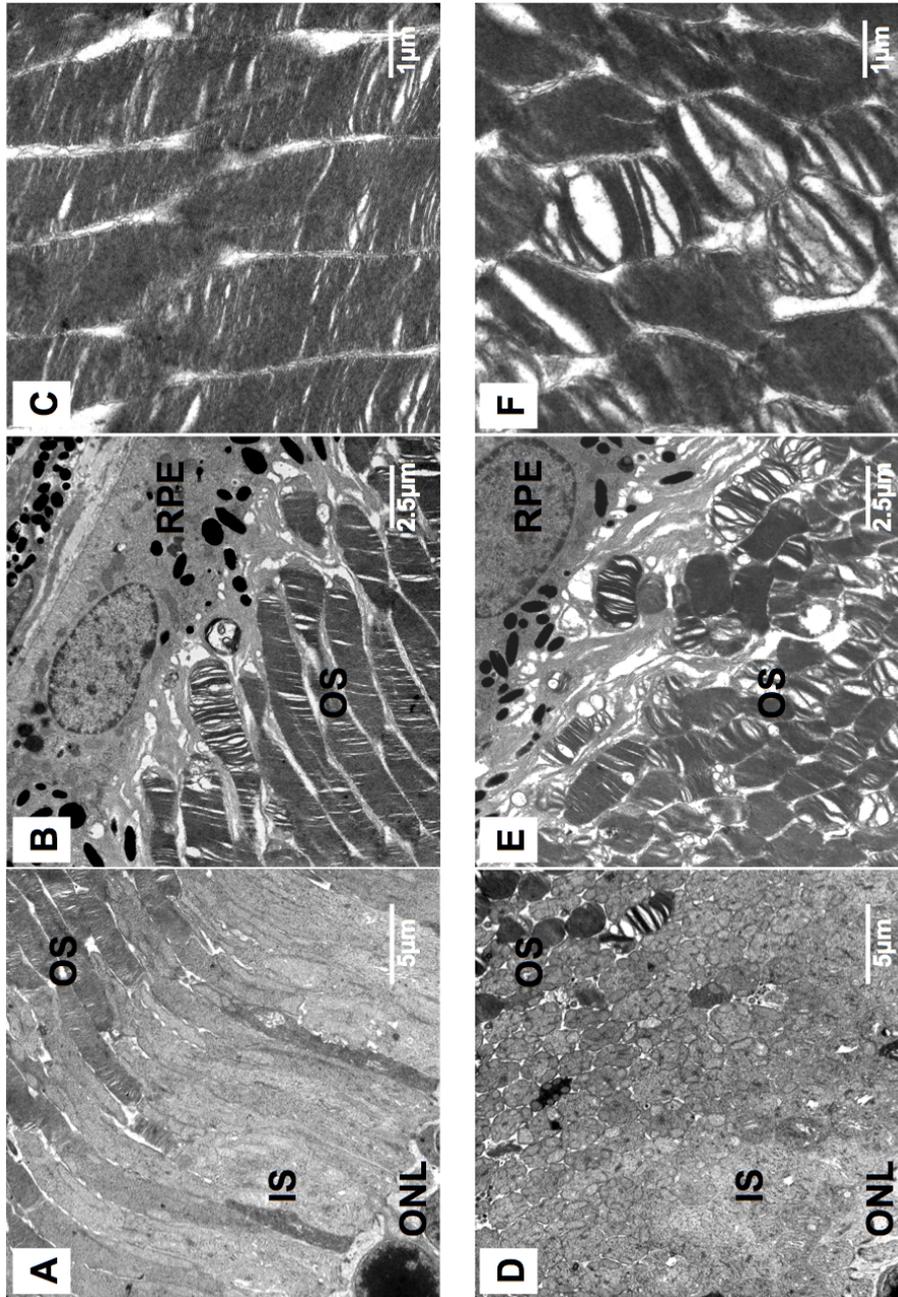


**Abbildung 3.27: Semidünnschnitte der Retinae:** Verglichen werden zwei Wurfgeschwister (links: *wt*, rechts: erkrankt) im Alter von 12 Wochen. Beim erkrankten Tier sind die Äußeren-, sowie die Inneren Segmente und die Nuclei der ONL desorganisiert und in ihrer Struktur deutlich verändert.

Vergrößerungen. Dabei zeigte sich, dass sowohl die IS als auch die OS der Photorezeptoren sehr starke morphologische Veränderungen aufweisen.

Die OS sind rundlich und in ihrem Aufbau unorganisiert. Auch bei den IS liegen anstelle der länglichen Zellkompartimente, wie sie beim *wt* zu finden sind beim mutierten Tier runde Strukturen vor. Die Schicht der Inneren Segmente ist deutlich verdickt, wobei keine einzelnen Zellen zu unterscheiden sind.

Auch bei den Disks der OS ist keine geordnete Schichtung vorhanden. Die Disks liegen in lockeren von großen Lücken durchzogenen Verbänden nebeneinander, wobei sich an Stelle länglicher Kolumnen blasenförmige Abschnitte ergeben. Die Zone der Mikrovilli, die vom RPE ausgehen und die OS der Photorezeptoren umgeben, ist ebenfalls deutlich vergrößert.



**Abbildung 3.28: Elektronenmikroskopische Aufnahme der Photorezeptoren von Wildtyp (oben) und betroffenem Tier (unten).** Die Bilder A und D (x 3333) zeigen die Innensegmente der Photorezeptoren im Längsschnitt. Die Bilder B und E (x 3333) zeigen die Außensegmente im Längsschnitt, die Bilder C und F (x 12000) zeigen die Außensegmente in höherer Vergrößerung.

# 4

## Diskussion

Bei der XLRP handelt es sich um eine fortschreitende Erblindungserkrankung, bei der die Patienten früh erkranken und oft schon in der zweiten Dekade ihres Lebens einen weitgehenden Verlust ihrer Sehfähigkeit erleiden. Bislang existieren noch keine Therapiemöglichkeiten für Patienten, die an XLRP aufgrund einer Mutation im *RPGR* Gen erkrankt sind. Die jüngsten Erfolge bei der gentherapeutischen Behandlung von Patienten mit anderen degenerativen Erblindungserkrankungen (RPE65) geben jedoch Anlass zu der Hoffnung auf Heilung auch bei RPGR bezogenen retinalen Degenerationen [83]. Nach heutigem Ermessen zeichnet sich ab, dass die Gentherapie in Zukunft vermehrt zur Behandlung erblicher Erkrankungen eingesetzt werden wird, wobei gerade die Behandlung retinaler Erkrankungen großes Potential hat. Für die effiziente Entwicklung solcher Behandlungsverfahren stellt jedoch die Verfügbarkeit von Tiermodellen, die eng an der humanen Pathologie orientiert sind, eine Grundvoraussetzung dar, um die Zusammenhänge vor und nach einer Therapie möglichst realistisch beurteilen zu können. Ziel dieser Arbeit war die Herstellung einer transgenen Mauslinie, die aufgrund einer Punktmutation im *RPGR* Gen eine retinale Degeneration ausprägt, wie sie bei Menschen mit X-chromosomaler Retinitis Pigmentosa auftritt. Hierbei beinhaltet die Durchführung alle Schritte von der Klonierung des Targetingvektors bis zur initialen phänotypischen Charakterisierung der Mäuse.

## 4.1 Strategie zur Herstellung der transgenen Maus

---

Bei der Entwicklung einer Strategie zur Vektorklonierung ist es von entscheidender Bedeutung, in welcher Weise das Genom des Tieres verändert werden soll. In dieser Arbeit sollten gezielt einzelne Basenpaare im Genom der Maus verändert werden, was eine hohe Präzision bei allen Verfahrensschritten voraussetzt. Das Verfahren der homologen Rekombination ist in diesem Fall die Technik der Wahl zur Einbringung des Transgens, anders als beispielsweise bei einer Überexpression, bei der das Transgen an einer beliebigen Stelle im Genom integriert werden kann.

Auch bei einer *knock-out* Mutation oder der Deletion eines gesamten Exons können einzelne Basenpaarverluste oder Ungenauigkeiten bei der Veränderung der Gensequenz vernachlässigt werden. Anders als bei anderen transgenen Mausmodellen ist bei der Herstellung dieser Mauslinie auch die exakte Sequenzierung des Targetingvektors unumgänglich, um einen möglichen unbeabsichtigten Verlust einzelner Basenpaare während der Klonierung oder andere aufgetretene Fehler in der Sequenz zu erkennen und gegebenenfalls zu korrigieren. Ebenso sind im Rahmen der Genotypisierung der ES Zellen und später auch der Mäuse umfassende Untersuchungen mittels PCR, Restriktionsverdau und Sequenzierung erforderlich, um Kolonien bzw. Zuchttiere mit zweifelsfrei nachgewiesenen Mutationen auszuwählen. Die Genotypisierung der ES Zellen lässt ein eindeutiges Ergebnis zu, da die Zelllinie aus einem männlichen Tier hervorgegangen ist und somit nur ein X-Chromosom enthält. Im Gegensatz dazu gestaltet sich die Genotypisierung der chimären Tiere schwieriger, da die chimären Tiere sowohl einen Teil der Blastozyste als auch der ES Zellen enthalten und somit eine eindeutige Genotypisierung nur schwer möglich ist. Hierbei ist zu beachten, dass die getestete DNA aus den Schwanzspitzenbiopsien gewonnen wurde, die nur einen Teil des Tieres repräsentieren. Wie in Abschnitt 3.6 beschrieben, kann es auch zu falsch positiven Ergebnissen bei der Genotypisierung kommen. Die chimären Tiere werden mit Cre-Rekombinase exprimierenden Tieren verpaart, um schon in der nächsten Generation die nun nicht

mehr benötigte Neomycin-Kassette zu entfernen (siehe Abschnitt 3.7). Dies ist notwendig, da die Neomycin-Kassette im Genom einen die Expression modifizierenden Effekt haben könnte. Bei den Tieren der darauf folgenden Generation wird sowohl auf die Expression der Cre-Rekombinase getestet, als auch auf die Abwesenheit der Neomycin-Kassette.

Es wird mit einem Tier weiter gezüchtet, das keine Neomycin-Kassette mehr enthält, selbst aber keine Cre-Rekombinase exprimiert. Im Genom dieser Maus ist nach erfolgter Cre-Rekombination nur noch die Sequenz einer der beiden loxP Stellen enthalten, die sich hinter dem Stop-Codon befindet. Die loxP Stelle mit einer Größe von 34 Basenpaaren könnte möglicherweise auch einen Effekt haben, was jedoch nach dem heutigen Wissensstand nicht belegt ist. Ebenso muss mittels einer umfassenden Sequenzierung der Tiere dieser Generation Aufschluss über eine erfolgreiche Keimbahntransmission des Transgens gegeben werden. Erst durch den Nachweis der Keimbahntransmission ist die Voraussetzung für die Etablierung der Mauslinie gegeben.

## 4.2 Phänotypischer Vergleich

---

Die Pathologie des in dieser Arbeit generierten Mausmodells wurde initial charakterisiert. Die morphologischen Veränderungen der retinalen Strukturen, wie sie anhand der Paraffinschnitte und EM Aufnahmen deutlich werden, sind dabei hervorzuheben.

Auf den mittels HE Färbung angefärbten Paraffinschnitten sind deutlich delokalisierte Nuclei in der Schicht der Inneren Segmente zu beobachten (siehe Abb. 3.26). Um welchen Zelltyp es sich bei diesen Nuclei handelt, ist noch nicht abschließend zu beurteilen. Deutlich zu erkennen ist jedoch, dass die *Membrana Limitans Externa* (MLE) dort, wo delokalisierte Nuclei auftreten, deutlich gestört, teilweise sogar nicht mehr vorhanden ist. Diese Beobachtung könnte den Rückschluss nahelegen, dass Zellkerne aus der ONL in das IS eingewandert sind und dabei die Integrität der MLE zerstört haben. Bei einem kürzlich publizierten Modell für eine progressive Retinopathie beim

Hund wurden ebenfalls Nuclei in der Schicht der Inneren Segmente gefunden, bei denen es sich um die Kerne von Zapfen handelt [36]. Ob dies auch für das hier vorgestellte Mausmodell zutrifft, muss noch untersucht werden.

Die äußeren retinalen Schichten (OS, IS, ONL) zeigen eine deutliche Desorganisation in ihrer Struktur, was besonders anhand der Semidünnschnitte zu erkennen ist, während die GCL keine deutlichen Veränderungen aufweist (siehe Abb. 3.27). Die OS sind im Gegensatz zum *wt* nicht in Reihen nebeneinander angeordnet, sondern erscheinen als zerrüttete Strukturen, die eine Zuordnung einzelner Zellen nicht zulassen. Die Schicht der Inneren Segmente ist deutlich verdickt, wobei die Inneren Segmente selbst nicht mehr als einzelne Strukturen oder Zellen zu erkennen sind. Eine ähnliche Morphologie wurde auch bei rd12 Mäusen gefunden, die eine non-sense Mutation im RPE65 Gen aufweisen und ein Modell für Lebersche Kongenitale Amaurose darstellen [60]. Vergleichbar zu den Befunden von Pang et al. ist auch die Anordnung der Photorezeptoren in dem hier vorgestellten Modell. Die Zellkörper sind nicht wie beim *wt* stiftförmig und in Reihen angeordnet, sondern stellen sich als rundliche Partikel ohne jede Struktur und Anordnung dar. Auch bei einem von Ali et al. beschriebenen Modell (*Prph2<sup>-/-</sup>*) sind anhand der EM Bilder Veränderungen an den Inneren Segmenten zu erkennen, die denen in dem hier vorgestellten Modell ähneln [5]. Auch bei der Untersuchung der Äußeren Segmente treten Ähnlichkeiten auf. Die Disks bilden von Ali et al. als Windungen bezeichnete Strukturen [5], wie sie auch in diesem Modell zu beobachten sind. Ähnliche Anordnungen der Disks wie sie auf den in dieser Arbeit gezeigten EM Bildern zu erkennen sind, wurden auch von Redmond et al. (*RPE65<sup>-/-</sup>*), Huber et al. (*RPE65<sup>-/-</sup>*) und Liu et al. (*R3/+*) gefunden [66] [35] [43]. Diese Gruppen beschreiben die auch hier beobachteten Lücken zwischen den OS und die lockere und unorganisierte Packung der Disks in den OS. Ähnlich wie bei dem von Zhao et al. beschriebenen knock-out Modell für *Rpgrip* (*RPGRIP<sup>-/-</sup>*) neigen sich die Disks in verschiedene Richtungen [99].

Die hier gezeigten EM Aufnahmen zeigen außerdem, dass die vesikulierten

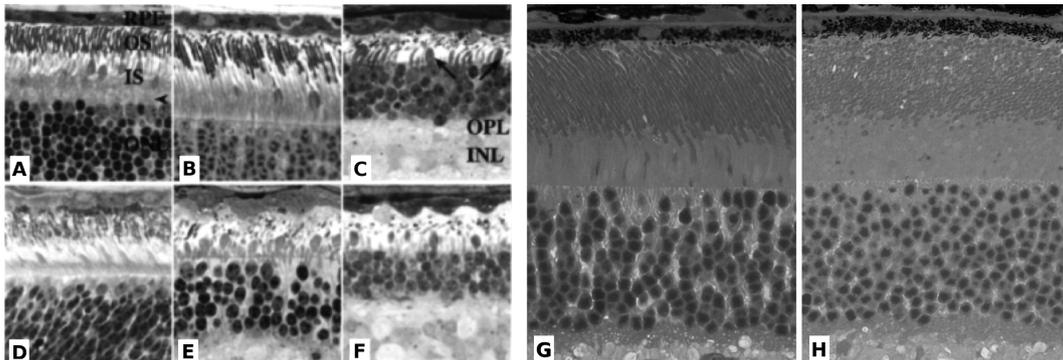
und desorganisierten OS von ausgedehnten Mikrovillistrukturen des RPE umgeben sind. Ein solches Geschehen wurde bereits 1978 von Szamier et al. beschrieben [86]. Die Gruppe fertigte EM Aufnahmen eines 24 Jahre alten, männlichen Patienten mit X-chromosomaler Retinitis Pigmentosa an. Ob allerdings bei diesem Patienten die Erkrankung durch eine Mutation im *RPGR* Gen ausgelöst wurde, ist nicht belegt, da keine genetischen Untersuchungen vorliegen.

Die Kerne der Photorezeptoren sind ebenfalls verändert und in ihrer Anordnung gestört. Während beim *wt* die Kerne in der ONL in Kolumnen angeordnet sind, liegen sie beim erkrankten Tier unorganisiert und pyknotisch vor. Ähnliches wurde auch von Farber et al. bei einer heterozygoten *rd/+* Maus beschrieben [23]. Pyknotische Nuclei und die Auflösung der MLE wurden auch von Remé et al. beschrieben, die Apoptose durch Lichtexposition in der Retina ausgelöst haben [67].

Bei den bereits erwähnten Hundemodellen mit *RPGR* Mutationen sind die Auslöser der pathologischen Veränderungen mit denen bei dem hier beschriebenen Mausmodell vergleichbar [98]. Bei der *XLPR1* sind ebenfalls Auffälligkeiten bei den Äußeren Segmenten der Photorezeptoren zu beobachten und eine fortschreitende Desorganisation der retinalen Strukturen [97]. Es handelt sich bei der *XLPR1*, die durch die Deletion von 5bp im *RPGR* Gen verursacht wird, um eine vergleichsweise langsame Degeneration mit zunächst normaler retinaler Entwicklung. Hierbei sind Ähnlichkeiten zwischen dem Hundemodell für *XLPR1* und dem hier vorgestellten Mausmodell zu beobachten. Bei der *XLPR2*, die ebenfalls durch eine Deletion im *RPGR* Gen ausgelöst wird, verläuft die Krankheit und die damit einhergehende Degeneration sehr viel schneller [98]. Bereits die Photorezeptorentwicklung ist gestört, was bei dem hier vorgestellten Mausmodell nicht der Fall zu sein scheint.

In Abbildung 4.1 werden histologische Schnitte der Retina von Hunden mit *XLPR1* bzw. *XLPR2* mit Retinaschnitten von Mäusen (*wt* und *del2793A*) verglichen. Sowohl bei den von *XLPR1* betroffenen Hunden, als auch bei den *del2793A* Mäusen kommt es im Verlauf der Pathologie zu morpholo-

gischen Veränderungen der OS, einer Verdickung der IS und pyknotischen Nuclei. Bei den von XLPRA2 betroffenen Hunden verläuft die Degeneration sehr viel schneller und bereits die retinale Entwicklung ist stark gestört, was bei dem hier vorgestellten Mausmodell nicht der Fall ist. Das neu erzeugte Mausmodell ähnelt in den bislang beschriebenen Eigenschaften also mehr dem Modell für XLPRA1.



**Abbildung 4.1: Vergleich der histologischen Schnitte von XLPRA1 (A-C) und XLPRA2 (D-F) mit den histologischen Schnitten des neuen Mausmodells (G,H).** **A:** XLPRA1 (9,4 Monate); **B:** XLPRA1 (13 Monate); **C:** XLPRA1 (15 Monate) **D:** XLPRA2 (1 Monat); **E:** XLPRA2 (4 Monate); **F:** XLPRA2 (7 Monate); **G:** wt Maus (3 Monate); **H:** del2793A Maus (3 Monate). Abbildung verändert nach [98].

Bislang beschränken sich die einzigen histologischen Untersuchungen von Mutationsträgern beim Menschen auf zwei Konduktorinnen [4] [2]. Bei einer solchen Konduktorin wurde die Deletion eines Nucleotids an Position 632 im ORF15 festgestellt. Diese Deletion führte zu einem *frame-shift*, der eine Verkürzung des RPGR Proteins zur Folge hatte. Das translatierte Protein war im Vergleich zum Wildtyp um 335 Aminosäuren verkürzt. Zu beobachten waren lokale Degenerationen von Stäbchen und Zapfen, außerdem ein ausgeprägter wenn auch nicht vollständiger Verlust von Stäbchen im parafovealen Bereich [4].

Die zweite Konduktorin zeigte eine Mutation in Exon 11 des *RPGR* Gens an der Position 436, wodurch Asparagin anstelle von Glycin kodiert wird.

Histologische Untersuchungen mittels Fluoreszenz-Färbung haben delokalisierte rot/grün Opsine und blaue Zapfenopsine in einigen Zapfen gezeigt. Diese wurden im IS, in der ONL und in den Synapsen der Zellen der äußeren plexiformen Schicht gefunden. Zudem war auch Rhodopsin in einigen Stäbchen delokalisiert [2]. Ob die pathologischen Veränderungen vergleichbar sind, kann erst abschließend beurteilt werden, wenn weitere Untersuchungsergebnisse des hier vorgestellten Mausmodells vorliegen.

Das in dieser Arbeit hergestellte Mausmodell ist nicht das erste Mausmodell, das eine Veränderung im *Rpgr* Gen enthält. Bis heute ist schon eine Reihe von Modellen beschrieben worden, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

Modell	Genetische Modifikation	Klinischer Phänotyp	Referenz
Rpgr-knockout	Deletion Exon 4-6	Opsindelokalisation, reduzierte Stäbchensensitivität	Hong 2000
Verkürzte mRNA von ORF15	<i>In-frame</i> Deletion im ORF15	Photorezeptordegeneration	Hong 2004
Rescue-Modell	Verkürzte ORF15 Sequenz	Funtionserhalt des Rpgr	Hong 2005
Überexpression	Überexpression von Rpgr	Infertilität	Brunner 2008
Splice-site Mutation	<i>In-frame</i> Deletion von Exon 4	Opsindelokalisation, verringerte ERG Amplitude	Brunner 2010
Knock-out <i>Rpgr</i> <sup>1-19</sup>	Expression von <i>Rpgr</i> <sup>ORF15</sup>	Keine Degeneration	Wright 2011
Knock-out <i>Rpgr</i> <sup>ORF15</sup>	Expression von <i>Rpgr</i> <sup>1-19</sup>	Schnelle Degeneration der Photorezeptoren	Wright 2011
Punktmutation im <i>Rpgr</i> <sup>ORF15</sup>	sub2650T, del2793A, sub3071C, I-SceI	Pathologie in OS, IS und ONL	Schlegel (diese Arbeit)

**Tabelle 4.1: Mausmodelle mit *Rpgr* Mutationen.**

Bei dem im Jahr 2000 von Hong erzeugten Mausmodell besteht die genetische Veränderung in einer Deletion von 3 Exonen. Bei diesen handelt es sich um die Exone 4, 5 und 6, die allen *Rpgr* Splicevarianten gemeinsam sind. Durch die Deletion dieser Exone kommt es zu einer Verkürzung der für das Rpgr Protein kodierenden Sequenz. Diese beinhaltet lediglich die Sequenz für die Exone 1-3, wodurch kein funktionales Protein gebildet wer-

den kann, da es zu einem *non-sense mediated decay* kommt. Bei diesem Mausmodell handelt es sich also um eine vollständige *knock-out* Mutation, da weder die retina-spezifische ORF15 Variante des Proteins, noch die Splicevariante  $Rpgr^{ex1-19}$  exprimiert wird. Von dieser genetischen Veränderung sind somit alle Zilien-enthaltenden Zellen betroffen, wodurch die Funktionsfähigkeit einer Vielzahl von Organen verändert sein kann. Hong et al. beschreiben jedoch nur die retinalen Veränderungen der Tiere und erwähnen lediglich deren uneingeschränkte Fertilität und normale Entwicklung [32]. In Abwesenheit des  $Rpgr$  Proteins kam es bei dieser Mauslinie zu delokalisierten Opsinen und einer reduzierten Stäbchensensitivität. Allerdings wurden große Deletionen genomischer  $Rpgr$  Fragmente beim Menschen in dieser Form nicht beobachtet. Durch die Untersuchung des Modells wurde jedoch die Lokalisation von  $Rpgr$  und seine Interaktion mit  $Rpgr1$  im CC nachgewiesen [32]. Bei dem del2793A Mausmodell steht eine Untersuchung der Opsinlokalisierung und Interaktion im CC bislang noch aus.

Auf der Basis des *knock-out* Modells wurde von derselben Gruppe im Jahr 2004 ein weiteres Modell für eine  $Rpgr$  Mutation hergestellt. Hierbei wurde durch Pronukleus- Injektion eine verkürzte Variante der ORF15 Sequenz in Tiere des *knock-out* Stamms eingeführt. Dabei handelt es sich um eine *in-frame* Deletion in der repetitiven purin-reichen Region von  $Rpgr^{ORF15}$ , was zu einer verkürzten mRNA aufgrund eines vorzeitigen Stop-Codons führt [29]. Die Untersuchung des Modells zeigte, dass eine solche Verkürzung der repetitiven Sequenz zu einer schnelleren Degeneration der Photorezeptoren führt, verglichen mit der Null-Mutation. Die Hälfte der Photorezeptoren war bei den Tieren mit verkürzter  $Rpgr$  Sequenz bereits nach 40 Tagen abgestorben, wohingegen ein vergleichbarer Zellverlust bei den *knock-out* Mäusen erst im Alter von 2 Jahren zu beobachten war [29]. Bei der hervorgerufenen Mutation handelt es sich also um eine so genannte *toxic gain-of-function* Veränderung, die zu einem schwereren Krankheitsverlauf als eine Null-Mutation führt. Eine mögliche Cytotoxizität des veränderten Proteins und der daraus resultierende Untergang der Photorezeptoren werden aufgrund der an dem Modell gemachten Beobachtungen vermutet.

Solche Veränderungen werden auch bei Patienten mit XLRP für die phänotypischen Auswirkungen der Mutationen verantwortlich gemacht und gelten als Auslöser der Erkrankung. Allerdings wurde bei diesem Modell ein Teil der Sequenz *in-frame* entfernt [29]. Die Veränderung besteht also in einer Verkürzung der Aminosäurekette und nicht in einer Veränderung der Aminosäureabfolge. Solche Mutationen sind beim Menschen bislang noch nicht beobachtet worden [76]. Vielmehr führen Deletionen im ORF15 zu *frame-shift* Mutationen, deren Folge ein vorzeitiger Kettenabbruch oder eine Veränderung der nachfolgenden Aminosäuresequenz ist [88], [76], wodurch sich die Proteineigenschaften grundlegend ändern. Das beschriebene Mausmodell hat also zu der noch heute gültigen Theorie des *toxic gain-of-function* geführt, stellt aber kein realistisches Modellsystem für die Charakterisierung der pathologischen Mechanismen dar. Hong und Kollegen stellten aufgrund ihrer Ergebnisse auch die Theorie der alternativen Rpgr-Splicevarianten auf, die sich im C-terminalen Teil, nicht jedoch im N-terminalen Teil unterscheiden, und vermuten die Beteiligung von Rpgr<sup>ORF15</sup> am IFT im CC [29]. Bei dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellten Mausmodell verläuft die Degeneration der Photorezeptoren sehr viel langsamer. Auffälliger als die Abnahme der Zellen ist ihre morphologische Veränderung. Daher scheint eine starke toxische Funktionszunahme nicht vorzuliegen.

Ausgehend von dem bestehenden *knock-out* Stamm wurde im Jahr 2005 noch ein weiteres Modell von Hong und Kollegen erzeugt, mit dem getestet wurde, ob ein *rescue* der Proteinfunktion durch die Einführung einer verkürzten ORF15 Sequenz möglich ist [31]. Die Sequenzverkürzung bestand aus einer *in-frame* Deletion von 654bp in der repetitiven Sequenz des ORF15. Bei dem Mausmodell wurde das Transgen nicht über Pronukleus-Injektion in die Mäuse eingebracht, sondern mittels Targetingvektor in ES Zellen transfiziert. Bei diesem Verfahren erhält man Mäuse mit einer definierten, der natürlichen Kopienzahl des Transgens. Die resultierenden Expressionsniveaus können also nicht auf unterschiedliche Kopienzahlen zurückgeführt werden. Die Untersuchungen des Modells zeigten, dass ein Erhalt der Photore-

zeptorzellen und deren Funktion auch durch ein Rpgr Protein mit verkürzter Aminosäurekette möglich ist. Das Expressionslevel der verkürzten Rpgr Variante betrug zwar nur etwa 20% der normalen Expression im Wildtyp, reichte aber dennoch aus, um den Untergang der Photorezeptoren erheblich zu verlangsamen. Während bei der *knock-out* Maus nach 14 Monaten mehr als die Hälfte der Photorezeptoren abgestorben waren, war der Photorezeptorverlust bei den transgenen Tieren kaum nachweisbar [31]. Es wurde also gezeigt, dass auch eine Rpgr Variante mit verkürzter Sequenz zum Funktionserhalt beitragen kann. Getestet werden sollte dies, um zu ermitteln, ob eine *gene addition* Therapie mittels AAV vermitteltem Gentransfer möglich ist. Da die Aufnahmekapazität von AAV jedoch auf 4,5kb beschränkt ist, ist es nicht möglich, eine vollständige ORF15 Sequenz mithilfe dieses Vektors ins Auge einzubringen, da diese die Größe von 4,5kb überschreitet [54]. Die Autoren weisen darauf hin, dass eine solches AAV vermitteltes *gene addition* eine Therapieoption für Patienten mit RPGR Null-Mutationen darstellen könnte [31].

Die meisten Patienten mit XLRP exprimieren jedoch veränderte RPGR Varianten, die nach dem heutigen Verständnis die Zelle schädigen und würden daher von einem reinen *gene addition* nicht profitieren. Abgesehen von den Modellen, die von Hong und Kollegen erzeugt wurden, gibt es noch weitere Mausmodelle, die Veränderungen in der Rpgr Sequenz enthalten. Von Brunner und Kollegen wurde ein Modell generiert, bei dem das wildtyp Rpgr Gen in einem wildtyp Rpgr Hintergrund überexprimiert wurde. Durch pronukleäre Injektion wurden variierende Kopienzahlen der Rpgr Sequenz eingeführt [13]. Folge der Überexpression war eine gestörte Spermatogenese, die zu erheblichen Fertilitätsstörungen führte. Es zeigte sich, dass die Schwere der Beeinträchtigung mit der vorhandenen Rpgr Kopienzahl korreliert werden konnte [13]. Trotz der starken Konservierung der Rpgr Gensequenzen bei Mensch und Maus [39], [38] werden im Unterschied zum Menschen bei der Maus die Exone 14 und 15 zusammengefasst. Während das menschliche Exon ORF15 ausschließlich in der Retina exprimiert wird, kommt das analoge Exon ORF14/15 der Maus auch in anderen Spliceva-

rianten vor und wird in geringem Maße beispielsweise im Hoden exprimiert [39]. Von der Überexpression sind also auch andere Organe betroffen. Darin besteht ein entscheidender Unterschied zum Menschen. Eine Überexpression und das Vorhandensein vielfacher Kopienzahlen ist eine Situation, wie sie beim Menschen nicht auftritt. Die Auswirkungen dieser genetischen Veränderung am Auge konnten mit dem Modell nicht studiert werden, da aufgrund der eingeschränkten Fertilität der Aufbau einer stabilen Kolonie nicht möglich war [13].

Dieselbe Gruppe entwickelte ein weiteres Modell, bei dem durch Einführung einer *splice-site* Mutation eine *in-frame* Deletion von Exon 4 hervorgerufen wurde [14]. Die Mutation wurde in zwei verschiedene Mauslinien eingeführt und zwar in pigmentierte BL/6J Mäuse und unpigmentierte (albinos) BALB/c Mäuse. Es tritt dadurch keine Veränderung des Leserasters auf, aber eine Verkürzung der RLD um 21 Aminosäuren [39]. Beobachtet wurden milde aber unterschiedlich ausgeprägte Phänotypen, die mit Mislokalisationen sowohl von Rhodopsin als auch von Zapfenopsin einhergingen. Bei den BL/6J Mäusen waren die Stäbchen stärker betroffen, während es bei den BALB/c Mäusen zu einer frühen Zapfen-Stäbchen Degeneration kam.

Der Grund für diesen Unterschied ist vermutlich in der genetischen Abweichung des Stammhintergrundes zu suchen, bleibt aber weiterhin Gegenstand der Diskussion. In Betracht kommen sowohl unterschiedliche genetische Modifizierer, die auf das physiologische Gleichgewicht von Stäbchen und Zapfen wirken, als auch mögliche Polymorphismen in einem Zapfenspezifischen Gen. Aber auch das Fehlen von protektivem Pigment in den BALB/c Mäusen könnte eine Rolle spielen, was allerdings eher unwahrscheinlich erscheint, da nur das Zapfensystem betroffen ist. Das Rpgr del2793A Modell wurde in einen BL/6J Hintergrund gekreuzt, um retinale Degenerationen die im Stammhintergrund enthalten sind (wie beispielsweise die rd1 Mutation, die durch die Insertion einer viralen Sequenz hervorgerufen wird) zu umgehen.

Bei den Mausmodellen von Brunner et al. wurden eine Fehllokalisation von

Rhodopsin und Zapfenopsin, gefolgt von einer Verringerung der ERG Amplitude beobachtet, was die Hypothese unterstützt, dass Mutationen im Rpgr zu einer Veränderung des IFT Komplex führen [14]. Da Rpgr<sup>ex1-19</sup> verschiedentlich im Organismus exprimiert wird, ist es wahrscheinlich, dass die Veränderung des Expressionslevels zu systemischen Beeinträchtigungen führt, wie etwa Lungenschäden [100] oder Unfruchtbarkeit [13]. Wenn man also die ersten Exons zum Ziel nimmt, die nur bei etwa 20% der Patienten mutiert sind, dann imitiert das entstandene Mausmodell die genetische Situation eines kleinen Teils der Patienten während bei der breiten Mehrheit die Mutationen im ORF15 Exon zu finden sind. Die aufgezählten Untersuchungen der Opsinlokalisierung und ERG Amplitude wurden bislang noch nicht an dem Rpgr2793A Mausmodell durchgeführt.

Neue Untersuchungen weisen darauf hin, dass vor allem das Expressionsverhältnis von Rpgr<sup>ex1-19</sup> und Rpgr<sup>ORF15</sup> von entscheidender Wichtigkeit für die Photorezeptorentwicklung ist [94]. Es konnte anhand zweier neuer Mausmodelle gezeigt werden, dass die Expressionsniveaus der beiden Splicevarianten im Photorezeptor während der retinalen Entwicklung stark reguliert sind. Dazu wurden Mäuse erzeugt, die entweder ausschließlich die Rpgr<sup>ex1-19</sup> Variante, oder ausschließlich die Rpgr<sup>ORF15</sup> Variante exprimieren [94]. Während die Expression der Rpgr<sup>ex1-19</sup> Variante im sich entwickelnden Photorezeptor hoch reguliert ist, wird sie in den reifen Zellen erheblich herunterreguliert. Im Gegenzug korreliert der Anstieg der Expression von Rpgr<sup>ORF15</sup> mit der Reifung der Photorezeptoren. Wird ausschließlich Rpgr<sup>ex1-19</sup> exprimiert, kommt es zu abnormalen Proteinakkumulationen im Außensegment, zu einer Zerstörung der Morphologie der Außensegmente und schließlich zu einer schnellen retinalen Degeneration [94]. Im Gegensatz dazu hat die alleinige Expression von Rpgr<sup>ORF15</sup> keine morphologischen Auswirkungen dieser Art. Weder atypisch akkumulierte Proteine im Außensegment, noch retinale Degenerationen konnten beobachtet werden. Diese Ergebnisse könnten eine Erklärung dafür liefern, warum auch bei mutiertem Rpgr<sup>ORF15</sup> die Retina sich zunächst normal entwickelt und die Pathologie erst später auftritt.

Den genauen Zeitpunkt des Einsetzens der morphologischen Veränderungen zu kennen, ist eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung einer Therapiestrategie, da die Behandlung vor der Zerstörung der Photorezeptoren stattfinden muss. Aus diesem Grund sollte ein geeignetes Modell für gentherapeutische Studien eine Mutation im ORF15 Exon enthalten, um eine Situation zu erzeugen, wie sie beim Menschen vorkommt und um eine Pathologie hervorzurufen, die sich möglichst auf das Auge beschränkt. Da die bisher erzeugten Mausmodelle der Erforschung der Rpgr Funktion dienen und nicht der Simulation einer durch Rpgr Mutationen ausgelösten humanen RP, ist die physiologische Ursache der retinalen Degeneration beim Menschen, sowie ihr Verlauf bislang nicht aufgeklärt. Ziel der hier vorgestellten Arbeit war die Herstellung eines Mausmodells, an dem sowohl die pathophysiologischen Ursachen der Erkrankung entschlüsselt, als auch mögliche gentherapeutische Strategien entwickelt werden können. Die detaillierte und umfassende Untersuchung des hergestellten Mausmodells wird zukünftig Aufschluss über den Verlauf der Degeneration und ihre Ursachen geben.

### 4.3 Ausblick

---

Aufbauend auf die beschriebene initiale Charakterisierung sollen in der Zukunft noch weitere Untersuchungen an dem hier vorgestellten Mausmodell durchgeführt werden. Diese umfassen sowohl die biochemische Untersuchung des veränderten Proteins als auch dessen Auswirkungen auf apoptotische Prozesse in der Photorezeptorzelle und mögliche Veränderungen der Interaktion mit den Interaktionspartnern des Rpgr Proteins im CC. Außerdem sollen anhand immunhistochemischer Färbungen die Auswirkungen der Proteinveränderung in der Zelle analysiert werden. Darüber hinaus werden die Tiere ophthalmologisch untersucht, wobei Funduskopie, Fluoreszenz–Angiographie und Fundusautofluoreszenz beurteilt werden. Ebenso sollen Sehtests mit den Mäusen durchgeführt werden, um das Vorschreiten der Erblindung beurteilen zu können.

Um ein geeignetes Modell für Therapiestudien darzustellen ist es von entscheidender Wichtigkeit, dass ein Tiermodell die beim Menschen auftretende Situation widerspiegelt [81] [91]. Diese Bedingung könnte das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Mausmodell erfüllen.

Für eine mögliche Gentherapie stehen verschiedene Strategien zur Verfügung [48]. Welche Form der Therapie bei dem hier vorgestellten Mausmodell als geeignet erscheint, hängt vom bestehenden Krankheitsmechanismus ab [82].

Getestet werden soll zum einen eine Genadditionstherapie, bei der eine korrekte Kopie des *Rpgr*<sup>ORF15</sup> in die Photorezeptoren eingeschleust wird. Dadurch kann die korrekte Proteinsequenz translatiert und so die Funktion der Photorezeptoren wiederhergestellt werden. Sollte jedoch aufgrund der Mutationsform das Protein wie vermutet einen toxischen Effekt auf die Zellen haben und diese deshalb degenerieren, müsste als Behandlungsform eine Blockade der Expression des mutierten Gens entwickelt werden. Dies ist mit sogenannten siRNA Molekülen möglich, die die Degradation der mRNA des mutierten *Rpgr* Gens herbeiführen und eine Produktion des Proteins unterdrücken [27].

Eine dritte Therapieform, die sich jedoch noch in einem sehr frühen Stadium der Entwicklung befindet, ist die Reparatur der Mutation in vivo durch eine gezielte Veränderung der Gensequenz am Ort der Mutation (*targeted gene alteration*) [59] [61] [79]. Diese könnte durch Aktivierung zelleigener Reparaturmechanismen, die Induzierung eines DNA Doppelstrangbruchs in der Zielsequenz und homologer Rekombination mit der korrekten Gensequenz erreicht werden [87]. Um diese Form der Therapie zu testen, wurde eine Schnittstelle für die homing Endonuclease I-SceI unmittelbar hinter dem *Rpgr* Gen eingefügt.

Mit Hilfe dieser Erkennungssequenz soll im späteren Verlauf einer Therapieentwicklung ein Strangbruch im Genom der Maus erzeugt werden, der die homologe Rekombination mit der korrekten Sequenz des ORF15 begünstigt. Dazu sollen mittels subretinaler Injektion AAV Vektorkonstrukte ins Auge eingebracht werden, die sowohl die korrekte Zielsequenz des

ORF15 enthalten, als auch die Sequenz der homing Endonuclease. Auf diese Weise soll der Austausch der mutierten ORF15 Sequenz direkt im Chromosom des Photorezeptors ermöglicht werden. Durch das Testen dieser drei verschiedenen Therapietechniken steigt die Chance, eine Möglichkeit zu finden, wie eine bisher unheilbare Erkrankung effektiv behandelt werden könnte. Die am Mausmodell getesteten Behandlungsmethoden, sollen im Falle eines erfolgreichen Ergebnisses auch am Hundemodell getestet werden, bevor ein Einsatz in der Klinik geplant ist. Hierfür steht ein natürlich vorkommendes Hundemodell für XLRP aufgrund von Mutationen im *RPGR* Gen zur Verfügung [1] [97] [98].

# 5

## Zusammenfassung

Mutationen im Gen des Retinitis Pigmentosa GTPase Regulators (*RPGR*) stellen die häufigste Ursache für X-chromosomale Retinitis Pigmentosa (RP) dar. Die meisten der verantwortlichen Mutationen treten in einer spezifischen repetitiven Region des terminalen Exons ORF15 auf, die deshalb als mutation hot spot bezeichnet wird. Punktmutationen im ORF15 verursachen Leserasterverschiebungen, die zu einer veränderten C-terminalen Aminosäure-Kette mit möglichen toxischen Effekten führen. In dieser Arbeit wurde ein Mausmodell entwickelt, bei dem die Deletion eines Basenpaares zu einer Aminosäureveränderung führt, die der des menschlichen mutierten Proteins gleicht.

Die pathologische Mutation und weitere stille Mutationen wurden mittels homologer Rekombination eines Vektorkonstrukts in murine ES Zellen eingeführt. Die Genotypisierung der ES Zellen und später der Tiere wurde mittels PCR, RT-PCR, Restriktionsverdau und Sequenzierung durchgeführt. Für histologische Untersuchungen wurden Paraffin- sowie Semidünnschnitte und elektronen-mikroskopische Aufnahmen angefertigt.

Der Targeting-Vektor wurde in C57/BL6-129sv hybrid ES Zellen eingeführt und die positiven Klone in Blastozysten implantiert. Die Chimären wurden genotypisiert und in einen BL/6J Hintergrund zurückgekreuzt. Histologische Untersuchungen der Retinae deuten auf eine fortschreitende Reduktion der Retinadicke hin, außerdem finden sich delokalisierte Nuclei in der Schicht der Inneren Segmente und eine Auflösung der Membrana Limitans Externa. Ab einem Alter von 6 Wochen sind umfassende morphologische

Veränderungen der Photorezeptorzellen zu beobachten.

Das neu erzeugte Mausmodell bildet einen degenerativen Phänotyp aus, was auf die Aktivierung eines ähnlichen oder verwandten pathologischen Verlaufs, verglichen mit dem beim Menschen, hindeutet. Dieses Modell wird zukünftig Einblicke in die pathologischen Mechanismen gewähren, die an der retinalen Degeneration beteiligt sind, ebenso wie in die biochemischen Gründe für die Toxizität der veränderten Proteine. Es soll jedoch zukünftig auch als Therapiemodell dienen, weshalb eine Erkennungssequenz für die Homingendonuklease I-SceI integriert wurde, um eine spätere Sequenzreparatur mittels homologer Rekombination an den Chromosomen der Photorezeptoren durchführen zu können.

# 6

## Summary

Mutations in the gene encoding the retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) are known to be the dominant cause for X-linked RP in humans. Most of the responsible mutations can be found in a specific, repetitive region of the ORF15, which is therefore called the mutation hot spot of RPGR. There, point mutations are responsible for a *frame shift*, causing the C-terminal amino acid chain to be modified while potentially causing a *toxic gain of function* of the mutated protein.

The purpose of this work was to develop a mouse model that contains a 1-base pair deletion, provoking the change of the amino acids at the C-terminal end of the mouse protein to be similar to the one in mutated human proteins. The pathological mutation along with additional, silent mutations were introduced into murine ES cells using homologous recombination of a targeting vector. The genotyping of the ES cells as well as the animals was performed using PCR, RT-PCR, restriction-digestion and sequencing. In order to perform the required histological analysis, paraffin sections, semi-thin sections and electron microscopic images were produced.

The targeting vector was introduced into C57/BL6-129sv hybrid ES cells and positive clones were implanted into surrogate mother mice. Chimeric animals were genotyped and back-crossed into a BL/6J background. Histological analysis of the retina at different ages of the mice revealed a progressive reduction of the retina thickness as well as delocalized nuclei among the IS (inner segments) and a disruption of the Outer Limiting Membrane. Beginning at an age of six weeks, severe morphological changes can be ob-

served in the photoreceptors.

The mouse model generated in the course of this work shows pathologies suggesting a disease-progression similar to the one found in human patients. In the future this model will allow us to gain insight into the pathological mechanisms responsible for the degeneration as well as the biochemical triggers for the toxicity of the mutated proteins. Furthermore, it is designed to be a model for therapeutic approaches since it contains an I-SceI homingendonuclease recognition site for later sequence repair by homologous recombination.

# Literaturverzeichnis

- [1] Acland G.M.; Blanton S.H.; Hershfield B. and Aguirre G.D. XLPR: A canine retinal degeneration inherited as an X-linked trait. *American Journal of Medical Genetics*, 52(1994)(1):27–33.
- [2] Adamian M.; Pawlyk B.S.; Hong D.H. and Berson E.L. Rod and cone opsin mislocalization in an autopsy eye from a carrier of X-linked retinitis pigmentosa with a Gly436Asp mutation in the RPGR gene. *American journal of ophthalmology*, 142(2006)(3):515–8.
- [3] Adams M.; Smith U.M.; Logan C.V. and Johnson C.A. Recent advances in the molecular pathology, cell biology and genetics of ciliopathies. *Journal of medical genetics*, 45(2008)(5):257–67.
- [4] Aguirre G.; Yashar B.; John S.; Smith J.; Breuer D.; Hiriyan S. et al. Retinal histopathology of an XLRP carrier with a mutation in the RPGR exon ORF15. *Experimental eye research*, 75(2002)(4):431–443.
- [5] Ali R.R.; Sarra G.M.; Stephens C.; Alwis M.D.; Bainbridge J.W.; Munro P.M. et al. Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nature genetics*, 25(2000)(3):306–10.
- [6] Arden G.B.; Carter R.M.; Hogg C.R.; Powell D.J.; Ernst W.J.; Clover G.M. et al. A modified ERG technique and the results obtained in X-linked retinitis pigmentosa. *The British journal of ophthalmology*, 67(1983)(7):419–30.
- [7] Ayyagari R.; Demirci F.; Liu J.; Bingham E.L.; Stringham H.; Kakuk L.E. et al. X-Linked Recessive Atrophic Macular Degeneration from RPGR Mutation. *Genomics*, 80(2002)(2):166–171.
- [8] Bader I. X-linked Retinitis Pigmentosa: RPGR Mutations in Most Families with Definite X Linkage and Clustering of Mutations in a Short

Sequence Stretch of Exon ORF15. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(2003)(4):1458–1463.

- [9] Beltran W.A.; Wen R.; Acland G.M. and Aguirre G.D. Intravitreal injection of ciliary neurotrophic factor (CNTF) causes peripheral remodeling and does not prevent photoreceptor loss in canine RPGR mutant retina. *Experimental eye research*, 84(2007)(4):753–71.
- [10] Berson E.L.; Remulla J.F.; Rosner B.; Sandberg M.A. and Weigel-DiFranco C. Evaluation of patients with retinitis pigmentosa receiving electric stimulation, ozonated blood, and ocular surgery in Cuba. *Archives of ophthalmology*, 114(1996)(5):560–3.
- [11] Blacque O.E.; Reardon M.J.; Li C.; Mccarthy J.; Mahjoub M.R.; Ansley S.J. et al. Loss of *C. elegans* BBS-7 and BBS-8 protein function results in cilia defects and compromised intraflagellar transport. *Genes and Development*, 1(2004):1630–1642.
- [12] Breuer D.K.; Yashar B.M.; Filippova E.; Hiriyan S.; Lyons R.H.; Meers A.J. et al. 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(2002)(6):1545–54.
- [13] Brunner S.; Colman D.; Travis A.J.; Luhmann U.F.O.; Shi W.; Feil S. et al. Overexpression of RPGR leads to male infertility in mice due to defects in flagellar assembly. *Biology of reproduction*, 79(2008)(4):608–17.
- [14] Brunner S.; Skosyrski S.; Kirschner-Schwabe R.; Knobloch K.P.; Neidhardt J.; Feil S. et al. Cone versus rod disease in a mutant *Rpgr* mouse caused by different genetic backgrounds. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(2010)(2):1106–15.
- [15] Chang B.; Khanna H.; Hawes N.; Jimeno D.; He S.; Lillo C. et al. In-frame deletion in a novel centrosomal/ciliary protein CEP290/NPHP6 perturbs its interaction with RPGR and results in

- early-onset retinal degeneration in the rd16 mouse. *Human molecular genetics*, 15(2006)(11):1847–57.
- [16] Cideciyan A.; Hauswirth W.; Aleman T.; Kaushal S.; Schwartz S.; Boye S. et al. Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 year. *Human gene therapy*, 20(2009)(9):999–1004.
- [17] Conley S.; Cai X. and Naash M. Non-Viral Ocular Gene Therapy: Assessment and Future Directions. *Current opinion in molecular therapeutics*, 10(2008)(5):456–463.
- [18] Cook T.A.; Ghomashchi F.; Gelb M.H.; Florio S.K. and Beavo J.A. The delta subunit of type 6 phosphodiesterase reduces light-induced cGMP hydrolysis in rod outer segments. *The Journal of biological chemistry*, 276(2001)(7):5248–55.
- [19] D’Angelo A. and Franco B. The dynamic cilium in human diseases. *PathoGenetics*, 2(2009)(1):3.
- [20] Demirci F.Y.K.; Rigatti B.W.; Wen G.; Radak A.L.; Mah T.S.; Baic C.L. et al. X-linked cone-rod dystrophy (locus COD1): identification of mutations in RPGR exon ORF15. *American journal of human genetics*, 70(2002)(4):1049–53.
- [21] den Hollander A.I.; Koenekoop R.K.; Mohamed M.D.; Arts H.H.; Boldt K.; Towns K.V. et al. Mutations in LCA5, encoding the ciliary protein lebercilin, cause Leber congenital amaurosis. *Nature genetics*, 39(2007)(7):889–95.
- [22] Ebenezer N.D.; Michaelides M.; Jenkins S.A.; Audo I.; Webster A.R.; Cheetham M.E. et al. Identification of novel RPGR ORF15 mutations in X-linked progressive cone-rod dystrophy (XLCORD) families. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(2005)(6):1891–8.

- [23] Farber D. B. F.J.G. The rd Mouse Story : Seventy Years of Research on an Animal Model of Inherited Retinal Degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 13(1994)(1):31–64.
- [24] Fliegauf M.; Benzing T. and Omran H. When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(2007)(11):880–93.
- [25] Gerber S.; Perrault I.; Hanein S.; Barbet F.; Ducroq D.; Ghazi I. et al. Complete exon-intron structure of the RPGR-interacting protein (RPGRIP1) gene allows the identification of mutations underlying Leber congenital amaurosis. *European journal of human genetics : EJHG*, 9(2001)(8):561–71.
- [26] Ghosh A.K.; Murga-Zamalloa C.A.; Chan L.; Hitchcock P.F.; Swaroop A. and Khanna H. Human retinopathy-associated ciliary protein retinitis pigmentosa GTPase regulator mediates cilia-dependent vertebrate development. *Human molecular genetics*, 19(2010)(1):90–8.
- [27] Grimm D. and Kay M.A. Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time? *The Journal of clinical investigation*, 117(2007)(12):3633–41.
- [28] Hartong D.T.; Berson E.L. and Dryja T.P. Retinitis pigmentosa. *Lancet*, 368(2006)(9549):1795–809.
- [29] Hong D.H. Dominant, Gain-of-Function Mutant Produced by Truncation of RPGR. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(2004)(1):36–41.
- [30] Hong D.H. and Li T. Complex expression pattern of RPGR reveals a role for purine-rich exonic splicing enhancers. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(2002)(11):3373–82.
- [31] Hong D.H.; Pawlyk B.S.; Adamian M.; Sandberg M.A. and Li T. A single, abbreviated RPGR-ORF15 variant reconstitutes RPGR function in vivo. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46(2005)(2):435–41.

- [32] Hong D.H.; Pawlyk B.S.; Shang J.; Sandberg M.A.; Berson E.L. and Li T. A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2000)(7):3649–54.
- [33] Hong D.H.; Yue G.; Adamian M. and Li T. Retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGRr)-interacting protein is stably associated with the photoreceptor ciliary axoneme and anchors RPGR to the connecting cilium. *The Journal of biological chemistry*, 276(2001)(15):12091–9.
- [34] Hosch J.; Lorenz B. and Stieger K. RPGR: role in the photoreceptor cilium, human retinal disease, and gene therapy. *Ophthalmic genetics*, 32(2011)(1):1–11.
- [35] Huber G.; Beck S.C.; Grimm C.; Sahaboglu-Tekgoz A.; Paquet-Durand F.; Wenzel A. et al. Spectral domain optical coherence tomography in mouse models of retinal degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(2009)(12):5888–95.
- [36] Karlstam L.; Hertel E.; Zeiss C.; Ropstad E.O.; Bjerkaas E.; Dubielzig R.R. et al. A slowly progressive retinopathy in the Shetland Sheepdog. *Veterinary ophthalmology*, 14(2011)(4):227–238.
- [37] Khanna H.; Hurd T.W.; Lillo C.; Shu X.; Parapuram S.K.; He S. et al. RPGR-ORF15, which is mutated in retinitis pigmentosa, associates with SMC1, SMC3, and microtubule transport proteins. *The Journal of biological chemistry*, 280(2005)(39):33580–7.
- [38] Kirschner R.; Erturk D.; Zeitz C.; Sahin S.; Ramser J.; Cremers F.P. et al. DNA sequence comparison of human and mouse retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) identifies tissue-specific exons and putative regulatory elements. *Human genetics*, 109(2001)(3):271–8.
- [39] Kirschner R.; Rosenberg T.; Schultz-Heienbrock R.; Lenzner S.; Feil S.; Roepman R. et al. RPGR transcription studies in mouse and hu-

- man tissues reveal a retina-specific isoform that is disrupted in a patient with X-linked retinitis pigmentosa. *Human molecular genetics*, 8(1999)(8):1571–8.
- [40] Kozminski K.G.; Johnson K.A.; Forscher P. and Rosenbaum J.L. A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(1993)(12):5519–23.
- [41] Lima L.H.; Cella W.; Greenstein V.C.; Wang N.K.; Busuioc M.; Smith R.T. et al. Structural assessment of hyperautofluorescent ring in patients with retinitis pigmentosa. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 29(2009)(7):1025–31.
- [42] Linari M.; Ueffing M.; Manson F.; Wright A.; Meitinger T. and Becker J. The retinitis pigmentosa GTPase regulator, RPGR, interacts with the delta subunit of rod cyclic GMP phosphodiesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(1999)(4):1315–20.
- [43] Liu H.; Wang M.; Xia C.H.; Du X.; Flannery J.G.; Ridge K.D. et al. Severe retinal degeneration caused by a novel rhodopsin mutation. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(2010)(2):1059–65.
- [44] Liu P.; Jenkins N.A. and Copeland N.G. A highly efficient recombineering-based method for generating conditional knockout mutations. *Genome research*, 13(2003)(3):476–84.
- [45] Liu Q.; Zuo J. and Pierce E. The retinitis pigmentosa 1 protein is a photoreceptor microtubule-associated protein. *The Journal of neuroscience*, 24(2004)(29):6427–6436.
- [46] Liu X.; Bulgakov O.V.; Darrow K.N.; Pawlyk B.; Adamian M.; Liberman M.C. et al. Usherin is required for maintenance of retinal photoreceptors and normal development of cochlear hair cells. *Procee-*

*dings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(2007)(11):4413–8.

- [47] Lorenz B.; Andrassi M. and Kretschmann U. Phenotype in two families with RP3 associated with RPGR mutations. *Ophthalmic genetics*, 24(2003)(2):89–101.
- [48] Lorenz B.; Preising M. and Stieger K. Retinal blinding disorders and gene therapy—molecular and clinical aspects. *Current gene therapy*, 10(2010)(5):350–70.
- [49] Marszalek J.R.; Liu X.; Roberts E.A.; Chui D.; Marth J.D.; Williams D.S. et al. Genetic evidence for selective transport of opsin and arrestin by kinesin-II in mammalian photoreceptors. *Cell*, 102(2000)(2):175–87.
- [50] Meindl A.; Dry K.; Herrmann K.; Manson F.; Ciccodicola A.; Edgar A. et al. A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Nature genetics*, 13(1996)(1):35–42.
- [51] Michaelides M.; Hardcastle A.J.; Hunt D.M. and Moore A.T. Progressive cone and cone-rod dystrophies: phenotypes and underlying molecular genetic basis. *Survey of ophthalmology*, 51(2006)(3):232–58.
- [52] Moritz O.L.; Tam B.M.; Hurd L.L.; Peraenen J.; Deretic D. and Papermaster D.S. Mutant rab8 Impairs docking and fusion of rhodopsin-bearing post-Golgi membranes and causes cell death of transgenic *Xenopus* rods. *Molecular biology of the cell*, 12(2001)(8):2341–51.
- [53] Murga-Zamalloa C.A.; Atkins S.J.; Peranen J.; Swaroop A. and Khanna H. Interaction of retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) with RAB8A GTPase: implications for cilia dysfunction and photoreceptor degeneration. *Human molecular genetics*, 19(2010)(18):3591–8.
- [54] Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Current topics in microbiology and immunology*, 158(1992):97–129.

- [55] Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 26(2000)(2):99–109.
- [56] Nehrbass U. and Blobel G. Role of the nuclear transport factor p10 in nuclear import. *Science (New York, N.Y.)*, 272(1996)(5258):120–2.
- [57] Neidhardt J.; Glaus E.; Lorenz B.; Netzer C.; Li Y.; Schambeck M. et al. Identification of novel mutations in X-linked retinitis pigmentosa families and implications for diagnostic testing. *Molecular vision*, 14(2008)(August 2007):1081–93.
- [58] Otto E.A.; Loeys B.; Khanna H.; Hellemans J.; Sudbrak R.; Fan S. et al. Nephrocystin-5, a ciliary IQ domain protein, is mutated in Senior-Loken syndrome and interacts with RPGR and calmodulin. *Nature genetics*, 37(2005)(3):282–8.
- [59] Palfi A.; Millington-Ward S.; Chadderton N.; O'Reilly M.; Goldmann T.; Humphries M.M. et al. Adeno-associated virus-mediated rhodopsin replacement provides therapeutic benefit in mice with a targeted disruption of the rhodopsin gene. *Human gene therapy*, 21(2010)(3):311–23.
- [60] Pang J.j.; Chang B.; Kumar A.; Nusinowitz S.; Noorwez S.M.; Li J. et al. Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 13(2006)(3):565–72.
- [61] Pawlyk B.S.; Bulgakov O.V.; Xu X. and Adamian M. Replacement Gene Therapy with a Human RPGRIP1 Sequence Slows Photoreceptor Degeneration in a Murine Model of Leber Congenital Amaurosis. *Human Gene Therapy*, 1004(2010)(August):993–1004.
- [62] Pazour G.J.; Baker S.A.; Deane J.A.; Cole D.G.; Dickert B.L.; Rosenbaum J.L. et al. The intraflagellar transport protein, IFT88, is essential

- for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance. *The Journal of cell biology*, 157(2002)(1):103–13.
- [63] Pratt A.J. and MacRae I.J. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *The Journal of biological chemistry*, 284(2009)(27):17897–901.
- [64] Rabb M.F.; Tso M.O. and Fishman G.A. Cone-rod dystrophy. A clinical and histopathologic report. *Ophthalmology*, 93(1986)(11):1443–51.
- [65] Ramamurthy V. and Cayouette M. Development and disease of the photoreceptor cilium. *Clinical Genetics*, 76(2009)(2):137–145.
- [66] Redmond T.M.; Yu S.; Lee E.; Bok D.; Hamasaki D.; Chen N. et al. Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nature genetics*, 20(1998)(4):344–51.
- [67] Remé C.E.; Grimm C.; Hafezi F.; Marti A. and Wenzel A. Apoptotic cell death in retinal degenerations. *Progress in retinal and eye research*, 17(1998)(4):443–64.
- [68] Roepman R.; Bernoud-Hubac N.; Schick D.E.; Maugeri A.; Berger W.; Ropers H.H. et al. The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) interacts with novel transport-like proteins in the outer segments of rod photoreceptors. *Human molecular genetics*, 9(2000)(14):2095–105.
- [69] Roepman R.; van Duijnhoven G.; Rosenberg T.; Pinckers A.J.; Bleeker-Wagemakers L.M.; Bergen A.A. et al. Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 3: homology with the guanine-nucleotide-exchange factor RCC1. *Human molecular genetics*, 5(1996)(7):1035–41.
- [70] Roepman R. and Wolfrum U. Protein networks and complexes in photoreceptor cilia. *Sub-cellular biochemistry*, 43(2007):209–35.
- [71] Rosenbaum J.; Cole D. and Diener D. Intraflagellar transport: the eyes have it. *The Journal of cell biology*, 144(1999)(3):385.

- [72] Rozet J.m.; Perrault I.; Gigarel N.; Souied E.; Ghazi I.; Gerber S. et al. Dominant X linked retinitis pigmentosa is frequently accounted for by truncating mutations in exon ORF15 of the RPGR gene. *Journal of Medical Genetics*, 39(2002)(4):284.
- [73] Sahel J. Spotlight on childhood blindness. *The Journal of clinical investigation*, 121(2011)(8):1.
- [74] Sauer B. and Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(1988)(14):5166–70.
- [75] Sharon D.; Sandberg M.A.; Rabe V.W.; Stillberger M.; Dryja T.P. and Berson E.L. RP2 and RPGR mutations and clinical correlations in patients with X-linked retinitis pigmentosa. *American journal of human genetics*, 73(2003)(5):1131–46.
- [76] Shu X.; Black G.; Rice J.; Hart-Holden N.; Jones A.; O’Grady A. et al. RPGR mutation analysis and disease: an update. *Human mutation*, 28(2007)(4):322–328.
- [77] Shu X.; Fry A.M.; Tulloch B.; Manson F.D.C.; Crabb J.W.; Khanna H. et al. RPGR ORF15 isoform co-localizes with RPGRIP1 at centrioles and basal bodies and interacts with nucleophosmin. *Human molecular genetics*, 14(2005)(9):1183–97.
- [78] Shu X.; Zeng Z.; Gautier P.; Lennon A.; Gakovic M.; Patton E.E. et al. Zebrafish Rpgr is required for normal retinal development and plays a role in dynein-based retrograde transport processes. *Human molecular genetics*, 19(2010)(4):657–70.
- [79] Smith A.J.; Bainbridge J.W. and Ali R.R. Prospects for retinal gene replacement therapy. *Trends in genetics : TIG*, 25(2009)(4):156–65.

- [80] Spencer M.; Detwiler P.B. and Bunt-Milam a.H. Distribution of membrane proteins in mechanically dissociated retinal rods. *Investigative ophthalmology & visual science*, 29(1988)(7):1012–20.
- [81] Stieger K.; Lh riteau E.; Lh ariteau E.; Moullier P. and Rolling F. AAV-mediated gene therapy for retinal disorders in large animal models. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 50(2009)(2):206–24.
- [82] Stieger K. and Lorenz B. [The treatment of inherited dystrophies and neovascular disorders of the retina by rAAV-mediated gene therapy]. *Klinische Monatsblaetter fuer Augenheilkunde*, 225(2008)(12):1009–23.
- [83] Stieger K. and Lorenz B. Gene Therapy for Vision Loss – Recent Developments. *Discov Med*, 10(2010)(54).
- [84] Streilein J.W. and Stein-Streilein J. Does innate immune privilege exist? *Journal of leukocyte biology*, 67(2000)(4):479–87.
- [85] Strunnikov a.V. SMC proteins and chromosome structure. *Trends in cell biology*, 8(1998)(11):454–9.
- [86] Szamier R.B.; Berson E.L.; Klein R. and Meyers S. Sex-linked retinitis pigmentosa: ultrastructure of photoreceptors and pigment epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science*, 18(1979)(2):145–60.
- [87] Urnov F.D.; Rebar E.J.; Holmes M.C.; Zhang H.S. and Gregory P.D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature reviews. Genetics*, 11(2010)(9):636–46.
- [88] Vervoort R.; Lennon A.; Bird A.C.; Tulloch B.; Axton R.; Miano M.G. et al. Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa. *Nature genetics*, 25(2000)(4):462–6.
- [89] von Rueckmann A.; Fitzke F.W. and Bird A.C. Distribution of pigment epithelium autofluorescence in retinal disease state recorded in vivo and its change over time. *Graefe’s archive for clinical and experimental*

*ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fuer klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 237(1999)(1):1–9.

- [90] Wegscheider E.; Preising M.N. and Lorenz B. Fundus autofluorescence in carriers of X-linked recessive retinitis pigmentosa associated with mutations in RPGR, and correlation with electrophysiological and psychophysical data. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fuer klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 242(2004)(6):501–11.
- [91] Wolfe J. Gene therapy in large animal models of human genetic diseases. *ILAR journal/National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 50(2009)(2):107–111.
- [92] Wright A.F.; Chakarova C.F.; Abd El-Aziz M.M. and Bhattacharya S.S. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nature reviews. Genetics*, 11(2010)(4):273–84.
- [93] Wright A.F. and Shu X. Focus on Molecules: RPGR. *Experimental eye research*, 85(2007)(1):1–2.
- [94] Wright R.N.; Hong D.H. and Perkins B. Misexpression of the constitutive Rpgr(ex1-19) variant leads to severe photoreceptor degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(2011)(8):5189–201.
- [95] Yang Z.; Peachey N.S.; Moshfeghi D.M.; Thirumalaichary S.; Chorich L.; Shugart Y.Y. et al. Mutations in the RPGR gene cause X-linked cone dystrophy. *Human molecular genetics*, 11(2002)(5):605–11.
- [96] Young R.W. The renewal of photoreceptor cell outer segments. *The Journal of cell biology*, 33(1967)(1):61–72.
- [97] Zeiss C. and Acland G. Retinal pathology of canine X-linked progressive retinal atrophy, the locus homologue of RP3. *Investigative ophthalmology & visual*, 40(1999)(13):3292–3304.

- [98] Zhang Q.; Acland G.M.; Wu W.X.; Johnson J.L.; Pearce-Kelling S.; Tulloch B. et al. Different RPGR exon ORF15 mutations in Canids provide insights into photoreceptor cell degeneration. *Human molecular genetics*, 11(2002)(9):993–1003.
- [99] Zhao Y.; Hong D.H.; Pawlyk B.; Yue G.; Adamian M.; Grynberg M. et al. The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)- interacting protein: subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(2003)(7):3965–70.
- [100] Zito I.; Downes S.M.; Patel R.J.; Cheetham M.E.; Ebenezer N.D.; Jenkins S.A. et al. RPGR mutation associated with retinitis pigmentosa, impaired hearing, and sinorespiratory infections. *Journal of medical genetics*, 40(2003)(8):609–15.

# Publikationen und Präsentationen

## Publikationen

---

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

## Präsentationen

---

2011 DOG (Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft), Berlin: Entwicklung eines humanisierten Mausmodells für X-chromosomale Retinitis Pigmentosa, verursacht durch eine Punktmutation im RPGR Gen. **(Posterpreis der DOG)**

2011 4th GGL Conference on Life Sciences, Gießen: Development of a humanized Mouse-Model for X-linked Retinitis Pigmentosa caused by a point mutation in the RPGR gene.

2011 ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), Ford Lauderdale, USA: Development of a humanized mouse model for X-linked Retinitis Pigmentosa.

2011 Pro Retina Meeting, Potsdam: Development of a humanized Mouse-Model for X-linked Retinitis Pigmentosa caused by a point mutation in the RPGR gene.

2010 3rd GGL Conference on Life Sciences, Gießen: Development of a humanized Mouse-Model for X-linked Retinitis Pigmentosa.

2010 EPOS (European Pediatric Ophthalmology Society), Bad Nauheim: Development of a humanized Mouse-Model for X-linked Retinitis Pigmentosa.

2009 2nd GGL Conference on Life Sciences, Gießen: Development of a humanized Mouse-Model for X-linked Retinitis Pigmentosa.

# Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, 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 oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Jutta Schlegel

Gießen, den 25. Oktober 2011