

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD WEBER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchungen zur gentherapeutischen
Behandlung der
X-gebundenen juvenilen Retinoschisis**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefanie Johanna Joos

2018

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD WEBER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchungen zur gentherapeutischen
Behandlung der
X-gebundenen juvenilen Retinoschisis**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefanie Johanna Joos

2018

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Weber

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Herbert Jäggle

Tag der mündlichen Prüfung: 19.09.2018

Inhalt

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. X-gebundene juvenile Retinoschisis (XLRS) | 1 |
| 1.2. Diagnostik..... | 2 |
| 1.3. Mutationen im <i>RS1</i> -Gen als Ursache der XLRS..... | 3 |
| 1.4. Regulation der <i>RS1</i> -Genexpression | 5 |
| 1.5. Das Retinoschisin-Protein | 5 |
| 1.6. <i>Rs1h^Y</i> -Mäuse als Modellsystem für die XLRS..... | 7 |
| 1.7. Gentherapie zur Behandlung der XLRS | 8 |
| 1.8. Fragestellung und Ziele dieser Dissertation..... | 9 |
| 2. Material und Methoden..... | 10 |
| 2.1. Material..... | 10 |
| 2.1.1. Zelllinien | 10 |
| 2.1.2. Mauslinien | 10 |
| 2.1.3. Plasmide | 10 |
| 2.1.4. Antikörper..... | 11 |
| 2.1.5. Kit-Systeme, Molekularmassenstandard | 12 |
| 2.1.6. Chemikalien..... | 13 |
| 2.1.7. Puffer, Medien und Lösungen | 15 |
| 2.1.8. Verbrauchsmaterialien | 18 |
| 2.1.9. Geräte und Software | 20 |
| 2.2. Methoden..... | 23 |
| 2.2.1. <i>In vitro</i> Versuche | 23 |
| 2.2.1.1. Kultivierung eukaryotischer Zelllinien | 23 |
| 2.2.1.2. Transfektion | 23 |
| 2.2.1.3. Ernten der Zellen..... | 24 |

| | |
|--|----|
| 2.2.1.4. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 25 |
| 2.2.1.5. Western Blot..... | 26 |
| 2.2.1.6. Immunzytochemie | 26 |
| 2.2.2. „Ex vivo“ Versuche | 27 |
| 2.2.2.1. Vorbereitung der DNA-Lösungen für „ex vivo“ Elektroporation | 27 |
| 2.2.2.2. Netzhautpräparation..... | 27 |
| 2.2.2.3. „Ex vivo“ Elektroporation | 27 |
| 2.2.2.4. Fixierung und Einbetten der Netzhäute | 28 |
| 2.2.2.5. Kryoschnitte | 29 |
| 2.2.2.6. Immunhistochemie | 29 |
| 2.2.3. <i>In vivo</i> Versuche..... | 30 |
| 2.2.3.1. Vorbereiten der DNA-Lösungen für <i>in vivo</i> Elektroporation | 30 |
| 2.2.3.2. Injektion..... | 30 |
| 2.2.3.3. <i>In vivo</i> Elektroporation..... | 30 |
| 2.2.3.4. Fixierung und Einbetten der Augen 4 und 12 Wochen nach Elektroporation | 31 |
| 2.2.3.5. Zählung der Zapfen..... | 31 |
| 2.2.3.6. Schisisbestimmung | 32 |
| 2.2.3.7. Messung der Photorezeptordegeneration | 33 |
| 3. Ergebnisse | 34 |
| 3.1. Darstellung der verwendeten Konstrukte..... | 34 |
| 3.2. Expressionsanalyse in Zelllinien (<i>in vitro</i> Versuche)..... | 36 |
| 3.3. Expressionsanalyse in explantierten Netzhäuten („ex vivo“ Versuche) . | 43 |
| 3.4. Expressionsanalyse in <i>Rs1h^{fl/y}</i> -Mäusen (<i>in vivo</i> Versuche) | 46 |
| 4. Diskussion und Ausblick..... | 54 |

| | |
|---------------------------------|-----|
| Inhaltsverzeichnis | III |
| 5. Zusammenfassung..... | 61 |
| 6. Anhang..... | IV |
| 6.1. Abbildungsverzeichnis..... | IV |
| 6.2. Tabellenverzeichnis..... | V |
| 6.3. Abkürzungsverzeichnis..... | V |
| 6.4. Literaturverzeichnis | VII |
| 6.5. Danksagung | XX |

1. Einleitung

1.1. X-gebundene juvenile Retinoschisis (XLRS)

Die X-gebundene juvenile Retinoschisis (X-linked juvenile retinoschisis, XLRS) ist eine genetisch determinierte Erkrankung, bei der es zu einer Aufspaltung der inneren Netzhautschichten kommt. Die Inzidenz der Erkrankung liegt zwischen 1: 5 000 bis 1: 20 000 (1), wobei aufgrund des X-chromosomal rezessiven Vererbungsmusters überwiegend Männer betroffen sind. Konduktorinnen zeigen in der Regel keine Symptome, es gibt jedoch selten auch homozygot betroffene Frauen (2). Die Retinoschisis wird bei Jungen häufig erst kurz vor oder zum Schuleintritt entdeckt. Bereits im Säuglingsalter erkrankte Patienten weisen jedoch auf eine kongenitale Manifestation hin (3–5).

Typisch für die XLRS ist ein in der indirekten Ophthalmoskopie sichtbares Radspeichenphänomen im Bereich der Makula (Abbildung 1). Dieses entsteht durch intraretinal gelegene Zysten, die sich aufgrund der Schisis in verschiedenen retinalen Schichten, besonders in der inneren Körnerschicht und der äußeren plexiformen Schicht bilden (6,7). In 40-50 % tritt die namensgebende Aufspaltung der Netzhautschichten in der peripheren Netzhaut auf, hier vor allem im unteren temporalen Quadranten (Abbildung 1). Bei älteren Patienten werden häufig anstelle der Zysten zentrale Pigmentanomalien in der Netzhaut beobachtet (Abbildung 1) (8,9).



Abbildung 1 **Fundusaufnahmen bei XLRS** Links: **Radspeichenphänomen:** Im Bereich der Makula sieht man hier bei einem Patienten mit XLRS das sogenannte Radspeichenphänomen (Pfeil). Abbildung modifiziert nach Sieving et al., 2014 (10). Mitte: **Periphere Retinoschisis:** Im unteren temporalen Quadranten im rechten Auge eines 20-jährigen Mannes mit XLRS zeigt sich hier gut sichtbar die periphere Retinoschisis. Abbildung modifiziert nach Molday et al., 2012 (11). Rechts: **Pigmentanomalien:** Bei einem 61-jährigen Patienten mit XLRS sind in der Fundusaufnahme deutliche Pigmentanomalien sichtbar. Abbildung modifiziert nach Xiao et al., 2016 (9).

In den meisten Fällen wird keine oder nur eine geringfügige Krankheitsprogression beobachtet (8,12,13). Ein weiteres charakteristisches Kennzeichen der XLRS ist eine Störung der Signalweiterleitung zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen (14).

In der Regel sind beide Augen gleichermaßen betroffen. Die Sehstärke ist je nach involvierter Netzhautregion sowie dem Auftreten von sekundären Komplikationen, wie zum Beispiel Netzhautablösung oder intravitreale Einblutung, unterschiedlich stark eingeschränkt (15). Trotz nahezu vollständiger Penetranz (8,16) zeigt sich eine große Variabilität der Symptome bei Patienten mit XLRS. So kann die gleiche Mutation stark divergierende Phänotypen verursachen (9,17), es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass der Phänotyp durch die Art der Mutation beeinflusst werden kann (18,19).

1.2. Diagnostik

Die Patienten werden häufig aufgrund reduzierter Sehstärke augenärztlich vorgestellt. Ein plötzlicher Visusverlust ist eher untypisch für die XLRS und ist in der Regel auf die sekundären Komplikationen zurückzuführen. In der indirekten Ophthalmoskopie zeigt sich bei Patienten unter 30 Jahren im Bereich der Macula oft das Radspeichenphänomen (Abbildung 1), welches jedoch in einigen Fällen schwierig zu identifizieren ist, oder seltener periphere Retinoschisis. In den letzten Jahren hat sich die Spektral-Domänen-optische-Kohärenztomographie (SD-OCT) zur klinischen Diagnostik durchgesetzt (Abbildung 2 (a)). Die SD-OCT ermöglicht bereits in einem einmaligen Scan typische Veränderungen der Netzhaut festzustellen (4,20–22). Dies ist besonders bei jüngeren Kindern von Vorteil, da keine aktive Mitarbeit vonnöten ist (23,24). Zum Ausschluss von Differentialdiagnosen kann eine intravenöse Fluoreszenzangiographie durchgeführt werden. Mit dieser Methode ist eine Abgrenzung der XLRS zum zystischen Makulaödem möglich, bei welchem sich in der Spätphase eine Hyperfluoreszenz zeigt. Im Gegensatz dazu stellt sich die XLRS in der Regel angiographisch normal dar. Es kann jedoch in höherem Alter durch die Pigmentatrophie auch zu diffus hyperfluoreszierenden Bereichen kommen (15).

Ein weiteres diagnostisches Verfahren ist die Erstellung eines skotopischen Elektroretinogramms (ERG) (Abbildung 2 (b)). Hierbei wird ein Lichtblitz auf die dunkeladaptierte Netzhaut abgegeben und die Reizweiterleitung in der Netzhaut gemessen. Bei Patienten mit XLRS zeigt sich im ERG typischerweise eine reduzierte oder fehlende b-Welle, die eine reduzierte oder fehlende Reizantwort der den

Photorezeptoren nachgeschalteten Zellen bei erhaltener Antwort der Photorezeptoren (a-Welle) auf den Lichtblitz hin anzeigt (1,15). Dadurch erhält man ein negatives Verhältnis von a- zu b-Welle, weswegen man von einem „negativen“ ERG spricht. Jedoch zeigte sich in verschiedenen Studien mit *RS1*-Mutationsträgern, dass es eine größere Variabilität der Ergebnisse im ERG gibt als anfänglich angenommen (4,25,26). Daher hat das ERG zunehmend an Bedeutung verloren, wohingegen die OCT als diagnostisches Mittel besonders bei unauffälligem ERG breitere Anwendung findet (27). Zur Bestätigung der klinischen Diagnose sollte neben der Familienanamnese auch eine genetische Analyse durchgeführt werden (7,10,23,28).

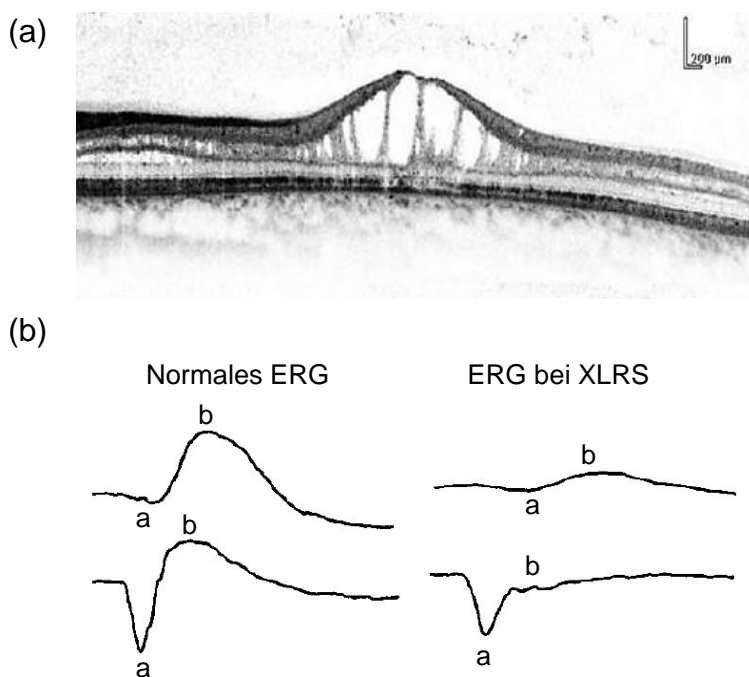


Abbildung 2 **SD-OCT-Aufnahme und ERG bei XLRs Patienten**

(a) SD-OCT-Scan bei einem 22-jährigen Mann mit XLRs. Der Scan zeigt die Retinoschisis in verschiedenen Netzhautschichten. Abbildung modifiziert nach Molday et al., 2012 (11).

(b) ERG bei einem normalen Probanden und bei einem Patienten mit XLRs. Links normale, rechts auffällige Reizantwort auf einen leichten (erste Reihe) versus starken (zweite Reihe) Lichtreiz auf die dunkel-adaptierte Netzhaut. Bei dem Patienten mit XLRs zeigt sich durch eine starke Reduktion der b-Welle ein sogenanntes negatives ERG. Abbildung modifiziert nach Weber et al., 2006 (16).

1.3. Mutationen im *RS1*-Gen als Ursache der XLRs

Ursächlich für die XLRs sind Mutationen im *RS1*-Gen auf Chromosom Xp22.2 (29). Bislang sind über 200 verschiedene *RS1*-Mutationen bekannt (Stand April 2018: <https://databases.lovd.nl/shared/genes/RS1>). Der Genort des *RS1*-Gens ist 32,4 kb groß und besteht aus 6 Exonen sowie 5 Intronen. Es kodiert für das Protein Retinoschisin und wird bei Säugetierarten ausschließlich im Auge und in der Zirbeldrüse exprimiert (29,30).

Von den verschiedenen *RS1*-Mutationen, wie Substitutionen (81 %), Deletionen (13 %), Duplikationen (3 %) oder Insertionen (1,5 %), stellen ca. 40 % wahre Null-

Allele dar, die durch Nonsense- oder Leseraster-Mutationen zu einem vorzeitigen Kettenabbruch und somit einem unvollständigen und nicht funktionsfähigen Protein führen (11). Über 50 % der Mutationen sind Missense-Mutationen, wodurch verschiedene Fehler in der Translation, Faltung oder Sekretion des Proteins entstehen. In manchen dieser Fälle kann das Retinoschisin-Protein aufgrund einer fehlerhaften Signalsequenz nicht in das endoplasmatische Retikulum (ER) aufgenommen werden und wird daraufhin intrazellulär rasch wieder abgebaut. In anderen Fällen kommt es durch Cystein-Mutationen zu fehlender Ausbildung der Disulfidbrücken, wodurch sich Retinoschisin nicht zum funktionsfähigen Oktamer zusammenlagern kann. Sehr häufig liegen Mutationen der Discoidin-Domäne vor, die zu Fehlfaltung des Proteins innerhalb des ERs und dortigem Abbau führen (Abbildung 3) (11,31).

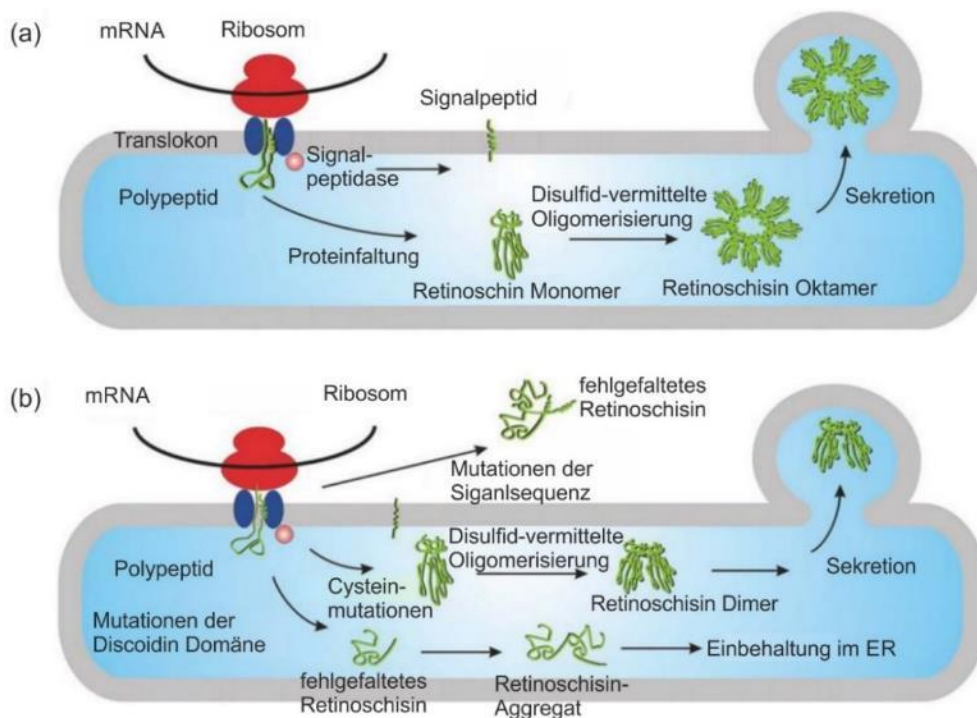


Abbildung 3 **Schematische Darstellung verschiedener *RS1*-Missense-Mutationen und deren Folgen.** (a) Wildtyp-Retinoschisin wird an ER-gebundenen Ribosomen synthetisiert und durch das Translokon in das ER aufgenommen. Dort entsteht durch Abspaltung der Signalsequenz durch die Signalpeptidase das reife Polypeptid, das zum Retinoschisin-Monomer gefaltet wird. Dieses wiederum lagert sich über Disulfid-Brücken zum Retinoschisin-Oktamer zusammen und wird daraufhin sezerniert. (b) Durch Mutationen der Signalsequenz kann Retinoschisin nicht in das ER aufgenommen werden und das fehlgefaltete Polypeptid wird im Zytoplasma rasch von Proteosomen abgebaut. Mutationen der Discoidin-Domäne führen zu Fehlfaltungen des Proteins innerhalb des ERs und es wird deshalb im ER einbehalten. Cystein-Mutationen in den Regionen vor und hinter der Discoidin-Domäne führen zwar zu normaler Proteinsynthese, -faltung und Bildung von Retinoschisin-Dimeren, jedoch zu einer Störung der weiteren Oligomerisierung als Retinoschisin-Oktamer. Die Retinoschisin-Dimere werden sezerniert, für die Funktion von Retinoschisin ist jedoch die Oktamer-Form entscheidend.

ER = endoplasmatisches Retikulum; *mRNA* = Boten-Ribonukleinsäure. Abbildung modifiziert nach Molday et al., 2012 (11).

1.4. Regulation der *RS1*-Genexpression

Die *RS1*-Expression wird über verschiedene regulatorische Elemente gesteuert, die 2011 am hiesigen Institut für Humangenetik genauer identifiziert wurden (Abbildung 4) (32). Bereits 2008 wurde von Langmann et al. ein proximal des *RS1*-Gens (- 177 bp bis + 32 bp von der *RS1*-Transkriptionsstartstelle aus) gelegener Minimalpromotor identifiziert (33). Diese Cone-rod-homeobox (= CRX)-bindende Region (CBR) enthält mehrere CRX-regulierende Elemente (CRE). CRX fungiert als Schlüsselregulator der Genexpression in Photorezeptorzellen (34,35) und es konnte anhand *CRX*-defizienter Mäuse gezeigt werden, dass CRX auch für die *RS1*-Expression eine essentielle Rolle spielt (36). Im Jahr 2011 wurden von derselben Arbeitsgruppe weitere regulatorische Elemente identifiziert: Hierzu zählt eine 3 kb stromaufwärts des *RS1*-Gens gelegene CpG-Insel sowie eine weitere, in Säugetieren stark konservierte, CBR im Intron 1 (+ 81 bp bis + 758 bp von der *RS1*-Transkriptionsstartstelle aus). Dabei wirkt die CpG-Insel stimulierend auf die *RS1*-Expression. Im Gegensatz dazu scheint die intronisch gelegene CBR eine inhibitorische Wirkung auf die *RS1*-Expression zu haben. Daher könnte diese Region essentiell zur Feinregulation einer physiologisch angepassten *RS1*-Expression sein (32).

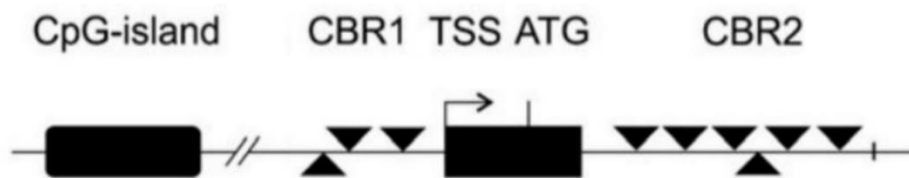


Abbildung 4 **Schematische Darstellung der regulatorischen Elemente des humanen *RS1*-Gens.** Die Positionen werden relativ zum Exon 1 von *RS1* dargestellt. -2,8 bis -3,4 kb stromaufwärts des *RS1*-Gens liegt die CpG-Insel, die signifikant verstärkende Wirkung auf die unmittelbar vor dem Exon 1 liegende Promotorregion (CBR1) hat. Im Intron 1 liegt CBR2, welche durch inhibitorische Wirkung auf CBR1 wichtig für die Feinregulation der *RS1*-Expression ist. Dreiecke stellen die einzelnen CREs dar. ATG = Startcodon; CBR = CRX-bindende Region; CRE = CRX-regulierende Elemente; TSS = Transkriptionsstartstelle. Abbildung modifiziert nach Kraus et al., 2011 (32).

1.5. Das Retinoschisin-Protein

Retinoschisin besteht aus 4 Domänen, einem 23 Aminosäuren (AS) langen Signalpeptid, einer 157 AS langen Discoidin-Domäne, einer 39 AS langen *RS1*-spezifischen Domäne und einem kurzen, 5 AS langen C-terminalen Segment (29,37). Kryoelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass 8 Retinoschisin-Monomere sich zu einem rotationssymmetrischen, zahnradartigen Gebilde zusammensetzen, welches auch als Doppeloktamer vorliegen kann (38–40).

In der Netzhaut wird Retinoschisin von Photorezeptoren und Bipolarzellen sezerniert und ist in immunhistochemischen Untersuchungen vor allem im Bereich der inneren Segmente von Stäbchen und Zapfen, aber auch im Bereich der inneren Körnerschicht an den Bipolarzellen, sowie in den beiden plexiformen Schichten nachweisbar (Abbildung 5) (41–43).

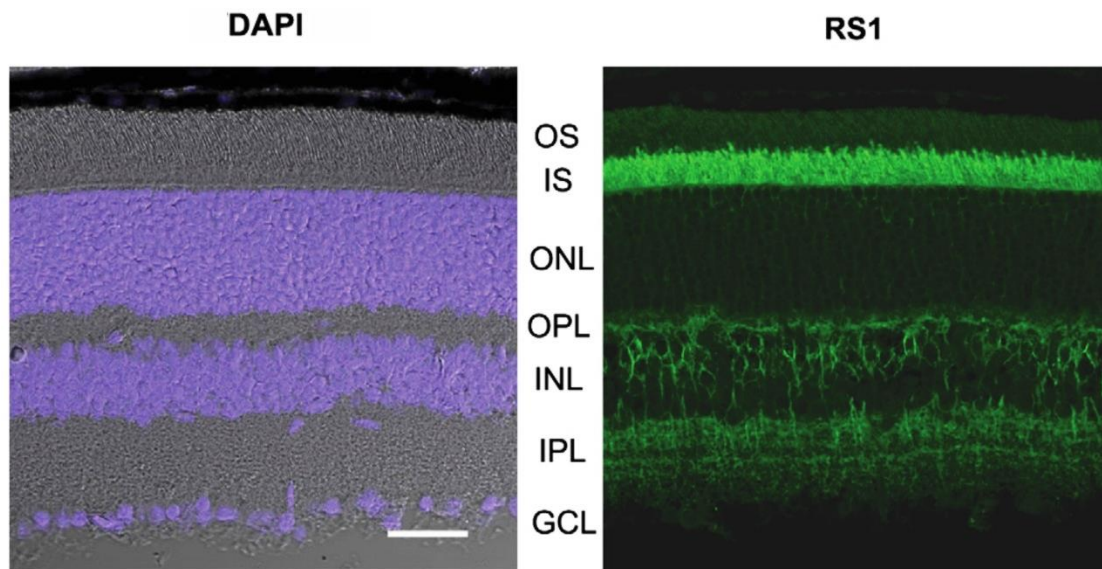


Abbildung 5 **Immunhistochemische Retinoschisin-Färbung einer adulten Mäusenetzhaut**. Links: DAPI gefärbte Zellkerne zeigen die Körnerschichten. Rechts: Verteilung von Retinoschisin in den Netzhautschichten mit starker Färbung in der inneren Segmentschicht (IS) und moderater Färbung in den beiden plexiformen Schichten (OPL, IPL) und der inneren Körnerschicht (INL).

OS = äußere Segmente; IS = innere Segmente; ONL = äußere Körnerschicht; OPL = äußere plexiformen Schicht; INL = innere Körnerschicht; IPL = innere plexiforme Schicht; GCL = Ganglienzellschicht. Maßstabsleiste 20 μ m. Abbildung modifiziert nach Molday et. al, 2012 (11).

Die genaue Funktion von Retinoschisin ist Gegenstand aktueller Forschungen. So konnte gezeigt werden, dass Retinoschisin mit der β 2-Untereinheit der retinalen Na/K-ATPase, einer aktiven Ionenpumpe, interagiert (44). Dabei scheint Retinoschisin nicht die Ionentransport-Aktivität der Na/K-ATPase zu beeinflussen (44). Jedoch wurde ein Einfluss von Retinoschisin auf Signalkaskaden, die von der Na/K-ATPase angestoßen werden, und auf die Lokalisation der retinalen Na/K-ATPase beschrieben (44,45). Des Weiteren wurde ein protektiver Effekt von Retinoschisin gegenüber apoptotisch bedingter Photorezeptordegeneration gezeigt (45,46). Andere Studien zeigen einen Einfluss von Retinoschisin auf die Funktion spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle in der Netzhaut (47,48).

1.6. *Rs1h*^Y-Mäuse als Modellsystem für die XLRS

Zur genaueren Untersuchung der molekularen und zellulären Pathomechanismen der XLRS wurden *Rs1h*^Y-Mäuse entwickelt, in denen das dem humanen *RS1* entsprechende murine *Rs1h* inaktiviert wurde (49–51). In dieser Arbeit wurde das von Weber et al. generierte Mausmodell verwendet (Abbildung 6) (49). Das *Rs1h*-Gen wird hier durch eine lacZ-neo-Kassette in Exon 3 unterbrochen. In dem von Zeng et al. generierten Mausmodell führt eine Neomycin Kasette in Exon 1 zur *Rs1h*-Inaktivierung (50). Von Jablonski et al. wurde durch Mutagenese mit Ethylnitroisoharnstoff eine Substitution im Intron 2 innerhalb der Donorspleißstelle bewirkt (51). Sowohl in funktionellen Untersuchungen als auch in strukturellen Analysen zeigen alle drei Mausmodelle große Übereinstimmungen mit der XLRS beim Menschen. Im ERG zeigen *Rs1h*^Y-Mäuse die typische, stark reduzierte b-Welle („negatives ERG“). In der Histologie weisen sie zystische Strukturen sowie eine generelle Desorganisation retinaler Schichten auf. Auch liegt die Schisis bei *Rs1h*^Y-Mäusen wie bei XLRS-Patienten vor allem in der inneren Körnerschicht. Schließlich zeigen *Rs1h*^Y-Mäusen eine mit der Zeit zunehmende Photorezeptordegeneration (Abbildung 6). (49–51).

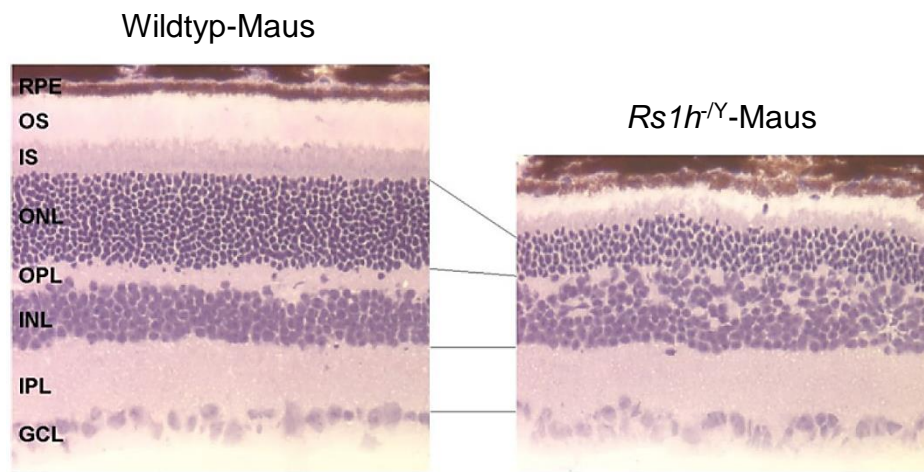


Abbildung 6 **Krioschnitte der Netzhaut einer Wildtyp- und einer *Rs1h*^Y-Maus in Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.** Im Vergleich zum linken Bild ist im rechten Bild eine deutliche Reduktion der Photorezeptoren in der äußeren Körnerschicht, sowie eine Desorganisation der Zellen in der äußeren plexiformen Schicht und inneren Körnerschicht erkennbar. Auch die äußeren und inneren Segmente der Photorezeptoren erscheinen deutlich kürzer. Die innere plexiforme Schicht sowie die Ganglienzellschicht erscheinen intakt.

OS = äußere Segmente; IS = innere Segmente; ONL = äußere Körnerschicht; OPL = äußere plexiformen Schicht; INL = innere Körnerschicht; IPL = innere plexiforme Schicht; GCL = Ganglienzellschicht; RPE = retinales Pigmentepithel. Abbildung modifiziert nach Weber et al., 2006 (16).

1.7. Gentherapie zur Behandlung der XLRS

Die Behandlung der XLRS besteht aktuell aus der Verschreibung von Sehhilfen sowie der frühzeitigen Erkennung von Komplikationen wie z.B. einer Netzhautablösung und deren Therapie. In einigen Studien wurde ein positiver Effekt auf die Netzhautveränderungen durch die Therapie mit Carboanhydrase-Hemmern berichtet. Als Kriterien wurden eine Verbesserung der Sehstärke um mindestens 7 Buchstaben sowie ein Rückgang der pathologischen Veränderungen im OCT herangezogen. Allerdings war dieser Effekt nur unter kontinuierlicher Behandlung und bevorzugt bei jüngeren Patienten mit mildereren Symptomen erreichbar. Auch gab es einige Patienten, die auf die Behandlung nicht ansprachen (52–55). Daher ist aktuell noch unklar, inwieweit Carboanhydrase-Hemmer eine therapeutische Option bei der XLRS, besonders im Langzeitverlauf, darstellen. In einer aktuellen Studie von Verbakel et al. wird vermutet, dass eine vorhergehende Behandlung mit Carboanhydrase-Hemmern durch die Verbesserung der anatomischen Verhältnisse optimale Rahmenbedingungen für eine gentherapeutische Behandlung schaffen könnte (55).

Aktuell sind daher keine etablierten, effektiven therapeutischen Optionen zur Behandlung der XLRS verfügbar. Verschiedene Gründe lassen insbesondere gentherapeutische Ansätze als vielversprechend erscheinen. Dazu zählt der rezessive Vererbungsmodus verbunden mit einer Retinoschisin-Defizienz als Pathomechanismus. Zudem wird die XLRS durch den Defekt genau eines Gens, des *RS1*-Gens, hervorgerufen. In Zellkulturversuchen mit humanen Netzhautzellen konnte bereits gezeigt werden, dass Wildtyp-*RS1* unabhängig von endogen vorhandenem defektem Retinoschisin exprimiert und sezerniert wird (56,57). Dies deutet darauf hin, dass selbst bei Patienten mit einer *RS1*-Restfunktion eine Gentherapie möglich wäre (11).

Des Weiteren ist das Auge durch die Blut-Retina-Schranke ein immunologisch privilegierter Raum, der zudem von außen gut zugänglich ist und die Einbringung von Therapeutika direkt an ihren Zielort – weitgehend ohne systemische Wirkung – ermöglicht (58–62).

In Vorversuchen an *RS1*-defizienten Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass eine Gentherapie der XLRS im Tierversuch die Netzhautstruktur und -funktion wiederherstellen kann und dadurch die retinale Degeneration aufhalten kann (50,63–66). In diesen Studien zeigte sich, dass sich das sezernierte Retinoschisin über die

gesamte Netzhaut ausbreitet und in gleicher räumlicher Verteilung wie bei einer Wildtypmaus nachweisbar ist (63,66). Auch blieb die *RS1*-Expression nach einmaliger Injektion über die gesamte Lebensspanne der Maus nachweisbar (11,67). Jedoch war der Zeitpunkt der Injektion entscheidend, da eine Injektion bei älteren Mäusen zu einem weniger stark ausgeprägten therapeutischen Effekt führte (63).

Mittlerweile gibt es erste klinische Studien in den USA, bei denen an einer kleinen Zahl von Patienten mit XLR5 eine gentherapeutische Behandlung getestet wird (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02317887?cond=RS1&rank=1>, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02416622?cond=RS1&rank=5>).

Diese verwenden zwei verschiedene Gentherapiekonstrukte, bei denen das *RS1*-Gen einerseits unter einem modifizierten humanen Promotor in Kombination mit einem Retinoid-bindenden Protein-Enhancer, zum anderen unter einem CMV-Enhancer/Hühner- β -Aktin-Promotor steht. Die Studien sollen bis 2021 bzw. 2022 laufen, daher ist aktuell noch keine Aussage über den Verlauf der gentherapeutischen Behandlung möglich.

1.8. Fragestellung und Ziele dieser Dissertation

Bei den meisten bisher durchgeführten Studien zur gentherapeutischen Behandlung der XLR5 im Mausmodell stand das exogen eingebrachte *RS1*-Gen unter der Kontrolle von starken Photorezeptor-spezifischen Promotoren (63,66,68) oder CMV-Promotoren (50,65). Verschiedene Studien lassen jedoch den Schluss zu, dass eine nicht-physiologische *RS1*-Expression einen schädigenden Einfluss auf die Netzhaut haben könnte (69,70). Daher war es das Ziel dieser Arbeit, einen gentherapeutischen Vektor zu testen, bei welchem das humane *RS1*-Gen unter der Kontrolle der von Kraus et al. identifizierten regulatorischen Elemente des humanen *RS1*-Gens steht (32). Die Untersuchungen an diesem Vektor sollten an retinalen und nicht-retinalen Zelllinien (*in vitro*), murinen retinalen *Rs1h^Y*-Netzhautexplantaten („*ex vivo*“) und direkt an lebenden *Rs1h^Y*-Mäusen (*in vivo*) getestet werden. Durch den Einsatz des endogenen *RS1*-Promotors soll bei gentherapeutischen Anwendungen letztlich eine physiologische *RS1*-Expression in der Netzhaut erreicht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zelllinien

Tabelle 1 Verwendete Zelllinien und ihre Herkunft

| Zelllinie | Organismus | Ursprungszelltyp |
|------------------|---------------------|-------------------------|
| 661W | <i>Mus musculus</i> | Retinale Tumorzellen |
| HEK293 | <i>Homo sapiens</i> | Embryonale Nierenzellen |
| Y-79 | <i>Homo sapiens</i> | Retinoblastomzellen |

2.1.2. Mauslinien

Tabelle 2 Verwendete Mauslinien und ihre Herkunft

| Stamm | Genotyp | Herkunft |
|--------------|-------------------------|--|
| C57BL/6J | Wildtyp | Jackson Laboratory |
| C57BL/6J | <i>Rs1h^Y</i> | Institut für Humangenetik, Universität Regensburg (49) |

2.1.3. Plasmide

Tabelle 3 Verwendete Plasmide, ihr Verwendungszweck und Herkunft

| Bezeichnung | Verwendung | Resistenz | zur Verfügung gestellt von |
|--------------------|--|---------------------|---|
| pcDNA4_CRX | heterologe Expression von <i>CRX</i> | Ampicillin + Zeocin | Prof. Dr. Thomas Langmann, Institut für Experimentelle Immunologie des Auges, Universitätsklinikum Köln |
| pcDNA3_GFP | heterologe Expression von <i>GFP</i> | Ampicillin | Institut für Humangenetik, Universität Regensburg |
| pcDNA3_mOPS-RS1 | heterologe Expression von <i>RS1</i> unter der Kontrolle des murinen Opsin-Promotors | Ampicillin | Institut für Humangenetik, Universität Regensburg |

| | | | |
|--------------------|---|------------|---|
| pcDNA3_natives-RS1 | heterologe Expression von <i>RS1</i> unter der Kontrolle der <i>RS1</i> -spezifischen regulatorischen Elemente | Ampicillin | Institut für Humangenetik, Universität Regensburg |
| pcDNA3_Myc-RS1 | heterologe Expression von Myc-getagtem <i>RS1</i> unter der Kontrolle der <i>RS1</i> -spezifischen regulatorischen Elemente | Ampicillin | Institut für Humangenetik, Universität Regensburg |

2.1.4. Antikörper

Tabelle 4 Primärantikörper

| Primär-antikörper | Typ | Spezies | Verdünnung | Verwendung | Herkunft |
|--------------------------|------------|----------------|-----------------------|-------------------|--|
| anti-β-Aktin | mAK | Maus | 1 : 10 000 | WB | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| anti-c-Myc (9E10) | mAK | Maus | 1 : 10 | WB | Institut für Humangenetik, Universität Regensburg |
| anti-GFP | pAK | Kaninchen | 1 : 10 000 1 : 500 | WB ICC IHC | Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA |
| anti-Retinoschisin | mAK | Maus | 1 : 10 000 1 : 500 | WB ICC IHC | Prof. Dr. Robert S. Molday, Department of Ophthalmology and Visual Sciences, |

| | | | | | |
|--|--|--|--|--|---|
| | | | | | University of British Columbia, Vancouver, Canada |
|--|--|--|--|--|---|

GFP = grün fluoreszierendes Protein; ICC = Immunzytochemie; IHC = Immunhistochemie; mAK = monoklonaler Antikörper; pAK = polyklonaler Antikörper; WB = Western Blot.

Tabelle 5 Sekundärantikörper

| Sekundärantikörper | Spezies | Verdünnung | Verwendung | Herkunft |
|---|----------------|-------------------|-------------------|--|
| Alexa Fluor® 594 anti-Maus IgG (H&L) | Ziege | 1 : 1 000 | ICC IHC | Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Alexa Fluor® 488 anti-Kaninchen IgG (H&L) | Ziege | 1 : 1 000 | ICC IHC | Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| anti-Maus IgG, H&L Chain Specific Peroxidase Conjugate | Ziege | 1 : 10 000 | WB | Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| anti-Kaninchen IgG, H&L Chain Specific Peroxidase Conjugate | Ziege | 1 : 10 000 | WB | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |

ICC = Immunzytochemie; ICH = Immunhistochemie; WB = Western Blot.

2.1.5. Kit-Systeme, Molekularmassenstandard

Tabelle 6 Kit-Systeme

| Kit | Hersteller |
|---|--|
| Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent | Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| NucleoBond® Xtra Midi | Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland |
| SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |

| | |
|-----------------------------------|---|
| TransIT®-LT1 Transfektionsreagenz | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |
|-----------------------------------|---|

Tabelle 7 Molekularmassenstandard

| Molekularmassenstandard | Hersteller |
|-------------------------------------|---|
| PageRuler Prestained Protein Ladder | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |

2.1.6. Chemikalien

Tabelle 8 Chemikalien

| Chemikalie | Hersteller |
|---|--|
| Ammoniumpersulfat (APS) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland / VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Ampicillin Natriumsalz $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{NaO}_4\text{S}$ | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Bromphenolblau Natriumsalz $\text{C}_{19}\text{H}_9\text{Br}_4\text{O}_5\text{SNa}$ | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Coumarinsäure $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_3$ | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5$ | Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$ | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Ethanol $\geq 99,8 \%$ p.a. $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Fast Green Tracer $\text{C}_{37}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_{10}\text{S}_3$ | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| fetales Kälberserum (FCS) | (PAA) GE Healthcare, Galfont St Giles, UK/ Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |

| | |
|--|--|
| Fluorescent Mounting Medium | Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland |
| Gentamycin | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Glycerin 99,5 % $C_3H_8O_3$ | Chemikalienlager der Universität Regensburg |
| Glycin, $C_2H_5NO_2$ | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Hefeextrakt | BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland |
| Insulin | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Isopropanol C_3H_8O | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Kaliumchlorid KCl | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| L-Glutamin (200 mM) mit Penicillin/ Streptomycin (100x) (P/S/G) | (PAA) GE Healthcare, Galfont St Giles, UK |
| Luminol Natriumsalz $C_8H_7N_3O_2$ | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| MA Lipofection Enhancer | IBA GMBH, Göttingen, Deutschland |
| Methanol CH_3OH | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| β -Mercaptoethanol C_2H_6OS | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Milchpulver | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Natriumacetat Trihydrat $NaCH_3CO_2$ | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Natriumchlorid, NaCl | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate = SDS) $\geq 99\%$ $C_{12}H_{25}NaO_4S$ | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Paraformaldehyd (PFA) $(CH_2O)_n$ | AppliChem GmbH, ^[L] _[SEP] Darmstadt, Deutschland |

| | |
|---|---|
| Penicillin/Streptomycin (100 x; 10 000 U/ml) (Pen/Strep) | Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Poly-L-Lysin (C ₆ H ₁₂ N ₂ O) _n | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Rotiphorese [®] Gel 40 (37,5:1) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Saccharose C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Tetramethylethyldiamin (TEMED) (CH ₃) ₂ NCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂ | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Triton [®] X-100 (10 %) C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Trypsin (0,5 %) - EDTA (0,2 %) 10 x in PBS | (PAA) GE Healthcare, Galfont St Giles, Vereinigtes Königreich |
| Trypton | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Wasserstoffperoxid 30 % H ₂ O ₂ | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |

2.1.7. Puffer, Medien und Lösungen

Tabelle 9 Medien und Medienzusätze, sowie Puffer für die Zellkultur

| Medium | Hersteller |
|--|---|
| Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose | Gibco [®] , Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Dulbecco's Modified Eagle Medium/ Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) | Gibco [®] , Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) | Gibco [®] , Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Geneticindisulfat (G-418)-Lösung | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Opti-Minimal Essential Medium (Opti-MEM) Medium | Gibco [®] , Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |

| | |
|---|---|
| Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium | Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland |
|---|---|

Tabelle 10 Zusammensetzung der Medien

| Medium | Zusammensetzung | Menge |
|---------------------------------|---|---|
| 661W | DMEM High Glucose (4,5 g/L) FCS Pen/Strep | 500 ml 10 % (v/v) 1 % (v/v) |
| HEK293 | DMEM High Glucose (4,5 g/L) FCS Pen/Strep G-418 | 500 ml 10 % (v/v) 1 % (v/v) 1 % (v/v) |
| LB-Medium | Trypton Hefeextract NaCl dH ₂ O Ampicillin | 10 g 5 g 10 g 1 L 100 µg/ml |
| Medium für Elektroporationen | DMEM/F-12 FCS Insulin P/S/G | 500 ml 10 % (v/v) 0,08 % (v/v) 0,8 % (v/v) |
| Y-79 | RPMI 1640 FCS Pen/Strep | 500 ml 10 % (v/v) 1 % (v/v) |

dH₂O = destilliertes Wasser; FCS = fetales Kälberserum; Pen/Strep = Penicillin/Streptomycin; P/S/G = L-Glutamin mit Penicillin/Streptomycin.

Tabelle 11 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen

| Lösung | Zusammensetzung | Menge |
|------------------------|---|------------------------|
| Antikörperlösung (ICC) | Ziegenserum 10 % Triton® X-100 1x PBS | 2,5 % v/v 0,1 % v/v |
| Antikörperlösung (IHC) | Ziegenserum 10 % Triton® X-100 1x PB | 2,5 % v/v 0,1 % v/v |

| | | |
|--------------------------------|--|---|
| Antikörperlösung (WB) | Milchpulver 1x PBS | 3 % w/v |
| Blocklösung (ICC) | Ziegenerum 10 % Triton® X-100 1x PBS | 10 % v/v 0,3 % v/v |
| Blocklösung (IHC) | Ziegenerum 10 % Triton® X-100 1x PB | 10 % v/v 0,3 % v/v |
| Blocklösung (WB) | Milchpulver 1x PBS | 3 % w/v |
| ECL Lösung 1 | Luminol 0,1 M TrisHCl pH 8,6 | 50 mg 200 ml |
| ECL Lösung 2 | Coumarinsäure DMSO | 11 mg ad 10 ml |
| Lämmli Puffer 5x | Bromphenolblau TrisHCl pH 6,8 β-Mercaptoethanol SDS Glycerin | 0,01 % w/v 60 mM 5 % (v/v) 2 % (v/v) 10 % (v/v) |
| PB-Puffer 5x (500mM) pH 7,2 | Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄ dH ₂ O | 27,45 g 7,8 g 500 ml |
| PBS 10x pH 7,4 | NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O KH ₂ PO ₄ dH ₂ O | 80 g 2 g 14,4 g 2,4 g 1 L |
| PFA 4 % pH 7 | PFA PB H ₂ O | 1 g 1 x 35 ml |
| SDS-Laufpuffer 10x | Tris Glycin SDS | 150 g 720 g 50 g |

| | | |
|-------------------|-------------------|--------|
| | dH ₂ O | ad 5 L |
| Towbin Puffer 10x | Glycin | 72 g |
| | Tris | 15 g |
| | dH ₂ O | 1 L |

ECL = verstärkte Chemilumineszenz; GFP = grün fluoreszierendes Protein; ICC = Immunzytochemie; IHC = Immunhistochemie; PB = Phosphatpuffer; PBS = Phosphatgepufferte Saline; PFA = Paraformaldehyd.

Tabelle 12 Fertige Lösungen für ICC, IHC, WB

| Lösung | Hersteller |
|----------------------------|---|
| Entwicklerlösung WB | AGFA, Mortsel, Belgien |
| Fixierlösung WB | AGFA, Mortsel, Belgien |
| Roti Liquid Barrier Marker | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| O.C.T. tissue tek compound | Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland |
| Ziegenerum | Abcam, Cambridge, UK |

ICC = Immunzytochemie; IHC = Immunhistochemie; WB = Western Blot.

2.1.8. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 13 Verbrauchsmaterialien

| Material | Hersteller |
|--|---|
| 6-Well Platten | Corning Incorporated, Corning, NY, USA |
| 24-Well Platten | Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units | Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland |
| Antibiotika- und kortisonhaltige Augensalbe (Isoptomax AS) 3,5 g | Alcon Pharma GmbH, Freiburg, Deutschland |
| Deckgläschen 10mm Ø | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Einbettwürfel ((T-8) peel-away disposable embedding molds) | Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA |
| Einmal Plastikpipetten | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |

| | |
|---|---|
| Einwegpasteurpipetten 3 ml | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Eppendorf-Cups 0,5 ml | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| Eppendorf-Cups 1,5 ml | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| Eppendorf-Cups 2 ml | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| Falcontube 15 ml | Cellstar [®] , Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Falcontube 50 ml | Cellstar [®] , Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Flaschen 25 cm ² Zellkultur | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| Glaspipetten | Brand, Wertheim, Deutschland |
| Handschuhe Nitril grün | Kimtech [®] , Kimberly-Clark Professional*, Kanada |
| Handschuhe Peha-soft [®] nitrile guard | Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland |
| Kerakain-Augentropfen (0,4 %) | Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Nadeln Microlance 3 0,3 mm * 13 mm/ 30 G ½ | BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland |
| Nadeln Microlance 3 0,4 mm * 19 mm/ 27 G ¾ | BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland |
| Whatman [®] Nuclepore [™] Track-Etched Membranes | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Objektträger Polylysin | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland / Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Pasteurpipetten | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Petrischalen | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |
| Pipettenspitzen 10 µl | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Pipettenspitzen 100 µl | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |

| | |
|--|--|
| Pipettenspitzen 1000 µl | VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Pipettenspitzen gestopft | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| PVDF Immobilon-P Membran | Millipore, Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Röntgenfilm Cronex 5 | AGFA, Mortsel, Belgien |
| Skalpell | Feather® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan |
| Spritzen Plastipak 1 ml | BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland |
| Whatman-Filterpapiere /: Gel-Blotting-Papiere 1,5 mm | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Zellkulturschalen | Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland |

2.1.9. Geräte und Software

Tabelle 14 Geräte und Software

| Gerät | Hersteller |
|---|--|
| Autoklav V-150 | Systemec GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| Binokular | Nikon Metrology GmbH, Alzenau, Deutschland |
| Binokular | Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| BluePower™ 500x4 Power Supply | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Brutschrank 37 °C | Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland |
| CO ₂ Inkubator CB 210 | Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland |
| Corel Draw X6 | Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada |
| Eclipse TE2000-S | Nikon Metrology GmbH, Alzenau, Deutschland |
| Eismaschine AF 100 | Scotsman, VerNicht Hills, IL, USA |
| Elektroporator ECM 830 Electrosquare Porator BTX | Biochrom Limited, Harvard Apparatus, Cambridge, UK |
| Färbekammer | Mechanische Werkstatt Universität Regensburg |
| Fluoreszenzmikroskop Axioskop2 mot plus | Zeiss, Oberkochen, Deutschland |

| | |
|--|--|
| Gelelektrophoreseapparatur Mini PROTEAN 3 | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Gelelektrophoreseapparatur | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Gelkammer Blue Marine200 | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| GraphPad Prism 6.01 | GraphPad Software, La Jolla, CA, USA |
| Handheld Automated Cell Counter | Millipore, Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| Image J 1.46r | Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA |
| Kämme 1,0 mm | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Kämme 1,5 mm | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Kryostat Leica CM1850 | Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, Deutschland |
| Milli-Q-Synthesis Reinstwasseranlage | Millipore, Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland |
| NanoDrop ND1000 Spektrophotometer | NanoDrop, Wilmington, DE, USA |
| pH Meter Lab-850 | Schott Instruments, SelectScience®, Bath, UK |
| Pipette Reference 10 µl | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland |
| Pipette Reference 100 µl | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland |
| Pipette Reference 1000 µl | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland |
| Schüttelinkubator Ceromat R | B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland |
| Schüttelinkubator KS 500 | Janke & Kunkel IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland |
| Schüttelgerät Duomax 1030 | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland |
| SDS-PAGE Platten Mini Protean System 1,5 mm | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |

| | |
|---|---|
| SDS-PAGE Platten Mini Protean System Short Plates | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| SDS-PAGE Platten SE6402 Glass Plates 18x8 cm | Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| Sterilbank | Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland |
| Thermomixer compact | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland |
| Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell | Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland |
| Ultraschallgerät Vibra Cell VCX400 | Sonics& Materials, Newtown, CT, USA |
| Vortex Genie2 | Scientific Industries, Bohemia, NY, USA |
| Waage | Scaltec Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland |
| Wasserbad | Labortechnik Medingen, Arnsdorf, Deutschland |
| Wasserdestilliergerät | GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland |
| Zentrifuge 5415 R (Tischzentrifuge) | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland |
| Zentrifuge Megafuge 1.0R (Falcontubezentrifuge) | Heraeus/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Zentrifuge Sigma 2-5, groß | Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA |
| Zentrifuge 5810 | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland |

2.2. Methoden

2.2.1. *In vitro* Versuche

2.2.1.1. Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen bei einer konstanten Temperatur von 37 °C und einem konstanten CO₂-Gehalt von 5 %. Es wurden stets sterile Medien, Puffer und Lösungen eingesetzt. Die HEK293- und 661W-Zellen wurden in DMEM High Glucose mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep in 10 cm-Schalen kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 80-90 % im Verhältnis 1:10 (HEK293), bzw. 1:6 (661W) passagiert. Bei den HEK293-Zellen wurde hierfür das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 ml frischem Medium von der Platte ab gespült. Von dieser Zellsuspension wurde dann 1 ml auf eine neue 10 cm-Schale gegeben und mit 9 ml frischem Medium aufgefüllt. Da die 661W-Zellen eine stärkere Adhäsion an die Platte zeigen, erfolgte vor dem Passagieren zunächst ein Waschschriff mit 5 ml 1x PBS und anschließend eine Inkubation mit 2 ml Trypsin-Lösung für 3 Minuten bei 37 °C zum Ablösen der Zellen. Daraufhin wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 ml frischem Medium gestoppt, 2 ml der Zellsuspension in einer neuen Schale ausgesät und mit 8 ml Medium aufgefüllt.

Die Y-79-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen 1:4 gesplittet und in einer neuen 25 cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Hierzu wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcontube überführt und bei 1 000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert (Falcontubezentrifuge, Heraeus). Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert und 2,5 ml hiervon mit 7,5 ml frischem Medium in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.1.2. Transfektion

HEK293-Zellen wurden mit dem TransIT[®]-LT1 Transfection Reagent transfiziert. Am Nachmittag des Vortags wurden hierfür ca. 2,4 Mio. HEK293-Zellen in eine frische 10 cm-Schale ausgesät. Nach 15 Stunden Inkubation wurde so eine Konfluenz von etwa 70 % erreicht. Nun wurden je Transfektionsansatz 1,5 ml Medium mit 15 µg der entsprechenden Plasmid-DNA und 45 µl TransIT[®]-LT1 Transfection Reagent gemischt. Nach 20 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mischung

vorsichtig auf die Platte getropft. Nach 24 Stunden wurde das Medium zu FCS-freiem Medium gewechselt und nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen geerntet.

Y-79- und 661W-Zellen wurden mit dem Lipofectamine[®] Transfection Reagent transfiziert. Hierfür wurden am Vortag ca. 2,4 Mio. 661W-Zellen, bzw. 4,8 Mio. Y-79-Zellen ausgesät. Nach 15 Stunden wurden pro Transfektionsansatz zunächst je 750 µl Opti-MEM-Medium und 15 µg DNA vermischt, sowie separat 750 µl Opti-MEM-Medium und 30 µl Lipofectamine[®] Transfection Reagent. Nach 5 Minuten Inkubation wurden die beiden Lösungen miteinander vermischt und für weitere 15 Minuten inkubiert.

Für die Transfektion von Y-79-Zellen wurde im Anschluss zu dieser Mischung noch 15 µl Enhancer zugegeben und für weitere 15 Minuten inkubiert. Nach dem Auftropfen des Transfektionsansatzes auf die Y-79-Zellen wurden diese für 15-20 Minuten auf einen Magneten im Brutschrank gestellt.

Beim Transfektionsansatz für die 661W-Zellen wurde kein Enhancer zugegeben. Nach Auftropfen des Transfektionsansatzes auf die Zellen wurden diese sowie die Y-79-Zellen für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt. Danach wurde das Medium zu Medium ohne FCS gewechselt und die Zellen für weitere 24 Stunden im Brutschrank kultiviert.

2.2.1.3. Ernten der Zellen

48 Stunden nach Transfektion wurde am Fluoreszenzmikroskop (Nikon) die Transfektionseffizienz anhand der GFP-Fluoreszenz überprüft und dokumentiert. Darauf wurde der Überstand abgenommen, in 15 ml Falcontubes abgefüllt und für 5 Minuten bei 1 500 rpm zentrifugiert (Falcontubezentrifuge, Heraeus). Anschließend wurde der Überstand in neue Falcontubes überführt und mit Hilfe von Amicon Ultra-4-Falcontubes aufkonzentriert.

Zum Ernten der 661W-Zellen wurden diese zunächst mit 5 ml 1x PBS gewaschen und dann mit 2 ml Trypsin-Lösung für 3 Minuten in den Brutschrank (37 °C) gestellt und anschließend mit Medium vollständig abgelöst. Bei den HEK293-Zellen wurde das alte Medium abgenommen und die Zellen konnten mit frischem Medium direkt von der Platte abgespült werden. Die Y-79 Zellsuspension wurde pro Flasche in ein 15 ml

Falcontube überführt und bei 1 000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert.

Die so gewonnenen jeweiligen Zellsuspensionen wurden pro Schale oder Flasche je in ein 15 ml Falcontube gefüllt und 3 Minuten bei 1 500 rpm zentrifugiert. Dann erfolgte ein Waschschrift mit 1x PBS bei 4 000 rpm für 5 Minuten. Zuletzt wurde das Pellet in 500 µl PBS gelöst, in Eppendorf Cups überführt und mit 100 µl 5x Lämmli Puffer versetzt.

2.2.1.4. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zunächst wurde ein 12,5 % Trenngel in untenstehender Zusammensetzung gegossen (Tabelle 15). Durch eine Beschichtung mit Isopropanol konnte eine gerade und blasenfreie Kante erreicht werden. Nach Aushärtung des Gels und Entfernung des Isopropanols wurde das Sammelgel (Tabelle 15) darauf gegossen und der Kamm für die Kammern gesteckt. Nach etwa 1 Stunde war das Gel vollständig ausgehärtet und konnte nach Entfernung des Kamms verwendet werden.

Tabelle 15 Zusammensetzungen von Trenngel und Sammelgel

| Komponente | Trenngel 12,5 % | Sammelgel 3 % |
|-----------------------|------------------------|----------------------|
| 1 M TrisHCl pH 6,8 | - | 2,76 ml |
| 1 M TrisHCl pH 8,8 | 3,83 ml | - |
| H ₂ O | 3,045 ml | 1,69 ml |
| Acrylamid-Lösung 40 % | 3,125 ml | 0,55 ml |
| 20 % SDS | 100 µl | 50 µl |
| 10 % APS | 100 µl | 50 µl |
| TEMED | 10 µl | 5 µl |

APS = Ammoniumpersulfat; SDS = Natriumdodecylsulfat; TEMED = Tetramethylethylendiamin.

Vor der gelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proben in 1x Lämmli Puffer für 10 Minuten bei 95 °C aufgekocht. In die erste Kammer wurden 5 µl PageRuler Prestained Protein Ladder als Standard geladen. Nach dem Auftragen der denaturierten Proben auf die Gele erfolgte die Elektrophorese in 1x SDS-Laufpuffer für 1 Stunde und 20 Minuten bei 150 V.

2.2.1.5. Western Blot

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden im Semi-Dry-Verfahren auf eine PVDF-Membran geblottet. Dazu wurde die PVDF-Membran zunächst für 1 Minute in Methanol aktiviert, danach für 10 Minuten in 1x Towbin Puffer geschwenkt. Gleichzeitig wurden je Blot 2 Whatman-Filterpapiere in 1x Towbin Puffer eingelegt. Auf die Anode wurde ein Whatman-Filterpapier gelegt, darauf die PVDF-Membran, als nächstes das Gel und ein weiteres Whatman-Filterpapier. Darauf wurde die Kathode gepresst. Die Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte bei 24 V in 40 Minuten.

Im Anschluss wurde die PVDF-Membran in eine 3 % Blocklösung (WB) gelegt. Die PVDF-Membran wurde darin für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation in der primären Antikörperlösung über Nacht bei 4 °C ebenfalls auf einem Schüttler. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit 1x PBS für je 15 Minuten gewaschen. Auch die Inkubation in der sekundären Antikörperlösung erfolgte über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Danach wurde die Membran dreimal mit 1x PBS für je 15 Minuten gewaschen.

Die Detektion der gebundenen sekundären Antikörper erfolgte über Chemilumineszenz, welche durch Luminolspaltung durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettich-Peroxidase hervorgerufen wurde. Hierfür wurde die Membran in einer selbsthergestellten „Enhancing Chemiluminescence“-Lösung (ECL-Lösung), die aus 1 ml ECL-Lösung 1, 100 µl ECL-Lösung 2 und 0,5 µl H₂O₂ bestand, für wenige Minuten inkubiert. Für einen sensitiveren Nachweis wurde gegebenenfalls statt der ECL-Lösung SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate verwendet. Zur Detektion wurde ein Röntgenfilm auf die Membran aufgelegt. Dieser wurde daraufhin in Entwicklerlösung und Fixierlösung gegeben.

2.2.1.6. Immunzytochemie

Für immunzytochemische Analysen wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert, welche vor dem Splitten in frische 10 cm-Schalen gegeben wurden. Die Deckgläschen wurden nach Kultivierung der Zellen in eine 24-Well-Platte überführt, mit 1x PBS gewaschen und danach für 10 Minuten mit 4 % PFA fixiert. Anschließend erfolgten drei Waschschrte mit 1x PBS für je 5 Minuten und eine Inkubation in Blocklösung (ICC) für 25 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Deckgläschen über Nacht bei

4 °C in primärer Antikörperlösung (ICC) inkubiert. Die Platte wurde hierzu mit einem Paraffinstreifen abgedichtet in den Kühlschrank gestellt. Am nächsten Tag wurde die primäre Antikörperlösung abgenommen und die Deckgläschen dreimal 5 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper abgedeckt für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgten drei Waschschrte mit 1x PBS für je 5 Minuten. Daraufhin wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Fluorescent Mounting Medium auf Objektträger aufgelegt.

2.2.2. „Ex vivo“ Versuche

2.2.2.1. Vorbereitung der DNA-Lösungen für „ex vivo“ Elektroporation

Für die „ex vivo“ Elektroporation wurde 30 µg Plasmid-DNA in 60 µl 1x PBS gelöst und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Das benötigte Medium in unten stehender Zusammensetzung wurde frisch hergestellt und maximal 1-2 Tage im Kühlschrank aufbewahrt.

Tabelle 16 Medien für die Verwendung in der „ex vivo“ Elektroporation

| Komponente | Medium <u>mit</u> FCS | Medium <u>ohne</u> FCS |
|-------------------|------------------------------|-------------------------------|
| DMEM/F12 | 36 ml | 40 ml |
| FCS | 4 ml | - |
| 100x P/S/G | 400 µl | 400 µl |
| 1000x Insulin | 40 µl | 40 µl |

FCS = fetales Kälberserum; P/S/G = L-Glutamin mit Penicillin/Streptomycin.

2.2.2.2. Netzhautpräparation

Die Elektroporation erfolgte in murinen Netzhäute von *Rs1h*^{-/-}-Mäusen, welche in den ersten 24 Stunden nach Geburt (postnataler Tag 0 = p0) entnommen wurden. Es wurde dabei stets darauf geachtet, drei oder mehr Jungtiere bei der Mutter zu lassen. Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet. Anschließend wurden die Augen frei präpariert, mit einer gebogenen Pinzette entnommen und in eine Schale mit FCS-freiem Medium überführt. Unter dem Mikroskop wurde danach die Netzhaut einschließlich Linse herauspräpariert (71,72).

2.2.2.3. „Ex vivo“ Elektroporation

Die „ex vivo“ Elektroporation erfolgte nach Matsuda und Cepko 2004 und 2008 (71,72). Die Elektroporationskammer wurde zunächst an den Elektroporator (ECM 830

Electrosquare Porator BTX Harvard Apparatus) angeschlossen, dann die einzelnen Kammern mit den jeweiligen Elektroporations-Cocktails gefüllt. Nicht benötigte Kammern wurden mit 1x PBS aufgefüllt. Im Anschluss daran wurden die Netzhäute so in den Kammern platziert, dass sie mit der Linse an der mit dem Pluspol verbundenen Seite festklebten (Abbildung 7). Pro Kammer konnten maximal drei Netzhäute gleichzeitig elektroporiert werden. Die Elektroporation erfolgte mit den folgenden Einstellungen: Modus: LV; Stromspannung: 30 V; Anzahl der Pulse: 5; Intervalle: 950 ms; Polarität: unipolar.

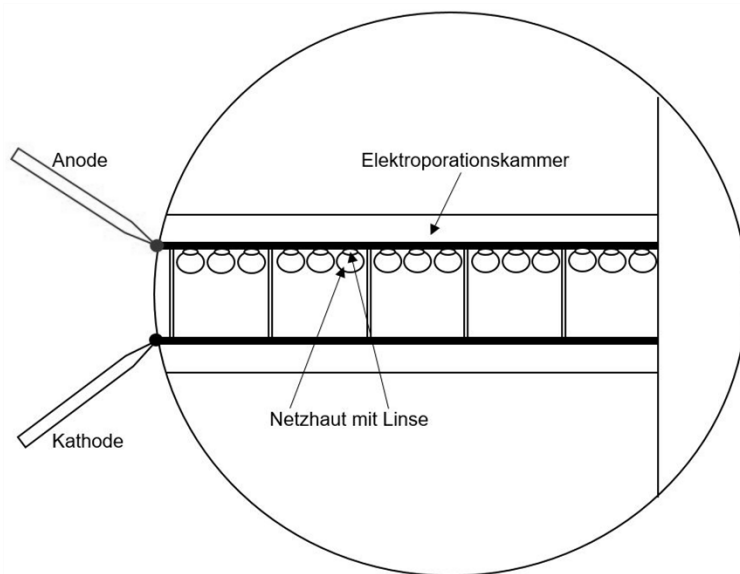


Abbildung 7 Aufbau der Elektroporationskammer: In der Mitte sind die einzelnen Kammern zu sehen, in denen je drei Netzhäute gleichzeitig elektroporiert werden können. Links sind die Anschlussstellen für Anode und Kathode gezeigt. Die Netzhäute werden für die Elektroporation mit der Linse an der Anodenseite positioniert.
Abbildung: eigene Darstellung.

Nach erfolgter Elektroporation wurden die Netzhäute mit Hilfe einer Pinzette je Konstrukt in eine Schale mit FCS-freiem Medium überführt. 10 Minuten später folgte der Transfer in Medium mit FCS. Dann wurde eine 6-Well-Platte vorbereitet, indem in jedes benötigte Well (1 Well für je 3 mit demselben Konstrukt behandelten Netzhäute) 3 ml Medium mit FCS sowie ein darauf schwimmender Whatman Filter gegeben wurde. Nun wurden je 3 Netzhäute getrennt voneinander auf dem Filter platziert und mit einem Tropfen Medium überschichtet. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C für 8 Tage.

2.2.2.4. Fixierung und Einbetten der Netzhäute

Am 8. Tag wurde das Medium abgezogen, die Netzhäute vom Filter gespült und in 1x PBS für 5 Minuten gewaschen. Danach wurden sie für 25 Minuten mit 4 % PFA fixiert. Anschließend erfolgten zwei weitere Waschschrte mit 1x PBS für je 5 Minuten.

Darauf wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 10-facher Vergrößerung Aufsichtsbilder („Flat Mount“ Bilder) aufgenommen. Dies diente zur Kontrolle einer erfolgreichen Elektroporation anhand der GFP-Signale. Hierfür wurden die Netzhäute mit der Linse nach unten auf einem Objektträger platziert. Als Abstandshalter lag in jeder Ecke ein Glasstückchen, so dass das Deckgläschen die Netzhäute nicht zerdrückte.

Nach den Aufnahmen wurden die Netzhäute mit 3 ml 30 % Saccharose-Lösung in Glasgefäße mit Schraubdeckel überführt. Diese wurden mit Alufolie umwickelt, um die Netzhäute möglichst wenig Licht auszusetzen. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht auf einem Schüttler bei Raumtemperatur. Am folgenden Tag wurden 3 ml O.C.T. tissue tek hinzugegeben und die Gefäße für weitere 2 Stunden auf dem Schüttler platziert. Daraufhin wurde sämtliche Flüssigkeit entfernt und die Netzhäute in 3 ml O.C.T. tissue tek für die folgenden 2 Stunden inkubiert. Zuletzt erfolgte die Einbettung der Netzhäute mit O.C.T. tissue tek in Einbettwürfeln. Diese wurden zum Durchfrieren auf Trockeneis positioniert und im Anschluss daran bei -80 °C gelagert.

2.2.2.5. Kryoschnitte

Für Kryoschnitte wurde der Kryostat Leica CM1850 verwendet. Pro Objektträger wurden drei Netzhautschnitte mit einer Schnittdicke von 10 µm aufgenommen. Diese wurden dann bei -80 °C bis zur immunhistochemischen Färbung aufbewahrt.

2.2.2.6. Immunhistochemie

Für die Färbung wurden ausgewählte Netzhautschnitte aufgetaut und anschließend mit Roti Liquid Barrier Lösung umgrenzt. Nachdem die Netzhäute mit 1x PB angefeuchtet wurden, wurden sie für 30 Minuten bei Raumtemperatur in Blocklösung (IHC) inkubiert. Als nächstes wurden die Schnitte über Nacht im Kühlschrank in der primären Antikörperlösung (IHC) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten drei Waschschrte mit 1x PB für je 5 Minuten. Danach wurde die sekundäre Antikörperlösung (IHC) zugegeben und für 30 Minuten abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrten mit 1x PB für je 5 Minuten wurden die Schnitte mit Fluorescent Mounting Medium überschichtet und mit einem Deckglas abgedeckt.

2.2.3. *In vivo* Versuche

Die im folgenden durchgeführten Tierversuche wurden zuvor von der Regierung der Oberpfalz genehmigt (Antragsteller: Prof. Dr. Bernhard Weber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg; Kurzbezeichnung: „XLRG-Gentherapie“; Aktenzeichen 54-2432.1-27/12; Antrag vom 06.06.2012).

2.2.3.1. Vorbereiten der DNA-Lösungen für *in vivo* Elektroporation

Für den *in vivo* Elektroporations-Cocktail wurden 200 µg DNA in 50 µl 1x PBS gelöst (Endkonzentration DNA: 4 µg/µl) und mit 0,1 % grünem Indikator (Fast Green Tracer) versetzt.

2.2.3.2. Injektion

Für die *in vivo* Versuche wurden *Rs1h^Y*-Mäuse innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt (p0) verwendet. Die Injektionen wurden von Dr. Marcus Karlstetter (Institut für Experimentelle Immunologie des Auges, Universitätsklinikum Köln) am Institut für Humangenetik, Universität Regensburg, durchgeführt.

Als erstes wurden die Tiere für einige Minuten narkotisiert und das Auge mit Kerakain-Augentropfen anästhesiert. Dann wurde das Augenlid mit einem mit 70 % Ethanol befeuchteten Wattestäbchen abgewischt. Mit einer 30 G ½ Nadel erfolgte die Öffnung des Lidspaltes. Daraufhin konnte die Haut so gespannt werden, dass das Auge gut sichtbar war. Als nächstes wurde mit der Spitze der 30 G ½ Nadel ein kleiner Einschnitt in die Sklera nahe der Hornhaut gestochen. Wichtig hierbei war, dass die Nadelspitze durch die Linse sichtbar war, aber nicht an die Netzhaut heranreichte. Daraufhin konnte die Hamilton Injektionsnadel durch den Einschnitt ins Auge geführt werden. Sobald die Injektionsnadel durch die Netzhaut den subretinalen Raum erreicht hatte, war ein Widerstand spürbar und durch die Linse ein leichtes Nachgeben des Auges sichtbar. Nun wurden ca. 0,5 µl des Elektroporations-Cocktails injiziert. Wenn die Injektion erfolgreich war, konnten injizierte von nicht-injizierten Stellen der Netzhaut anhand des grünen Indikators im Elektroporations-Cocktail unterschieden werden.

2.2.3.3. *In vivo* Elektroporation

Die *in vivo* Elektroporation wurde modifiziert nach Matsuda und Cepko, 2004 und 2008, durchgeführt (71,72). Um die Kontaktfläche zwischen Elektrode und Maus zu vergrößern, wurden die Elektroden kurz in 1x PBS getaucht und überschüssige

Flüssigkeit danach abgeschüttelt. Mit den Elektroden wurde der Kopf der Maus mit sanftem Druck umfasst. Dabei wurde die markierte Positivelektrode auf der injizierten Seite platziert, um die DNA aus dem subretinalen Raum in die Netzhaut zu elektroporieren. Folgende Einstellungen am Elektroporator wurden verwendet: Modus: LV; Stromspannung: 80 V; Pulslänge: 50 ms; Anzahl der Pulse: 5; Intervalle: 950 ms; Polarität: unipolar.

Anschließend wurde die Maus unter einer Infrarot-Wärmelampe aufgewärmt und das Augenlid mit einer antibiotika- und kortisonhaltigen Augensalbe (Isoptomax) zur Infektionsprophylaxe sowie zum Vermeiden potentieller Schmerzen bestrichen. Nach ausreichender Erholung konnte die Maus zurück zur Mutter gesetzt werden.

2.2.3.4. Fixierung und Einbetten der Augen 4 und 12 Wochen nach Elektroporation

Nach 4 bzw. 12 Wochen wurden die Tiere mit CO₂-Vergasung und anschließendem Genickbruch getötet. Die Augenentnahme erfolgte mit einer gebogenen Pinzette oder einer gebogenen Schere. Zum Abwaschen von Blutresten wurden die Augen in Eppendorf Cups mit 500 µl 1x PBS gegeben. Anschließend wurde das 1x PBS entfernt und die Augen in 500 µl 4 % PFA für eine Stunde fixiert. Danach erfolgten drei Waschschriffe mit je 500 µl 1x PBS für jeweils 10 Minuten. Als nächstes wurde 18 % Saccharose-Lösung dazugegeben und die Augen darin für 1-2 Stunden inkubiert. Zuletzt erfolgten nochmals drei Waschschriffe mit je 500 µl 1x PBS für jeweils 10 Minuten. Zum Einbetten wurde O.C.T. tissue tek in die Einbettwürfel gegeben und daraufhin die Augen mit einer Pinzette am Sehnerv in den Einbettwürfel überführt und in eine waagrechte Position gebracht. Auf Trockeneis positioniert konnte der Würfel durchfrieren und wurde dann bei -80 °C gelagert. Von den eingebetteten Augen wurden Kryoschnitte (siehe 2.2.2.5) und anschließend immunhistochemische Analysen (2.2.2.6) durchgeführt.

2.2.3.5. Zählung der Zapfen

Als Merkmal für den Zustand der Netzhaut wurde die Anzahl der Zapfen herangezogen. Dafür wurden die Kryoschnitte mit PNA gefärbt. Mit dem Programm Image J wurde zunächst der Bildausschnitt auf die Photorezeptorschicht begrenzt. Durch einen Filter konnten alle Punkte über einer bestimmten Größe, die auch optisch als Zapfen identifiziert wurden, markiert und ausgezählt werden (Abbildung 8). Von

einem Netzhautschnitt wurden sämtliche Abschnitte unter dem Mikroskop abfotografiert und mit Image J ausgezählt. Aus den daraus gewonnen Zahlen erfolgte die Darstellung in Diagrammen mittels GraphPad Prism.

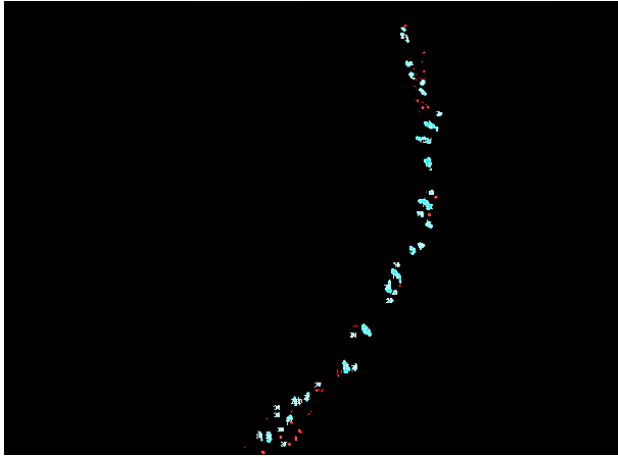


Abbildung 8 **Zählung der Zapfen mittels Image J.** Die im Netzhautabschnitt mit PNA gefärbten Zapfen wurden von Image J ab einer vorgegebenen Größe identifiziert, farblich markiert und ausgezählt. In diesem Beispiel wurden 37 Zapfen markiert und ausgezählt.

2.2.3.6. Schisisbestimmung

Zur Ermittlung der Schisis wurden die immunhistochemisch-gefärbten Bilder verwendet und die Netzhautschisis optisch in 10 %-Schritten zwischen 0 % und 100 % eingeteilt (beispielhaft dargestellt in Abbildung 9). Dabei entsprach 0 % keiner sichtbaren Schisis und 100 % kompletter Schisis, d.h. keiner sichtbaren Adhäsion zwischen den Netzhautschichten. Diese Werte wurden dann wiederum mittels GraphPad Prism in Diagramme übertragen.

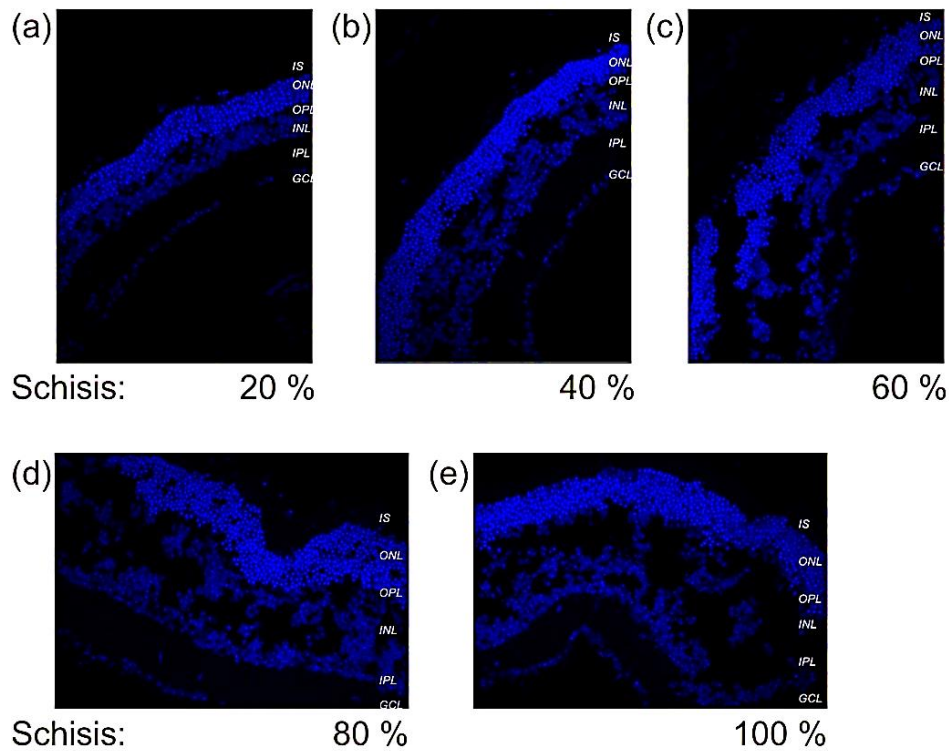


Abbildung 9 **Einteilung der Schisis zwischen 0 % und 100 %**. Hier beispielhaft 5 DAPI gefärbte Netzhautschnitte von *Rs1h^{-Y}*-Netzhautabschnitten mit einer Schisis von 20 % (a), 40 % (b), 60 % (c), 80 % (d) und 100 % (e).

2.2.3.7. Messung der Photorezeptordegeneration

Zur Ermittlung der Photorezeptordegeneration wurde die äußere Körnerschicht (ONL) vermessen. In die Messungen wurden nur behandelte Netzhautstellen (ersichtlich anhand des GFP-Signals) eingeschlossen. Die erhobenen Daten wurden pro Konstrukt, Zeitpunkt und Maus gemittelt und mittels GraphPad Prism in Diagrammen dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Darstellung der verwendeten Konstrukte

In dieser Arbeit sollten erste Untersuchungen zu einem gentherapeutischen Ansatz zur Behandlung der XLRS vorgenommen werden. In diesem Ansatz soll *RS1* in der Netzhaut heterolog unter der Kontrolle der Zell-spezifischen regulatorischen Elemente des *RS1*-Gens exprimiert werden. Für die Vorversuche wurden verschiedene *RS1*-Expressionsvektoren und Kontrollvektoren verwendet. Als Kontrolle diente ein *GFP*-Expressionsvektor. Hier wurde die kodierende Sequenz von *GFP* unter die Kontrolle des CMV-Promotors gestellt (pcDNA3_GFP, Abbildung 10 (a)). In diesen Vektor wurden verschiedene *RS1*-Expressionskassetten eingefügt, wobei das koexprimierte *GFP* zur Transfektions- und Elektroporationskontrolle herangezogen werden konnte.

In der ersten *RS1*-Expressionskassette wurde die kodierende Sequenz von *RS1* unter die Kontrolle des murinen Opsin-Promotors gestellt (Abbildung 10 (b)). Der hieraus entstandene Vektor, pcDNA3_mOPS-*RS1*, diente als Positivkontrolle, da unter Verwendung dieses *RS1*-Expressionskonstruktes eine gentherapeutische Behandlung im Mausmodell bereits erfolgreich war (63,66).

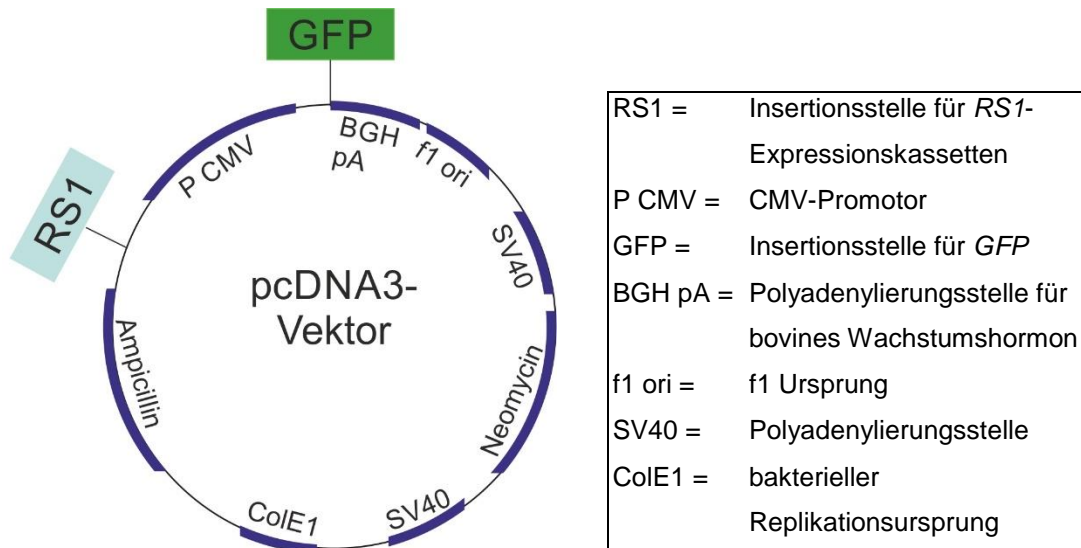
Die zweite *RS1*-Expressionskassette war diejenige, welche zu ihrer möglichen Verwendung bei der gentherapeutischen Behandlung an XLRS-Patienten getestet werden sollte (Abbildung 10 (c)). Sie enthielt die von Kraus et al. (32) identifizierten regulatorischen Elemente des humanen *RS1*-Gens sowie die kodierende Sequenz von *RS1* in nachfolgender Zusammensetzung. Die stromaufwärts gelegene CpG-Insel wurde direkt vor den *RS1*-Minimalpromotor gesetzt. Um die im Intron 1 gelegenen regulatorischen Elemente an physiologischer Position einzubringen, wurde das Intron 1 zwischen Exon 1 und Exon 2 belassen, die anderen Exone folgten ohne weitere Introne entsprechend der kodierenden Sequenz. Der pcDNA3_GFP-Vektor, in den diese Kassette eingebracht wurde, wurde pcDNA3_natives-*RS1* genannt.

Die dritte *RS1*-Expressionskassette war identisch zur zweiten, enthielt jedoch zusätzlich einen N-terminalen Myc-Tag, welcher direkt im Anschluss an das Signalpeptid eingefügt wurde (Abbildung 10 (d)). Dadurch könnte in späteren Versuchen an wildtypischen Mäusen oder Rhesusaffen zwischen eingebrachtem und

endogenem Retinoschisin unterschieden werden. Der mit dieser Expressionskassette versehene pcDNA3_GFP-Vektor wurde pcDNA3_Myc-RS1 genannt.

Diese Vektoren wurden bereits zuvor am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg generiert.

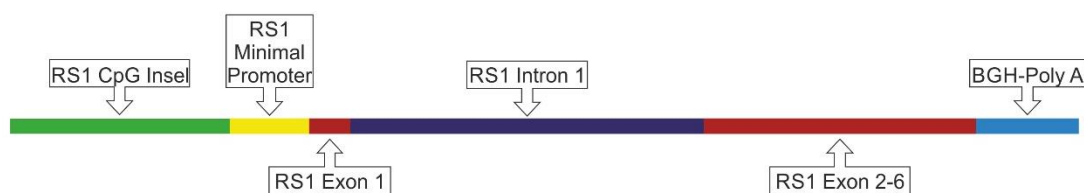
(a) Grundgerüst pcDNA3_GFP:



(b) pcDNA3_mOPS-RS1:



(c) pcDNA3_natives-RS1:



(d) pcDNA3_Myc-RS1:

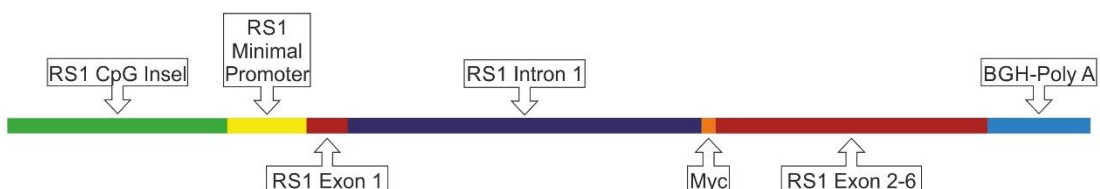


Abbildung 10 **Schematische Darstellung der verwendeten Vektorkonstrukte.** Das Grundgerüst pcDNA3_GFP (a) enthält die kodierende Sequenz für *GFP* unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Der Vektor pcDNA3_mOPS-RS1 (b) enthält eine *RS1*-Expressionskassette, bei welcher das *RS1*-Gen unter der Kontrolle des murinen Opsin-Promotors steht. Der Vektor pcDNA3_natives-RS1 (c) enthält eine *RS1*-Expressionkassette, in welcher die kodierende Sequenz von *RS1* unter der Kontrolle der von Kraus et al. (32) identifizierten regulatorischen Elemente steht.

Der Vektor pcDNA3_Myc-RS1 (d) enthält dieselbe *RS1*-Expressionskassette, bei welcher *RS1* jedoch zusätzlich mit einem N-terminalen Myc-Tag in Exon 2 versehen wurde. Alle *RS1*-Expressionskassetten enthalten eine BGH-Polyadenylierungssequenz (BGH-Poly A) hinter dem Stopcodon des *RS1*.

Im ersten Versuchsteil wurden die Vektorkonstrukte mit den *RS1*-Expressionskassetten zunächst in Zellkultur an verschiedenen retinalen (661W, Y-79) und nicht-retinalen (HEK293) Zelllinien getestet (*in vitro*). Zusätzlich wurde die Induzierbarkeit der *RS1*-Expression durch den Photorezeptor-spezifischen Transkriptionsfaktor *CRX* überprüft (33).

Im nächsten Schritt wurden die Vektorkonstrukte in murinen Netzhautexplantaten getestet. Dazu wurden die Konstrukte in explantierte Netzhäute von *Rs1h^Y*-Mäuse elektroporiert und nach 8-tägiger Inkubation auf *RS1*-Expression überprüft („*ex vivo*“). Im dritten Versuchsteil wurden die Vektorkonstrukte an lebenden *Rs1h^Y*-Mäuse getestet (*in vivo*). Dabei galt es zu überprüfen, ob nach einer einmaligen Behandlung im Mausauge eine längerfristige *RS1*-Expression ausgehend von dem neuartigen *RS1*-Expressionskonstrukt und somit letztlich ein anhaltender Behandlungserfolg erzielt werden kann. Außerdem sollten Unterschiede in *RS1*-Expression und Behandlungserfolg zwischen dem neuen *RS1*-Gentherapiekonstrukt (pcDNA3_natives-RS1) und dem schon getesteten pcDNA3_mOPS-RS1, bei welchem *RS1* unter der Kontrolle des murinen Opsin-Promotors steht, ermittelt werden.

3.2. Expressionsanalyse in Zelllinien (*in vitro* Versuche)

Die *RS1*-Expression der verschiedenen *RS1*-Expressionskassetten wurde zunächst an drei Zelllinien, HEK293, 661W und Y-79, getestet. Bei HEK293 handelt es sich um eine humane Nierenzelllinie. 661W ist eine murine und Y-79 eine humane retinale Zelllinie. Die 4 oben genannten Vektoren (pcDNA3-GFP, pcDNA3_mOPS-RS1, pcDNA3-GFP-natives RS1, pcDNA3_Myc-RS1) wurden über Transfektion in HEK293, 661W und Y-79-Zellen eingebracht. Sowohl der murine Opsin-Promotor als auch der *RS1*-Promotor werden durch den retinaspezifischen Transkriptionsfaktor *CRX* aktiviert (33). Dieser wird von 661W- und Y-79-Zellen endogen exprimiert, nicht jedoch von HEK293-Zellen (32). Deswegen wurden in HEK293-Zellen zusätzliche Ansätze durchgeführt, in welchen ein *CRX*-Expressionsvektor (pcDNA4_CRX) kotransfiziert wurde.

Im ersten Schritt wurde der Erfolg der Transfektion anhand der *GFP*-Expression unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Dabei zeigte sich bei den HEK293-Zellen eine Transfektionseffizienz von etwa 70 % (Abbildung 11).

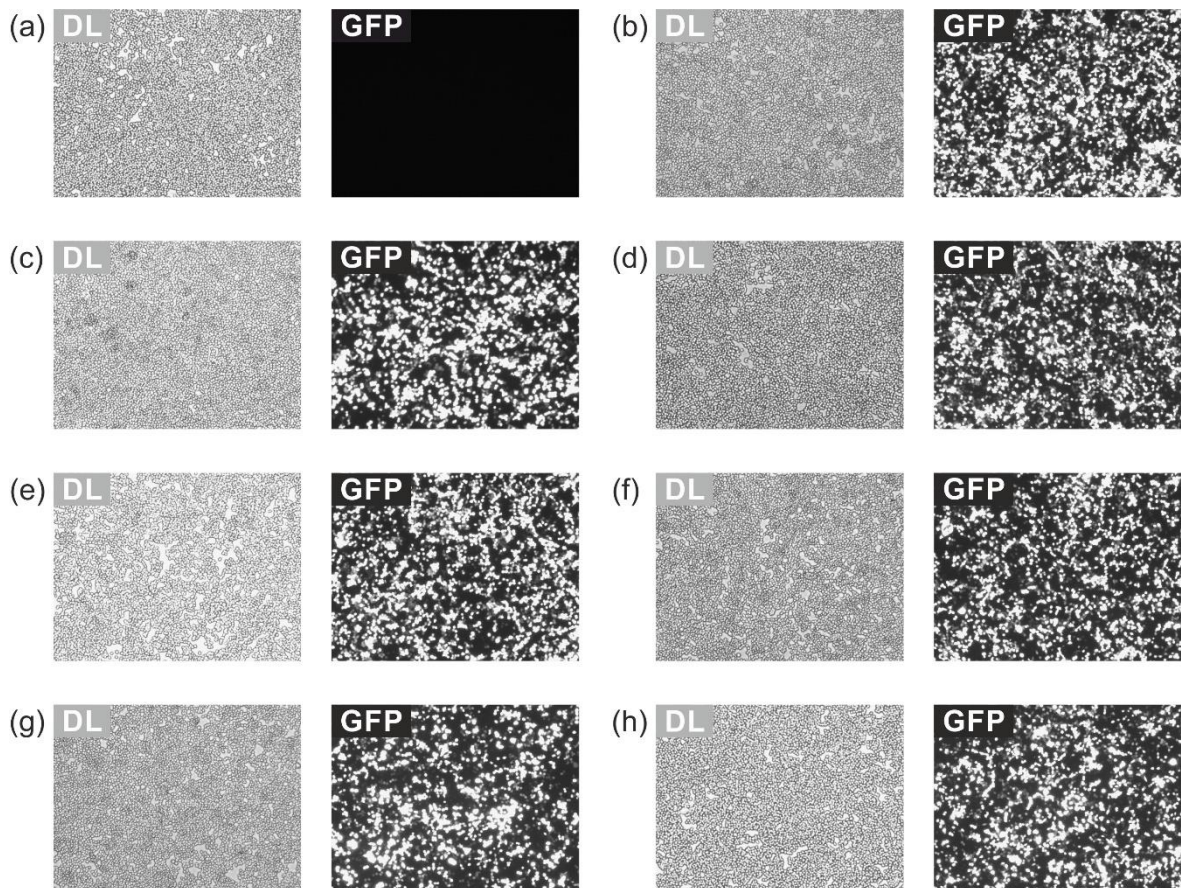


Abbildung 11 **Kontrolle des Transfektionserfolgs in HEK293-Zellen**, die nicht transfiziert wurden (a), mit pcDNA3_GFP + pcDNA4_CRX (b), pcDNA3_mOPS-RS1 (c), pcDNA3_mOPS-RS1 + pcDNA4_CRX (d), pcDNA3_natives-RS1 (e), pcDNA3_natives-RS1 + pcDNA4_CRX (f), pcDNA3_Myc-RS1 (g), pcDNA3_Myc-RS1 + pcDNA4_CRX (h) transfiziert wurden. Anhand der *GFP*-Expression (weiß leuchtende Zellen in den rechten Teilbildern von (a-h)) konnte die Transfektionseffizienz unter dem Mikroskop vor dem Ernten der Zellen kontrolliert werden.

DL = Durchlichtaufnahme, *GFP* = grün fluoreszierendes Protein.

Die Transfektionseffizienz der 661W-Zellen (Abbildung 12) und Y-79-Zellen (Abbildung 13) war mit etwa 30 % bzw. 20 % deutlich geringer.

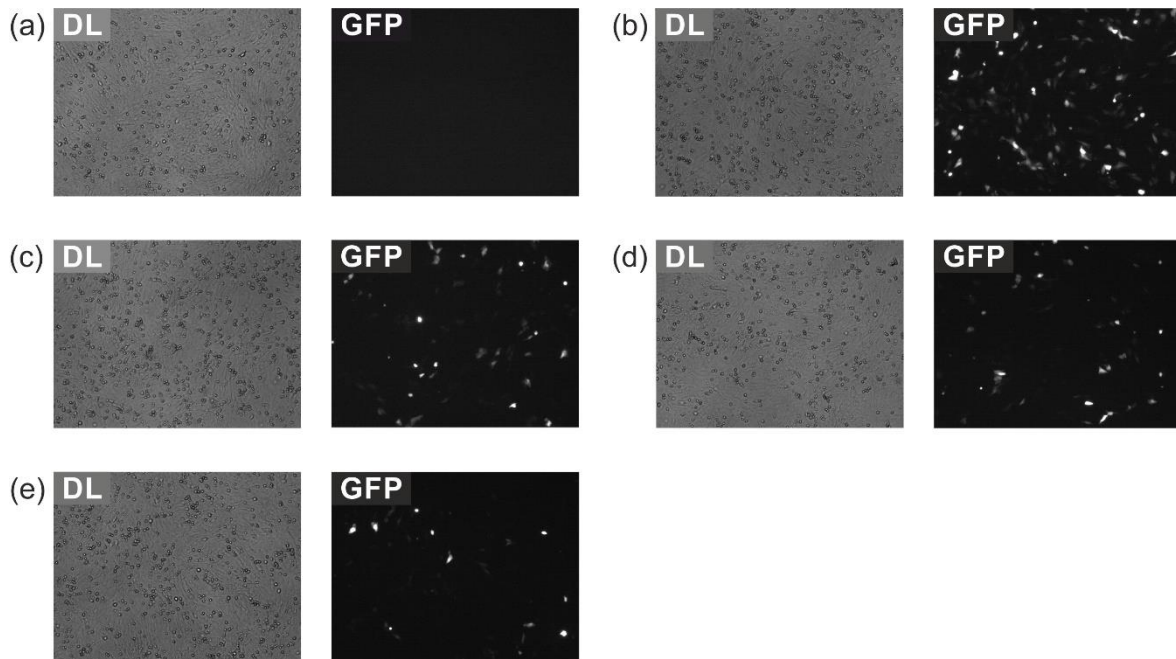


Abbildung 12 **Kontrolle des Transfektionserfolgs in 661W-Zellen**, die nicht transfiziert wurden (a), mit pcDNA3_GFP (b), pcDNA3_mOPS-RS1 (c), pcDNA3_natives-RS1 (d), pcDNA3_Myc-RS1 (e) transfiziert wurden. Anhand der GFP-Expression (weiß leuchtende Zellen in den rechten Teilbildern von (a-e)) konnte die Transfektionseffizienz unter dem Mikroskop vor dem Ernten der Zellen kontrolliert werden. DL = Durchlichtaufnahme, GFP = grün fluoreszierendes Protein.

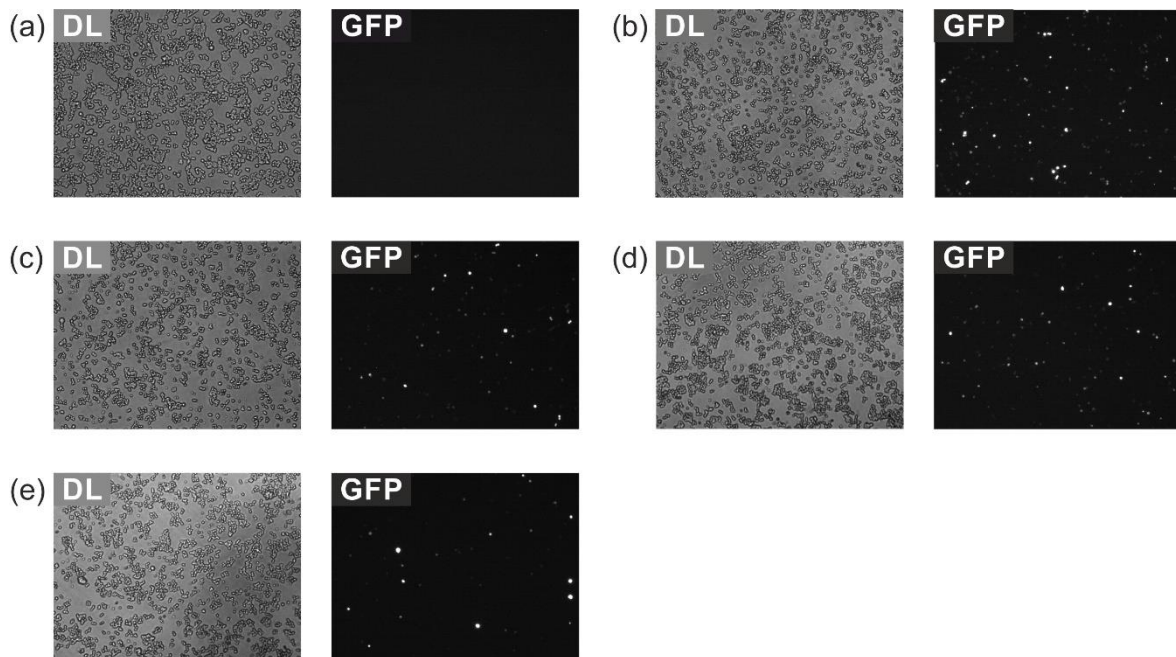


Abbildung 13 **Kontrolle des Transfektionserfolgs in Y-79-Zellen**, die nicht transfiziert wurden (a), mit pcDNA3_GFP (b), pcDNA3_mOPS-RS1 (c), pcDNA3_natives-RS1 (d), pcDNA3_Myc-RS1 (e) transfiziert wurden. Anhand der GFP-Expression (weiß leuchtende Zellen in den rechten Teilbildern von (a-e)) konnte die Transfektionseffizienz unter dem Mikroskop vor dem Ernten der Zellen kontrolliert werden. DL = Durchlichtaufnahme, GFP = grün fluoreszierendes Protein.

Im nächsten Schritt erfolgte an den transfizierten Zellen über Western Blot die Analyse der heterologen RS1-Expression (Abbildung 14). Hierfür wurde im Zellkulturmedium

die Menge an sezerniertem Retinoschisin überprüft. Zur Transfektionskontrolle wurde die intrazelluläre GFP-Menge in den Zellen verfolgt. Eine Färbung gegen β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Bei den HEK293-Zellen wurden in allen Ansätzen, die mit pcDNA3_GFP-Vektoren transfiziert worden waren, starke Signale für GFP erhalten. Dabei wurde festgestellt, dass Zellen, welche zusätzlich mit pcDNA4_CRX kotransfiziert worden waren, geringere Mengen an GFP produzierten. Durch die Kotransfektion wurde also offensichtlich die Transfektionseffizienz der pcDNA3_GFP-Vektoren beeinträchtigt. Retinoschisin wurde in den Überständen aller mit *RS1*-Expressionskonstrukten transfizierter HEK293-Zellen detektiert. Es zeigte sich eine deutliche Steigerung der *RS1*-Expression durch Kotransfektion mit dem *CRX*-Expressionsvektor (Abbildung 14 (a)). Das Molekulargewicht des Myc-getaggen Retinoschisin-Proteins war leicht größer als die Retinoschisin-Bande mit ungetagtem Retinoschisin. Dies zeigt das durch den angehefteten Myc-Tag größere Molekulargewicht des Myc-getagten Retinoschisins.

Auch bei den retinalen Zelllinien 661W (Abbildung 14 (b)) und Y-79 (Abbildung 14 (c)) konnte in allen Ansätzen, die mit pcDNA3_GFP-Expressionsvektoren transfiziert worden waren, GFP nachgewiesen werden. Im Überstand zeigte sich in Ansätzen, die mit *RS1*-Expressionskonstrukten transfiziert worden waren, die erfolgreiche Retinoschisin-Produktion und -Sekretion. Das Molekulargewicht des Myc-getagten Retinoschisin im Ansatz mit pcDNA3_Myc-RS1 war wiederum etwas größer als das des ungetagten Retinoschisins.

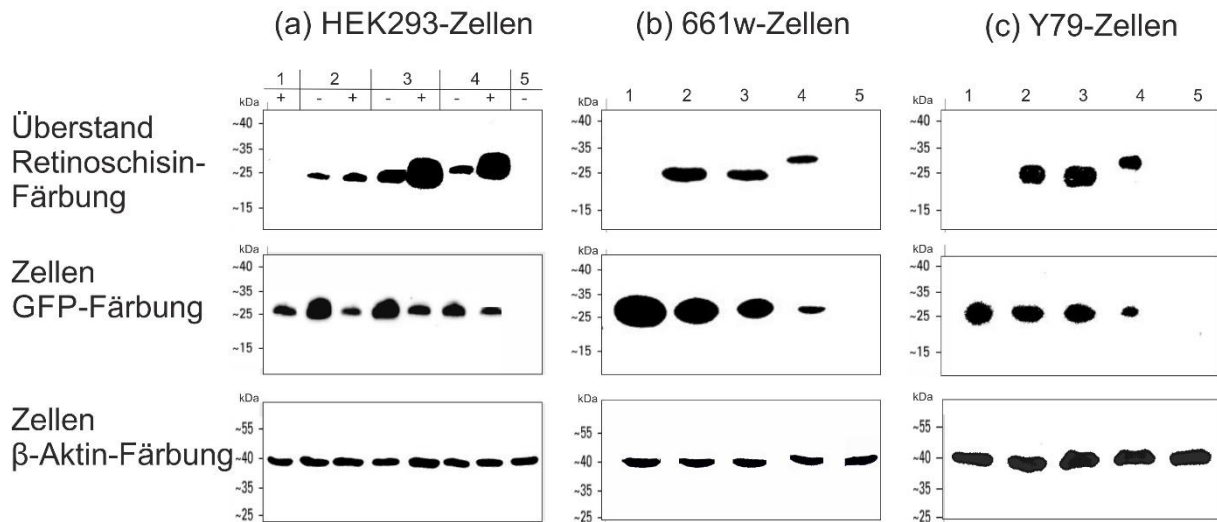


Abbildung 14 **Western Blot Analysen der RS1-Expression ausgehend von verschiedenen RS1-Expressionskonstrukten** HEK293-Zellen (a), 661W-Zellen (b) und Y-79-Zellen (c) wurden mit pcDNA3_GFP (1), pcDNA3_mOPS-RS1 (2), pcDNA3_natives-RS1 (3) und pcDNA3_Myc-RS1 (4) transfiziert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen (5). Da es sich bei den HEK293-Zellen um humane embryonale Nierenzellen handelt, die keine endogene Expression des Transkriptionsfaktors CRX aufweisen, wurden diese mit (+) oder ohne (-) pcDNA4_CRX kotransfiziert. 48 Stunden nach Transfektion erfolgten Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen Retinoschisin und GFP. Als Ladekontrolle diente die β -Aktin-Färbung.

Zusätzlich wurde die heterologe RS1-Expression in HEK293-Zellen mittels Immunzytochemie überprüft (Abbildung 15). Unter dem Mikroskop konnte hier bei allen mit pcDNA3_GFP-Expressionsvektoren transfizierten Zellen eine GFP-Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abbildung 15 (b-h)). In Zellen, die mit den RS1-Expressionsvektoren transfiziert worden waren, zeigten sich nach Färbung mit einem anti-Retinoschisin-Antikörper ebenfalls spezifische Signale (Abbildung 15 (c-h)). Stärkere Retinoschisin-Signale wurden in den Zellen erhalten, die zusätzlich mit dem CRX-Expressionsvektor transfiziert worden waren (Abbildung 15 (d, f, h) im Vergleich zu (c, e, g)).

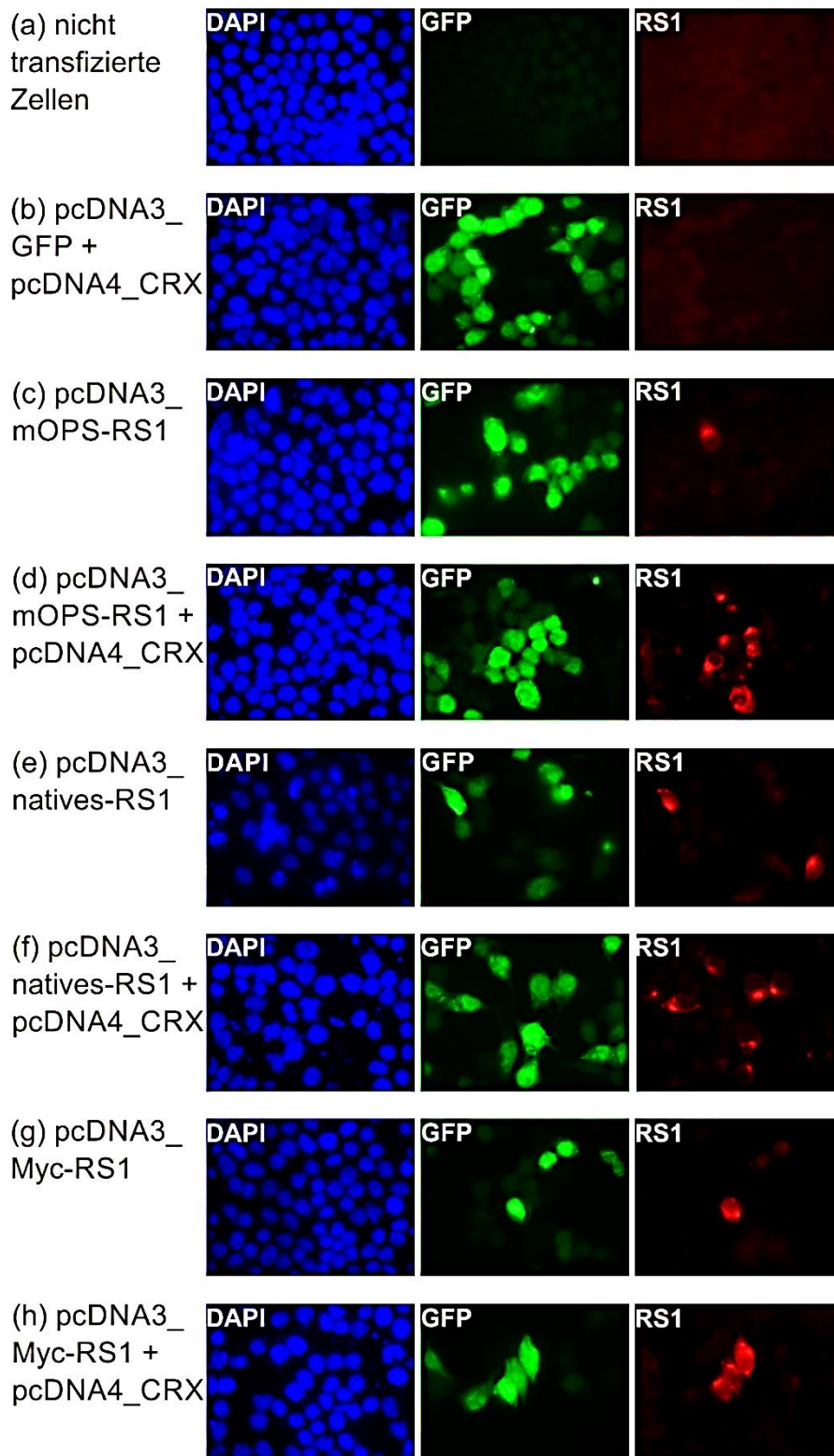


Abbildung 15 **Immunzytochemische Analyse von HEK293-Zellen, die mit den neu generierten RS1-Expressionsvektoren transfiziert worden waren, Retinoschisin-Färbung.** HEK293-Zellen wurden mit verschiedenen Expressionskonstrukten transfiziert. Nach 48 Stunden wurden immunzytochemische Analysen durchgeführt. Als Kontrolle werden unbehandelte HEK293-Zellen (a), sowie mit pcDNA3_GFP + pcDNA4_CRX (b) transfizierte Zellen gezeigt. Zusätzlich wurden die Zellen mit pcDNA3_mOPS-RS1 (c), pcDNA3_mOPS-RS1 + pcDNA4_CRX (d), pcDNA3_natives-RS1 (e), pcDNA3_natives-RS1 + pcDNA4_CRX (f), pcDNA3_Myc-RS1 (g), sowie pcDNA3_Myc-RS1 + pcDNA4_CRX (h) transfiziert. In der ersten Spalte wurden die Zellkerne mit DAPI visualisiert. In der zweiten stellten sich transfizierte Zellen aufgrund der Fluoreszenz von GFP grün dar. Die dritte Spalte zeigt Zellen, die mit dem anti-Retinoschisin-Antikörper markiert sind (rot).

In einer weiteren immunzytochemischen Färbung mit anti-Myc-Antikörpern (Abbildung 16) wurden spezifische Signale in den Zellen erhalten, die mit pcDNA_Myc-RS1 transfiziert worden waren und somit Myc-getagtes Retinoschisin exprimierten (Abbildung 16 (c, d)). Auch hier zeigten sich stärkere Signale in den HEK293-Zellen, die zusätzlich zum pcDNA3_Myc-RS1-Vektor mit dem CRX-Expressionsvektor kotransfiziert worden waren.

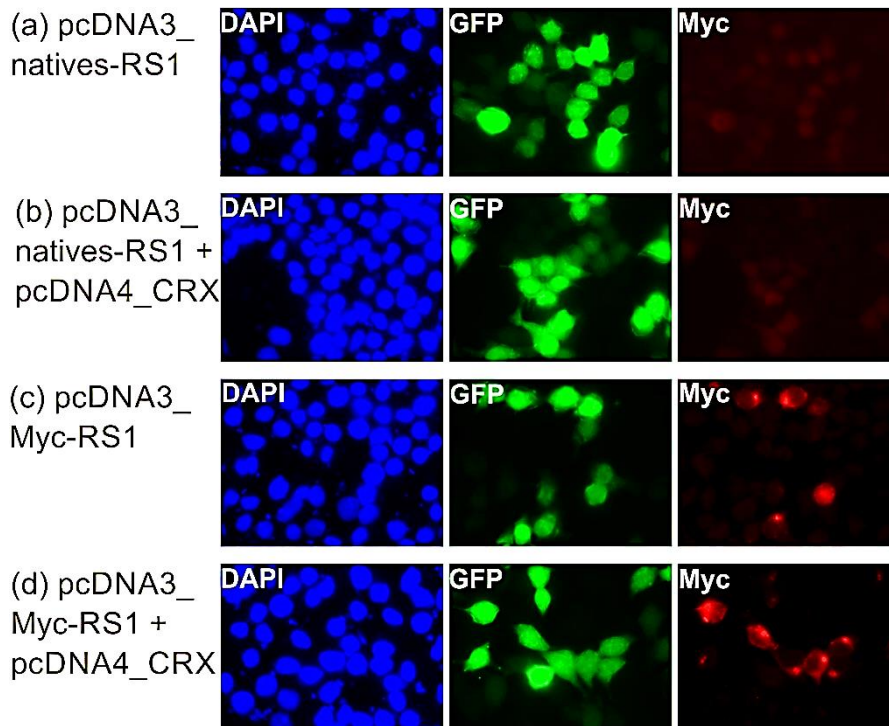


Abbildung 16 **Immunzytochemische Analyse von HEK293-Zellen, die mit den neu generierten RS1-Expressionsvektoren transfiziert worden waren, Myc-Färbung.** HEK293-Zellen wurden mit pcDNA3_natives-RS1 (a), pcDNA3_natives-RS1 + pcDNA4_CRX (b), pcDNA3_Myc-RS1 (c), sowie pcDNA3_Myc-RS1 + pcDNA4_CRX (d) transfiziert. Nach 48 Stunden wurden immunzytochemische Analysen durchgeführt. In der ersten Spalte wurden die Zellkerne mit DAPI visualisiert. In der zweiten stellten sich transfizierte Zellen aufgrund der Fluoreszenz von GFP grün dar. Die dritte Spalte zeigt Zellen, die mit dem anti-Myc-Antikörper markiert sind (rot).

Zusammenfassend deuten die *in vitro* Analysen darauf hin, dass eine heterologe RS1-Expression ausgehend vom neuartigen Gentherapiekonstrukt (pcDNA3_natives-RS1) möglich und nachweisbar ist. Im nächsten Schritt wurde deswegen die Expression in der murinen Netzhaut getestet.

3.3. Expressionsanalyse in explantierten Netzhäuten („ex vivo“ Versuche)

Im folgenden Versuchsteil wurde die *RS1*-Expression ausgehend von den Konstrukten pcDNA3_GFP, pcDNA3_mOPS-RS1, pcDNA3_natives-RS1, pcDNA3_Myc-RS1 in murinen *Rs1h^Y*-Netzhautexplantaten getestet. Für diese Versuche wurde neugeborenen *Rs1h^Y*-Mäusen die Netzhaut entnommen. In diese wurden durch Elektroporation die Konstrukte eingeschleust. Es folgte eine 8-tägige Kultivierung der elektroporierten Netzhautexplantate, welche die heterologe Expression ausgehend von den elektroporierten Expressionskonstrukten ermöglichen sollte (71,72).

Nach 8 Tagen wurde zunächst die Elektroporationseffizienz anhand der GFP-Fluoreszenz kontrolliert. Hierfür wurden Aufsichtsbilder („Flat Mount“ Bilder) auf die Netzhäute am Fluoreszenzmikroskop erstellt. In allen elektroporierten Netzhäute zeigten sich GFP-Signale und somit eine erfolgreiche Elektroporation (beispielhaft gezeigt in Abbildung 17).

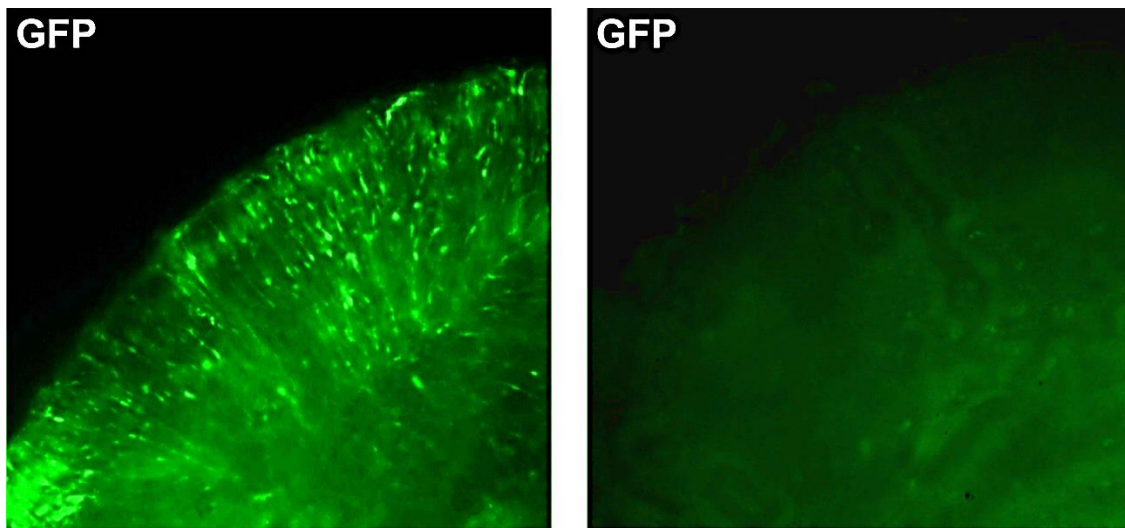


Abbildung 17 **Aufsichtsbild auf zwei *Rs1h^Y*-Netzhäute nach „ex vivo“ Elektroporation.** Murine *Rs1h^Y*-Netzhäute wurden mit pcDNA3_natives-RS1 (links) bzw. mit Kontrolllösung (rechts, Elektroporationscocktail ohne *GFP*-Expressionsvektor) elektroporiert (71,72) und für 8 Tage kultiviert. Im Anschluss erfolgte eine Untersuchung der Elektroporationseffizienz, indem Aufsichtsbilder von der Netzhaut im Fluoreszenzmikroskop erstellt wurden.

Im Anschluss wurden die explantierten Netzhäute eingebettet und Kryoschnitte dieser Explantate immunhistochemisch untersucht. Dabei konnten in keiner der elektroporierten Netzhäute spezifische Retinoschisin-Signale detektiert werden. (Abbildung 18). Es wurde lediglich eine schwache Hintergrundfärbung in allen Explantaten erhalten, die sich jedoch nicht zwischen den kontrollbehandelten

Netzhäuten, die nur mit pcDNA3_GFP elektroporiert worden waren, und den mit den *RS1*-Expressionsvektoren (pcDNA3_mOPS-*RS1*, pcDNA3_natives-*RS1* und pcDNA3_Myc-*RS1*) elektroporierten Netzhäuten unterschieden. Nicht nur ausgehend von den neu generierten *RS1*-Expressionskassetten (pcDNA3_natives-*RS1* und pcDNA3_Myc-*RS1*), sondern auch ausgehend von pcDNA3_mOPS-*RS1* fand keine *RS1*-Expression in den Netzhäuten statt. Die *RS1*-Expression ausgehend von der pcDNA3_mOPS-*RS1*-Expressionskassette wurde zuvor jedoch schon erfolgreich in *Rs1h^Y*-Mäusen gezeigt (16,66). Zur Charakterisierung der Genexpressionsvektoren war die Elektroporation in 0 Tage alte *Rs1h^Y*-Netzhäute also offensichtlich nicht geeignet.

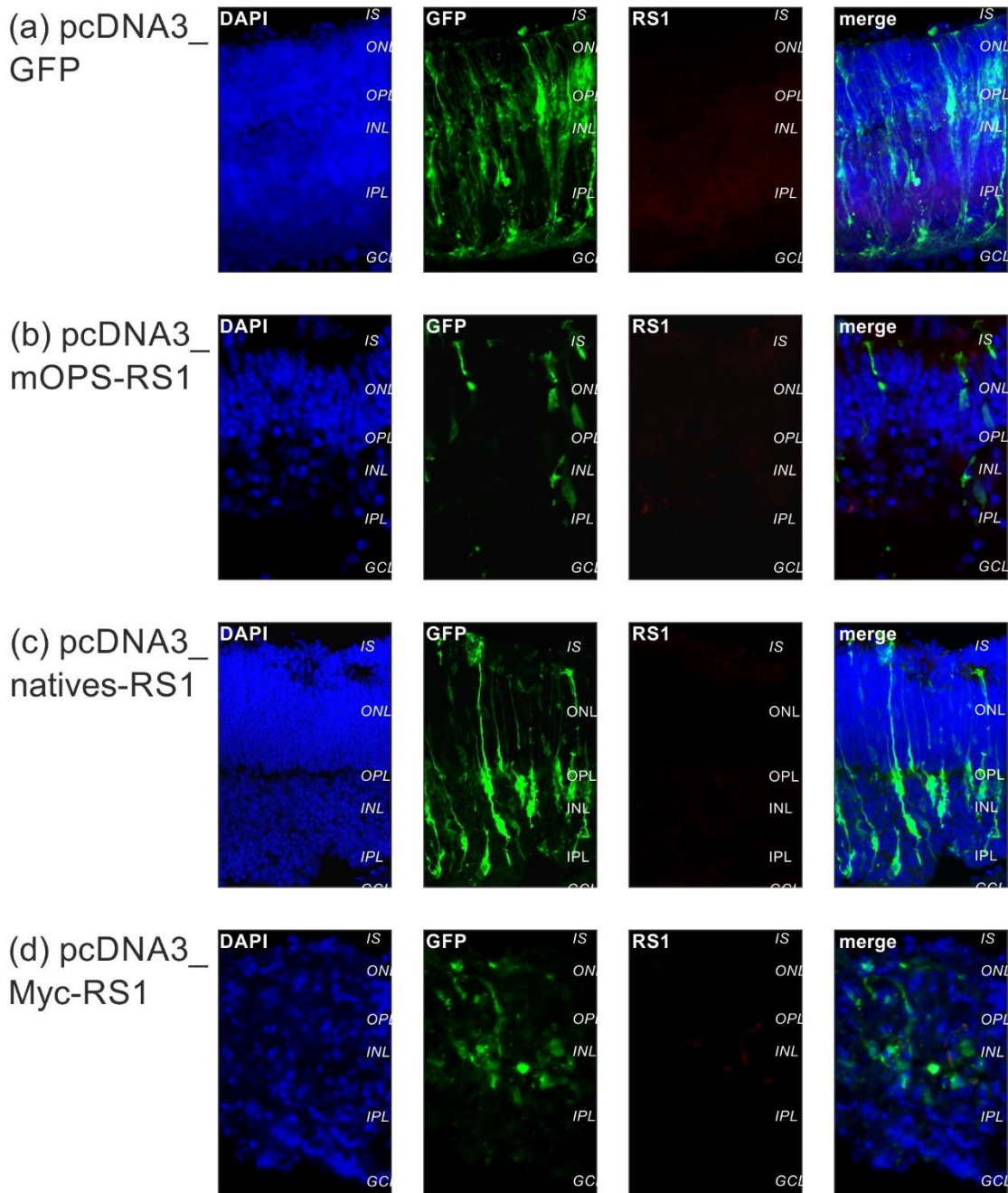


Abbildung 18 **Immunhistochemische Analyse von $Rs1h^Y$ -Netzhäuten nach „ex vivo“ Elektroporation mit verschiedenen RS1-Expressionsvektoren.** Murine $Rs1h^Y$ -Netzhäute wurden mit pcDNA3_GFP (a), pcDNA3_mOPS-RS1 (b), pcDNA3_natives-RS1 (c) und pcDNA3_Myc-RS1 (d) elektroporiert (71,72) und für 8 Tage kultiviert. Im Anschluss wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. In der ersten Spalte wurden die Zellkerne mit DAPI visualisiert. In der zweiten stellten sich transfizierte Zellen aufgrund der Fluoreszenz von GFP grün dar. Die dritte Spalte zeigt die Färbung mit dem anti-Retinoschisin-Antikörper (rot). Die vierte Spalte stellt die übereinander gelagerten Bilder der anderen drei Spalten dar (merge).
 IS = innere Segmente; ONL = äußere Körnerschicht; OPL = äußere plexiforme Schicht; INL = innere Körnerschicht; IPL = innere plexiforme Schicht; GCL = Ganglienzellschicht.

3.4. Expressionsanalyse in $Rs1h^{-Y}$ -Mäusen (*in vivo* Versuche)

Schließlich wurden die Vektoren *in vivo* an $Rs1h^{-Y}$ -Mäusen getestet. Zu diesen Versuchen konnte die Unterstützung von Prof. Dr. Thomas Langmann und Dr. Marcus Karlstetter, Institut für Experimentelle Immunologie des Auges, Universitätsklinikum Köln, gewonnen werden. Mit Hilfe von Dr. Karlstetter wurden die Konstrukte in das Auge neugeborener $Rs1h^{-Y}$ -Mäuse injiziert und elektroporiert. Für die *in vivo* Versuche wurden die Konstrukte pcDNA3_mOPS-RS1 und pcDNA3_natives-RS1 getestet. Pro Zeitpunkt (4 bzw. 12 Wochen nach Elektroporation) und Konstrukt wurden je vier Mäuse behandelt. Nach 4 bzw. 12 Wochen wurden die Tiere getötet und die Augen entnommen, das kontralaterale, nicht-injizierte Auge diente als Kontrolle. Es folgte die immunhistochemische Analyse von Kryoschnitten dieser Augen.

Sowohl nach 4-wöchiger (Abbildung 19) als auch nach 12-wöchiger (Abbildung 20) Behandlung waren in allen behandelten Augen im Gegensatz zu den unbehandelten Augen starke GFP-Signale zu erkennen. Dies zeigt die erfolgreiche Aufnahme der Konstrukte in die Netzhaut mittels Elektroporation.

Bei Augen, die mit pcDNA3_mOPS-RS1 elektroporiert worden waren, zeigten sich nach 4 und 12 Wochen spezifische Retinoschisin-Signale (Abbildung 19 und Abbildung 20). Bei den mit pcDNA3_natives-RS1 behandelten Augen zeigte sich nach 4 Wochen nur ein schwaches Retinoschisin-Signal (Abbildung 19), nach 12 Wochen wurden hier stärkere Signale nachgewiesen, die in etwa mit der Signalintensität in den mit pcDNA3_mOPS-RS1 behandelten Augen vergleichbar war (Abbildung 20). Insgesamt waren die erhaltenen Retinoschisin-Signale jedoch schwach, und konnten in machen Bereichen kaum vom Hintergrund unterschieden werden.

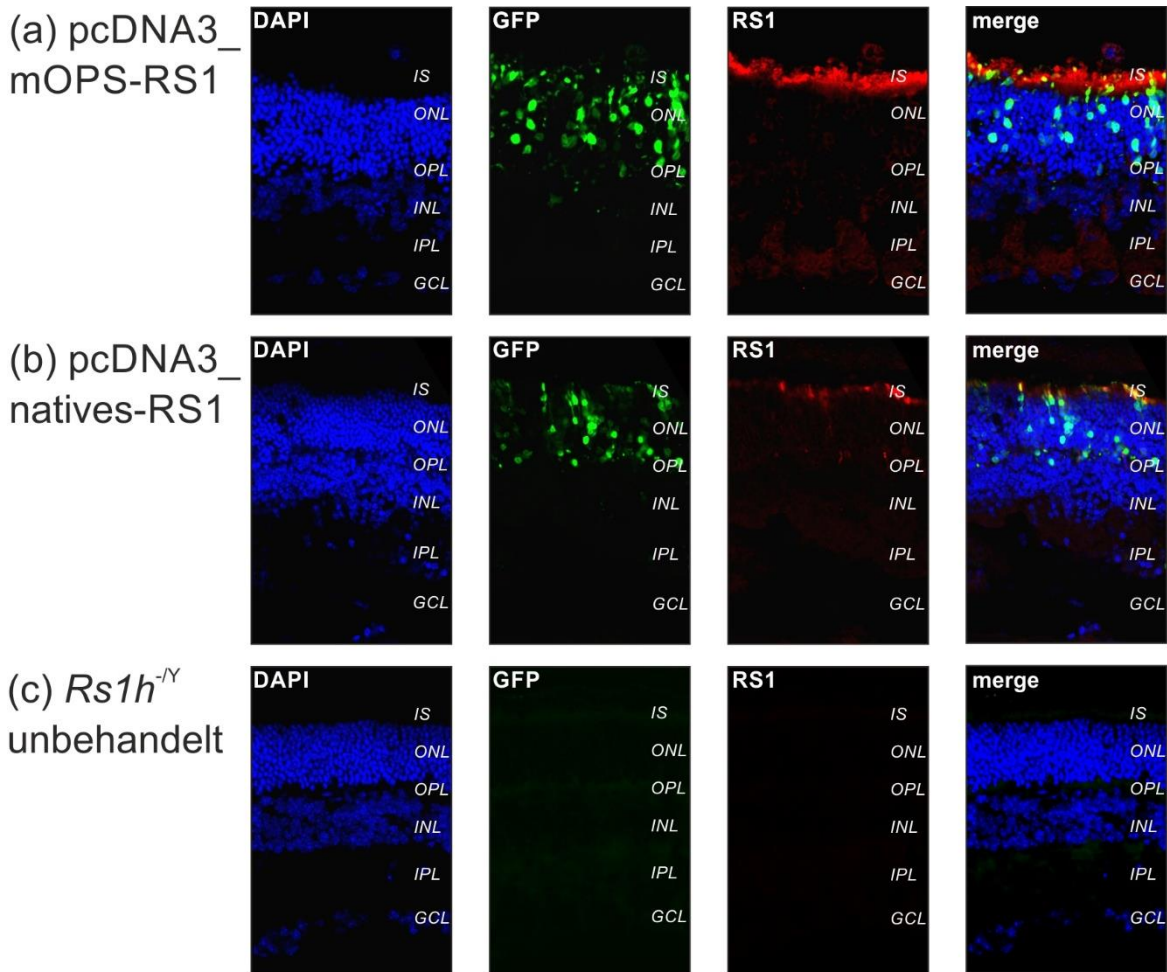


Abbildung 19 Immunhistochemische Analyse zur Ermittlung der heterologen *RS1*-Expression von *Rs1h*^{-Y}-Netzhäuten 4 Wochen nach *in vivo* Elektroporation mit verschiedenen *RS1*-Expressionsvektoren. Murine *Rs1h*^{-Y}-Netzhäute wurden zu p0 *in vivo* mit pcDNA3_mOPS-RS1 (a) und pcDNA3_natives-RS1 (b) elektroporiert. Unbehandelte Augen (c) dienten als Kontrolle. 4 Wochen nach Elektroporation wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. In der ersten Spalte wurden die Zellkerne mit DAPI visualisiert. In der zweiten stellten sich transfizierte Zellen aufgrund der Fluoreszenz von GFP grün dar. Die dritte Spalte zeigt die Färbung mit dem anti-Retinoschisin-Antikörper (rot). Die vierte Spalte stellt die übereinander gelagerten Bilder der anderen drei Spalten dar (merge).

IS = innere Segmente; *ONL* = äußere Körnerschicht; *OPL* = äußere plexiforme Schicht; *INL* = innere Körnerschicht; *IPL* = innere plexiforme Schicht; *GCL* = Ganglienzellschicht.

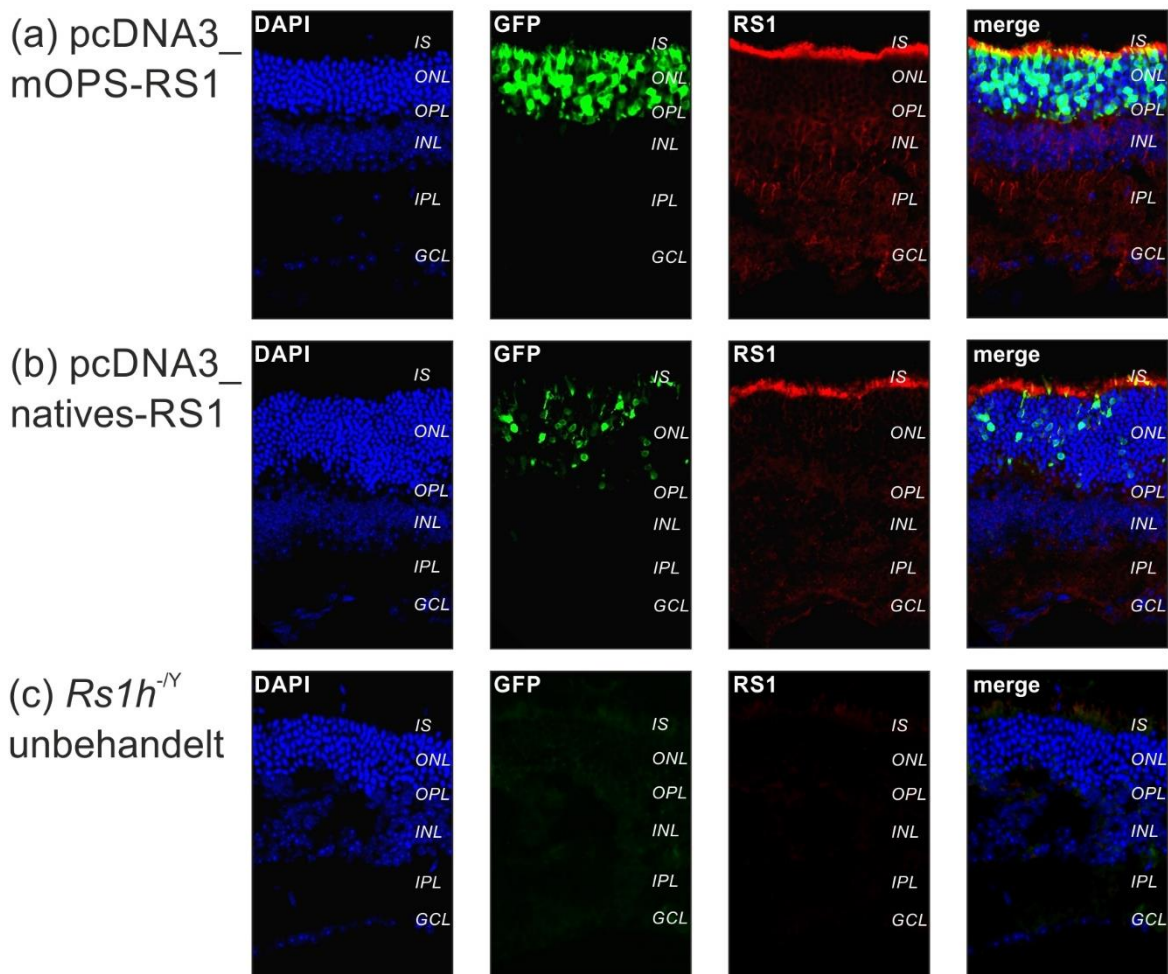


Abbildung 20 **Immunhistochemische Analyse zur Ermittlung der heterologen RS1-Expression von $Rs1h^{Y}$ -Netzhäuten 12 Wochen nach *in vivo* Elektroporation mit verschiedenen RS1-Expressionsvektoren.** Murine $Rs1h^{Y}$ -Netzhäute wurden zu p0 *in vivo* mit pcDNA3_mOPS-RS1 (a) und pcDNA3_natives-RS1 (b) elektroporiert. Unbehandelte Augen (c) dienen als Kontrolle. 12 Wochen nach Elektroporation wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. In der ersten Spalte wurden die Zellkerne mit DAPI visualisiert. In der zweiten stellten sich transfizierte Zellen aufgrund der Fluoreszenz von GFP grün dar. Die dritte Spalte zeigt die Färbung mit dem anti-Retinoschisin-Antikörper (rot). Die vierte Spalte stellt die übereinander gelagerten Bilder der anderen drei Spalten dar (merge).

IS = innere Segmente; ONL = äußere Körnerschicht; OPL = äußere plexiforme Schicht; INL = innere Körnerschicht; IPL = innere plexiforme Schicht; GCL = Ganglienzellschicht.

Da Retinoschisin die Lokalisation der retinalen Na/K-ATPase beeinflusst (73), wurde überprüft, ob auch ein Einfluss der gentherapeutischen Behandlung auf die Na/K-ATPase-Lokalisation detektiert werden kann. Hierfür wurde in den Explantaten die ATP1 β 2-Untereinheit der retinalen Na/K-ATPase immunhistochemisch gefärbt (Abbildung 21). Nach 4-wöchiger Behandlung wurde ein leichter Unterschied in der Na/K-ATPase-Lokalisation zwischen unbehandelten Augen und behandelten Augen detektiert. Insbesondere in den mit pcDNA3_mOPS-RS1 behandelten Augen erschien eine leichte Anreicherung der Na/K-ATPase-Signale in den inneren Segmenten,

wohingegen die Signalintensität in den Kernschichten im Vergleich zu unbehandelten Zellen leicht abnahm. Bei den 12-Wochen alten Tieren war aufgrund der stark fortgeschrittenen retinalen Degeneration auch in elektroporierten Bereichen eine vergleichbare Darstellung der Na/K-ATPase Lokalisation nicht mehr möglich.

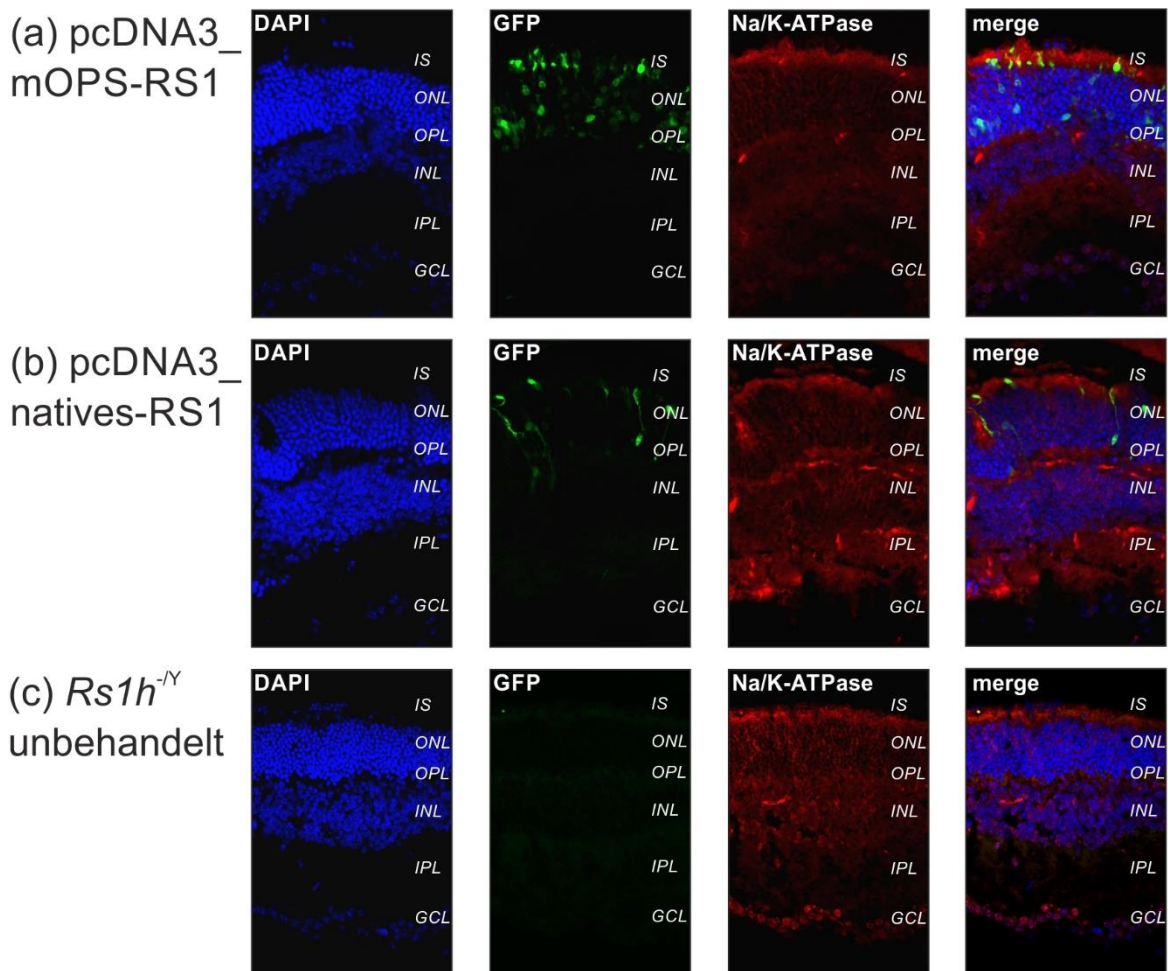


Abbildung 21 **Immunhistochemische Analyse von $Rs1h^{-/-}$ -Netzhäuten zur Bestimmung der Na/K-ATPase-Lokalisation nach *in vivo* Elektroporation mit verschiedenen RS1-Expressionsvektoren.** Murine $Rs1h^{-/-}$ -Netzhäute wurden zu p0 *in vivo* mit pcDNA3_mOPS-RS1 (a) und pcDNA3_natives-RS1 (b) elektroporiert. Unbehandelte Augen (c) dienen als Kontrolle. 4 Wochen nach Elektroporation wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. In der ersten Spalte wurden die Zellkerne mit DAPI visualisiert. In der zweiten stellten sich transfizierte Zellen aufgrund der Fluoreszenz von GFP grün dar. Die dritte Spalte zeigt die Färbung mit dem anti-ATP1 β -Antikörper (rot). Die vierte Spalte stellt die übereinander gelagerten Bilder der anderen drei Spalten dar (merge).

IS = innere Segmente; ONL = äußere Körnerschicht; OPL = äußere plexiforme Schicht; INL = innere Körnerschicht; IPL = innere plexiforme Schicht; GCL = Ganglienzellschicht.

Im nächsten Schritt wurde ein Einfluss der gentherapeutischen Behandlung auf die Photorezeptordegeneration untersucht. Hierfür wurde die Anzahl an Zapfen nach PNA-Färbung ermittelt. Mithilfe des Programms Image J wurden die mit PNA gefärbten Zapfen in einem kompletten Netzhautschnitt ausgezählt. Im Kontrollauge wurde ein

Netzhautabschnitt mit vergleichbarer Entfernung zum Sehnerv wie im behandelten Auge gewählt und ebenfalls die mit PNA gefärbten Zapfen ausgezählt. Aus den gewonnenen Daten wurden die Mittelwerte pro Netzhautschnitt hergenommen und die Ergebnisse aus den einzelnen Versuchsgruppen (3-4 Tiere pro Gentherapievektor plus Kontrollaugen) mit GraphPad Prism zusammengefasst und in Diagrammen dargestellt. Zunächst zeigte sich eine generelle Abnahme der Zapfenzahl bei 12 Wochen alten Tieren im Vergleich zu 4 Wochen alten Tieren (Abbildung 22), was im Einklang mit der fortschreitenden Netzhautdegeneration im *Rs1h^Y*-Mausmodell steht (49).

Erstaunlicherweise wiesen jedoch die behandelten Netzhäute eine geringere Zapfenzahl als die unbehandelten auf (Abbildung 22). Dies deutet auf eine Schädigung der Netzhaut aufgrund der angewandten Behandlung hin.

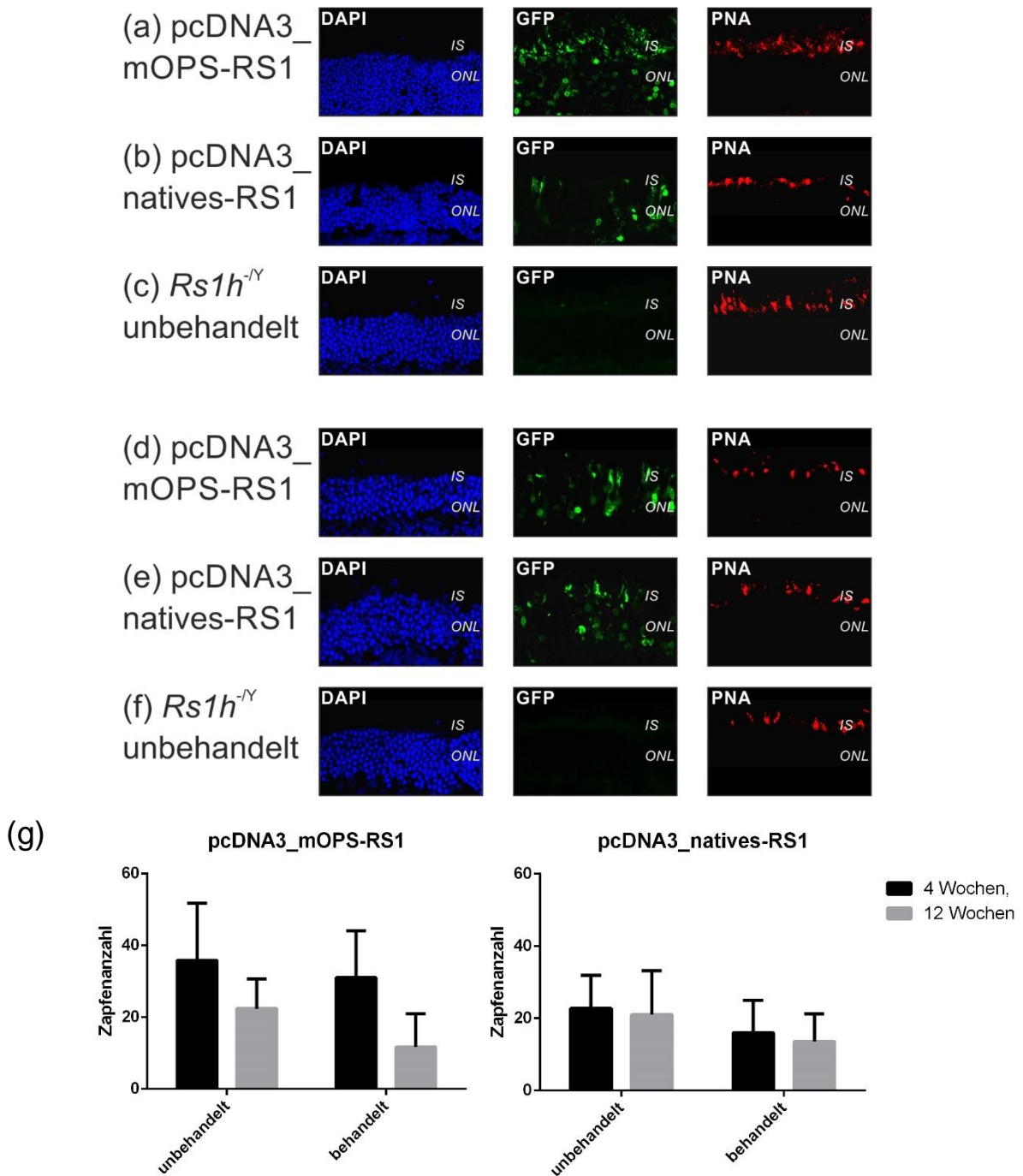


Abbildung 22 Immunhistochemische Analyse zur Ermittlung der Photorezeptordegeneration von *Rs1h*^{-Y}-Netzhäuten nach *in vivo* Elektroporation mit verschiedenen RS1-Expressionsvektoren. Murine *Rs1h*^{-Y}-Netzhäute wurden zu p0 *in vivo* mit pcDNA3_mOPS-RS1 (a, d) und pcDNA3_natives-RS1 (b, e) elektroporiert. Unbehandelte Augen (c, f) dienen als Kontrolle. 4 (a-c) bzw. 12 (d-f) Wochen nach Elektroporation wurden histochemische Analysen durchgeführt. In der ersten Spalte wurden die Zellkerne mit DAPI visualisiert. In der zweiten Spalte stellten sich transfizierte Zellen aufgrund der Fluoreszenz von GFP grün dar. Die dritte Spalte zeigt die Färbung mit PNA (rot). Mit Image J wurden unbehandelte und behandelte Netzhautschnitte komplett ausgezählt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichung pro Versuchsgruppe errechnet (g). IS = innere Segmente; ONL = äußere Körnerschicht.

In einem weiteren Schritt wurde zusätzlich die Dicke der äußeren Körnerschicht (ONL) verglichen, welche bei *Rs1h^Y*-Mäusen im Zuge der progressiven degenerativen Prozesse mit fortschreitendem Alter abnimmt (16). Es wurden nur Daten von Netzhautsegmenten eingeschlossen, die GFP-Signale zeigten und somit die Konstrukte mittels Elektroporation aufgenommen hatten. Es wurde darauf geachtet im Kontrollauge einen Netzhautabschnitt mit ähnlicher Entfernung zum Sehnerv wie bei der elektroporierten Stelle im behandelten Auge für die Messung zu analysieren. Die Messung der Körnerschichtdicke erfolgte mittels Image J. Abbildung 23 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Messwerte. Bei allen behandelten Tieren zeigte sich hier eine Reduktion der Schichtdicke der äußeren Körnerschicht im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Dies deutet erneut auf einen schädigenden Effekt der angewandten Behandlung hin.

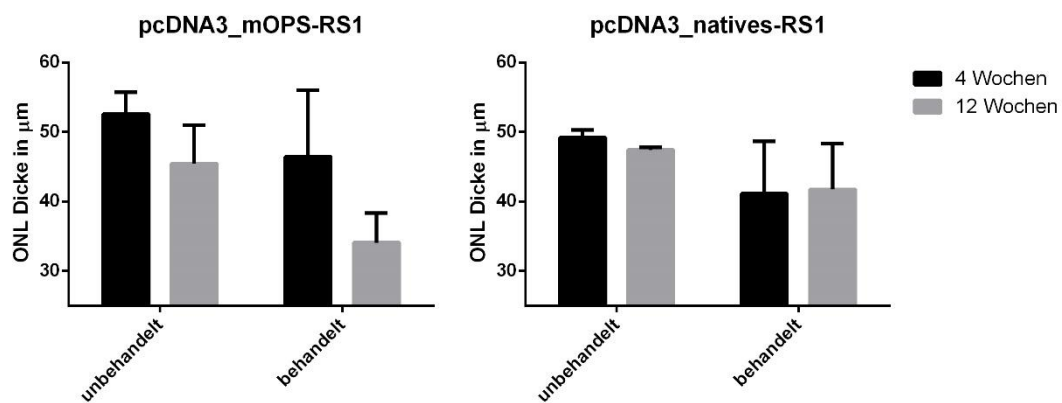


Abbildung 23 **Ermittlung der Dicke der äußeren Körnerschicht von *Rs1h^Y*-Netzhäuten nach *in vivo* Elektroporation mit verschiedenen *RS1*-Expressionsvektoren.** Murine *Rs1h^Y*-Netzhäute wurden zu p0 *in vivo* mit pcDNA3_mOPS-RS1 und pcDNA3_natives-RS1 elektroporiert. Unbehandelte Augen dienen als Kontrolle. 4 bzw. 12 Wochen nach Elektroporation wurden immunhistochemische Analysen (DAPI-gefärbte Präparate) zur Bestimmung der Dicke der äußeren Körnerschicht (ONL) durchgeführt. Die Schichtdicken wurden mittels Image J gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus je 4 gleich behandelten Augen.

Schließlich wurde der Einfluss der gentherapeutischen Behandlung auf die Schisis ermittelt. Hierbei wurde der Grad der Netzhautschisis auf DAPI-gefärbten Bildern (prozentualer Anteil der von der Schisis betroffenen Netzhautregionen an der gesamten Netzhaut) in 10 % Schritten zwischen 0 % und 100 % pro Netzhautabschnitt eingeteilt (beispielhaft gezeigt in Methoden 2.2.3.6 Schisisbestimmung). Die Mittelwerte der einzelnen Messwerte dieser Messungen sind in Abbildung 24 dargestellt. Nach 4 Wochen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Schisis zwischen unbehandelten und behandelten Augen. Nach 12-wöchiger Behandlung

wurde in den mit den *RS1*-Expressionskonstrukten behandelten Augen eine geringere Schisis beobachtet als in den unbehandelten Augen. Aufgrund hoher Standardabweichungen in den unbehandelten Augen wurde jedoch keine statistische Signifikanz erzielt (Abbildung 24).

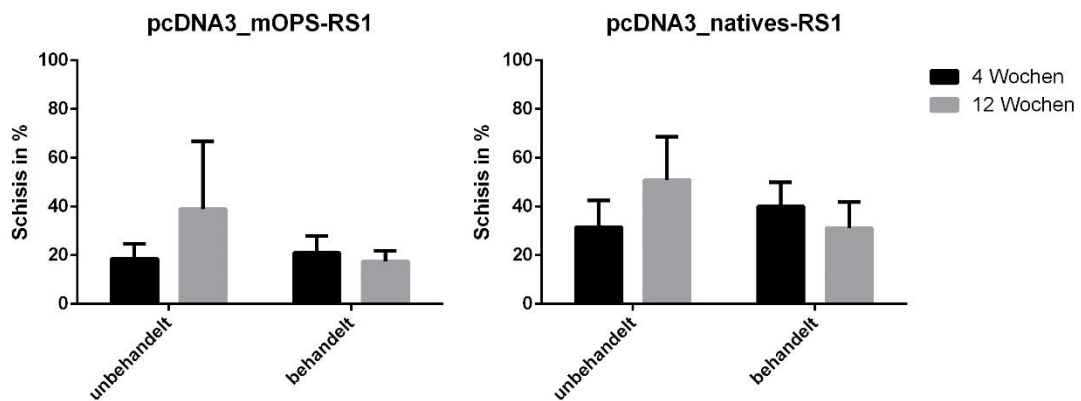


Abbildung 24 **Schisisbestimmung von *Rs1h^{+/+}*-Netzhäuten nach *in vivo* Elektroporation mit verschiedenen *RS1*-Expressionsvektoren.** Murine *Rs1h^{+/+}*-Netzhäute wurden zu p0 *in vivo* mit pcDNA3_mOPS-RS1 und pcDNA3_natives-RS1 elektroporiert. Unbehandelte Augen dienen als Kontrolle. 4 bzw. 12 Wochen nach Elektroporation wurden immunhistochemische Analysen (DAPI-gefärbte Präparate) zur Bestimmung der Schisis durchgeführt. Der Aufspaltungsgrad der Netzhautschichten wurde prozentual in 10 % Schritten zwischen 0 % und 100 % eingeteilt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus je 4 gleich behandelten Augen.

4. Diskussion und Ausblick

In dieser Arbeit wurde ein neuartiges *RS1*-Expressionskonstrukt (pcDNA3_natives-*RS1*) zur Gentherapie der XLRS getestet, bei welchem die *RS1*-Expression unter die Kontrolle der nativen regulatorischen Elemente des *RS1*-Gens (32) gestellt wurde.

Unsere *in vitro* Versuche zeigten, dass eine messbare heterologe *RS1*-Expression ausgehend von den neu generierten *RS1*-Expressionskonstrukten erzielt werden kann, und dass diese Expression abhängig vom retinalen Transkriptionsfaktor *CRX* ist. Nach „*ex vivo*“ Elektroporation in *Rs1h^{-/-}*-Netzhautexplantate wurde hingegen keine heterologe *RS1*-Expression detektiert. Jedoch fand auch nach Elektroporation mit der Positivkontrolle pcDNA3_mOPS-*RS1* (*RS1* unter der Kontrolle des murinen Opsin-Promotors), die in früheren Untersuchungen bereits heterologe *RS1*-Expression in transfizierten murinen *Rs1h^{-/-}*-Netzhäuten (*in vivo*) gezeigt hatte, keine *RS1*-Expression statt. Die „*ex vivo*“ Elektroporation in *Rs1h^{-/-}*-Netzhautexplantate ist daher für weitere Untersuchungen nach diesen ersten Experimenten möglicherweise nicht geeignet. *RS1*-Expressionskonstrukte, die mittels subretinaler Injektion und anschließender Elektroporation in die Netzhäute lebender *Rs1h^{-/-}*-Mäuse an p0 (*in vivo*) eingebracht wurden, zeigten wiederum *RS1*-Expression, welche jedoch schwächer war als in vergleichbaren früheren gentherapeutischen Ansätzen. Es wurden zudem Hinweise auf einen schädlichen Effekt dieser Behandlung auf die Integrität der Netzhaut erhalten, was vermutlich auf die subretinale Injektion und Elektroporation zurückgeführt werden kann. Hier würde sich für künftige Untersuchungen die Verwendung von Adeno-assoziierten Viren (AAV) als Vektorsystem anbieten, durch welche weniger schädliche Effekte erwartet werden könnten. Auch die Transfektionsrate und somit die heterologe *RS1*-Expression wäre mit viralen Vektoren vermutlich höher, da mit viralen Vektoren eine nahezu hundertprozentige Transfektionseffizienz in der gesamten Netzhaut erreicht werden kann (61,74–79). Die hier erzielte Elektroporationseffizienz lag im Gegensatz dazu nur bei ca. 10-30 %, was im Einklang mit bereits publizierten Daten zur Elektroporationseffizienz in murinen Netzhäuten steht (72,80–82).

In den letzten Jahren wurden für zahlreiche, genetisch bedingte Erkrankungen gentherapeutische Ansätze entwickelt und getestet. Aufgrund der rasanten technischen Entwicklungen und vielversprechender Erfolge werden solche und neue Ansätze auch in den kommenden Jahren weiter zunehmen (58,79). Dabei zeigte sich

in vielen Ansätzen, dass eine räumlich und zeitlich kontrollierte Expression des eingebrachten Gens eine entscheidende Bedeutung für den Erfolg der Gentherapie besitzt. Einige Untersuchungen zu Zelltyp-spezifischen Promotoren legten nahe, dass ein spezifischer Promotor eine sicherere Möglichkeit der Gentherapie im Vergleich zur unkontrollierten Überexpression durch ubiquitäre Promotoren (z.B. CMV) in allen Zellen darstellt. Hierdurch könnte auch das Risiko einer unerwünschten Immunreaktion oder unbeabsichtigter Effekte auf andere Zellen geringer sein (83–87). Auch ist seit längerem bekannt, dass virale Promotoren (z.B. CMV-Promotor) *in vivo* in eukaryotischen Zellen über Interferone und Tumor-Nekrose-Faktoren ausgeschaltet werden. Des Weiteren rufen Proteine eingeschleuster Gene, die durch starke virale Promotoren wie den CMV-Promotor gesteuert werden, eine besonders starke Immunantwort hervor. Dies könnte durch spezifische endogene Promotoren vermieden werden (88). In Arbeiten zur Retinopathia Pigmentosa wurde gezeigt, dass eine Überexpression an Opsin zu einer Photorezeptordegeneration führt und daher eine Gensatztherapie möglichst optimal an die endogenen Verhältnisse angepasst sein sollte (69,89,90). Für verschiedene gentherapeutische Behandlungsansätze werden deswegen bereits genspezifische Promotoren verwendet. Ein Beispiel hierfür ist die Lebersche kongenitale Amaurose, bei der Bainbridge et al. zur heterologen *RPE65*-Expression in der gentherapeutischen Behandlung den zugehörigen humanen Promotor verwendeten. Somit gelang es den Autoren, eine lokale Immunreaktion zu vermeiden (91).

Auch bei der XLR5 lassen Studiendaten vermuten, dass eine Überexpression von *RS1* schädlich für die Netzhaut sein könnte und daher der Einsatz des humanen Promotors physiologisch vorteilhaft sein sollte (70). In dieser Arbeit wurden deswegen Untersuchungen an neu generierten *RS1*-Expressionskonstrukten durchgeführt, welche die *RS1*-Expression unter die Kontrolle der regulatorischen Elemente des *RS1*-Gens stellen und so letztlich eine zeitlich und räumlich physiologische *RS1*-Expression bei gentherapeutischer Anwendung in XLR5-Patienten ermöglichen sollen.

Im ersten Schritt wurden die *RS1*-Expressionskonstrukte an Zellkulturmodellen getestet. Die vorliegenden *in vitro* Daten zeigten dabei, dass *RS1* ausgehend von den Expressionskonstrukten für pcDNA3_mOPS-*RS1*, pcDNA3_natives-*RS1* sowie für pcDNA3_Myc-*RS1* exprimiert und sezerniert wird. Die Expression in HEK293-Zellen wurde dabei stark vom Netzhaut-spezifischen Transkriptionsfaktor *CRX* stimuliert. In

Y-79 und 661W-Zellen, welche endogen *CRX* exprimieren, wurde eine starke Expression bereits ohne Zugabe dieses Faktors erzielt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die *RS1*-Expression ausgehend von den Konstrukten auch in humanen Photorezeptorzellen erzielt werden sollte, welche ebenfalls endogen *CRX* exprimieren (32,33). Die Abhängigkeit der Expression vom Transkriptionsfaktor *CRX* stellt einen Hinweis darauf dar, dass ein physiologisches Expressionsmuster, vergleichbar mit dem des endogenen *RS1*-Gens erreicht werden könnte (33).

In den „*ex vivo*“ Versuchen allerdings konnte nach Elektroporation mit den Konstrukten pcDNA3_mOPS-*RS1*, pcDNA3_natives-*RS1* und pcDNA3_Myc-*RS1* keine *RS1*-Expression in den explantierten Netzhäuten nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnte der zeitliche Verlauf der *RS1*-Expression in Mäusen sein: Zum Zeitpunkt der Geburt weisen Mäuse noch keine endogene *RS1*-Expression auf, erst 3 Tage nach der Geburt ist eine schwache Expression nachweisbar, die ihren Höhepunkt 11 Tage postnatal erreicht (92). Zur „*ex vivo*“ Elektroporation müssen die Netzhäute neugeborener Mäuse verwendet werden. Unter Umständen fehlen diesen Netzhäuten noch die nötigen Transkriptionsfaktoren für die *RS1*-Expression. Das negative Ergebnis in diesem Versuchsteil könnte also tatsächlich ein Hinweis darauf sein, dass das getestete Gentherapiekonstrukt eine entsprechend dem endogenen *RS1* zeitlich regulierte Expression ermöglicht. Des Weiteren könnte der Inkubationszeitraum von 8 Tagen zu kurz gewählt sein: Von Jansen et al. wurde unter Verwendung eines AAV5-mOPS-*RS1* Gentherapievektors gezeigt, dass die durch den murinen Opsin-Promotors gesteuerte *RS1*-Expression zwar nach etwa 2 Wochen nach subretinaler Injektion detektierbar ist, aber erst nach ca. 8-12 Wochen stark genug ist, um funktionelle Verbesserungen im ERG sichtbar zu machen (63). Von weiteren Versuchen mit „*ex vivo*“ Elektroporation wurde daher abgesehen.

Die Gentherapiekonstrukte pcDNA3_mOPS-*RS1* und pcDNA3_natives-*RS1* wurden im dritten Versuchsteil durch Elektroporation in die Netzhäute lebender *Rs1^{h^Y}*-Mäuse eingebracht. Dies ermöglichte längere Inkubationszeiträume zur heterologen *RS1*-Expression und außerdem eine Beurteilung, ob durch die einmalige Behandlung mit den Gentherapiekonstrukten ein gentherapeutischer Erfolg erzielt werden kann. Nach Einschleusen des Konstrukts mit den humanen regulatorischen Elementen von *RS1* (pcDNA3_natives-*RS1*) zeigte sich nach 4 Wochen in den behandelten Netzhäuten eine schwächere *RS1*-Expression als in Netzhäuten, in die pcDNA3_mOPS-*RS1*

eingbracht wurde. Nach 12 Wochen waren die *RS1*-Expressionsstärken ausgehend von beiden Konstrukten vergleichbar. Auch dies könnte erneut ein Hinweis darauf sein, dass eine physiologische *RS1*-Expression ausgehend von pcDNA3_natives-*RS1* erzielt werden kann, da die endogene *RS1*-Expression in Mäusen auch zunächst gering ist und erst etwa 2-4 Wochen nach der Geburt ihre volle Expressionsstärke erreicht (43). Des Weiteren gilt zu bedenken, dass die regulatorischen Elemente des humanen *RS1* unter Umständen nur in humanem Gewebe ihre physiologische Aktivität zeigen, da sie möglicherweise Elemente benötigen, welche in der murinen Netzhaut fehlen könnten. Der mOPS-Promotor hingegen ist im Vergleich zum *RS1*-Promotor deutlich aktiver und ermöglicht schon früher die Produktion großer Proteinmengen (32,63,66,92).

Mit beiden Konstrukten wurde eine leichte Beeinflussung der Na/K-ATPase Lokalisation hin zum wildtypischen Muster (73) detektiert, was einen ersten Erfolg der gentherapeutischen Behandlung anzeigen könnte. Jedoch zeigten die behandelten Netzhäute stärkere Zeichen retinaler Degeneration (reduzierte Zapfenzahl und reduzierte Dicken der äußeren Körnerschicht). Da mit heterolog exprimiertem *RS1* unter der Kontrolle des Opsin-Promotors (pcDNA3_mOPS-*RS1*) schon positive gentherapeutische Erfolge bei *Rs1h^Y*-Mäusen erzielt worden sind (16,66), ist davon auszugehen, dass die stärkere retinale Degeneration nicht auf die Gentherapiekonstrukte an sich, sondern eher auf die Art der Behandlung zurückzuführen ist. Im Gegensatz zu den früheren Therapieversuchen (16,63,65,66,93) wurden die Konstrukte in dieser Arbeit nicht über AAV eingebracht, sondern über Elektroporation nach subretinaler Injektion. Diese Methode wurde bislang nicht für gentherapeutische Anwendungen verwendet, sondern ausschließlich für funktionelle Studien (71,72,94). Zum Beispiel stellten Matsuda und Cepko 2004 die Methode zur schnellen *in vitro* und *in vivo* Testung von unter anderem Promotoraktivität, Gain-of-Function- oder Loss-of-Function-Mutationen vor (71). Deswegen wurde ein möglicherweise schädigender Effekt auf die retinale Integrität bislang nicht untersucht. Jedoch zeigten verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien, dass die Elektroporation zu einer Schädigung dieser Zellen führt, da die Permeabilisierung der Membran zwar die Aufnahme der DNA ermöglicht, aber gleichzeitig auch toxische Substanzen aufgenommen werden können und die Zelle anfällig für kolloid-osmotische Druckschwankungen wird, die zum Platzen der Zelle

führen können. Zusätzlich gilt zu beachten, dass die Stärke des elektrischen Feldes optimal angepasst sein muss, da es sonst zu vermehrter Apoptose der behandelten Zellen kommt (94–96). Hierbei spielt neben oben genannten Faktoren besonders die erzeugte Temperatur und Schwankungen des pH-Wertes durch die Permeabilisierung eine Rolle (97–99).

Die Anwendung der Elektroporation zur Untersuchung gentherapeutischer Anwendungen müsste daher genauer auf die toxischen Effekte hin untersucht werden und gegebenenfalls entsprechend modifiziert werden, um die negativen Wirkungen zu vermeiden. Standardmäßig wird für gentherapeutische Ansätze zur Behandlung retinaler Degenerationen am Mausmodell AAV als Vektorsystem verwendet, welches in diesen Studien keine offensichtlichen Schädigungen der retinalen Integrität zur Folge hatte: Beispiel hierfür sind bisherige Veröffentlichungen am *Rs1h^{-Y}*-Mausmodell (50,66), aber auch Untersuchungen zur Leberschen kongenitalen Amaurose (100–102), Achromatopsie (103) oder Morbus Stargardt (104). Mittlerweile sind zudem verschiedene AAV-Subtypen bekannt, die spezifisch verschiedene retinale Zelltypen adressieren (59,60,74,77,105,106). In einer Studie von Byrne et al. stellte sich die Behandlung mit AAV8, welcher gezielt Photorezeptoren transfiziert, am vielversprechendsten für die Behandlung der XLR5 am Mausmodell heraus (68). Weitere Studien mit dem neu generierten Gentherapiekonstrukt könnten somit mit AAV als Vektorsystem erfolgen. Dadurch könnte vermutlich ein besserer Vergleich zwischen dem gentherapeutischen Effekt des pcDNA3_mOPS-RS1- und des pcDNA3_natives-RS1-Konstrukts gezogen werden. In diesen Versuchen sollte darüber hinaus ein skotopisches ERG der behandelten Tiere erstellt werden, was einen Einblick in die Verbesserung der retinalen Reizweiterleitung durch die gentherapeutische Behandlung ermöglicht. So würde, zusätzlich zum Einfluss der Behandlung auf die Struktur, auch ein Einfluss auf die Funktion der Netzhaut möglich sein.

Der in dieser Arbeit getestete *RS1*-Expressionsvektor pcDNA3_natives-RS1 stellt die *RS1*-Expression unter die Kontrolle der von Kraus et al. identifizierten regulatorischen Elemente des humanen *RS1*-Gens (32). Dies unterscheidet den hier getesteten Vektor von bisher verwendeten Vektoren, welche fremde Promotoren (zum Beispiel den CMV-Promotor (50,64,65,93)) oder einen modifizierten *RS1*-Promotor ohne die intronischen regulatorischen Elemente (CBR2) des *RS1*-Gens (67,107,108) verwendeten.

In einer aktuell laufenden Phase I/IIa klinischen Studie des National Institutes of Health Clinical Center, USA wird ein gentherapeutischer Ansatz zur Behandlung der XLRS getestet (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02317887?cond=RS1&rank=1>). Der hierbei verwendete AAV8-scRS/IRBPhRS-Vektor enthält einen modifizierten humanen *RS1*-Promotor, einen Retinoid-bindenden Protein-Enhancer, die intakte humane *RS1*-cDNA mit einem gekürzten Intron 1 an der physiologischen Position zwischen Exon 1 und 2, sowie eine humane β -Globin 3'-untranslatierte Region und eine SV40-Polyadenylierungsstelle in einem AAV8-Kapsid (107). Im Vergleich zu dem von uns getesteten pcDNA3_natives-RS1-Konstrukt verwendet dieser Vektor ein deutlich kürzeres Intron 1 (150 bp), dem die in pcDNA3_natives-RS1 vorhandenen intronischen Regulationssequenzen (CBR2: + 81 bp bis + 758 bp von der *RS1*-Transkriptionsstartstelle aus) fehlen (32). Auch ist die im AAV8-scRS/IRBPhRS-Vektor verwendete Promotorregion mit 3429 bp deutlich länger als in pcDNA3_natives-RS1 (683 bp), enthält jedoch ebenfalls die CBR1-Region (den „*RS1*-Minimalpromotor“) und die regulatorische CpG-Insel (32). Der nicht physiologisch im *RS1*-Gen vorkommende Retinoid-bindende Protein-Enhancer wird bei dieser Studie verwendet, um die Promotoraktivität zu steigern und dadurch eine Dosisreduktion der notwendigen Virusmenge zu erreichen und potentielle Nebenwirkungen zu verringern (67). Gleichzeitig wird dadurch jedoch die endogene Regulierung der *RS1*-Expression wieder eingeschränkt. Ziel der Studie ist es, die Sicherheit und Toleranz gegenüber einer AAV-Gentherapie bei 24 Patienten mit XLRS zu testen. Die Studie soll bis Juli 2021 laufen und neben funktionellen oder strukturellen Änderungen sowie unerwünschten Wirkungen auch Veränderungen der Sehstärke, des ERGs oder der OCT und die Bildung von Antikörpern gegen AAV oder Retinoschisin erfassen. Gegenüber dem von uns generierten *RS1*-Expressionskonstrukt ist das dort verwendete Konstrukt deutlich länger, was häufig einen Nachteil beim Verpacken in den AAV-Vektor mit sich bringt (60,109). Außerdem fehlt ihm die CBR2-Region und er enthält den unphysiologischen Retinoid-bindende Protein-Enhancer.

Eine weitere Phase I/II klinische Studie, durchgeführt von der Applied Genetic Technologies Corporation, USA, testet ebenfalls eine gentherapeutische Behandlung der XLRS (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02416622?cond=RS1&rank=5>). In diesem Ansatz wird der rAAV2tYF-CB-hRS1-Vektor verwendet. Dieser enthält einen CMV-Enhancer/Hühner- β -Aktin-Promotor, die humane *RS1*-cDNA und eine SV40-

Polyadenylierungssequenz in einem AAV2-Kapsid (110). Bis voraussichtlich 2022 sollen auch hier hauptsächlich unerwünschte Wirkungen bei den 27 partizipierenden XLRS-Patienten durch die AAV-Gentherapie erfasst werden. Weitere erfasste Kriterien sind Veränderungen der Sehstärke, des ERGs und des Ausmaßes der Schisis mittels OCT. Nach Identifizierung der maximal tolerierten Dosis sollen in dieser Studie auch Patienten zwischen 6-18 Jahren inkludiert werden. Gegenüber dem von uns generierten *RS1*-Expressionskonstrukt verwendet das hier eingesetzte Konstrukt einen gänzlich unphysiologischen, starken viralen Promotor, um eine heterologe *RS1*-Expression zu erzielen.

Die beiden Ansätze unterscheiden sich also in der Wahl der Promotoren zur heterologen *RS1*-Expression deutlich. Ein Vergleich der Ergebnisse dieser beiden Ansätze könnte somit einen ersten Einblick in die Auswirkung des verwendeten Promotors (*RS1*-Minimalpromotor vs. starker viraler Promotor) auf den Erfolg der gentherapeutischen Anwendung im Menschen liefern.

5. Zusammenfassung

Bei der XLR5 handelt es sich um eine X-chromosomal rezessive Netzhautdegeneration. Sie wird verursacht durch Mutationen im *RS1*-Gen und ist eine der häufigsten Ursachen für eine frühe zentrale Netzhautdegeneration beim männlichen Geschlecht. Charakteristisch für die Erkrankung ist eine Aufspaltung der Netzhautschichten und eine Signalweiterleitungsstörung zwischen Photorezeptoren und den nachgeschalteten Bipolarzellen (1,16). Die überwiegende Mehrheit der bekannten *RS1*-Mutationen führt zu einem Funktionsverlust des kodierten Proteins, Retinoschisin. In früheren Versuchen verschiedener Arbeitsgruppen konnte bereits ein therapeutischer Erfolg eines *RS1*-Gentransfers im Mausmodell gezeigt werden. Da mehrere Studien den Vorteil einer möglichst physiologischen heterologen Genexpression bei gentherapeutischen Anwendungen zeigen, war es Ziel dieser Dissertation, ein gentherapeutisches Konstrukt zu testen, bei dem das *RS1*-Gen unter Kontrolle der bisher bekannten humanen regulatorischen Regionen (32) von *RS1* steht (pcDNA3_natives-*RS1*).

In *in vitro* Studien an verschiedenen retinalen und nicht-retinalen Zelllinien konnte eine *RS1*-Expression ausgehend von diesem Konstrukt (pcDNA3_natives-*RS1*) nachgewiesen werden. Es wurde zudem gezeigt, dass die Expression, wie auch im endogenen *RS1*-Promotor, abhängig vom retinalen Expressionsfaktor *CRX* ist. Im zweiten Versuchsteil wurde das neue Gentherapiekonstrukt in explantierten murinen *Rs1h^Y*-Netzhäuten getestet. Nach Elektroporation dieser Netzhäute und 8-tägiger Inkubation konnte jedoch keine *RS1*-Expression nachgewiesen werden. Möglicherweise weist dies auf eine physiologische Expression des *RS1*-Konstruktes hin, da zum Zeitpunkt der Entnahme des Gewebes (p0) natürlicherweise nur eine sehr schwache Expression im Mausauge detektierbar ist. Zuletzt wurden die Konstrukte *in vivo* nach Elektroporation in die Netzhäute von *Rs1h^Y*-Mäusen getestet. Hier zeigte sich eine schwache, aber deutliche, *RS1*-Expression. Interessanterweise wurde jedoch auch bei verwendeten Kontrollkonstrukten, mit denen schon erfolgreich eine gentherapeutische Behandlung an *Rs1h^Y*-Mäusen durchgeführt worden war, ein schädigender Einfluss auf die retinale Integrität gezeigt. Dies lässt eventuell darauf schließen, dass die Art des Konstrukttransfers mittels Elektroporation schädlich für die Netzhaut war.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die von Kraus et al. (32) identifizierten humanen regulatorischen Elemente *in vitro* und im Mausmodell *in vivo* eine *RS1*-Expression ermöglichen. In weiterführenden Studien könnte ein möglicher Vorteil einer von diesem Konstrukt ausgehenden räumlich, zeitlich und quantitativ kontrollierten *RS1*-Expression gegenüber anderen gentherapeutischen Konstrukten, zum Beispiel durch die Verwendung von AAV als Vektorsystem im Mausmodell, deutlich werden.

6. Anhang

6.1. Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1 Fundusaufnahmen bei XLR5..... | 1 |
| Abbildung 2 SD-OCT-Aufnahme und ERG bei XLR5 Patienten..... | 3 |
| Abbildung 3 Schematische Darstellung verschiedener <i>RS1</i> -Missense-Mutationen und deren Folgen | 4 |
| Abbildung 4 Schematische Darstellung der regulatorischen Elemente des humanen <i>RS1</i> -Gens..... | 5 |
| Abbildung 5 Immunhistochemische Retinoschisin-Färbung einer adulten Mäusenetzhaut..... | 6 |
| Abbildung 6 Kryoschnitte der Netzhaut einer Wildtyp- und einer <i>Rs1h^Y</i> -Maus in Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung..... | 7 |
| Abbildung 7 Aufbau der Elektroporationskammer | 28 |
| Abbildung 8 Zählung der Zapfen mittels Image J | 32 |
| Abbildung 9 Einteilung der Schisis zwischen 0 % und 100 %..... | 33 |
| Abbildung 10 Schematische Darstellung der verwendeten Vektorkonstrukte..... | 35 |
| Abbildung 11 Kontrolle des Transfektionserfolgs in HEK293-Zellen..... | 37 |
| Abbildung 12 Kontrolle des Transfektionserfolgs in 661W-Zellen..... | 38 |
| Abbildung 13 Kontrolle des Transfektionserfolgs in Y-79-Zellen | 38 |
| Abbildung 14 Western Blot Analysen der <i>RS1</i> -Expression..... | 40 |
| Abbildung 15 Immunzytochemische Analyse von HEK293-Zellen, Retinoschisin- Färbung. | 41 |
| Abbildung 16 Immunzytochemische Analyse von HEK293-Zellen, Myc-Färbung. ... | 42 |
| Abbildung 17 Aufsichtsbild auf zwei <i>Rs1h^Y</i> -Netzhäute nach „ <i>ex vivo</i> “ Elektroporation..... | 43 |
| Abbildung 18 Immunhistochemische Analyse von <i>Rs1h^Y</i> -Netzhäuten nach „ <i>ex vivo</i> “ Elektroporation | 45 |
| Abbildung 19 Immunhistochemische Analyse von <i>Rs1h^Y</i> -Netzhäuten 4 Wochen nach <i>in vivo</i> Elektroporation..... | 47 |
| Abbildung 20 Immunhistochemische Analyse von <i>Rs1h^Y</i> -Netzhäuten 12 Wochen nach <i>in vivo</i> Elektroporation..... | 48 |
| Abbildung 21 Immunhistochemische Analyse von <i>Rs1h^Y</i> -Netzhäuten zur Bestim- mung der Na/K-ATPase-Lokalisation nach <i>in vivo</i> Elektroporation..... | 49 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 22 Immunhistochemische Analyse zur Ermittlung der Photorezeptor- degeneration von <i>Rs1h^Y</i> -Netzhäuten nach <i>in vivo</i> Elektroporation ... | 51 |
| Abbildung 23 Ermittlung der Dicke der äußeren Körnerschicht von <i>Rs1h^Y</i> - Netzhäuten nach <i>in vivo</i> Elektroporation | 52 |
| Abbildung 24 Schisisbestimmung von <i>Rs1h^Y</i> -Netzhäuten nach <i>in vivo</i> Elektroporation | 53 |

6.2. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1 Verwendete Zelllinien und ihre Herkunft | 10 |
| Tabelle 2 Verwendete Mauslinien und ihre Herkunft | 10 |
| Tabelle 3 Verwendete Plasmide, ihr Verwendungszweck und Herkunft | 10 |
| Tabelle 4 Primärantikörper | 11 |
| Tabelle 5 Sekundärantikörper..... | 12 |
| Tabelle 6 Kit-Systeme..... | 12 |
| Tabelle 7 Molekularmassenstandard..... | 13 |
| Tabelle 8 Chemikalien | 13 |
| Tabelle 9 Medien und Medienzusätze, sowie Puffer für die Zellkultur | 15 |
| Tabelle 10 Zusammensetzung der Medien..... | 16 |
| Tabelle 11 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen | 16 |
| Tabelle 12 Fertige Lösungen für ICC, IHC, WB | 18 |
| Tabelle 13 Verbrauchsmaterialien | 18 |
| Tabelle 14 Geräte und Software..... | 20 |
| Tabelle 15 Zusammensetzungen von Trenngel und Sammelgel..... | 25 |
| Tabelle 16 Medien für die Verwendung in der „ <i>ex vivo</i> “ Elektroporation..... | 27 |

6.3. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------------|---|
| AAV | Adeno-assoziiertes Virus |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP1 β 2 | Adenosintriphosphatase-Untereinheit β 2 |
| bp | Basenpaare |
| CBR | CRX-bindende Region |
| CpG | Cytosin-phosphatidyl-Guanin |
| CRE | CRX-regulierende Elemente |

| | |
|-------------|--|
| CRX | cone-rod-homeobox |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole |
| DL | Durchlicht |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ECL | verstärkte Chemilumineszenz |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ERG | Elektroretinogramm |
| et al. | und andere |
| FCS | fetales Kälberserum |
| GCL | Ganglienzellschicht |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| HE | Hämatoxylin-Eosin |
| ICC | Immunzytochemie |
| IHC | Immunhistochemie |
| INL | innere Körnerschicht |
| IPL | innere plexiforme Schicht |
| IS | innere Segmente der Photorezeptoren |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| LB | Lysogenie-Brühe |
| m | Maus |
| mAK | monoklonaler Antikörper |
| Mio. | Millionen |
| mOPS | muriner Opsin-Promotor |
| mRNA | Boten-Ribonukleinsäure |
| Na/K-ATPase | Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase |
| ONL | äußere Körnerschicht |
| OPL | äußere plexiforme Schicht |
| OS | äußere Segmente der Photorezeptoren |
| P/S/G | L-Glutamin mit Penicillin/Streptomycin |
| pAK | polyklonaler Antikörper |
| PB | Phosphatpuffer |
| PBS | Phosphatgepufferte Saline |

| | |
|-----------|--|
| Pen/Strep | Penicillin/Streptomycin |
| PFA | Paraformaldehyd |
| PNA | Erdnuss Agglutinin |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| rb | Kaninchen |
| RPE65 | retinales Pigmentepithel–spezifisches 65-kDa Protein |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RPE | retinales Pigmentepithel |
| RS1 | Retinoschisin |
| Rs1h | murines Retinoschisin |
| SD-OCT | Spektral-Domänen-optische Kohärenztomographie |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| WB | Western Blot |
| XLRS | X-linked juvenile Retinoschisis |

6.4. Literaturverzeichnis

1. George ND, Yates JRW, Moore AT. X linked retinoschisis. *Br J Ophthalmol.* 1995;79(7):697–702.
2. Ali A, Feroze AH, Rizvi ZH, Rehman T-U. Consanguineous marriage resulting in homozygous occurrence of X-linked retinoschisis in girls. *American Journal of Ophthalmology.* 2003;136(4):767–9. doi:10.1016/S0002-9394(03)00448-3
3. Prasad A, Wagner R, Bhagat N. Vitreous hemorrhage as the initial manifestation of X-linked retinoschisis in a 9-month-old infant. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 2006;43(1):56–8.
4. Renner AB, Kellner U, Fiebig B, Cropp E, Foerster MH, Weber, B. H. F. ERG variability in X-linked congenital retinoschisis patients with mutations in the RS1 gene and the diagnostic importance of fundus autofluorescence and OCT. *Doc Ophthalmol.* 2008;116(2):97–109. doi:10.1007/s10633-007-9094-5

5. Lee JJ, Kim JH, Kim SY, Park SS, Yu YS. Infantile Vitreous Hemorrhage as the Initial Presentation of X-linked Juvenile Retinoschisis. *Korean Journal of Ophthalmology: KJO*. 2009;23(2):118–20. doi:10.3341/kjo.2009.23.2.118
6. Gregori NZ, Berrocal AM, Gregori G, Murray TG, Knighton RW, Flynn HW, Dubovy S, Puliafito CA, Rosenfeld PJ. Macular spectral-domain optical coherence tomography in patients with X linked retinoschisis. *British Journal of Ophthalmology*. 2009;93(3):373. doi:10.1136/bjo.2007.136127
7. Yu J, Ni Y, Keane PA, Jiang C, Wang W, Xu G. Foveomacular Schisis in Juvenile X-Linked Retinoschisis: An Optical Coherence Tomography Study. *American Journal of Ophthalmology*. 2010;149(6):973-978.e2. doi:10.1016/j.ajo.2010.01.031
8. Kellner U, Brümmer S, Foerster MH, Wessing A. X-linked congenital retinoschisis. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 1990;228(5):432–7.
9. Xiao Y, Liu X, Tang L, Wang X, Coursy T, Guo X, Li Z. X-Linked Retinoschisis: Phenotypic Variability in a Chinese Family. *Sci Rep*. 2016;620118. eng. doi:10.1038/srep20118
10. Sieving PA, MacDonald IM, Chan S. X-Linked Juvenile Retinoschisis: University of Washington, Seattle; 2014.
11. Molday RS, Kellner U, Weber, B. H. F. X-linked juvenile retinoschisis: Clinical diagnosis, genetic analysis, and molecular mechanisms. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2012;31(3):195–212. doi:10.1016/j.preteyeres.2011.12.002
12. Apushkin MA, Fishman GA, Rajagopalan AS. Fundus findings and longitudinal study of visual acuity loss in patients with X-linked retinoschisis. *RETINA*. 2005;25(5):612–8.
13. Kjellstrom S, Vijayasathy C, Ponjavic V., Sieving PA, Andréasson S. Long-term 12 year follow-up of X-linked congenital retinoschisis. *Ophthalmic genetics*. 2010;31(3):114–25. doi:10.3109/13816810.2010.482555
14. Khan NW, Jamison JA, Kemp JA, Sieving PA. Analysis of photoreceptor function and inner retinal activity in juvenile X-linked retinoschisis. *Vision Research*. 2001;41(28):3931–42. doi:10.1016/S0042-6989(01)00188-2

15. Tantri A, Vrabec TR, Cu-Unjieng A, Frost A, Annesley, William H, Jr., Donoso LA. X-linked retinoschisis: A clinical and molecular genetic review. *Survey of Ophthalmology*. 2004;49(2):214–30. doi:10.1016/j.survophthal.2003.12.007
16. Weber, B. H. F., Kellner U. X-linked juvenile Retinoschisis. In: Tombran-Tink J, Barnstable CJ, editors. *Retinal Degeneration*; 2006. p. 119–36.
17. Xu J, Gu H, Ma K, Liu X, Snellingsen T, Sun E, Wang N, Liu N. R213W mutation in the retinoschisis 1 gene causes X-linked juvenile retinoschisis in a large Chinese family. *Mol Vis*. 2010;16:593–600.
18. The Retinoschisis Consortium. Functional implications of the spectrum of mutations found in 234 cases with X-linked juvenile retinoschisis. The Retinoschisis Consortium. *Human Molecular Genetics*. 1998;7(7):1185–92.
19. Sergeev YV, Caruso RC, Meltzer MR, Smaoui N, MacDonald IM, Sieving PA. Molecular modeling of retinoschisin with functional analysis of pathogenic mutations from human X-linked retinoschisis. *Human Molecular Genetics*. 2010;19(7):1302–13. doi:10.1093/hmg/ddq006
20. Eriksson U, Larsson E, Holmström G. Optical coherence tomography in the diagnosis of juvenile X-linked retinoschisis. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*. 2004;82(2):218–23. doi:10.1111/j.1600-0420.2004.00227.x
21. Dhingra S, Patel CK. Diagnosis and pathogenesis of congenital X-linked retinoschisis with optical coherence tomography. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 2010;47(2):105–7. doi:10.3928/01913913-20100308-09
22. Gregori NZ, Lam BL, Gregori G, Ranganathan S, Stone EM, Morante A, Abukhalil F, Aroucha PR. Wide-Field Spectral-Domain Optical Coherence Tomography in Patients and Carriers of X-linked Retinoschisis. *Ophthalmology*. 2013;120(1):169–74. doi:10.1016/j.ophtha.2012.07.051
23. Shukla D, Rajendran A, Gibbs D, Suganthalakshmi B, Zhang K, Sundaresan P. Unusual manifestations of x-linked retinoschisis: Clinical profile and diagnostic evaluation. *American Journal of Ophthalmology*. 2007;144(3):419–23. doi:10.1016/j.ajo.2007.05.016
24. Menke MN, Feke GT, Hirose T. Effect of aging on macular features of X-linked retinoschisis assessed with optical coherence tomography. *Retina (Philadelphia, Pa)*. 2011;31(6):1186–92. doi:10.1097/IAE.0b013e3181ff0d2d

25. Sieving PA, Bingham E. L., Kemp JA, Richards J, Hiriyan K. T. Juvenile X-linked retinoschisis from XLR51 Arg213Trp mutation with preservation of the electroretinogram scotopic b-wave. *American Journal of Ophthalmology*. 1999;128(2):179–84. doi:10.1016/S0002-9394(99)00144-0
26. Eksandh L. C., Andréasson S., Abrahamson M. Juvenile X-Linked Retinoschisis with Normal Scotopic b-Wave in the Electroretinogram at an Early Stage of the Disease. *Ophthalmic genetics*. 2005;26(3):111–7. doi:10.1080/13816810500228688
27. Prenner JL, Capone A, Ciaccia S, Takada Y, Sieving PA, Trese MT. Congenital X-linked retinoschisis classification system. *Retina (Philadelphia, Pa)*. 2006;26(7 Suppl):S61-4. doi:10.1097/01.iae.0000244290.09499.c1
28. Jeffrey BG, Cukras CA, Vitale S, Turriff A, Bowles K, Sieving PA. Test-Retest Intervisit Variability of Functional and Structural Parameters in X-Linked Retinoschisis. *Transl Vis Sci Technol*. 2014;3(5):5. doi:10.1167/tvst.3.5.5
29. Sauer CG, Gehrig A, Warneke-Wittstock R, Marquardt A, Ewing CC, Gibson A, Lorenz B, Jurklies B, Weber, B. H. F. Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis. *Nature genetics*. 1997;17(2):164–70.
30. Takada Y, Fariss RN, Muller M, Bush RA, Rushing EJ, Sieving PA. Retinoschisin expression and localization in rodent and human pineal and consequences of mouse RS1 gene knockout. *Mol Vis*. 2006;12:1108–16.
31. Wu WWH, Molday RS. Defective discoidin domain structure, subunit assembly, and endoplasmic reticulum processing of retinoschisin are primary mechanisms responsible for X-linked retinoschisis. *J Biol Chem*. 2003;278(30):28139–46. doi:10.1074/jbc.M302464200
32. Kraus D, Karlstetter M, Walczak Y, Hilfinger D, Langmann T, Weber, B. H. F. Retinal expression of the X-linked juvenile retinoschisis (RS1) gene is controlled by an upstream CpG island and two opposing CRX-bound regions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2011;1809(4-6):245–54. doi:10.1016/j.bbagr.2011.03.001
33. Langmann T, Lai, C. C. L., Weigelt K, Tam BM, Warneke-Wittstock R, Moritz OL, Weber, B. H. F. CRX controls retinal expression of the X-linked juvenile retinoschisis (RS1) gene. *Nucleic Acids Research*. 2008;36(20):6523–34. doi:10.1093/nar/gkn737

34. Furukawa T, Morrow EM, Cepko CL. Crx, a Novel otx-like Homeobox Gene, Shows Photoreceptor-Specific Expression and Regulates Photoreceptor Differentiation. *Cell*. 1997;91(4):531–41. doi:10.1016/S0092-8674(00)80439-0
35. Chen S, Wang Q-L, Nie Z, Sun H, Lennon G, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Zack DJ. Crx, a Novel Otx-like Paired-Homeodomain Protein, Binds to and Transactivates Photoreceptor Cell-Specific Genes. *Neuron*. 1997;19(5):1017–30. doi:10.1016/S0896-6273(00)80394-3
36. Livesey FJ, Furukawa T, Steffen MA, Church GM, Cepko CL. Microarray analysis of the transcriptional network controlled by the photoreceptor homeobox gene Crx. *Current Biology*. 2000;10(6):301–10. doi:10.1016/S0960-9822(00)00379-1
37. Molday LL, Wu WWH, Molday RS. Retinoschisin (RS1), the protein encoded by the X-linked retinoschisis gene, is anchored to the surface of retinal photoreceptor and bipolar cells through its interactions with a Na/K ATPase-SARM1 complex. *J Biol Chem*. 2007;282(45):32792–801. doi:10.1074/jbc.M706321200
38. Bush M, Setiাপutra D, Yip CK, Molday RS. Cog-Wheel Octameric Structure of RS1, the Discoidin Domain Containing Retinal Protein Associated with X-Linked Retinoschisis. *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0147653. eng. doi:10.1371/journal.pone.0147653
39. Ramsay EP, Collins RF, Owens TW, Siebert CA, Jones RPO, Wang T, Roseman AM, Baldock C. Structural analysis of X-linked retinoschisis mutations reveals distinct classes which differentially effect retinoschisin function. *Human Molecular Genetics*. 2016;25(24):5311–20. doi:10.1093/hmg/ddw345
40. Tolun G, Vijayasarathy C, Huang R, Zeng Y, Li Y, Steven AC, Sieving PA, Heymann JB. Paired octamer rings of retinoschisin suggest a junctional model for cell-cell adhesion in the retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(19):5287–92. doi:10.1073/pnas.1519048113
41. Molday LL, Hicks D, Sauer CG, Weber, B. H. F., Molday RS. Expression of X-Linked Retinoschisis Protein RS1 in Photoreceptor and Bipolar Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2001;42(3):816–25.

42. Reid SNM, Yamashita C, Farber DB. Retinoschisin, a Photoreceptor-Secreted Protein, and Its Interaction with Bipolar and Müller Cells. *The Journal of Neuroscience*. 2003;23(14):6030.
43. Takada Y, Fariss RN, Tanikawa A, Zeng Y, Carper D, Bush RA, Sieving PA. A Retinal Neuronal Developmental Wave of Retinoschisin Expression Begins in Ganglion Cells during Layer Formation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2004;45(9):3302–12. doi:10.1167/iovs.04-0156
44. Plössl K, Royer M, Bernklau S, Tavraz NN, Friedrich T, Wild J, Weber, B. H. F., Friedrich U. Retinoschisin is linked to retinal Na/K-ATPase signaling and localization. *Mol Biol Cell*. 2017;28(16):2178–89. doi:10.1091/mbc.E17-01-0064
45. Plössl K, Weber, B. H. F., Friedrich U. The X-linked juvenile retinoschisis protein retinoschisin is a novel regulator of mitogen-activated protein kinase signalling and apoptosis in the retina. *J Cell Mol Med*. 2017;21(4):768–80. doi:10.1111/jcmm.13019.
46. Gehrig A, Langmann T, Horling F, Janssen A, Bonin M, Walter M, Poths S, Weber, B. H. F. Genome-wide expression profiling of the retinoschisin-deficient retina in early postnatal mouse development. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2007;48(2):891–900. doi:10.1167/iovs.06-0641
47. Shi L, Jian K, Ko ML, Trump D, Ko GY-P. Retinoschisin, a new binding partner for L-type voltage-gated calcium channels in the retina. *J Biol Chem*. 2009;284(6):3966–75. doi:10.1074/jbc.M806333200
48. Shi L, Ko ML, Ko GY-P. Retinoschisin Facilitates the Function of L-Type Voltage-Gated Calcium Channels. *Front Cell Neurosci*. 2017;11232. doi:10.3389/fncel.2017.00232
49. Weber, B. H. F., Schrewe H, Molday LL, Gehrig A, White KL, Seeliger MW, Jaissle GB, Friedburg C, Tamm E, Molday RS. Inactivation of the murine X-linked juvenile retinoschisis gene, *Rs1h*, suggests a role of retinoschisin in retinal cell layer organization and synaptic structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(9):6222–7. doi:10.1073/pnas.092528599
50. Zeng Y, Takada Y, Kjellstrom S, Hiriyanna K. T., Tanikawa A, Wawrousek E, Smaoui N, Caruso R, Bush RA, Sieving PA. *RS-1 Gene Delivery to an Adult Rs1h Knockout Mouse Model Restores ERG b-Wave with Reversal of the*

- Electronegative Waveform of X-Linked Retinoschisis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2004;45(9):3279–85. doi:10.1167/iovs.04-0576
51. Jablonski MM, Dalke C, Wang X, Lu L, Manly KF, Pretsch W, Favor J, Pardue MT, Rinchik EM, Williams RW, Goldowitz D, Graw J. An ENU-induced mutation in Rs1h causes disruption of retinal structure and function. *Mol Vis*. 2005;11569–81. eng.
 52. Apushkin MA, Fishman GA. Use of dorzolamide for patients with X-linked retinoschisis. *Retina (Philadelphia, Pa)*. 2006;26(7):741–5. doi:10.1097/01.iae.0000237081.80600.51
 53. Walia S, Fishman GA, Molday RS, Dyka FM, Kumar NM, Ehlinger MA, Stone EM. Relation of response to treatment with dorzolamide in X-linked retinoschisis to the mechanism of functional loss in retinoschisin. *American Journal of Ophthalmology*. 2009;147(1):111-115.e1. doi:10.1016/j.ajo.2008.07.041
 54. Salvatore S, Fishman GA, Genead MA. Treatment of cystic macular lesions in hereditary retinal dystrophies. *Survey of Ophthalmology*. 2013;58(6):560–84. doi:10.1016/j.survophthal.2012.11.006
 55. Verbakel SK, van de Ven JPH, Le Blanc LMP, Groenewoud JMM, Jong EK de, Klevering BJ, Hoyng CB. Carbonic Anhydrase Inhibitors for the Treatment of Cystic Macular Lesions in Children With X-Linked Juvenile Retinoschisis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2016;57(13):5143–7. doi:10.1167/iovs.16-20078.
 56. Dyka FM, Molday RS. Coexpression and interaction of wild-type and missense RS1 mutants associated with X-linked retinoschisis: Its relevance to gene therapy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2007;48(6):2491–7. doi:10.1167/iovs.06-1465
 57. Gleghorn LJ, Trump D, Bulleid NJ. Wild-type and missense mutants of retinoschisin co-assemble resulting in either intracellular retention or incorrect assembly of the functionally active octamer. *Biochem J*. 2009;425(1):275–83. doi:10.1042/BJ20091179
 58. Grob SR, Finn A, Papakostas TD, Elliott D. Clinical Trials in Retinal Dystrophies. *Middle East African Journal of Ophthalmology*. 2016;23(1):49–59. doi:10.4103/0974-9233.173135

59. Liu MM, Tuo J, Chan C-C. Gene therapy for ocular diseases. *Br J Ophthalmol*. 2010;95(5):604–12. doi:10.1136/bjo.2009.174912
60. Smith AJ, Bainbridge JWB, Ali RR. Prospects for retinal gene replacement therapy. *Trends in Genetics*. 2009;25(4):156–65. doi:10.1016/j.tig.2009.02.003
61. Dinculescu A, Glushakova L, Min S-H, Hauswirth WW. Adeno-associated virus-vectored gene therapy for retinal disease. *Hum Gene Ther*. 2005;16(6):649–63. doi:10.1089/hum.2005.16.649
62. Streilein JW. Ocular immune privilege: Therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(11):879–89. doi:10.1038/nri1224
63. Janssen A, Min S-H, Molday LL, Tanimoto N, Seeliger MW, Hauswirth WW, Molday RS, Weber, B. H. F. Effect of Late-stage Therapy on Disease Progression in AAV-mediated Rescue of Photoreceptor Cells in the Retinoschisin-deficient Mouse. *Mol Ther*. 2008;16(6):1010–7. doi:10.1038/mt.2008.57
64. Takada Y, Vijayasarathy C, Zeng Y, Kjellstrom S, Bush RA, Sieving PA. Synaptic Pathology in Retinoschisis Knockout (Rs1(-)/y) Mouse Retina and Modification by rAAV-Rs1 Gene Delivery. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2008;49(8):3677–86. doi:10.1167/iovs.07-1071
65. Kjellstrom S, Bush RA, Zeng Y, Takada Y, Sieving PA. Retinoschisin Gene Therapy and Natural History in the Rs1h-KO Mouse: Long-term Rescue from Retinal Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2007;48(8):3837–45. doi:10.1167/iovs.07-0203
66. Min S-H, Molday LL, Seeliger MW, Dinculescu A, Timmers AM, Janssen A, Tonagel F, Tanimoto N, Weber, B. H. F., Molday RS, Hauswirth WW. Prolonged Recovery of Retinal Structure/Function after Gene Therapy in an Rs1h-Deficient Mouse Model of X-Linked Juvenile Retinoschisis. *Mol Ther*. 2005;12(4):644–51. doi:10.1016/j.ymthe.2005.06.002
67. Bush RA, Zeng Y, Colosi P, Kjellstrom S, Hiriyanna S, Vijayasarathy C, Santos M, Li J, Wu Z, Sieving PA. Preclinical Dose-Escalation Study of Intravitreal AAV-RS1 Gene Therapy in a Mouse Model of X-linked Retinoschisis: Dose-Dependent Expression and Improved Retinal Structure and Function. *Hum Gene Ther*. 2016;27(5):376–89. eng. doi:10.1089/hum.2015.142

68. Byrne LC, Öztürk BE, Lee T, Fortuny C, Visel M, Dalkara D, Schaffer DV, Flannery JG. Retinoschisin gene therapy in photoreceptors, Müller glia or all retinal cells in the *Rs1h*^{-/-} mouse. *Gene Ther.* 2014;21(6):585–92. doi:10.1038/gt.2014.31
69. Liu Q, Collin, Rob W. J., Cremers, Frans P. M., den Hollander, Anneke I., van den Born, L. Ingeborgh, Pierce EA, Janecke AR. Expression of Wild-Type Rp1 Protein in Rp1 Knock-in Mice Rescues the Retinal Degeneration Phenotype. *PLoS ONE.* 2012;7(8):e43251. doi:10.1371/journal.pone.0043251
70. Bush RA, Wei LL, Sieving PA. Convergence of Human Genetics and Animal Studies: Gene Therapy for X-Linked Retinoschisis. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(8):a017368. doi:10.1101/cshperspect.a017368.
71. Matsuda T, Cepko CL. Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004;101(1):16–22. doi:10.1073/pnas.2235688100
72. Matsuda T, Cepko CL. Analysis of Gene Function in the Retina. In: Li S, editor. *Electroporation Protocols: Humana Press; 2008.* p. 259–78. (Methods in Molecular Biology™; vol. 423). Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-194-9_19
73. Friedrich U, Stohr H, Hilfinger D, Loenhardt T, Schachner M, Langmann T, Weber, B. H. F. The Na/K-ATPase is obligatory for membrane anchorage of retinoschisin, the protein involved in the pathogenesis of X-linked juvenile retinoschisis. *Human Molecular Genetics.* 2011;20(6):1132–42. doi:10.1093/hmg/ddq557
74. Lebherz C, Maguire AM, Tang W, Bennett J, Wilson JM. Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. *J Gene Med.* 2008;10(4):375–82. doi:10.1002/jgm.1126
75. Park TK, Wu Z, Kjellstrom S, Zeng Y, Bush RA, Sieving PA, Colosi P. Intravitreal delivery of AAV8 retinoschisin results in cell type-specific gene expression and retinal rescue in the *Rs1*-KO mouse. *Gene Ther.* 2009;16(7):916–26. doi:10.1038/gt.2009.61
76. Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, Min S-H, Chiodo V, Pang J-J, Zhong L, Zolotukhin S, Srivastava A, Lewin AS, Hauswirth WW. High-efficiency

- transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors. *Mol Ther.* 2009;17(3):463–71. doi:10.1038/mt.2008.269
77. Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, Visel M, Yin L, Merigan WH, Flannery JG, Schaffer DV. In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. *Sci Transl Med.* 2013;5(189):189ra76. doi:10.1126/scitranslmed.3005708
78. Öner A. Recent Advancements in Gene Therapy for Hereditary Retinal Dystrophies. *Turk J Ophthalmol.* 2017;47(6):338–43. doi:10.4274/tjo.41017
79. Campa C, Gallenga CE, Bolletta E, Perri P. The Role of Gene Therapy in the Treatment of Retinal Diseases: A Review. *Curr Gene Ther.* 2017;17(3):194–213. doi:10.2174/1566523217666171116170040
80. Matsuda T, Cepko CL. Controlled expression of transgenes introduced by in vivo electroporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2007;104(3):1027–32. doi:10.1073/pnas.0610155104
81. Johnson CJ, Berglin L, Chrenek MA, Redmond TM, Boatright JH, Nickerson JM. Technical brief: Subretinal injection and electroporation into adult mouse eyes. *Mol Vis.* 2008;14:2211–26.
82. Haberl S, Kandušer M, Flisar K, Hodžić D, Bregar VB, Miklavčič D, Escoffre J-M, Rols M-P, Pavlin M. Effect of different parameters used for in vitro gene electrotransfer on gene expression efficiency, cell viability and visualization of plasmid DNA at the membrane level. *J Gene Med.* 2013;15(5):169–81. doi:10.1002/jgm.2706
83. Li Y, Yang Y, Wang S. Neuronal gene transfer by baculovirus-derived vectors accommodating a neurone-specific promoter. *Exp Physiol.* 2005;90(1):39–44. doi:10.1113/expphysiol.2004.028217
84. Hashimoto T, Gibbs D, Lillo C, Azarian SM, Legacki E, Zhang X-M, Yang X-J, Williams DS. Lentiviral gene replacement therapy of retinas in a mouse model for Usher syndrome type 1B. *Gene Ther.* 2007;14(7):584–94. doi:10.1038/sj.gt.3302897
85. Hashimoto T. Development of viral vectors with optimal transgene expression for ocular gene therapies. *Adv Exp Med Biol.* 2008;613:113–9. doi:10.1007/978-0-387-74904-4_12

86. Li Q, Timmers AM, Guy J, Pang J, Hauswirth WW. Cone-specific expression using a human red opsin promoter in recombinant AAV. *Vision Research*. 2008;48(3):332–8. doi:10.1016/j.visres.2007.07.026
87. Hanlon KS, Chadderton N, Palfi A, Blanco Fernandez A, Humphries P, Kenna PF, Millington-Ward S, Farrar GJ. A Novel Retinal Ganglion Cell Promoter for Utility in AAV Vectors. *Front Neurosci*. 2017;11521. doi:10.3389/fnins.2017.00521
88. Papadakis ED, Nicklin SA, Baker AH, White SJ. Promoters and control elements: Designing expression cassettes for gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2004;4(1):89–113.
89. Olsson JE, Gordon JW, Pawlyk BS, Roof D, Hayes A, Molday RS, Mukai S, Cowley GS, Berson EL, Dryja TP. Transgenic mice with a rhodopsin mutation (Pro23His): A mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Neuron*. 1992;9(5):815–30.
90. Tan E, Wang Q, Quiambao AB, Xu X, Qtaishat NM, Peachey NS, Lem J, Fliesler SJ, Pepperberg DR, Naash MI, Al-Ubaidi MR. The relationship between opsin overexpression and photoreceptor degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2001;42(3):589–600.
91. Bainbridge JWB, Smith AJ, Barker SS, Robbie SJ, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petersen-Jones SM, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT, Ali RR. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*. 2008;358(21):2231–9. doi:10.1056/NEJMoa0802268
92. Ichsan AM, Kato I, Yoshida T, Takasawa K, Hayasaka S, Hiraga K. Rhodopsin promoter-EGFP fusion transgene expression in photoreceptor neurons of retina and pineal complex in mice. *Neurosci Lett*. 2005;379(2):138–43. doi:10.1016/j.neulet.2004.12.072
93. Li W, Kong F, Li X, Dai X, Liu X, Zheng Q, Wu R, Zhou X, Lü F, Chang B, Li Q, Hauswirth WW, Qu J, Pang J-J. Gene therapy following subretinal AAV5 vector delivery is not affected by a previous intravitreal AAV5 vector administration in the partner eye. *Mol Vis*. 2009;15267–75.
94. Li S, editor. *Electroporation Protocols*: Humana Press; 2008. (Methods in Molecular Biology™).

95. Kotnik T, Frey W, Sack M, Haberl Meglič S, Peterka M, Miklavčič D. Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2015;33(8):480–8. doi:10.1016/j.tibtech.2015.06.002
96. Rosazza C, Haberl Meglic S, Zumbusch A, Rols M-P, Miklavcic D. Gene Electrotransfer: A Mechanistic Perspective. *CGT.* 2016;16(2):98–129. doi:10.2174/1566523216666160331130040
97. Lackovic I, Magjarevic R, Miklavcic D. Three-dimensional finite-element analysis of joule heating in electrochemotherapy and in vivo gene electrotransfer. *IEEE Trans. Dielect. Electr. Insul.* 2009;16(5):1338–47. doi:10.1109/TDEI.2009.5293947
98. Maglietti F, Michinski S, Olaiz N, Castro M, Suárez C, Marshall G. The role of pH fronts in tissue electroporation based treatments. *PLoS ONE.* 2013;8(11):e80167. doi:10.1371/journal.pone.0080167
99. Olaiz N, Signori E, Maglietti F, Soba A, Suárez C, Turjanski P, Michinski S, Marshall G. Tissue damage modeling in gene electrotransfer: The role of pH. *Bioelectrochemistry.* 2014;100105–11. doi:10.1016/j.bioelechem.2014.05.001
100. Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM, Jacobson SG, Hauswirth WW, Bennett J. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet.* 2001;28(1):92–5. doi:10.1038/ng0501-92
101. Pawlyk BS, Smith AJ, Buch PK, Adamian M, Hong D-H, Sandberg MA, Ali RR, Li T. Gene replacement therapy rescues photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis lacking RPGRIP. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2005;46(9):3039–45. doi:10.1167/iovs.05-0371
102. Boye SL, Conlon TJ, Erger KE, Ryals R, Neeley A, Cossette T, Pang J-J, Dyka FM, Hauswirth WW, Boye SE. Long-term preservation of cone photoreceptors and restoration of cone function by gene therapy in the guanylate cyclase-1 knockout (GC1KO) mouse. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2011;52(10):7098–108. doi:10.1167/iovs.11-7867
103. Alexander JJ, Umino Y, Everhart D, Chang B, Min S-H, Li Q, Timmers AM, Hawes NL, Pang J-J, Barlow RB, Hauswirth WW. Restoration of cone vision in

- a mouse model of achromatopsia. *Nat Med.* 2007;13(6):685–7.
doi:10.1038/nm1596
104. Kong J, Kim S-R, Binley K, Pata I, Doi K, Mannik J, Zernant-Rajang J, Kan O, Iqball S, Naylor S, Sparrow JR, Gouras P, Allikmets R. Correction of the disease phenotype in the mouse model of Stargardt disease by lentiviral gene therapy. *Gene Ther.* 2008;15(19):1311–20. doi:10.1038/gt.2008.78
105. Klimczak RR, Koerber JT, Dalkara D, Flannery JG, Schaffer DV. A novel adeno-associated viral variant for efficient and selective intravitreal transduction of rat Müller cells. *PLoS ONE.* 2009;4(10):e7467.
doi:10.1371/journal.pone.0007467
106. Koerber JT, Klimczak R, Jang J-H, Dalkara D, Flannery JG, Schaffer DV. Molecular evolution of adeno-associated virus for enhanced glial gene delivery. *Mol Ther.* 2009;17(12):2088–95. doi:10.1038/mt.2009.184
107. Marangoni D, Bush RA, Zeng Y, Wei LL, Ziccardi L, Vijayasarathy C, Bartoe JT, Palyada K, Santos M, Hiriyanna S, Wu Z, Colosi P, Sieving PA. Ocular and systemic safety of a recombinant AAV8 vector for X-linked retinoschisis gene therapy: GLP studies in rabbits and Rs1-KO mice. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016;516011. doi:10.1038/mtm.2016.11.
108. Zeng Y, Petralia RS, Vijayasarathy C, Wu Z, Hiriyanna S, Song H, Wang Y-X, Sieving PA, Bush RA. Retinal Structure and Gene Therapy Outcome in Retinoschisin-Deficient Mice Assessed by Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2016;57(9):OCT277-87. doi:10.1167/iovs.15-18920
109. Planul A, Dalkara D. Vectors and Gene Delivery to the Retina. *Annu Rev Vis Sci.* 2017;3121–40. doi:10.1146/annurev-vision-102016-061413
110. Ye G-J, Budzynski E, Sonnentag P, Miller PE, Sharma AK, Hoeve JN ver, Howard K, Knop DR, Neuringer M, McGill T, Stoddard J, Chulay JD. Safety and Biodistribution Evaluation in Cynomolgus Macaques of rAAV2tYF-CB-hRS1, a Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Expressing Retinoschisin. *Hum Gene Ther Clin Dev.* 2015;26(3):165–76. doi:10.1089/humc.2015.076.

6.5. Danksagung

Ohne Unterstützung von vielen Seiten wäre diese Dissertation nicht entstanden, daher möchte ich mich hier nochmals bei allen bedanken, die mir über die Jahre hinweg zur Seite gestanden sind.

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Bernhard Weber, der mir die Möglichkeit geboten hat unter seiner Leitung diese Dissertation am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg durchzuführen. Für seine Unterstützung zum Erlangen des Promotionsstipendiums möchte ich mich besonders bedanken. Ebenfalls danke ich herzlich meiner Betreuerin Frau Dr. Ulrike Friedrich, die stets ein offenes Ohr für all meine Fragen hatte und mich immer wieder ermutigte.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Marcus Karlstetter, der extra aus Köln anreiste, um meine *in vivo* Versuche zu ermöglichen. Vielen herzlichen Dank dafür!

Vielen Dank an Lina Plössl und Sabrina Unkel für die Einführung in die Laborarbeit und die tagtägliche Unterstützung und Motivation. Dank Kerstin Rückl und Denise Schmied hatte ich stets einen kompetenten Ansprechpartner für alle Fragen und Probleme bezüglich der Mäuse. Auch allen weiteren Institutsmitarbeitern möchte ich für die angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre danken.

Die Unterstützung durch meine Familie und Freunde war Voraussetzung für das Gelingen dieser Arbeit. Danke, dass ihr mich zu allen Zeiten ermutigt, unterstützt und begleitet habt!