

Aus der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg
Prof. Dr. Bernhard Weber
Humangenetik

Charakterisierung von *RPI*-defizienten Retinalen Organoiden

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anne-Sophie Pieger

2025

Aus der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg
Prof. Dr. Bernhard Weber
Humangenetik

Charakterisierung von *RPI*-defizienten Retinalen Organoiden

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anne-Sophie Pieger

2025

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernhard Weber
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Markus J. Riemenschneider
Tag der mündlichen Prüfung:	13.01.2026

Inhaltsverzeichnis

1	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>5</u>
2	<u>SUMMARY</u>	<u>7</u>
3	<u>EINLEITUNG</u>	<u>9</u>
3.1	DIE HUMANE RETINA	9
3.2	ENTWICKLUNG DER HUMANEN RETINA.....	11
3.3	RETINALE ORGANOIDE.....	14
3.4	RO ALS KRANKHEITSMODELL UND DIE ANWENDUNG DER CRISPR-CAS9 TECHNOLOGIE	16
3.5	RETINITIS PIGMENTOSA	18
3.6	RP1	19
3.7	ZIEL DIESER ARBEIT	21
4	<u>MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>23</u>
4.1	MATERIAL	23
4.1.1	ZELLINIEN	23
4.1.2	ZELLKULTURMEDIENTEN UND ZUSÄTZE	23
4.1.3	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	25
4.1.1	ENZYMEN.....	25
4.1.2	KIT- UND REAKTIONSSYSTEME	26
4.1.3	PUFFER UND LÖSUNGEN.....	26
4.1.4	PRIMÄRE ANTIKÖRPER	28
4.1.5	SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	30
4.1.6	VERBRAUCHSMATERIAL	30
4.1.7	LABORGERÄTE	33
4.1.8	COMPUTERPROGRAMME	34
4.2	METHODEN	34
4.2.1	VORARBEITEN.....	34
4.2.2	ZELLKULTUR	35
4.2.3	IMMUNZYTOCHEMIE	40

4.2.4	TUNEL-ASSAY.....	43
4.2.5	KONFOKALE AUFNAHMEN.....	44
4.2.6	HELLFELDAUFNAHMEN	47
5	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>49</u>
5.1	AUSDIFFERENZIERUNG VON STAMMZELLEN ZU RO	49
5.2	VERGLEICHBARE ZELLULÄRE ZUSAMMENSETZUNG DER KO- UND WT-RO AN TAG 69.....	50
5.3	VERGLEICHBARE DICKE DER ONL BEI KO- UND WT-RO AN TAG 140 UND TAG 180.....	52
5.4	VERGLEICHBARE LÄNGE DER OS DER KO- UND WT-RO AN TAG 180	54
5.5	VERGLEICHBARE APOPTOSERATEN DER KO- UND WT-RO AN TAG 180	55
5.6	VERGLEICHBARER ANTEIL DER PHOTOREZEPTORZELLEN DER KO- UND WT-RO AN TAG 180.....	56
5.7	VERGLEICHBARER ANTEIL AN TRANSPORTIERTEM RHO BZW. RCVRN IN DEN BEREICH DER IS UND OS DER KO- UND WT-RO	59
6	<u>DISKUSSION</u>	<u>61</u>
7	<u>ANHANG</u>	<u>73</u>
7.1	ZUSÄTZLICHE ABBILDUNGEN	73
7.2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	76
7.3	TABELLENVERZEICHNIS.....	81
7.4	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	82
7.5	BILDERRECHT.....	87
7.6	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	88
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>89</u>

1 Zusammenfassung

Retinale Organoide (RO) sind *in vitro* entstehende dreidimensionale (3D)-Kulturen mit einem ähnlichen histoarchitekturellen und zellulären Aufbau wie die menschliche Retina. RO stellen heutzutage vielversprechende Krankheitsmodelle zur Charakterisierung menschlicher Retinopathien, wie zum Beispiel (z.B.) der Retinitis Pigmentosa (RP), dar.

RP repräsentiert eine genetisch heterogene Gruppe hereditärer Netzhauterkrankungen, die durch eine progressive Degeneration der Stäbchen, gefolgt von einem Verlust der Zapfen, zu fortschreitenden Visuseinschränkungen führt. Ein kausaler Zusammenhang konnte bis heute aufgrund von pathogenen Mutationen in mehr als 90 verschiedenen Genen gezeigt werden.

Mutationen im *Retinitis Pigmentosa 1 Axonemal Microtubule Associated (RPI)*-Gen sind ursächlich mit RP, was sich auch im Mausmodell darstellen lässt. *RPI*-defiziente Mäuse weisen ein verschmälertes Stratum nucleare externum (Outer Nuclear Layer, ONL) mit degenerierenden Photorezeptorzellen und verkürzten Außensegmenten (Outer Segment, OS) auf. Außerdem ist in diesem Modell ein gestörter Transport von Rhodopsin (RHO) in die OS beobachtbar.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Folgen einer Mutation im *RPI*-Gen anhand von *RPI*-defizienten RO. Ein Vergleich von *RPI*-defizienten RO mit wildtypischen (WT) RO wurde schwerpunktmäßig in vier Bereichen unternommen: Untersuchungen zu (i) der Dicke der ONL, (ii) der Länge der OS, (iii) der relativen Anzahl an Stäbchen und Zapfen, (iv) dem Transport von RHO bzw. Recoverin (RCVRN) in den Bereich der Innensegmente (IS) und OS.

Zur Generierung der RO wurden vorab humane induzierte pluripotente Stammzellen (hiPSC) eines gesunden Spenders mittels CRISPR-Cas9 behandelt, um homozygote Mutationen mit Leserasterverschiebung im *RPI*-Gen einzuführen. Die aus den hiPSC differenzierten RO wurden anschließend im Rahmen dieser Arbeit methodisch mittels Hellfeldaufnahmen (HF) und Immunozytochemie (Immunocytochemistry, ICC) an Tag 69, 140 und an 180 der Ausdifferenzierung analysiert.

Untersuchungen an Tag 69 der Ausdifferenzierung zeigten, dass zu diesem Zeitpunkt die Entwicklung der *RPI*-defizienten und WT-RO bezüglich der untersuchten Zelltypen keine Unterschiede zeigten. Die *RPI*-defizienten RO wiesen auch (i) an den Tagen 140 und 180 eine zu den WT-RO vergleichbare Dicke der ONL und (ii) an Tag 180 eine vergleichbare Länge der OS auf. Der relative Anteil an Stäbchen und Zapfen (iii) war an Tag 180 für die Genotypen

ebenfalls vergleichbar. Auch die transportierte Quantität an RHO bzw. RCVRN in den Bereich der IS und OS (iv) war an Tag 180 vergleichbar für die *RPI*-defizienten und WT-RO.

Somit konnte bis Entwicklungstag 180 kein Phänotyp bei den *RPI*-defizienten RO beobachtet werden. Das Fehlen eines erfassbaren Phänotyps könnte ursächlich mit einer erst späten Manifestation oder einem eher milden Phänotyp der *RPI*-Defizienz erklärt werden. Diese Arbeit unterstreicht die Bedeutung, menschliche Netzhauterkrankungen anhand von RO zu erforschen und somit weitere Erkenntnisse über dieses vielversprechende Modellsystem sowie über die Netzhauterkrankungen zu erlangen.

2 Summary

Retinal organoids (RO) are in vitro developing three-dimensional (3D) cultures with a similar histoarchitectural and cellular structure as the human retina. RO now represent promising disease models for characterising human retinopathies, such as retinitis pigmentosa (RP).

RP represents a genetically heterogeneous group of hereditary retinal diseases that lead to progressive visual impairment through progressive degeneration of the rods followed by loss of the cones. A causal relationship has been shown to date due to pathogenic mutations in over 90 different genes.

Mutations in the *Retinitis Pigmentosa 1 Axonemal Microtubule Associated (RPI)* gene are causally associated with RP, which can also be demonstrated in the mouse model. *RPI*-deficient mice exhibit a narrowed stratum nucleare externum (Outer Nuclear Layer, ONL) with degenerating photoreceptor cells and shortened outer segments (OS). Furthermore, a disturbed transport of rhodopsin (RHO) into the OS is observable in this model.

The aim of this work was to characterise the consequences of a mutation in the *RPI* gene using *RPI*-deficient RO. A comparison of *RPI*-deficient RO with wild type (WT)-RO was undertaken with a focus on four areas: Studies on (i) the thickness of the ONL, (ii) the length of the OS, (iii) the relative number of rods and cones, (iv) the transport of RHO or Recoverin (RCVRN) into the inner segment (IS) and OS regions.

To generate RO, human induced pluripotent stem cells (hiPSC) from a healthy donor were first treated using CRISPR-Cas9 to introduce homozygous frameshift mutations in the *RPI* gene. The RO differentiated from the hiPSC were then methodically analysed in this work using bright field imaging (HF) and immunocytochemistry (ICC) at day 69, 140 and 180 of differentiation.

Investigations at day 69 of differentiation showed that at this point the development of the *RPI*-deficient and WT-ROs did not show any differences regarding the cell types investigated. The *RPI*-deficient ROs also showed (i) comparable ONL thickness to WT-ROs at days 140 and 180 and (ii) comparable OS length at day 180. The relative proportion of rods and cones (iii) was comparable for the genotypes on day 180. The quantity of RHO and RCVRN transported to the IS and OS (iv) was also comparable for the *RPI*-deficient and WT-ROs on day 180.

Thus, no phenotype could be observed in the *RPI*-deficient RO until development day 180. The lack of a detectable phenotype could be causally explained by a late manifestation or a rather mild phenotype of *RPI*-deficiency. This work highlights the importance of studying human

retinal diseases using RO and thus gaining further insights into this promising model system as well as into retinal diseases.

3 Einleitung

„Das Menschaugen kann von der Wirklichkeit nur erfassen, was seiner Aufnahmefähigkeit entspricht.“ (1). Mit diesem Zitat brachte der französische Philosoph Michel de Montaigne schon im 16. Jahrhundert zum Ausdruck, wie stark unsere Wahrnehmung der Realität von der Funktionalität unserer Augen abhängt. Umso wichtiger ist es, den Aufbau und die Funktionsweise dieses Sinnesorgans zu verstehen und mögliche Einschränkungen seiner Funktion beheben zu lernen.

3.1 Die humane Retina

Die Retina stellt die innerste Schicht des Auges dar und lässt sich in eine Pars caeca und eine Pars optica unterteilen (**Abbildung 1**). Die Pars optica besteht aus zwei Blättern, dem äußeren Stratum pigmentosum (Retinal Pigment Epithelium, RPE) und dem inneren Stratum nervosum (neuronal Retina). Zusammen weisen beide Blätter eine typische zehnfache Schichtung auf bestehend aus (von außen nach innen) dem RPE, dem Stratum neuroepitheliale, dem Stratum limitans externum (Outer Limiting Membrane, OLM), dem Stratum nucleare externum (Outer Nuclear Layer, ONL), dem Stratum plexiforme externum, dem Stratum nucleare internum (Inner Nuclear Layer, INL), dem Stratum plexiforme internum, dem Stratum ganglionicum (Ganglion Cell Layer, GCL), dem Stratum neurofibrarum und dem Stratum limitans internum. Innerhalb dieser zehn Schichten lassen sich vier Zellschichten definieren, die die Perikaryen der acht Zelltypen der humanen Retina beinhalten. Das einschichtig isoprismatische RPE besteht aus den RPE-Zellen und schließt direkt an das Stratum neuroepitheliale an. Die ONL beinhaltet die Perikaryen der beiden Photorezeptorarten - der Stäbchen und Zapfen - während das INL die Zellkörper der amakrinen Zellen, der Horizontalzellen, der Müllerzellen und der Bipolarzellen beinhaltet. Ganz innen befindet sich das GCL mit den Perikaryen der Ganglienzellen, deren Fasern im Stratum neurofibrarum verlaufen. Die Zellschichten sind durch zwei Synapsenschichten miteinander verbunden, dem Stratum plexiforme externum (Outer Plexiform Layer, OPL) und dem Stratum plexiforme internum (Inner Plexiform Layer, IPL). Die Synapsen werden unter den verschiedenen Zelltypen gebildet und dienen der Reizweiterleitung.

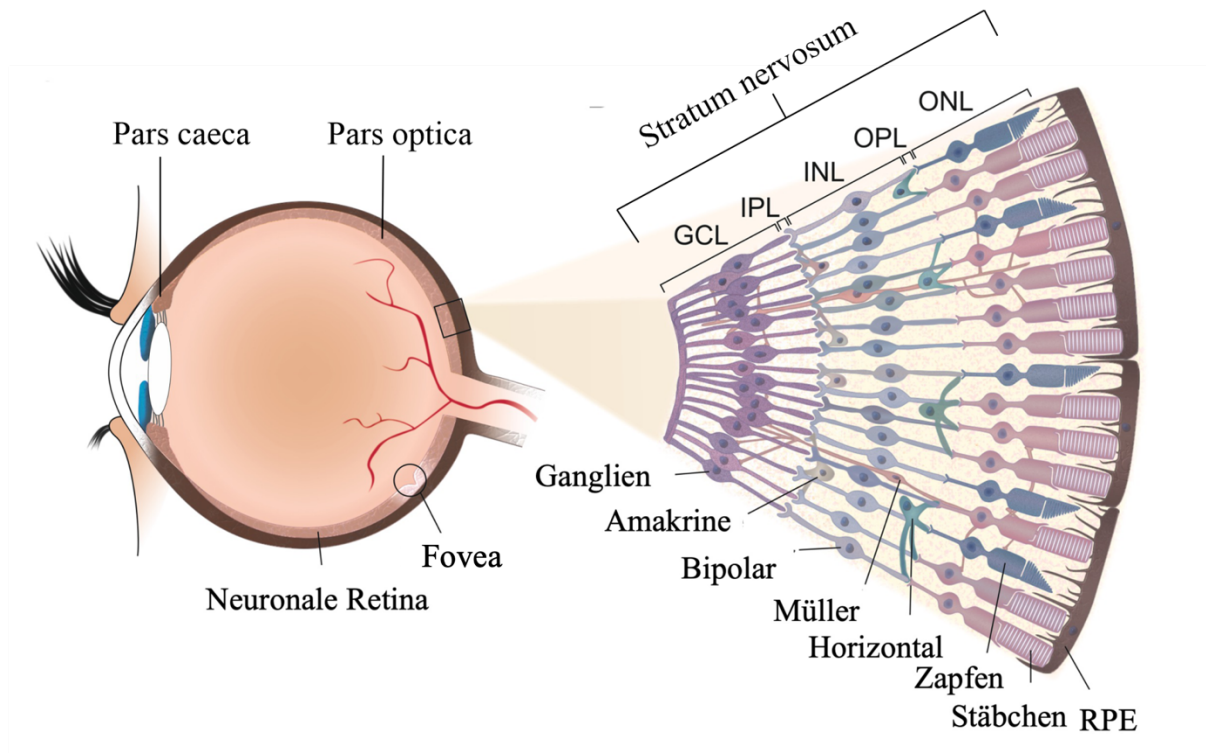


Abbildung 1: Aufbau der humanen Retina. Makroskopische und mikroskopische Darstellung der Retina mit ihren verschiedenen Schichten und Zelltypen. Die Retina lässt sich in eine Pars caeca und eine Pars optica unterteilen. In der Pars optica befindet sich ganz außen das RPE bestehend aus den RPE-Zellen. In der ONL befinden sich die Perikaryen der Stäbchen und Zapfen. In der INL lokalisieren sich die Bipolarzellen, die amakrinen Zellen, die Horizontalzellen und die Perikaryen der Müllerzellen. Die Müllerzellen erstrecken sich dabei von der GCL bis zur ONL. Die GCL setzt sich aus den Ganglienzellen zusammen. Die verschiedenen Zellschichten werden durch die IPL und die OPL miteinander verbunden und bilden zusammen das Stratum nervosum der Retina, auch noch neuronale Retina genannt. Modifizierte Abbildung nach Dr. Dr. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg.

Die menschliche Retina zählt mit ungefähr 120.000.000 Stäbchen und 6.400.000 Zapfen 95% Stäbchen und 5% Zapfen und weist starke Unterschiede in der regionalen Verteilung und Dichte der beiden Photorezeptortypen auf (2). Während die höchste Dichte an Zapfen im Bereich der Fovea besteht, finden sich Stäbchen vorwiegend in der Peripherie rund um die Fovea (3). Beide Photorezeptortypen besitzen einen ähnlichen Aufbau. Dieser setzt sich zusammen aus einem Außensegment (Outer Segment, OS), einem Innensegment (IS), einem Zellkörper und einem synaptischen Zellfortsatz (**Abbildung 2A, B**).

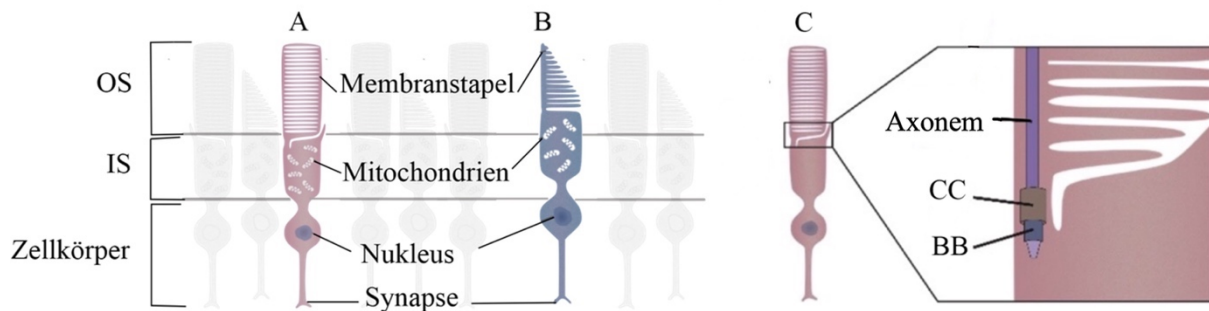


Abbildung 2: Struktur der Stäbchen und Zapfen. (A) Stäbchen samt OS, IS, Zellkörper und Synapse. (B) Zapfen samt OS, IS, Zellkörper und Synapse. Beide Photorezeptortypen beinhalten einen Nukleus im Zellkörper und Mitochondrien im IS. Die OS bestehen jeweils aus gestapelten Membranscheiben (C) Darstellung der Lokalisation des CC anhand eines Stäbchens. Das CC besteht aus einem Basalkörper (BB) und dem sich daraus entwickelnden Axonem (zusammengefasst in (4)). Modifizierte Abbildung nach Dr. Dr. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg.

Der Zellkörper beinhaltet den Zellkern, während sich in den IS die Mitochondrien befinden. Die OS bestehen aus gefalteten Membranscheiben, in denen Proteine für die Phototransduktion – die Opsine—lokalisiert sind. IS und OS sind durch ein Verbindungscilium (Connecting Cilium, CC) miteinander verbunden (**Abbildung 2C**). Das CC besteht aus einem Basalkörper (Basal Body, BB) und dem sich daraus entwickelnden Axonem und ist für den Proteintransport von den IS zu den OS verantwortlich (zusammengefasst in (4)). Die Proteine für die Phototransduktion werden somit in den IS gebildet und in die OS transportiert (5). Der Prozess der Phototransduktion, gleichzusetzen mit der Umwandlung eines äußeren Lichtreizes in ein elektrisches Signal, findet dementsprechend in den OS statt (6).

Trotz ihres ähnlichen Aufbaus unterscheiden sich Stäbchen und Zapfen morphologisch sowie funktionell voneinander. Stäbchen ermöglichen durch das vorhandene Opsin Rhodopsin (RHO) das skotopische Sehen, während Zapfen durch drei spezifische Opsine mit Sensitivitäten im kurzwelligen (S-Opsin), mittelwelligem (M-Opsin) und langwelligem Bereich (L-Opsin) sowie drei unterschiedlichen Absorptionsmaxima (420 nm, 530 nm und 560 nm) für das Farbsehen und die Sehschärfe verantwortlich sind ((7,8), zusammengefasst in (9)).

3.2 Entwicklung der humanen Retina

Die Entwicklung der humanen Retina ist ein hochkomplexer Prozess, der sich in eine pränatale und eine postnatale Phase aufteilt. Pränatal beginnt die Augenentwicklung mit der Entstehung des Augenfeldes im Neuroektoderm des vorderen Neuralrohres auf Höhe des Diencephalons (10,11). Die Bildung dieses Augenfeldes wird unter anderem (u.a.) durch die spezifischen

Transkriptionsfaktoren *paired box gene 6 (Pax6)*, *retinal homeobox gene 1 (Rx1)*, *SIX homeobox 3 (Six3)*, *LIM homeobox 2 (Lhx2)* und *Orthodenticle homeobox 2 (Otx2)* vermittelt (12,13). Das Augenfeld entwickelt sich zu den Sulci optici, aus denen mit Schluss des vorderen Neuralrohres zwei Augenbläschen entstehen. Der Kontakt der sich ausdehnenden Augenbläschen mit dem Oberflächenektoderm löst die Bildung der Linsenplakode aus dem Oberflächenektoderm und die anschließende Invagination der Augenbläschen in einen zweischichtigen Augenbecher aus (**Abbildung 3A-C**).

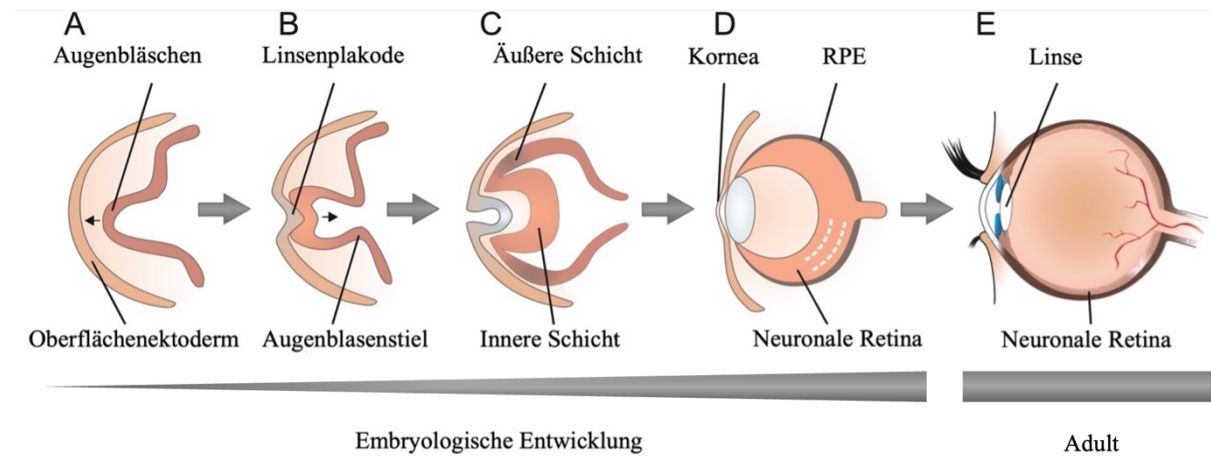


Abbildung 3: Entwicklung der humanen Retina. (A-E) Entwicklung der Netzhaut während der Embryogenese bis hin zur erwachsenen Netzhaut. (A) Das Augenbläschen erstreckt sich in Richtung des Oberflächenektoderms. Die Ausbreitungsrichtung des Augenbläschens ist mit einem schwarzen Pfeil dargestellt. (B) Die Entstehung der Linsenplakode aus dem Oberflächenektoderm und die Invagination des Augenbläschens werden initiiert. Der Augenblasenstiel verbindet den Augenbecher mit dem Diencephalon und entwickelt sich später zum Sehnerv. Die Invaginationsrichtung ist mit einem schwarzen Pfeil dargestellt (C-D) Durch die Invagination entsteht ein zweischichtiger Augenbecher. Die äußere Schicht entwickelt sich zum RPE. Die innere Schicht entwickelt sich zum Stratum nervosum der Retina (neuronale Retina). Die Kornea entwickelt sich aus dem Oberflächenektoderm (E) Das Auge eines erwachsenen Individuums nach der prä- und postnatalen Entwicklungsphase mit Markierung der neuronalen Retina und der Linse, die sich aus der Linsenplakode entwickelt hat, ist dargestellt. Modifizierte Abbildung nach Dr. Dr. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg.

Die äußere Schicht des Augenbechers bildet das spätere RPE, während die innere Schicht das Stratum nervosum der Retina darstellt (**Abbildung 3D-E**). Der Augenblasenstiel verbindet den Augenbecher mit dem Diencephalon und bildet den späteren Sehnerv (zusammengefasst in (11)). Durch die Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen in der inneren Schicht des Augenbechers beginnt ab der 7. Entwicklungswoche die Entstehung der zehnschichtigen

Retina (zusammengefasst in (14)). Die Ausdifferenzierung der retinalen Progenitorzellen in die spezifischen Zelltypen kann in eine frühe und eine späte Phase aufgeteilt werden. In der frühen Phase entwickeln sich Ganglienzellen, die amakrine Zellen, die Horizontalzellen und die Zapfen, während in der überlappenden späten Phase die Stäbchen, die Müllerzellen und die Bipolarzellen entstehen ((15–17), **Abbildung 4A, B**).

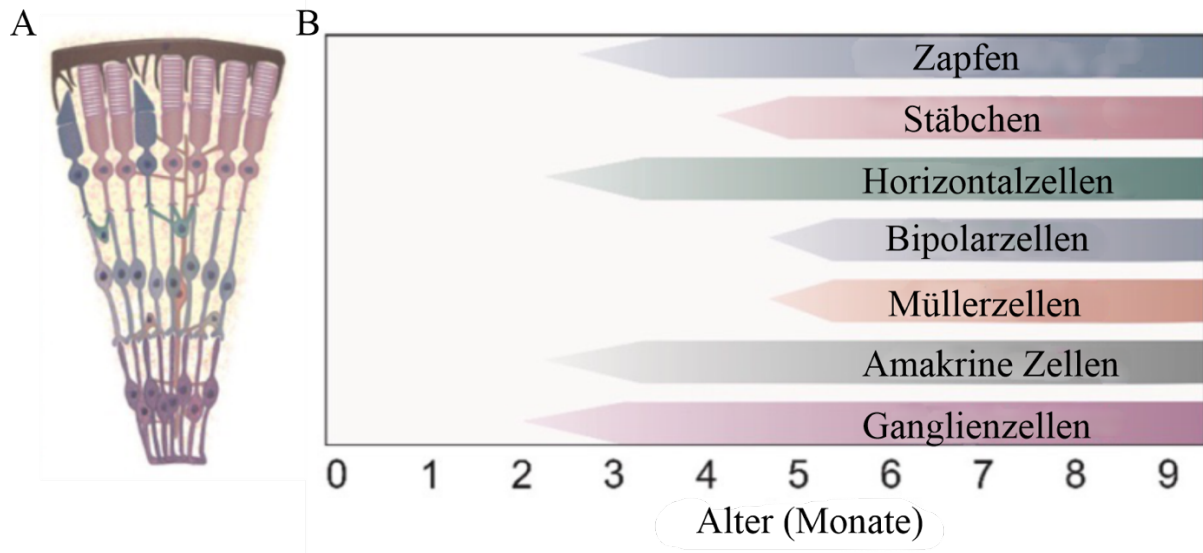


Abbildung 4: Retinale Abfolge der Zelldifferenzierung. (A) Schematische Darstellung der humanen Retina. (B) Darstellung der zeitlichen Abfolge der Differenzierung der verschiedenen Zelltypen in der humanen Retina. In der humanen Retina entwickeln sich in der frühen Phase der Zelldifferenzierung die Ganglienzellen, die amakrinen Zellen, die Horizontalzellen und die Zapfen. In der späteren Phase werden die Stäbchen, die Müllerzellen und die Bipolarzellen gebildet. Modifizierte Abbildung nach Dr. Dr. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg.

Durch die Zelldifferenzierung und durch diverse Arten der Zellmigration entsteht ein hochspezifisches Zellmosaik, welches die Funktionalität der Retina gewährt (zusammengefasst in (18)). Hendrickson et al. (1984) zeigten, dass sich dieses Zellmosaik sowie die Charakteristika der einzelnen Zelltypen, wie zum Beispiel (z.B.) die OS der Photorezeptorzellen, auch postnatal weiterentwickeln (19). Anhand der Analyse von gespendeten Menschaugen konnten die Forscher an Tag 5 postpartum (P5) bzw. P8 eine noch unvollständige Migration der Zellen der inneren Schichten der Retina zur Ausdünnung des Bereichs der Fovea beobachten. Die Zapfen der Fovea erschienen deutlich breiter und wiesen kurze, rudimentäre OS auf. Erst im Alter von 45 Monaten konnten sie bei den analysierten Augen Foveae mit dünnen Zapfen samt langer OS beobachten, die dem erwachsenen Auge vergleichbar waren.

3.3 Retinale Organoide

In den vergangenen Jahren half die Etablierung von Retinalen Organoiden (RO) noch spezifischere Einblicke in die Prozesse der Entwicklung der humanen Retina zu erhalten. Wie andere Organoide auch sind RO *in vitro* entstehende organähnliche dreidimensionale (3D)-Strukturen (20) mit einem ähnlichen histoarchitekturellen und zellulären Aufbau wie die jeweiligen Ursprungsgewebe ((21); **Abbildung 5A, B**).

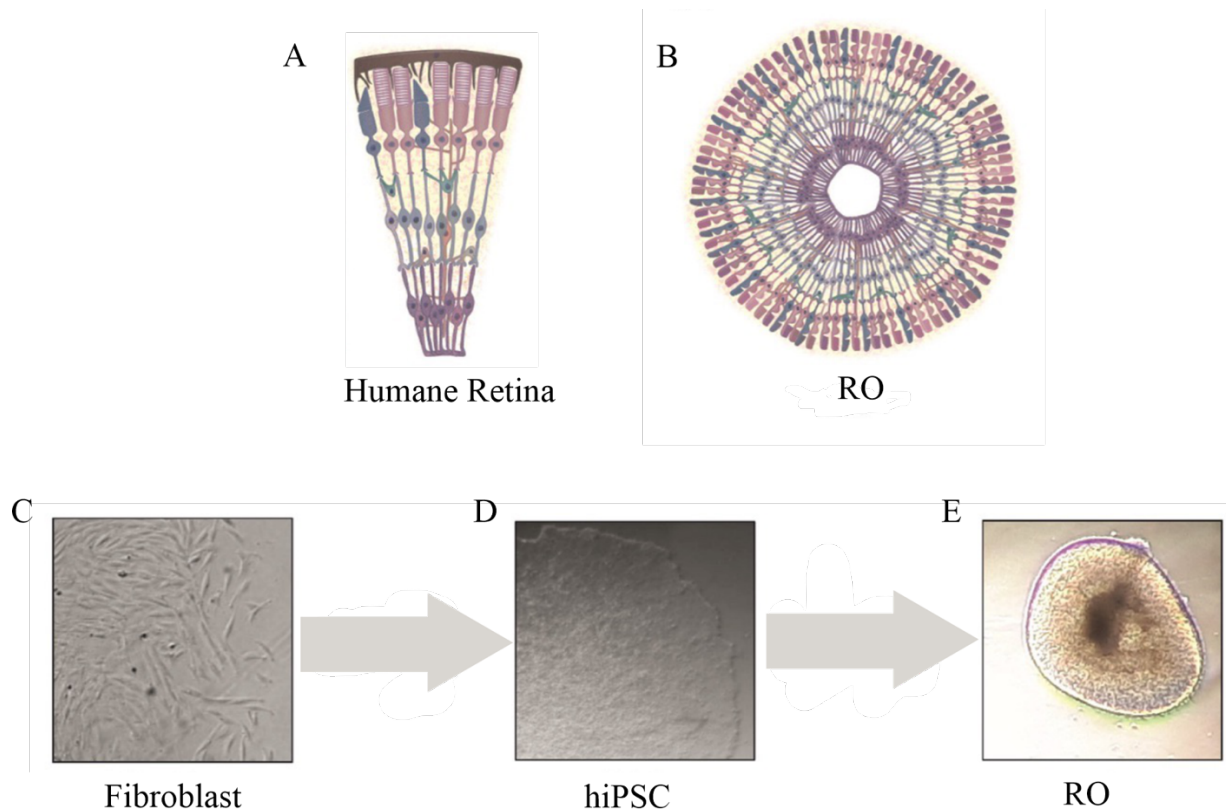


Abbildung 5: RO. (A) Schematische Darstellung der humanen Retina. (B) Schematische Darstellung eines RO mitsamt seinen Zelltypen. RO weisen einen ähnlichen histoarchitekturellen und zellulären Aufbau wie die humane Retina auf. (C-D) Die humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) werden durch die Reprogrammierung humaner Fibroblasten generiert. Der Prozess der Reprogrammierung benötigt 2 bis 2,5 Monate. (D-E) Differenzierung der hiPSC in RO. Die Dauer der anschließenden Differenzierung der hiPSC in RO ist abhängig von der Fragestellung. Je nach gewähltem Erntezeitpunkt befinden sich die verschiedenen Zelltypen der RO gemäß der zeitlichen Zelldifferenzierung der humanen Retina in einem spezifischen Entwicklungsstand. Modifizierte Abbildung nach Dr. Dr. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg.

2011 beobachteten Sasai et al. erstmals die Differenzierung von RO aus murinen embryonalen Stammzellen (ESC) anhand eines 3D-Differenzierungsprotokolls (22). Nachdem Sasai et al.

2012 RO aus humanen ESC (hESC) differenzieren konnten (23), wurden über die Jahre eine Vielfalt an Differenzierungsprotokollen entwickelt.

Prinzipiell kann zwischen zwei Differenzierungsmethoden unterschieden werden: die 3D-Methode und die 3D-2D-3D-Methode (zusammengefasst in (24)). Bei der 3D-Methode werden die Stammzellen basierend auf einer serumfreien schwimmenden Bildung von Embryoidkörper-ähnlichen Aggregaten mit schneller Reaggregation (Serum-Free Floating Embryoid Body-like Aggregate with Quick Reaggregation, SFEBq)-Methode von Eiraku und Watanabe et al. (2008) während des gesamten Differenzierungsprozesses in Suspension gehalten (25–27). Bei der 3D-2D-3D-Methode werden die Stammzellen nach der Aggregation auf Zellkulturplatten ausgesät (2D-Phase), um anschließend wieder als retinale Domäne exzidiert zu werden und dem weiteren 3D-Protokoll zu folgen (28). Der Vergleich der 3D-, der 3D-2D-3D-Methode sowie einer Varianten der 3D-2D-3D-Methode nach Capowski et al. (2019) mit Zusatz von bone morphogenetic protein 4 (BMP4) durch Berber et al. (2021) ergab eine deutliche quantitative und qualitative Überlegenheit der 3D-2D-3D-Methode mit zusätzlichem BMP4 (29).

Neben ESC können RO ebenfalls aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) differenziert werden ((30,31); **Abbildung 5C-E**). Die Reprogrammierung der hiPSC erfolgt durch Hinzufügen spezifischer Faktoren (z.B. Octamer-binding transcription factor $\frac{3}{4}$ (Oct3/4), SRY-box transcription factor 2 (Sox2), cellular myelocytomatosis oncogene (c-Myc) und Krüppel-like factor 4 (Klf4) nach Yamanaka et al. (2006)) zu adulten Zellen wie Fibroblasten, peripheren mononukleären Blutzellen (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) oder epithelialen Zellen (32–34).

Die *in vitro* Genese der Retina folgt bei RO zeitlich und topologisch prinzipiell der *in vivo* Entwicklung der humanen Retina (35). Bezüglich der zeitlichen Differenzierung der verschiedenen Zelltypen entwickeln sich in RO jedoch die Stäbchen früher als die Zapfen, während in der humanen Retina die Zapfen als erste Photorezeptoren entstehen (35). Ein wesentlicher Unterschied besteht aus der fehlenden Nachahmung der *in vivo* beobachtbaren Ausbildung einer zweischichtigen Augenbecherstruktur (36). Ebenso befindet sich das *in vitro* gebildete RPE als ektopischer Zellklumpen lediglich an einem Pol der RO ohne diese jedoch zu umkleiden (35,37).

Die Entwicklung der RO erreicht, wie Transkriptom-Analysen der RO zeigten, nach 30 bis 38 Wochen Kultivierungszeit einen stabilen Status mit ausdifferenzierten Zellen aus den meisten

retinalen Zellklassen (21). Einer der größten Herausforderung in der Differenzierung der RO ist die Genese ultrastrukturell korrekt ausgebildeter und lichtsensibler Photorezeptoren. Die Photorezeptoren der RO bilden meist OS variabler Länge mit noch rudimentären, ungeordneten Membranstapeln (30). Zhong et al. waren 2014 eine der ersten Forschungsgruppen, die eine Ausbildung von Photorezeptoren-OS mit vereinzelt vorhandenen Lichtreaktionen beschreiben konnte (35). Doch trotz dieses Durchbruchs war die Lichtreaktion in der Versuchsreihe von Zhong et al. (2014) nur bei einer limitierten Anzahl an Photorezeptoren mit einer geringen Photosensitivität zu sehen und konnte durch wiederholte Lichtreize nicht erneut ausgelöst werden (35). 2022 konnten Saha et al. in RO zwar bereits wiederholbare, intrinsische lichtabhängige Reaktionen nachweisen, die vergleichbar mit Lichtreaktionen in den Foveae von Primaten waren. Diese waren jedoch auf Zapfen limitiert und traten nur in circa (ca.) 35 % der untersuchten RO auf (38).

Der Nutzen der RO als Modell einer Netzhaut ist vielfältig. Neben ihrer Verwendung zur Untersuchung der Retinogenese und als Krankheitsmodell dienen RO auch als Plattform zur Prüfung von Arzneimitteltoxizität und -wirksamkeit (zusammengefasst in (39)). Ito et al. (2017) konnte RO z.B. für die Prüfung verschiedener neuroprotektiver Nahrungsergänzungsmittel, wie Vitamin E, nutzen (40). Der Einsatz von RO zur Bereitstellung transplantierbarer Photorezeptorzellen für Patienten, die an einer unheilbaren degenerativen Retinopathie erkrankt sind, ist ein aktuell hochaktives Forschungsgebiet und konnte u.a. bei Ratten schon Erfolge aufzeigen. He et al. (2021) bewies durch die Transplantation aus RO gewonnener retinaler Progenitorzellen in fortgeschritten degenerierte murine Retinae, dass die implantierten Progenitorzellen sich ins Empfängergerewebe integrieren und funktionelle Synapsen ausbilden können (41). In einer der ersten klinischen Anwendungen RO am Menschen durch Hiram et al. (2023) zeigte die Transplantation von hiPSC-abgeleiteten Organoidblättern bei Patienten mit fortgeschrittener Retinitis Pigmentosa (RP) über zwei Jahre eine stabile Integration in die Wirtsnetzhaut ohne wesentliche Abstoßungsreaktionen, jedoch ohne langfristige wesentliche Verbesserung der Sehschärfe (42). Die Aussagekraft der Studie ist aufgrund der geringen Fallzahl von lediglich zwei Probanden zwar stark eingeschränkt, stellt jedoch einen wichtigen Ausblick auf die zukünftige Anwendbarkeit RO-Zellen am Menschen dar.

3.4 RO als Krankheitsmodell und die Anwendung der CRISPR-Cas9 Technologie

Die Nutzung von RO als Krankheitsmodell hat das Ziel, vertiefte Kenntnisse über die genaue Pathogenese der jeweiligen Erkrankungen zu gewinnen. Zur Genese RO, die den Phänotyp

einer spezifischen Krankheit widerspiegeln, werden häufig hiPSC aus Patienten-gewonnenen Fibroblasten, aus PBMCs oder aus epithelialen Zellen reprogrammiert. Die generierten hiPSC können anschließend mittels der CRISPR-Cas9 Technologie weiter manipuliert werden ((43,44), zusammengefasst in (45)).

CRISPR-Cas ist Teil des adaptiven Immunsystems zahlreicher Bakterien und Archaea ((46,47), zusammengefasst in (48)). CRISPR-Cas9 stellt eines der am besten beschriebenen und in der heutigen Forschung am häufigsten genutzten CRISPR-Cas Systeme dar, welches ursprünglich im Bakterium *Streptococcus pyogenes* entdeckt wurde ((49), zusammengefasst in (50,51)). Das System besteht aus einer Cas9-Endonuklease und einer single guide RNA (sgRNA). Die sgRNA ist zusammengesetzt aus einer CRISPR-RNA (crRNA), die spezifische DNA-Sequenzen erkennt und somit die Cas9-Endonuklease zum Zielort der DNA-Spaltung leitet, sowie einer trans-activating CRISPR-RNA (tracrRNA) (52). Zusammen bilden die Cas9-Endonuklease und die sgRNA das Cas-Ribonucleoprotein (RNP) (zusammengefasst in (48)). Das RNP bindet und spaltet spezifische DNA-Stränge, wenn eine „Protospacer Adjacent Motif“ (PAM)-Sequenz vorhanden ist (52). Bei einer Genommodifikation wird nach der Induktion eines Doppelstrangbruchs durch CRISPR-Cas9 dieser Doppelstrangbruch durch eine von zwei endogenen Reparaturmechanismen repariert – die nichthomologe Endverknüpfung (Non-Homologous End Joining, NHEJ) oder die homologe Rekombination (Homology Directed Repair, HDR) (zusammengefasst in (48)) . Bei der NHEJ entstehen regelmäßig unspezifische Reparaturen, die zu Leserasterverschiebungen oder Stopcodons führen (53), während die HDR anhand von homologen DNA-Reparaturvorlagen spezifische Genmodifikationen an der Zielstelle ermöglicht (54).

Zahlreiche Studien haben RO bereits als Modellsystem für verschiedene Retinopathien und andere Augenerkrankungen etabliert. Bis Ende 2024 wurden mindestens 26 Arbeiten publiziert, die die Differenzierung patientenabgeleiteter hiPSC zu RO beschrieben (55). 2019 differenzierten Huang et al. *RS1*-mutierte RO aus den hiPSC der PBMCs von Patienten mit X-chromosomaler juveniler Retinoschisis (XLRS)- und quantifizierten die aufgetretene Retinoschisis zwischen dem ONL und dem INL. Die Gentherapie via CRISPR-Cas9, bestehend aus einer Korrektur einer *Retinoschisin 1 (RS1)*-Mutation in den hiPSC der Patienten, führte dabei zu einer Korrektur des pathologischen Phänotyps (56). Liu et al. (2020) konnten in RO, die aus hESC mit einer CRISPR-Cas9 induzierten biallelischen *RB transcriptional corepressor 1 (RBI)*-Mutation differenziert wurden, die Genese tumorähnlicher Areale mit einer Retinoblastom-spezifischen Ultrastruktur beobachten und Zapfenprogenitorzellen als

Tumorsprungszelle identifizieren (57). Die Hälfte der Studien benutzte die RO jedoch als Krankheitsmodell zur Charakterisierung der RP, wobei ein Augenmerk auf die verschiedenen zugrundeliegenden Genmutationen gelegt wurde (zusammengefasst in (45)).

3.5 Retinitis Pigmentosa

RP ist eine Gruppe hereditärer Netzhauterkrankungen, die erstmals 1857 von Frans Cornelis Donders, einem niederländischen Physiologen und Ophthalmologen, beschrieben wurde (58). Die Prävalenz von nicht-syndromaler RP liegt mit einer leichten länderspezifischen Variabilität zwischen 1 zu 3.000 und 1 zu 5.000 ((59,60), zusammengefasst in (61)). Die histopathologische Ausprägung der Erkrankung stellt das progressive Absterben der Stäbchen, gefolgt vom Absterben der Zapfen dar ((62), zusammengefasst in (63,64); **Abbildung 6A, B**). RP kann sich im frühen Kindesalter oder erst im mittleren Erwachsenenalter manifestieren und weist einen triphasischen Krankheitsverlauf auf. Die meist symmetrisch verlaufende Erkrankung beginnt mit Nachtblindheit, gefolgt von einem progressiven Tunnelblick (**Abbildung 6C**) bis hin zu einer stark beeinträchtigten Sehschärfe oder zur vollständigen Erblindung ((65,66), zusammengefasst in (63,64)).

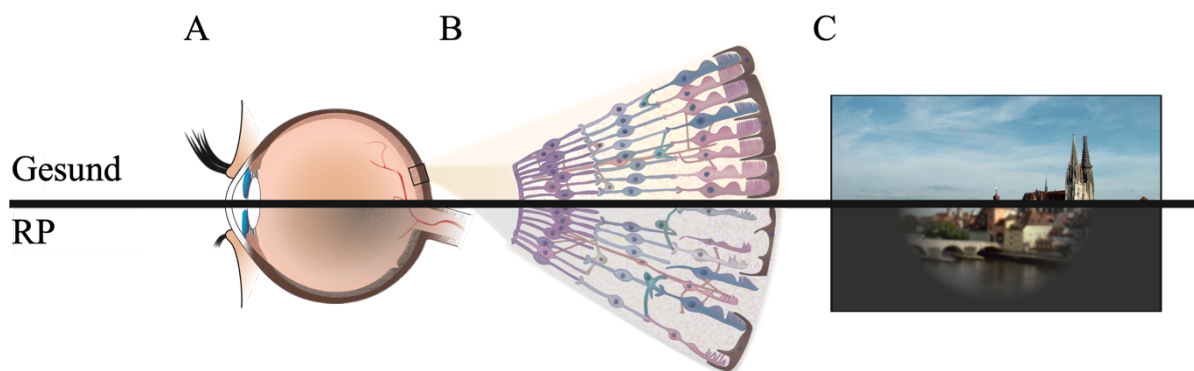


Abbildung 6: Darstellung der mikroskopischen und makroskopischen Auswirkungen von RP. (A) Sagittalschnitt eines Auges mit Unterteilung in ein gesundes und ein erkranktes Auge. Im erkrankten Auge wurde die RP-typische Bildung knochennadel-ähnlicher Strukturen und die Beeinträchtigung der retinalen Blutgefäße dargestellt. (B) Schematische Darstellung der humanen Retina im gesunden und im erkrankten Zustand. Im erkrankten Auge sind die absterbenden Stäbchen und die absterbenden weiteren Zelltypen wie z.B. Zapfen dargestellt. (C) Ein uneingeschränktes Blickfeld in einem gesunden Auge und die Manifestation der RP in einem erkrankten Auge sind dargestellt. Das symptomatische Korrelat bei der RP besteht aus Nachtblindheit und einem progressiven Tunnelblick. Modifizierte Abbildung nach Dr. Dr. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg.

Bis 2022 wurden mehr als 90 verschiedene Gene in einen kausalen Zusammenhang mit der Entstehung von RP gebracht ((67), zusammengefasst in (68)). Man unterscheidet RP-Formen mit autosomal-dominantem Erbgang (adRP, 5-35%), mit autosomal-rezessivem Erbgang (arRP, 5-45%), mit X-chromosomalem Erbgang (XLRP, 5-17%) und RP-Formen ohne familiären Zusammenhang („simplex“, 38-50%) (64). Auch seltene Fälle mitochondrial verursachter RP (mtRP) sind bekannt (69).

Luxturna® stellt derzeit die einzige zugelassene kausale Therapieoption bei RP dar (zusammengefasst in (70)). Die Therapie besteht dabei aus der subretinalen Injektion adeno-assoziierten Viren (AAV), die als virale Vektoren mit humaner *Retinoid isomerohydrolase RPE65* (*RPE65*)-complementary DNA (cDNA) beladen sind, und führte in den klinischen Studien zu einer signifikanten Verbesserung des visuellen Sehvermögens der Patient*innen ((71–73), zusammengefasst in (70)). Luxturna® limitiert sich jedoch auf die kleine Subpopulation an Patient*innen mit einer biallelischen *RPE65*-Mutation ((71–73), zusammengefasst in (70)). Neben Luxturna befinden sich aktuell mehrere weitere Gentherapien in klinischen Studien ((74) zusammengefasst in (75,76)). Somit stellen neue Therapieoptionen der RP ein wichtiges aktuelles Forschungsgebiet dar (zusammengefasst in (70)). Dabei spielen auch RO eine Rolle. Lane et al. (2020) erforschten beispielsweise die Auswirkungen eines defizienten *Retinitis Pigmentosa 2 activator of ARL3 GTPase* (*RP2*)-Gens anhand von RO, die von Gen-editierten hiPSCs sowie *RP2*-Patient*innen hiPSCs stammten. Die zwischen Tag 150 und 180 bei den *RP2*-KO RO durch das progressive Absterben der Photorezeptoren beobachtete Verschmälerung der ONL konnte durch eine AAV-vermittelte Anreicherung der *RP2*-defizienten RO mit humanem *RP2*-Transkript, die an Tag 140 durchgeführt wurde, nahezu vollständig korrigiert werden (77). An Tag 180 wiesen die transduzierten *RP2*-KO RO eine zu den wildtypischen (WT) RO vergleichbare Dicke der ONL auf. Auch Deng et al. analysierte 2018 RO aus den hiPSC *Retinitis Pigmentosa GTPase regulator* (*RPGR*)-defizienter Patient*innen und beobachtete eine effiziente CRISPR-Cas9 vermittelte Genkorrektur des *RPGR*-Gens sowie eine Behebung der gestörten Photorezeptorentwicklung in den *RPGR*-defizienten RO (78). Bezüglich der phänotypischen Auswirkungen eines defizienten *Retinitis Pigmentosa 1 Axonemal Microtubule Associated* (*RPI*)-Gens gab es jedoch bis zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine auf RO bezogenen Forschungsergebnisse.

3.6 RPI

RPI wird spezifisch in den Photorezeptoren der Retina exprimiert (79). Das vier Exone umfassende Gen befindet sich auf Chromosom 8q12 und kodiert für ein Protein mit 2.156

Aminosäuren (80). Das RP1-Protein ist im Axonem der Photorezeptoren lokalisiert (81,82). Das meiste Wissen über die genaue Funktion von RP1 stammt aus dem Mausmodell von *RP1*-defizienten Mäusen. So berichteten Gao et al. (2002), dass *RP1*-defiziente Mäuse im Laufe der Entwicklung eine sich progressiv verschmälernde ONL aufweisen (83). Die degenerierenden Photorezeptoren imponierten mit verkürzten und unorganisierten OS. Auch der RHO-Transport in die OS war durch das fehlende RP1 eingeschränkt und RHO in den IS und Zellkörpern fehllokalisiert (83). 2003 bestätigte Liu et al. am Modell von Mäusen, die anhand einer homozygoten Mutation im *RP1*-Gen ein trunkiertes RP1-Protein aufwiesen, dass RP1 für die korrekte Orientierung und Stapelung der Membranscheiben der OS zuständig ist (84). Schon während der Membranevagination bildeten sich Membranscheiben, die sich parallel anstatt perpendicular zur Längsachse des Axonems anordneten. Die gebildeten Membranstapel waren kleiner und beinhalteten verdickte einzelne Membranscheiben.

Mutationen im *RP1*-Gen können autosomal-dominant (adRP1) sowie autosomal-rezessiv (arRP1) vererbt werden ((85–87); **Abbildung 7**). Sie sind für 4-10% aller adRP-Fälle und für weniger als 1% aller arRP-Fälle verantwortlich (85–87). Die adRP1-Mutationen befinden sich in einer spezifischen Region im 4. Exon des *RP1*-Gens ((88); **Abbildung 7**). arRP1-Mutationen umfassen homozygote und zusammengesetzt heterozygote missense oder nonsense Mutationen sowie Mutationen mit Leserasterverschiebung. Sie treten im Exon 2, 3 oder in den Grenzbereichen um die adRP1-spezifische Region im 4. Exon des *RP1*-Gens auf ((89–91); **Abbildung 7**). arRP1-Mutationen sind durch einen frühen Krankheitsbeginn sowie einen gravierenden Krankheitsverlauf charakterisiert (92). Die Erkrankung beginnt in den meisten Fällen schon im frühen Kindesalter und kann noch vor Erreichen des Erwachsenenalters zur Erblindung führen (87).

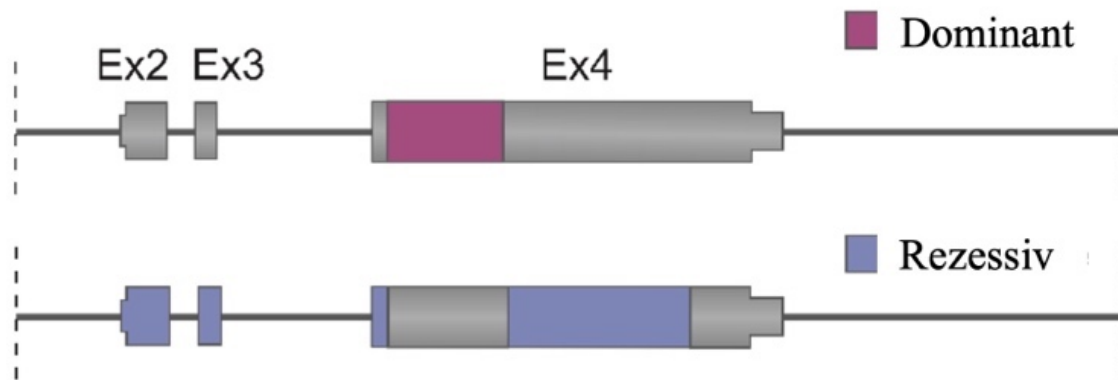


Abbildung 7: *RPI*. Darstellung des *RPI*-Gens mit seinen 4 Exonen. In rosa ist die adRP1-spezifische Region im Exon 4 dargestellt. In blauer sind die arRP1-spezifischen Regionen im Exon 2,3 und 4 dargestellt. Die arRP1-spezifischen Regionen im Exon 4 lokalisieren sich rundherum der adRP1-spezifischen Region. Modifizierte Abbildung nach Dr. Dr. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg.

3.7 Ziel dieser Arbeit

RP repräsentiert eine genetisch heterogene Gruppe hereditärer Netzhautdegenerationen, die durch ein progressives Absterben der Stäbchen gefolgt von dem Verlust der Zapfen charakterisiert sind. Mutationen im *RPI*-Gen stellen eine von sehr vielen möglichen Ursachen für RP dar. Sie manifestieren sich im Mausmodell *RPI*-defizienter Mäuse anhand einer verschmälerten ONL mit degenerierenden Photorezeptorzellen und verkürzten OS sowie anhand eines gestörten Transportes von RHO in die OS.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Konsequenzen *RPI*-defizienter Mutationen mit Hilfe des RO-Modellsystems. RO sind 3D-Modelle der humanen Retina mit einem ähnlichen zellulären sowie histoarchitekturellen Aufbau und wurden bis dato noch nicht in die Erforschung der phänotypischen Auswirkungen von *RPI*-Mutationen im Modellsystem RO eingeschlossen.

Für die Dissertation wurden vorab humane Fibroblasten in hiPSC reprogrammiert. Mittels der CRISPR-Cas9 Technologie wurde eine homozygote Mutation mit Leserasterverschiebung in das *RPI*-Gen eingeführt. Die so manipulierten hiPSC wurden anschließend zu RO differenziert und während 180 Tagen kultiviert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die RO mittels Hellfeldaufnahmen (HF) und Immunzytochemie (Immunocytochemistry, ICC) analysiert. Die Zielparameter der Charakterisierung der *RPI*-defizienten RO waren dabei die Dicke der ONL, die Länge der OS,

die relative Quantität an Stäbchen und Zapfen sowie der Transport der Proteine RHO und RCVRN in die IS und OS der Photorezeptoren.

Anhand der Quantifizierung des relativen Anteils bestimmter Zelltypen in den RO mittels ICC-Aufnahmen wurde an Tag 69 der Ausdifferenzierung untersucht, ob zu diesem frühen Zeitpunkt die Entwicklung der KO- und der WT-RO bezüglich der untersuchten Zelltypen vergleichbar war. Die Dicke der ONL wurde an 140 und 180 Tage alten RO untersucht, indem die spezifischen Zielregionen anhand von HF und ICC-Aufnahmen ausgemessen wurden. Die Analyse der Länge der OS bestand aus der Vermessung der spezifischen Zielregionen an Tag 180 anhand von HF. Die zelluläre Zusammensetzung der RO wurde an Tag 180 anhand von ICC-Aufnahmen ermittelt, indem einerseits der relative Anteil der Stäbchen bzw. der Zapfen gegenüber der gesamten Zellzahl der RO und andererseits der relative Anteil der Stäbchen gegenüber den Zapfen erhoben wurde. Des Weiteren wurde die Apoptoserate in den RO mittels der TUNEL-Methodik ermittelt. Im Rahmen der Untersuchung des RHO bzw. RCVRN-Transports in die OS an Tag 180 wurde mit Hilfe von ICC-Aufnahmen die Intensität von RHO- bzw. RCVRN-Immunofärbungen im Bereich der IS und OS relativ zur Gesamtintensität an RHO bzw. RCVRN in den Photorezeptorzellen quantifiziert. Für alle Untersuchungen wurde ein direkter Vergleich zwischen den *RPI*-defizienten und den WT-RO gezogen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zelllinien

Tabelle 1: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten hiPSC-Linien

hiPSC-Zelllinie	Klon	CRISPR-Cas9 behandelt	<i>RPI</i> Genotyp	Pseudonym
MK270413	26	nein	+/+	/
MK161019B	3	ja	c.295insC/c.295insC	KO #1
MK161019B	4	ja	+/+	WT #1
MK161019B	107	ja	c.295delC/c.295delC	KO #2
MK161019B	109	ja	+/+	WT #2

KO: Knockout, *RPI*-defizienter Genotyp; WT: Wildtyp

4.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Tabelle 2: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze

Material	Hersteller
(-)-Blebbistatin	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Antibiotikum-Antimykotikum (100x)	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
B-27™ Supplement (50x), minus vitamin A	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
B-27™ Supplement (50x), serumfrei	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
BMP4 Recombinant Human Protein	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Corning Matrigel h-ESC-qualified Matrix	Corning, Corning, NY, USA
Cryostar CS10	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada
DMEM, high glucose, no glutamine	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
DMEM/F-12	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

DMEM/F-12, GlutaMAX™ Supplement	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (1x)	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
F-12	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fötales Kälberserum, nicht hitzeinaktiviert (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gentamicin (50 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
GlutaMAX™ Supplement (100x)	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Heparin Natriumsalz aus Schweinedarm	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
HEPES (1 M)	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Knock-out DMEM	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Matrigel	Corning, Corning, NY, USA
Matrigel Growth Factor Reduced (Matrigel-GFR)	Corning, Corning, NY, USA
MEM nicht essenzielle Aminosäuren (100x) (NEAA)	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Mycoplasma Removal Agent (MRA)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
N-2 Supplement (100x)	(Gibco) Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Retinsäure (RA)	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Taurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TeSR™	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada

4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Stain-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Albumin (BSA) Fraction V for Western blotting	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Calciumchlorid, CaCl ₂	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid, NaN ₃	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehydlösung (PFA), 4 % in PBS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Saccharose, C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	VWR International, Löwen, Belgien
Triton® X-100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trizma Base	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

4.1.1 Enzyme

Tabelle 4: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
Citrat-Puffer (10x)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Dispase in DMEM/F12	Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada
Proteinase K Solution	Promega Corporation, Madison, USA

4.1.2 Kit- und Reaktionssysteme

Tabelle 5: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Kit- und Reaktionssysteme

Kit- bzw. Reaktionssystem	Hersteller
RNase free DNase set (50)	QIAGEN, Hilden, Deutschland
In situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

4.1.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen mit jeweiliger Zusammensetzung und Mengenangabe

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Menge
Blocklösung A	PBS (10x)	10 % v/v
	Ziegenserum	10 % v/v
	Triton (20 %)	0,3 % v/v
	H ₂ O dest.	
Blocklösung B	PBS (10x)	10 % v/v
	FBS	10 % v/v
	BSA (10 %)	1 % w/v
	Triton (20 %)	0,1 % v/v
	H ₂ O dest.	
BSA Stammlösung (10 %)	BSA	10 % w/v
	H ₂ O dest.	
Citrat-Pufferlösung (1x)	Citrat-Puffer (10x)	10 % v/v
	Millipore H ₂ O	
PBS (10x)	NaCl	8 % w/v
	KCl	0,02 % w/v
	Na ₂ HPO ₄	1,42 % w/v
	KH ₂ PO ₄	0,25 % w/v

	H ₂ O dest.	
Permeabilisationslösung	Triton X-100	0,1 % v/v
	Natriumcitrat	0,1 % v/v
	DPBS	
Primärantikörperlösung A	PBS (10x)	10 % v/v
	Ziegenserum	2,5 % v/v
	Triton (20 %)	0,1 % v/v
	NaN ₃	0,02 % w/v
	H ₂ O dest.	
Primärantikörperlösung B	PBS (10x)	10 % v/v
	Ziegenserum	5 % v/v
	Triton (20 %)	0,1 % v/v
	NaN ₃	0,02 % w/v
	H ₂ O dest.	
Primärantikörperlösung C	PBS (10x)	10 % v/v
	BSA (10 %)	0,5 % w/v
	Triton (20 %)	0,1 % v/v
	H ₂ O dest.	
Proteinase K Arbeitslösung	Proteinase K	0,00002 % w/v
	Triton (20 %)	1 % v/v
	TE CaCl ₂ Puffer	
Saccharose-Lösung (12,5 %)	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	12,5 % w/v
	DPBS	
Saccharose-Lösung (25 %)	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	25 % w/v
	DPBS	
Saccharose-Lösung (6,25 %)	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	6,25 % w/v
	DPBS	

Sekundärantikörperlösung A	PBS (10x)	10 % v/v
	Ziegenserum	2,5 % v/v
	Triton (20 %)	0,1 % v/v
	H ₂ O dest.	
Sekundärantikörperlösung B	PBS (10x)	10 % v/v
	Ziegenserum	5 % v/v
	Triton (20 %)	0,1 % v/v
	H ₂ O dest.	
Sekundärantikörperlösung C	PBS (10x)	10 % v/v
	BSA (10 %)	0,5 % w/v
	Triton (20 %)	0,1 % v/v
	H ₂ O dest.	
TE CaCl ₂ Puffer (pH 8)	Trizma Base	0,606 % w/v
	EDTA	0,037 % w/v
	CaCl ₂	0,056 % w/v
	Triton X-100	0,5 % v/v
	H ₂ O dest.	
Triton (20 %)	Triton X-100	20 % v/v
	DPBS	

dest.: destilliert

4.1.4 Primäre Antikörper

Tabelle 7: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten primären Antikörper mit jeweiligem Antikörpertyp sowie jeweiliger Herkunft und Verdünnung

Antikörper	Typ	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Transcription factor AP-2 alpha (TFAP2A, #ab108311)	mAK	Kaninchen	1:250	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Cone-rod homeobox (CRX, #H00001406-M02)	mAK	Maus	1:1000	Abnova, Taipeh, Taiwan
Retinaldehyde binding protein 1 (CRALBP, #ab15051)	mAK	Maus	1:500	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Marker of proliferation Ki-67 (MKI67, #ab15580)	pAK	Kaninchen	1:200	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Neural retina leucine zipper (NRL, #AF2945-SP)	pAK	Ziege	1:1000	R&D Systems, Minneapolis, Canada
Nuclear receptor subfamily 2 group E member 3 (NR2E3, #14246-1-AP)	pAK	Kaninchen	1:250	Proteintech Europe, Manchester, United Kingdom
Recoverin (RCVRN, #AB5585)	pAK	Kaninchen	1:1000	(Millipore) Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Rhodopsin (RHO, 1D4)	mAK	Maus	1:1000	Professor Dr. Robert S. Molday, University of British Columbia, Canada

Visual system homeobox 2 (VSX2, #HPA003436)	pAK	Kaninchen	1:1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Synuclein gamma (SNCG, #H00006623-M01)	mAK	Maus	1:500	Abnova, Taipeh, Taiwan

mAK: monoklonaler Antikörper, pAK: polyklonaler Antikörper

4.1.5 Sekundäre Antikörper

Tabelle 8: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten sekundären Antikörper mit jeweiliger Verdünnung

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Esel Anti-Ziege IgG, Alexa Fluor ® 488	1:667	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ziege Anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor ® 488	1:667	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ziege Anti-Maus IgG, Alexa Fluor ® 594	1:667	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

4.1.6 Verbrauchsmaterial

Tabelle 9: Aufgelistet ist das in der Arbeit verwendete Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
1 ml Luer	BD Plastinak, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spain
27G-Kanüle	BD Microbalance, Becton Dickinson S.A., Fraga, Spain
6-Well Zellkultur-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Corning® Costar® Mikrotiterplatte mit ultraniedriger Anhaftung (24-Well)	Corning, Corning, NY, USA

Corning® Costar® Mikrotiterplatte mit ultraniedriger Anhaftung (6-Well)	Corning, Corning, NY, USA
Corning® Costar® Mikrotiterplatte mit ultraniedriger Anhaftung (96-Well)	Corning, Corning, NY, USA
Corning®-Zellkulturkolben mit ultraniedriger Anhaftung 25 cm ²	Corning, Corning, NY, USA
Dako Eindeckmedium	Agilent, Santa Clara, CA, USA
Deckglas 24 x 50 mm	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Disposable base molds 7 x 7 x 5 mm (Einbetterschälchen)	Ted Pella Inc., Redding, CA, US
Einwegpasteurpipetten 3 ml	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Falcon 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcon 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Filterspitzen 10 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Filterspitzen 100 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Filterspitzen 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Handschuhe Peha-soft nitrile S 6-7	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
LeicaCryofect	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikrotomklingen Typ Feather C35	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
NOVA-Synthetik Malpinsel 1570	Da Vinci, Nürnberg, Deutschland
Parafilm	Bemis, Neenah, Wisconsin, USA
Petrischale 10 cm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipette CELLSTAR®, steril, 10 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Pipette CELLSTAR®, steril, 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipette CELLSTAR®, steril, 5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipette CELLSTAR®, steril, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 100 µl	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Roti®-Liquid Barrier Marker	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Sterifilter 150 ml	Corning, Corning, NY, USA
Sterifilter 250 ml	Sarstedt, Newton, NC, USA
Steriflip 50 ml, Vakuum Filtrationssystem	EMD Millipore Corporation, Burlington, USA
Superfrost® Plus Objektträger	VWR International Germany GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tissue Tec Neg-50	Epredia, Portsmouth NH, USA
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz

4.1.7 Laborgeräte

Tabelle 10: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
Centrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
CO ₂ -Incubator Binder CB 160	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Einkanal-Mikroliterpipette Transferpette® S, 0,5 µl – 10 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Einkanal-Mikroliterpipette Transferpette® S, 10 µl – 100 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Einkanal-Mikroliterpipette Transferpette® S, 100 µl – 1000 µl	Brand, Wertheim, Deutschland
Etikettendrucker BMP61	Brady, Langen, Deutschland
Färbekammer	Andreas Berber
Feinwaage Explorer	OHAUS, Nänikon, Schweiz
Kältemikrotom Leica CM1850	Leica, Solmis, Deutschland
Leica DMIL Durchlichtmikroskop	Leica, Solmis, Deutschland
Mehrkanal-Mikroliterpipette Eppendorf Research® plus, 8-Kanal, 30 µl – 300 µL	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Nikon HDMI Farbkamera	Nikon, Tokio, Japan
Nikon ECLIPSE Ts2 (inverses Durchlichtmikroskop)	Nikon, Tokio, Japan
Olympus Flouview FV-3000	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe accu-jet	Brand, Wertheim, Deutschland
Sterilbank HERAsafe HS 12	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific industries, Bohemia, NY, USA
Wasserdestilliergerät	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland

Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
--------------------------	---

4.1.8 Computerprogramme

Tabelle 11: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendete Computerprogramme

Computerprogramme	Hersteller
FV31S-SW Software 2.4.1.198	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Image J 1.53f51	Wayne Rasband and contributors, National Institutes of Health, USA
Mosaic V2.1	Tucsen Photonics, Co.,Fujian, China

4.2 Methoden

4.2.1 Vorarbeiten

Vor Beginn dieser Arbeit wurden hiPSC mit der CRISPR-Cas9 Methodik manipuliert, um Mutationen im *RPI*-Gen einzuführen. Diese Arbeiten wurden durch Dr. Dr. Patricia Berber mit den von ihr betreuten Student*innen am Institut für Humangenetik in Regensburg durchgeführt.

Zuerst wurden die Fibroblasten eines gesunden menschlichen Spenders nach dem Protokoll von Brandl et al. (93) zu hiPSC reprogrammiert (ein Votum der örtlichen Ethikkommission liegt unter dem Zeichen 19-1315-101 vom 20.02.2019 vor). Als Teil der CRISPR-Cas9 Behandlung wurden zunächst sieben sgRNAs bioinformatisch mit dem „Benchling CRISPR Design Tool“ (erhältlich auf: www.benchling.com/ [Internet]. 2019.) vorhergesagt. Ihre Effizienz wurde mit Hilfe eines fluoreszenzbasierten Versuches, basierend auf dem Protokoll von Mashiko et al. (2013) (94), in menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK293, Ursprung: ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland) geprüft. Die vier sgRNAs mit der höchsten vorhergesagten Effizienz wurden mit dem TrueCut™ Cas9 Protein (Hersteller: Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) als RNP-Komplex durch Elektroporation in die hiPSC eingeführt. Die DNA wurde aus den hiPSC isoliert, via Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) vervielfältigt und als Ligation mit einem pGEM®-T vector via Hitzeschock in DH5α *E. coli* eingeführt. Somit konnte eine sgRNA mit einer Effizienz von 23 % identifiziert werden und die mit dieser sgRNA behandelten hiPSC wurden zu

Einzelzellklonen dissoziiert. Die DNA der 126 Einzelzellklone wurde isoliert, via PCR vervielfältigt und anschließend durch Sanger-Sequenzierung analysiert. Somit wurden die Klone KO #1 und KO #2 identifiziert, welche eine homozygote Mutation mit Leserasterverschiebung im *RPI*-Gen tragen (**Tabelle 1, Abbildung 8**). Gleichzeitig wurden innerhalb der 126 Einzelzellklone die Klone WT #1 und WT #2 als wildtypische Klone, bei denen der CRISPR-Prozess keine Mutation in die Zielregion eingeführt hatte, identifiziert und als direkte Vergleichskontrollen mit identischer CRISPR-Cas9-Vorbehandlung genutzt.

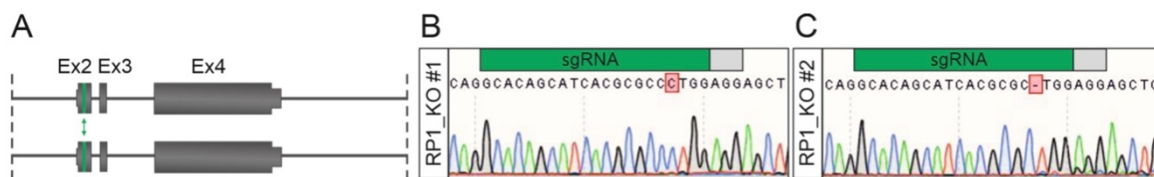


Abbildung 8: *RPI*-Gen mit Gensequenz des *RPI*-Gens aus KO #1 und KO #2 nach Sanger-Sequenzierung. (A) Darstellung des *RPI*-Gens und seiner kodierenden Exone. Die sgRNA, die für die CRISPR-Cas9 Behandlung eingesetzt wurde, wurde gegen das zweite Exon im *RPI*-Gen gerichtet. (B) Darstellung der verursachten Mutation mit Leserasterverschiebung durch Insertion einer Cytosin-Base in die *RPI*-Gensequenz von KO #1 (c.295insC/c.295insC) (C) Darstellung der verursachten Mutation mit Leserasterverschiebung durch Deletion einer Cytosin-Base in die *RPI*-Gensequenz von KO #2 (c.295delC/c.295delC). (B-C) Die Sequenzierung wurde anhand der DNA von den hiPSC KO #1 und KO #2 durchgeführt. Die sgRNA ist in grün und das PAM in grau dargestellt. Modifizierte Abbildung nach Dr. Dr. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg.

Für alle Versuche wurden Zellkultur und Ausdifferenzierungen von KO #1 und WT #1 einerseits sowie von KO #2 und WT #2 andererseits jeweils zeitlich unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

4.2.2 Zellkultur

4.2.2.1 Kultivierung von hiPSC

Die Zellkultur der hiPSC wurde mit Hilfe von Nico Hertel (Technischer Mitarbeiter, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg, Deutschland) durchgeführt.

Zu Beginn der Arbeit wurden die hiPSC-Zelllinien KO #1, KO #2, WT #1 und WT #2 in Kultur genommen. Die Langzeitlagerung der hiPSC fand seit der letzten Inkulturnahme in Cryostar CS120 Einfriermedium in einem Flüssigstickstofftank statt. Die jeweiligen Reaktionsgefäße mit den hiPSC-Chargen wurden anfänglich für etwa 1 Minute (min) im Wasserbad erwärmt

und anschließend an einer desinfizierten Sterilbank weiterverarbeitet. Pro Zelllinie wurde 1 Milliliter (ml) Zellsuspension mit 9 ml DMEM/F-12 versetzt und während 5 min bei 1.200 Umdrehungen zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden anschließend auf einer mit Matrigel-beschichteten 6-Well Zellkultur-Platte ausgesät. Dafür wurde die 6-Well Platte mit 2 ml DMEM/ F-12 pro Well gewaschen und jeweils 1 ml TeSR-Medium mit 0,05 % Gentamycin pro Well vorgelegt. Jedes Pellet wurde mit 1 ml TeSR-Medium und 0,05 % Gentamycin versetzt und ausgesät. Jedes Well wurde abschließend mit 1 % MRA versetzt. Ab Tag 1 (nächster Tag) wurde täglich ein kompletter Mediumwechsel mit TeSR-Medium mit 0,05 % Gentamycin, und 1 % MRA vorgenommen. Ab Tag 7 bestand der Mediumwechsel aus TeSR-Medium mit 0,05 % Gentamycin. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und einem Kohlenstoffdioxid (CO₂) Gehalt von 5 %. Während der gesamten Kulturzeit wurden die hiPSC täglich unter einem Lichtmikroskop inspiziert und ausdifferenzierte Areale gegebenenfalls durch Absaugen exzidiert. Bei einer Konflueszenz von 60 bis 80 % erfolgte eine Passagierung. Das Split-Verhältnis orientierte sich dabei an der Konfluenz der jeweiligen Zelllinien. Für die Passagierung wurden die hiPSC mit 2 ml DMEM/F-12 gewaschen und 5 min auf 37 °C mit Dispase inkubiert. Nach erneutem Waschen mit DMEM/F-12 wurden die Zellen mit einer 5 ml Glaspipette sowie einem Zellschaber vom Boden der Wells gelöst und mit TeSR mit 0,05 % Gentamycin auf eine neue Matrigel-beschichtete Platte überführt. Nach dem Passagieren wurden die Zellen weiterkultiviert, bis bei einer Konflueszenz von 70 bis 80 % das Differenzierungsprotokoll der hiPSC zu RO eingeleitet werden konnte.

4.2.2.2 Ausdifferenzierung von hiPSC zu RO

Das Differenzierungsprotokoll von hiPSC zu RO wurde von Dr. Dr. Patricia Berber etabliert (29) und basiert auf dem Vorgehen von Zhong et al (35). Die Kultivierung der sich ausdifferenzierenden Zellen fand in zeitlich genau definierten Zeiträumen in vier verschiedenen Medien statt (**Tabelle 12**). Während der gesamten Kulturzeit befanden sich die Kulturen in einem lichtundurchlässigen CO₂-Inkubator auf 37 °C mit 5 % CO₂. Die Kultur fand, falls nicht anderweitig spezifiziert, in Gefäßen mit ultraniedriger Anhaftung (UNA) statt.

Tabelle 12: Aufgelistet sind alle in der Arbeit benutzten Differenzierungsmedien zur Ausdifferenzierung der hiPSC zu RO mit Zusammensetzung und Mengenangabe

Differenzierungsmedium	Zusammensetzung	Menge
NIM	DMEM, high glucose, no glutamine	48,5 % v/v
	F12	48,5 % v/v
	NEAA (100x)	1 % v/v
	GlutaMAX™ Supplement (100x)	1 % v/v
	N-2 Supplement (100x)	1 % v/v
	Heparin Natriumsalz	2 µg/ml
RDM	DMEM, high glucose, no glutamine	72 % v/v
	F12	24 % v/v
	B-27™ Supplement (50x), minus vitamin A	2 % v/v
	NEAA (100x)	1 % v/v
	Antibiotikum-Antimykotikum (100x)	1 % v/v
	GlutaMAX™ Supplement (100x)	1 % v/v
RC2	DMEM, high glucose, no glutamine	64 % v/v
	F12	21 % v/v
	FCS	10 % v/v
	B-27™ Supplement (50x), serumfrei	2 % v/v
	NEAA (100x)	1 % v/v
	Antibiotikum-Antimykotikum (100x)	1 % v/v
	GlutaMAX™ Supplement (100x)	1 % v/v
	Taurin	0,1 % v/v

RC1	DMEM/F-12 GlutaMAX™ Supplement	87 % v/v
	FCS	10 % v/v
	N-2 Supplement (100x)	1 % v/v
	NEAA (100x)	1 % v/v
	Antibiotikum-Antimykotikum (100x)	1 % v/v
	Taurin	0,1 % v/v

Um den Ausdifferenzierungsprozess zu starten (Tag 0), wurden die Zellen dreier Wells pro Zelllinie zuerst mit sterilfiltriertem DPBS gewaschen und anschließend während 15 min bei 37 °C mit Dispase inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit DPBS wurden die Zellen in TeSR mit 0,2 % Blebbistatin mittels einer 5 ml Glaspipetten und einem Zellschaber vom Boden der Wells gelöst und in eine TeSR-Lösung mit 0,2 % Blebbistatin überführt. 10 ml dieser Zellsuspension wurde anschließend in einen Corning®-Zellkulturkolben (25 cm²) gegeben und liegend im Inkubator gelagert. In den nächsten drei Tagen wurden die Zellen auf das Neuronal Induction Medium (NIM; **Tabelle 12**) umgestellt. Dafür wurden sie an Tag 1 in TeSR+NIM im Verhältnis 3:1 kultiviert, an Tag 2 im Verhältnis 2:1 und an Tag 3 fand eine vollständige Umstellung auf NIM statt. Am Tag 6 fand ein Mediumwechsel mit NIM und 0,1 % BMP4 statt. Anschließend wurden die Zellen an Tag 7 auf eine frische Matrigel-GFR beschichtete 6-Well Zellkultur-Platte ohne UNA mit 3 ml NIM pro Well ausplattiert. Dafür wurde die Zellsuspension aus einem Corning®-Zellkulturkolben in ein 15 ml Falcon überführt und 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, bis sich die Zellen abgesetzt hatten. 30 µl der Zellaggregate wurden daraufhin in die Mitte eines Wells überführt. An Tag 9 wurden anschließend 3 ml NIM pro Well hinzugefügt, während an Tag 12 3 ml NIM pro Well und an Tag 16 2,5 ml NIM pro Well abgezogen und mit frischem NIM ersetzt wurden. Die Umstellung auf das Retinal Differentiation Medium (RDM; **Tabelle 12**) erfolgte an Tag 16 der Ausdifferenzierung. Anschließend wurde an jedem zweiten Tag ein kompletter Mediumwechsel durchgeführt. An den Tagen 22 und 24 wurden die neuronale Domäne von der 6-Well Zellkulturplatte ausgeschnitten und einzeln auf die Wells einer 96-Well Zellkulturplatte überführt. Dafür wurde ein kompletter Mediumwechsel mit 5 ml RDM mit 1 % Hepes durchgeführt und die neuronale Domäne mit 27G-Kanülen unter einem Durchlichtmikroskop bei einer 4x-Vergrößerung

ausgeschnitten. Die Qualitätskriterien bei der Überführung waren gut ausgebildete, kompakte, gelblich erscheinende neuronale Domänen. Die weitere Kultivierung der RO fand anschließend einzeln mit 250 µl RDM pro Well auf der 96-Well Zellkulturplatte statt. Dabei wurde von Tag 24 bis eine Woche vor Tag 42 zweimal wöchentlich ein halber Mediumwechsel durchgeführt und in der Woche vor der Umstellung auf das nächste Medium dreimal wöchentlich. An Tag 42 wurde das Medium auf Retinal Cup 2 (RC2; **Tabelle 12**) umgestellt und wie bei jeder anschließenden Umstellung wurden alle schlecht differenzierten (Zystenbildung, dunkle neuronale Domäne) oder abgestorbenen RO entfernt. Von den schlecht differenzierten RO wurden pro Genotyp sechs bis zehn RO aufgehoben und ohne Medium auf -20 °C für zukünftige Genotypisierung aufbewahrt. Ab Tag 42 fand die weitere Kultivierung der RO auf einer 24-Well Zellkulturplatte in 500 µl RC2-Medium statt. Dabei wurde bis Tag 62 zweimal wöchentlich ein subtotaler Mediumwechsel durchgeführt. Ab Tag 62 bis Tag 90 wurde durch ständiges Hinzufügen und Erneuern von mit Retinsäure (RA) versetztem RC2-Medium das Medium auf einer Konzentration von 0,01 % RA gehalten (**Tabelle 13**).

Tabelle 13: Aufgelistet ist der Wochenablauf für die Kultur der RO mit RC2 und RA

	Konzentration RA	Hinzugefügtes Medium pro Well
Montag	1 µl RA/10 ml RC2	600 µl
Dienstag	7 µl RA/10 ml RC2	100 µl
Mittwoch	8 µl RA/10 ml RC2	100 µl
Donnerstag	9 µl RA/10 ml RC2	100 µl
Freitag	1 µl RA/10 ml RC2	600 µl

Ab Tag 91 bis zum jeweiligen Zeitpunkt der Ernte wurden die RO schlussendlich in 750 µl Retinal Cups 1 (RC1)-Medium mit 0,005 % RA kultiviert (**Tabelle 12**). Dabei wurde zweimal wöchentlich ein subtotaler Mediumwechsel durchgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Ausdifferenzierung von den hiPSC-Zelllinien KO #1, WT #1, KO #2 und WT #2 durchgeführt. Die Einleitung des Differenzierungsprotokoll fand zuerst zeitgleich für KO #2 und WT #2 und danach zeitgleich für KO #1 und WT #1 statt. Weitere RO, die im Rahmen der Analysen dieser Arbeit benutzt wurden, wurden vorab von Lisa Parakenings (Technische Mitarbeiterin, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg,

Deutschland) oder Dr. Dr. Patricia Berber, nach dem obigen Protokoll aus den gleichen hiPSC-Zelllinien ausdifferenziert (**Tabelle 14**).

Tabelle 14: Aufgelistet sind die Analysen, die mit Hilfe eigenständig ausdifferenzierter RO durchgeführt wurden. Gegenübergestellt sind die Analysen, die mit Hilfe vorab ausdifferenzierter RO durchgeführt wurden.

	Eigenständige Ausdifferenzierung	Vorangegangene Ausdifferenzierungen
Qualitätskontrolle an Tag 69	✓	
Dicke der ONL		✓
Länge der OS		✓
Apoptoserate		✓
Quantifizierung der Photorezeptorzellen		✓
RHO und RCVRN Transport		✓

4.2.3 Immunzytochemie

4.2.3.1 Vorbereitung der Proben

Die Ernte der RO fand im Rahmen dieser Arbeit zu zwei verschiedenen Zeitpunkten statt. Der Haupterntezeitpunkt wurde auf den Tag 180 (± 1 Tag) gelegt. An Tag 180 wurden pro Genotyp (KO #1, WT #1, KO # 2, WT # 2) 10 RO geerntet, die von Lisa Parakenings ausdifferenziert wurden. Von den eigenständig ausdifferenzierte RO wurden schon an Tag 69 ein RO für die Genotype KO #1, WT #1 und KO #2 und drei RO für den Genotyp WT #2 geerntet. Vor der Entnahme der RO aus ihrer 24-Well Zellkulturplatte wurden Durchlichtbilder am Nikon ECLIPSE Ts2 Mikroskop in 2x und 10x Vergrößerung aufgenommen.

Die Ernte der RO erstreckte sich jeweils über zwei Tage. Am ersten Tag wurden die RO mitsamt ihrem gesamten Medium auf eine 24-Well Zellkulturplatte ohne UNA überführt. Anschließend wurden die RO einmal während 5 min in DPBS gewaschen. Die Fixierung der RO erfolgte durch eine 30-minütige Inkubation in 300 μ l PFA (4 % in PBS). Nach dreimaligem Waschen während 5 min in DPBS inkubierten die RO zunächst eine Stunde (h) bei RT in 500 μ l 6,25-prozentiger Saccharose-Lösung, dann 1 h bei RT in 500 μ l 12,5-prozentiger

Saccharose-Lösung. Über Nacht wurden die RO anschließend auf 4 °C in 500 µl 25-prozentiger Saccharose-Lösung inkubiert. Vor der Einbettung inkubierten die RO zunächst während 1 h auf RT in einer 1:1-Mischung aus Tissue Tec Neg-50 und 25-prozentiger Saccharose-Lösung. Anschließend wurden die RO in reines Tissue Tec Neg-50 in 2 ml Reagenzgefäßen überführt und dort vorsichtig mit einer Pipettenspitze umgerührt, um restliche Saccharosereste zu entfernen. Schlussendlich erfolgte die Überführung in mit Tissue Tec Neg-50 gefüllte Einbetterschälchen. Das Tissue Tec Neg-50 wurde für 2 min bei -20 °C ausgehärtet, bevor die Einbetterschälchen auf -80 °C gelagert wurden.

4.2.3.2 Anfertigung von Kryoschnitten

Alle Kryoschnitte wurden eigenständig oder mit Hilfe von Harriet Marchel (Interne Praktikantin, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg, Deutschland) und Lena Rauschecker (Studentische Hilfskraft, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg, Deutschland) angefertigt.

Die Kryoschnitte aller RO wurden am Kältemikrotom Leica CM1850 angefertigt. Die Schnitte wurden bei einer Temperatur von -20 °C angefertigt und die Schnittdicke betrug 10 µm. Vor dem Anfertigen der Schnitte wurden die Präparate während 30 min auf -20 °C gelagert. Das Auftragen der Schnitte auf die Objektträger erfolgte mittels Pinsel und anschließender Wärmeanwendung.

4.2.3.3 Immunzytochemische Färbung

Alle Färbungen mit den folgenden primären Antikörpern (AP-2-alpha, Ki67, SNCG, VSX2, CRALBP, CRX, RCVRN und RHO) folgten dem hier beschriebenen Protokoll mit der Blocklösung A, dem primären Antikörper A und dem sekundären Antikörper A (**Tabelle 6**).

Der Prozess der immunzytochemischen Färbung erstreckte sich jeweils über drei Tage. Für den gesamten Färbeprozess wurde eine mit Leitungswasser gefüllte Färbekammer zur Aufbewahrung der Objektträger genutzt. Am ersten Tag wurden die Schnitte eines Objektträgers mit Roti®-Liquid Barrier Marker umrandet und anschließend dreimal für 5 min mit DPBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte während 1 h bei RT mit einer Blocklösung inkubiert. Schließlich wurde auf alle Schnitte außer der Negativkontrolle die Primärantikörperlösung mit den primären Antikörpern in ihrer jeweiligen Verdünnung aufgetragen (**Tabelle 7**). Auf der Negativkontrolle blieb die Blocklösung. Der primäre Antikörper inkubierte während 24 h bei 4 °C. Am 2. Tag wurde erneut dreimal während 5 min mit DPBS gewaschen und anschließend die frisch aufgetaute sekundäre Antikörperlösung mit den sekundären Antikörpern Anti-Kaninchen 488 und Anti-Maus 594 in ihrer jeweiligen

Verdünnung aufgetragen (**Tabelle 8**). Die Inkubation des sekundären Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4° C. Am nächsten Morgen wurde dreimal mit DPBS gewaschen, bevor die Objektträger eingedeckelt wurden. Dafür wurden 1 bis 2 Tropfen Dako Eindeckmedium auf den Objektträger geben und die Deckgläser vorsichtig auf die Objektträger gesenkt. Die Objektträger trockneten abschließend mindestens eine Nacht im Dunkeln bei Raumluft vor dem Mikroskopieren.

4.2.3.4 Immunzytochemische Färbung der Stäbchen mit Antigendemaskierung

Die Etablierung eines Protokolls zur ICC-Färbung mit NR2E3 orientierte sich an der Publikation von Haque et al. (2013) (95). Für eine ICC-Doppelfärbung mit den primären Antikörpern NR2E3 und CRX in ihren jeweiligen Verdünnungen (**Tabelle 7**) wurde die Blocklösung A sowie die Primärantikörperlösung B (**Tabelle 6**) und die Sekundärantikörperlösung B (**Tabelle 6**) mit den sekundären Antikörpern Anti-Kaninchen 488 und Anti-Maus 594 in ihren jeweiligen Verdünnungen (**Tabelle 8**) genutzt. Der generelle Ablauf war vergleichbar mit dem Ablauf wie unter Punkt 4.2.3.3 beschrieben. Dabei wurde zusätzlich zwischen der Blocklösung und der Primärantikörperlösung eine Proteinase K-Arbeitslösung bei 37 °C appliziert. Die Wirkdauer von Proteinase K wurde für 9 min, 5 min und 1 min getestet und abschließend auf exakt 1 min festgelegt. Die Proteinase K-Arbeitslösung wurde anschließend wieder abgenommen und dreimal während 5 min mit DPBS (+0,1 % Triton) gewaschen. Anschließend konnte die Primärantikörperlösung appliziert werden und mit dem unter 4.2.3.3 beschriebenen Protokoll weiter verfahren werden. Alle Waschschrte erfolgten mit DPBS (+0,1 % Triton). Ein weiterer Versuchsansatz zur Rückgewinnung maskierter Antigenepitope erfolgte mit Citrat anstelle von Proteinase K. Dafür wurden die Kryoschnitte dreimal während 5 min mit DPBS gewaschen und anschließend während 15 min bei 60 °C mit einer Citrat-Pufferlösung inkubiert (**Tabelle 6**). Anschließend wurde während 1 h bei RT mit der Blocklösung A inkubiert, bevor die Primärantikörperlösung B hinzugefügt wurde. Der weitere Ablauf folgte dem Protokoll wie unter 4.2.3.3 beschrieben mit der sekundären Antikörperlösung A und dem sekundären Antikörper Anti-Kaninchen 488 in ihren spezifischen Verdünnungen.

Anstelle von NR2E3 wurde auch NRL als Antikörper zur Anfärbung der Stäbchen getestet. Um die Methodik und Konzentration für die Anwendung des NRL-Antikörpers zu etablieren, diente anfangs eine Publikation von Welby et al. (2017) als Grundlage, da die Autoren in ihrer Arbeit exakt den gleichen Antikörper benutzt haben (96). Dabei war der Ablauf der Färbung identisch zu einer immunzytochemischen Färbung wie unter Punkt 4.2.3.3 beschrieben. Die

Zusammensetzung der diversen Lösungen änderte sich zu der Zusammensetzung von der Blocklösung B, der Primärantikörperlösung C und der Sekundärantikörperlösung C (**Tabelle 6**). Der primäre Antikörper NRL sowie der sekundäre Antikörper Anti-Ziege 488 wurden dabei in ihren jeweiligen Verdünnungen eingesetzt (**Tabelle 7, Tabelle 8**). Die ICC-Färbung mit NRL wurde ohne und mit Proteinase K (Inkubation für 9 min) zur Antigendemaskierung ausgetestet.

4.2.4 TUNEL-Assay

Die Durchführung des TUNEL-Assays wurde für alle RO von Angelina Cimolino (Medizinische Doktorandin, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung der konfokalmikroskopischen Aufnahmen dieses Versuches wurde eigenständig durchgeführt.

Der TUNEL-Assay wurde in einer mit Wasser gefüllten Färbekammer durchgeführt. Zur korrekten Durchführung des TUNEL-Assays musste sowohl eine Positivkontrolle wie auch eine Negativkontrolle mitgeführt werden. Für den TUNEL-Assay sowie für beide Kontrollen wurden die Kryoschnitte anfangs dreimal für 5 min mit DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte während 2 min auf Eis mit einer Permeabilisationslösung (**Tabelle 6**) inkubiert. Die Permeabilisationslösung wurde abgenommen und die Schnitte erneut dreimal für 5 min mit DPBS gewaschen. Die Positivkontrolle wurde dann während 15 min bei RT mit einer DNase I -Lösung aus dem RNase free DNase Set (50) (**Tabelle 15**) versehen und erneut dreimal für 5 min mit DPBS gewaschen.

Tabelle 15: Aufgelistet ist die Zusammensetzung der DNase I-Lösung mit Volumenangabe

Komponente	Volumen
DNase I in RNase freiem H ₂ O	10 µl (1500 Kunitz)
RDD-Puffer	60 µl

Alle Reaktionsschritte mit der TUNEL-Reaktionsmischung wurden in Dunkelheit durchgeführt. Die Kryoschnitte für den TUNEL-Assay und die Positivkontrolle wurden mit der TUNEL-Reaktionsmischung (**Tabelle 16**) versehen, während die Negativkontrolle mit der Labellösung aus der TUNEL-Reaktionsmischung inkubiert wurde.

Tabelle 16: Aufgelistet ist die Zusammensetzung der TUNEL-Reaktionsmischung mit Volumenangabe

Komponente	Volumen
Labellösung	450 µl
Enzymlösung, 1:10 verdünnt	50 µl

Die Inkubationszeit betrug dabei jeweils 1 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Kryoschnitte erneut dreimal für 5 min mit DPBS gewaschen.

Die Kryoschnitte für den TUNEL-Assay sowie beide Kontrollschnitte wurden abschließend im Dunkeln während 30 min bei RT mit einer 1:1000 DAPI in DPBS-Lösung inkubiert, bevor sie dreimal mit DPBS gewaschen und schließlich mit Dako Eindeckmedium eingedeckelt wurden.

4.2.5 Konfokale Aufnahmen

4.2.5.1 Konfokalmikroskopie

Die konfokalmikroskopischen Bilder wurden entweder eigenständig oder mit Hilfe von Lena Rauschecker und Angelina Cimolino aufgenommen.

Die konfokalmikroskopischen Bilder wurden mit dem Olympus Flouview FV-3000 Mikroskop aufgenommen. Aufnahmen derselben Versuchsreihe wurden unter den gleichen Bedingungen unternommen. Die Aufnahmen der ganzen Kryoschnitte (Übersichtsaufnahmen) wurden für alle Färbungen in einer 10x-Vergrößerung aufgenommen. Nahaufnahmen der RHO und RCVRN gefärbten Kryoschnitte wurden in einer 20x-Vergrößerung gemacht. Bei den RHO und RCVRN-Nahaufnahmen wurde jeweils der mittigste Schnitt des Objektträgers gewählt und von diesem Schnitt drei Bilder an unterschiedlichen Stellen aufgenommen. Bei den Nahaufnahmen der NR2E3 gefärbten Kryoschnitten wurde ein Bild des mittigsten Schnitts des Objektträgers in 10x-Vergrößerung und 2,26-fachen Zoom aufgenommen.

4.2.5.2 Auswertung

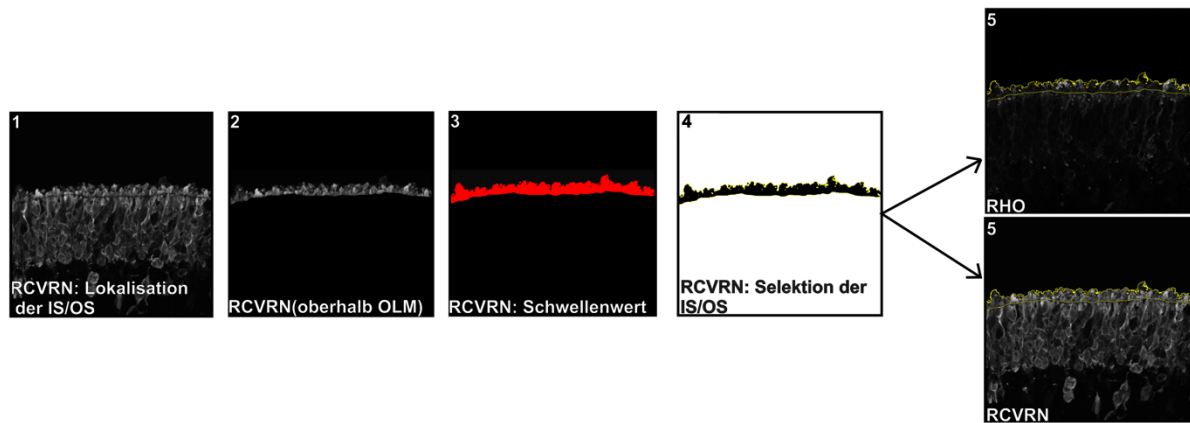
Die konfokalmikroskopischen Bilder wurden mit Hilfe der Software Image J (Version 1.53f51) ausgewertet. Die statistische Auswertung wurde mit Microsoft® Excel® (Version 16.59) erstellt.

Die Übersichtsbilder wurden anhand von Makros, gleichzusetzen mit definierten Befehlsreihenfolgen, ausgewertet, die entweder eigenständig oder von Dr. Dr. Patricia Berber geschrieben wurden. Diese Makros dienten der Quantifizierung der Fläche, die für den

jeweiligen Marker positiv angefärbt waren. Die Makros konvertierten die Aufnahmen zuerst in 16-bit Format, entfernten Signale die unter einem definierten Schwellwertbereich lagen nach der Methode aus (97) und quantifizierten die gefärbte Fläche für den jeweiligen Marker. Abschließend wurde für die nukleären Marker (AP-2-alpha, Ki67, SNCG, CRX, NR2E3) der relative Wert aus der gefärbten Fläche im Vergleich zur DAPI-gefärbten (DAPI⁺)-Fläche errechnet. Ebenfalls für die Aufnahmen, die mit der TUNEL-Methode angefärbt wurden, wurde der relative Wert aus der TUNEL⁺-Fläche im Vergleich zur DAPI⁺-Fläche erhoben. Für die zellulären Marker RHO und RCVRN wurde der relative Wert aus dem gesamten RHO⁺-Bereich im Vergleich zum gesamten RCVRN⁺-Bereich ermittelt. Die gleiche Analyse wurde für die NR2E3⁺-Fläche im Vergleich zur CRX⁺-Fläche durchgeführt. Für jedes RO wurden mindestens drei Kryoschnitte ausgewertet und der Mittelwert errechnet. Danach wurde der Mittelwert und die Standardabweichung von allen RO pro Zelllinie errechnet.

Die Auswertung der Nahaufnahmen der für RHO und RCVRN gefärbten Kryoschnitte zur Quantifizierung des RHO und RCVRN Transportes wurde in Image J anhand von Aufnahmen von Tag 180 alten RO durchgeführt. In die Auswertung wurden Bilder einbezogen, die eine deutlich erkennbare OLM sowie eine klar definierte ONL aufwiesen. Zunächst wurden die Aufnahmen in 16-bit Format konvertiert. Im Kanal der RCVRN-Färbung (**Abbildung 9A-1**) wurden anschließend alle Bereiche unterhalb der OLM und oberhalb der OS entfernt (**Abbildung 9A-2**). Nachdem mit Hilfe eines Schwellenwertes die gefärbte Fläche identifiziert wurde (**Abbildung 9A-3**), wurde eine Selektion dieser Fläche vorgenommen (**Abbildung 9A-4**). Diese Selektion wurde jeweils für den Kanal der RCVRN-Färbung sowie für den Kanal der RHO-Färbung übernommen (**Abbildung 9A-5**). Schließlich konnte die Intensität von RCVRN bzw. RHO im Bereich der IS und OS ausgemessen werden.

A



B

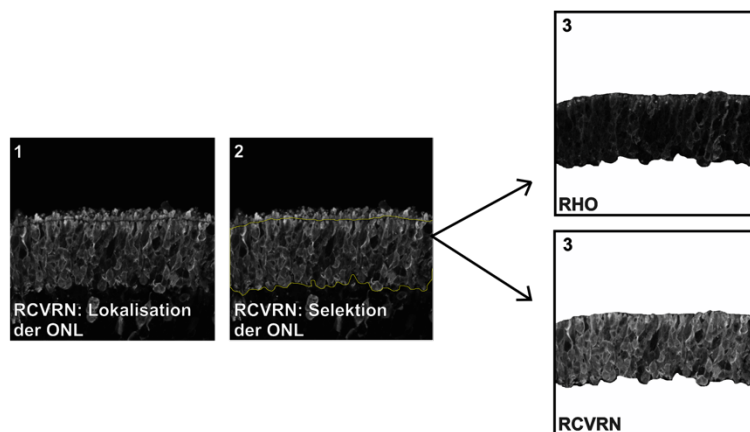


Abbildung 9: Darstellung der Auswertungsmethode der Nahaufnahmen von RCVRN und RHO.

(A) Methode zur Messung der Intensität von RHO bzw. RCVRN in den IS und OS. 1- Die Region der IS und OS wurde in einer im RCVRN-Kanal aufgenommenen Nahaufnahme im 16-bit Format lokalisiert. 2- Bereiche unterhalb der OLM und oberhalb der OS wurden entfernt. 3- Die gefärbte Fläche wurde mit Hilfe eines Schwellenwerts identifiziert. 4- Der Bereich der IS und OS wurde selektioniert. 5- Die Selektion wurde auf ein 16-bit Bild im RHO-Kanal sowie im RCVRN-Kanal überlagert. (B) Methode zur Messung der Intensität von RHO bzw. RCVRN in der ONL. 1- Die Region der ONL wurde in einer im RCVRN-Kanal aufgenommenen Nahaufnahme im 16-bit Format lokalisiert. 2- Die Region der ONL wurde manuell selektioniert. 3- Die Selektion wurde auf ein Bild im 16-bit Format im RHO-Kanal sowie im RCVRN-Kanal überlagert.

Um die Intensität im Bereich der ONL zu messen, wurde die Kernschicht unterhalb der OLM im Kanal der RCVRN-Färbung manuell umfahren und ausgemessen (**Abbildung 9B**). Die gleiche Selektion wurde für den Kanal der RHO-Färbung übernommen und ebenfalls ausgemessen (**Abbildung 9B**). Anschließend wurde pro Nahaufnahme eines RO jeweils für RHO und für RCVRN die Summe aus der Intensität in den IS und OS und der Intensität in der ONL errechnet und abschließend der Quotient aus der Intensität in den IS und OS im Vergleich zur Gesamtintensität erhoben. Pro RO wurde ein Mittelwert aus den Werten der drei Nahaufnahmen ermittelt werden. RO mit weniger als zwei ermittelten Werten wurden aus der

Analyse ausgeschlossen. Danach wurde der Mittelwert und Standardabweichung von allen RO pro Zelllinie erhoben.

Die Ausmessung der Dicke der ONL anhand von immunzytochemischen Aufnahmen wurde mit Hilfe von Aufnahmen von Tag 180 alten RO durchgeführt. Für diese Ausmessung wurden die Nahaufnahmen der NR2E3-gefärbten Kryoschnitte genutzt. Es wurde an drei verschiedenen Stellen der Nahaufnahme eines RO die Breite der angefärbten Zellkernschicht am Rand des RO ausgemessen. Abschließend wurde pro RO der Mittelwert aus den drei erhobenen Einzelwerten errechnet. Danach wurde der Mittelwert und Standardabweichung von allen RO pro Zelllinie erhoben.

4.2.6 Hellfeldaufnahmen

4.2.6.1 Durchlichtmikroskopie

Für die Aufnahme der Durchlichtbilder an Tag 140 und 180 der Ausdifferenzierung wurde das Nikon ECLIPSE Ts2 Mikroskop und das Programm Mosaic V2.1 genutzt. Bei allen Aufnahmen wurde auf eine Scharfstellung aller Areale des RO geachtet. An Tag 140 wurden Übersichtsaufnahmen der RO in einer 2x-Vergrößerung und mit 2x-Kalibrierung aufgenommen. Dabei wurde vor allem (v.a.) auf die Scharfstellung der ONL geachtet. Die Belichtungseinstellung wurde immer individuell angepasst. An Tag 180 wurden die RO in 2x und 10x-Vergrößerung und mit der jeweiligen 2x und 10x-Kalibrierung aufgenommen. Bei der 10x-Vergrößerung wurden drei Nahaufnahmen pro RO an drei verschiedenen Polen des RO aufgenommen. Dabei wurde auf die Fokussierung und Scharfstellung der ONL samt OS geachtet.

4.2.6.2 Auswertung

Die Durchlichtbilder wurden mit Hilfe der Software Image J ausgewertet. Die statistische Auswertung wurde mit Microsoft® Excel® erstellt. Lediglich RO, bei denen mindestens drei Messwerte erhoben werden konnten, wurden in die Auswertung eingeschlossen.

Die ONL wurde jeweils an Tag 140 und 180 mit Hilfe der Übersichtsaufnahmen, die in einer 2x-Vergrößerung aufgenommen wurden, ausgemessen. Es wurde die Dicke der hellen Außenzone der RO an 3 bis 16 Stellen pro RO ausgemessen. Die Anzahl der Messpunkte war abhängig von der Variabilität der Ausprägung der ONL sowie von der Größe der RO. Pro RO wurde abschließend der Mittelwert aus den erhobenen Einzelmessungen errechnet. Danach wurde der Mittelwert und Standardabweichung von allen RO pro Zelllinie erhoben.

Die Länge der OS wurde an Tag 180 anhand der 10x-vergrößerten Bilder ausgemessen. In ImageJ wurde in jedem der drei aufgenommenen Bilder die Länge der IS und OS an drei verschiedenen Stellen gemessen. Mindestens sechs Stellen pro RO wurden ausgemessen. RO, die keine sichtbaren OS aufwiesen, wurden mit 0 μm als OS-Länge eingetragen. Abschließend wurde pro RO ein Mittelwert aus den erhobenen Einzelwerten errechnet. Danach wurde der Mittelwert und Standardabweichung von allen RO pro Zelllinie erhoben.

5 Ergebnisse

KO #1 und WT #1 einerseits sowie KO #2 und WT #2 andererseits wurden parallel ausdifferenziert, geerntet, geschnitten, gefärbt und mikroskopiert. Die quantitativen Analysen sind graphisch gepaart dargestellt.

5.1 Ausdifferenzierung von Stammzellen zu RO

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hiPSC zu RO ausdifferenziert (**Abbildung 10**). Im Laufe der Ausdifferenzierung konnten dreidimensionale, überwiegend kugelförmige Strukturen beobachtet werden, die ein helle, kompakte Außenzone und einen dunkleren Kern aufwiesen (**Anhang 2**). Somit waren wichtige Qualitätskriterien und Charakteristika, die RO definieren, erfüllt worden (36). RO, die diesen Qualitätskriterien nicht gerecht wurden, wurden verworfen.

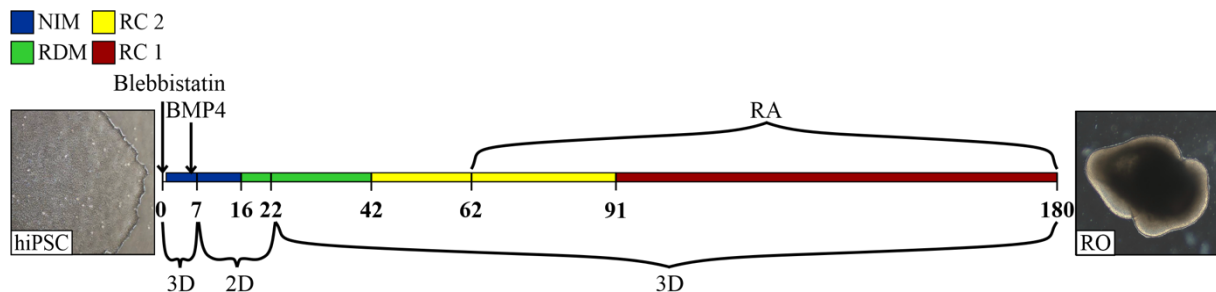


Abbildung 10: Zeitliche Darstellung der Ausdifferenzierung der hiPSC zu RO. Dargestellt sind die verwendeten Differenzierungsmedien und -zusätze sowie die Abfolge der Kultivierungsbedingungen. Die RO wurden in vier verschiedenen Differenzierungsmedien kultiviert. Von Tag 1 bis Tag 16 fand die Kultivierung in NIM statt, von Tag 16 bis 42 in RDM, von Tag 42 bis 91 in RC2 und abschließend von Tag 91 bis 180 in RC1. An Tag 0 wurden die hiPSC mit Blebbistatin behandelt. An Tag 6 wurde BMP4 zur Kultur hinzugegeben und von Tag 62 bis 180 wurde RA als Zusatz zur Kultur hinzugegeben. Das Differenzierungsprotokoll folgte einem 3D-2D-3D-Prinzip.

Zwischen den RO unterschiedlicher Genotypen (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2) konnten makroskopisch im Allgemeinen keine deutlichen Unterschiede erkannt werden. Zwischen den RO eines Genotyps konnten jedoch erhebliche qualitative sowie strukturelle Differenzen ausgemacht werden. Die RO unterschieden sich in der Ausbildung ihrer Qualitätsmerkmale sowie in ihrer Größe, ihrer Form (rund, oval, eingekerbt) und in der Ausdehnung ihrer hellen Außenzone (**Anhang 2**). Somit konnte eine merkliche Organoidvariabilität beobachtet werden.

5.2 Vergleichbare zelluläre Zusammensetzung der KO- und WT-RO an Tag 69

Der Ablauf der frühen retinalen Entwicklung der RO sollte sowohl in KO- als auch in WT-RO vergleichbar sein (56,77,78). Ziel der Qualitätskontrolle an Tag 69 der Ausdifferenzierung war somit die Untersuchung, ob sowohl KO- als auch WT-RO in einem frühen Entwicklungsstadium alle spezifischen retinalen Zelltypen in vergleichbaren Quantitäten aufwiesen und sich somit erwartungsgemäß entwickelten.

Die HF der RO ließen mikroskopisch keinen deutlichen Unterschied bezüglich des Entwicklungsstandes der RO erkennen (**Abbildung 11A**). Zur weiteren Durchführung dieser Untersuchung wurden konfokalmikroskopische Übersichtsaufnahmen der Tag 69 alten RO mit den Antikörpermarkern MKi67, VSX2, CRX, SNCG, TFAP2A, RCVRN und CRALBP gefärbt.

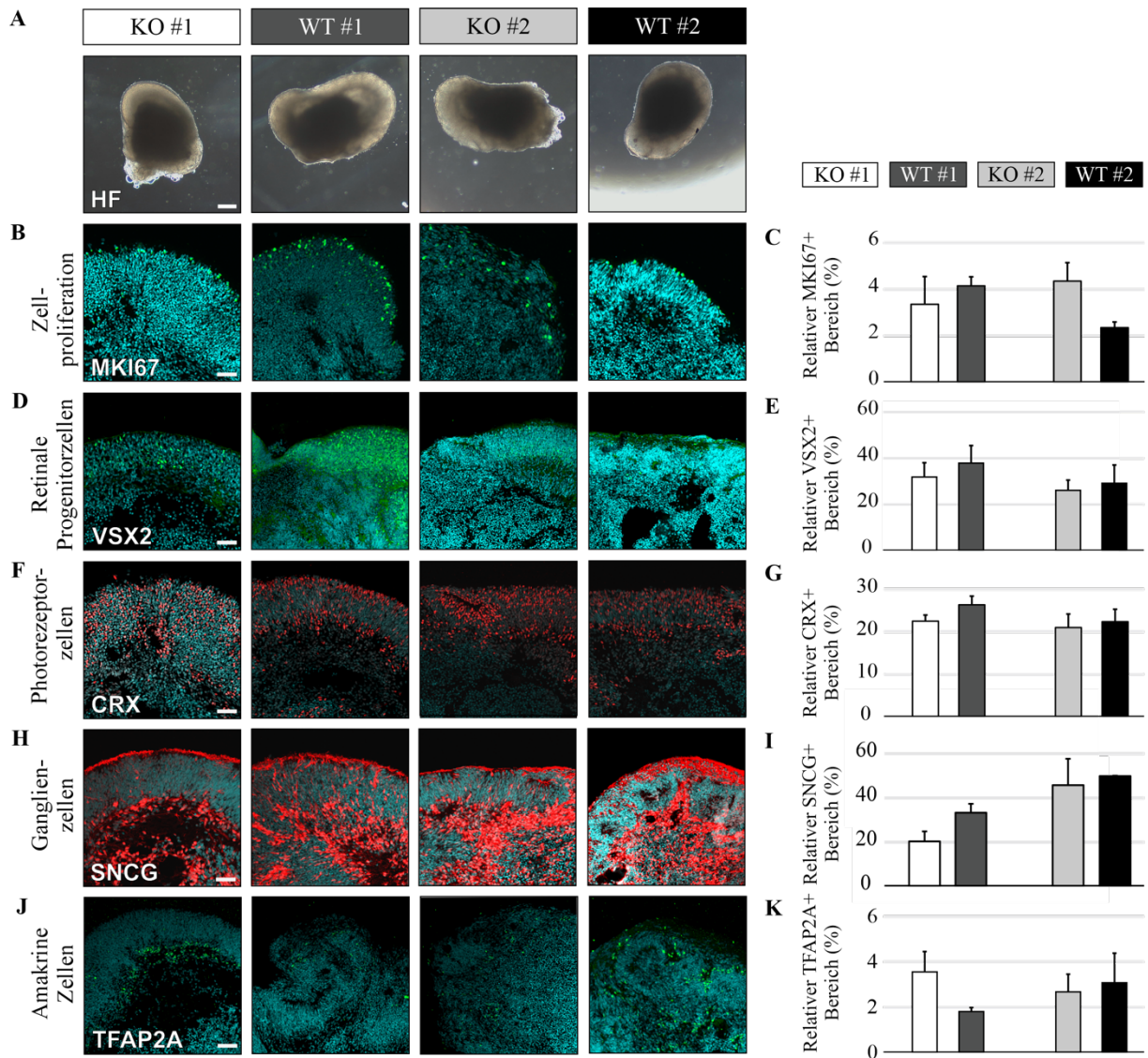


Abbildung 11: Qualitätskontrolle von KO- und WT-RO an Tag 69 der Ausdifferenzierung. (A) HF der RO. (B, D, F, H, J) Immunzytochemische Färbung der Kryoschnitte mit respektive MKi67, VSX2, CRX, SNCG und TFAP2A. (C, E, G, I, K) Quotient aus der MKi67⁺ (C), VSX2⁺ (E), CRX⁺ (G), SNCG⁺ (F) oder TFAP2A⁺ (K) und der DAPI⁺-Fläche. Angegeben ist der Mittelwert pro Genotyp mit Standardabweichung. Maßstäbe: (A) 300 µm (B) 50 µm. n = 1, 1, 1, 3 (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2).

MKi67 ist ein nukleärer Proliferationsmarker, der sich in mitotischen Zellen wiederfindet (98). Dieser Marker konnte in all unseren RO nachgewiesen werden und war in den KO- und WT-RO überwiegend in den äußeren Zonen der RO lokalisiert (**Abbildung 11B**). Die MKi67⁺-Fläche war dabei für die KO- und WT-RO vergleichbar (**Abbildung 11C**). VSX2 ist ein Retina-spezifischer Transkriptionsfaktor, der sich v.a. in frühen Entwicklungsstadien in retinalen Vorläuferzellen wiederfindet (99). VSX2⁺-Zellen fanden sich parallel zu den mitotischen Zellen ebenfalls überwiegend in den äußeren Zonen der RO, erstreckten sich aber etwas weiter

als die MKi67⁺-Zellen zum Zentrum der RO hin und waren in größerer Dichte vorhanden (**Abbildung 11D**). Auch die VSX2⁺-Fläche war dabei für KO- und WT-RO vergleichbar (**Abbildung 11E**). Die Photorezeptoren wurden einerseits mit Hilfe des nukleären Markers CRX gefärbt. CRX⁺-Zellen zeigten sich größtenteils im Bereich der ONL (**Abbildung 11F**). Dieser Marker war für alle Genotypen vergleichbar stark exprimiert (**Abbildung 11G**). Die Photorezeptoren wurden zusätzlich mit dem zellulären Marker RCVRN dargestellt (**Anhang 3**). Auch für diesen zweiten Marker ergaben sich vergleichbare positive Flächen für die KO- und WT-RO. SNCG ist ein spezifischer nukleärer Marker für Ganglienzellen (100), die in allen untersuchten RO v.a. rund um das Organoidzentrum in den tieferen Schichten der RO vorzufinden waren (**Abbildung 11H**). Für KO #2 und WT #2 machten Ganglienzellen in vergleichbaren Quantitäten den größten Anteil der Zellen der RO aus (**Abbildung 11I**). Für KO #1- und WT #1-RO waren Ganglienzellen die zweithäufigste Zellart nach den retinalen Progenitorzellen (**Abbildung 11E, I**). TFAP2A ist ein nukleärer Marker der amakrinen Zellen (101) und verteilte sich in den KO- und WT-RO vereinzelt über große Bereiche der RO (**Abbildung 11J**). Auch für TFAP2A wurden keine deutlichen Differenzen zwischen KO- und WT-RO in der Quantifizierung erfasst. CRALBP, ein zellulärer Marker für Müllerzellen (102), konnte nur sehr schwach in den beiden Arten der RO dargestellt werden (**Anhang 3**). Die Müllerzellen sind eine der letzten Zellarten, die sich zeitlich in der humanen Retina und somit in den RO entwickeln, und exprimieren CRALBP erst ab Tag 120 ihrer Ausdifferenzierung (103,104).

Bei der Betrachtung der verschiedenen Marker konnten demnach keine Unterschiede zwischen KO- und WT-RO nachgewiesen werden. Bei allen Genotypen waren die vier untersuchten Zelltypen in ähnlichen Quantitäten repräsentiert und die KO- und WT-RO schienen sich diesbezüglich in einem vergleichbaren Entwicklungsstadium zu befinden.

5.3 Vergleichbare Dicke der ONL bei KO- und WT-RO an Tag 140 und Tag 180

Einer der Parameter, die für die Charakterisierung der KO-RO erhoben wurden, war die Dicke der ONL. Dafür wurde die Dicke der ONL durch Ausmessung der sichtbaren ONL in den Aufnahmen der RO an Tag 140 sowie an Tag 180 erhoben.

An Tag 140 wurde die Dicke der ONL anhand von HF der RO ermittelt (**Abbildung 12A**). Die Ausmessung der Dicke der ONL anhand der HF zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen den KO- und WT-RO (KO #1 42,65 $\mu\text{m} \pm 4,19 \mu\text{m}$, WT #1 40,62 $\mu\text{m} \pm 2,99 \mu\text{m}$, KO #2 42,00

$\mu\text{m} \pm 5,58 \mu\text{m}$, WT #2 $39,92 \mu\text{m} \pm 4,19 \mu\text{m}$; **Abbildung 12B**). An Tag 180 wurden einerseits HF andererseits ICC-Aufnahmen in die Analyse einbezogen (**Abbildung 12C, E**). An Tag 180 war die ausgemessene Dicke der ONL anhand der HF ebenfalls vergleichbar für KO- und WT-RO. Generell konnte sowohl für die KO- als auch für die WT-RO von Tag 140 auf Tag 180 eine Zunahme der Dicke der ONL beobachtet werden (KO #1 $51,88 \mu\text{m} \pm 8,42 \mu\text{m}$, WT #1 $51,95 \mu\text{m} \pm 5,14 \mu\text{m}$, KO #2 $51,50 \mu\text{m} \pm 7,73 \mu\text{m}$, WT #2 $47,24 \mu\text{m} \pm 6,83 \mu\text{m}$; **Abbildung 12D**).

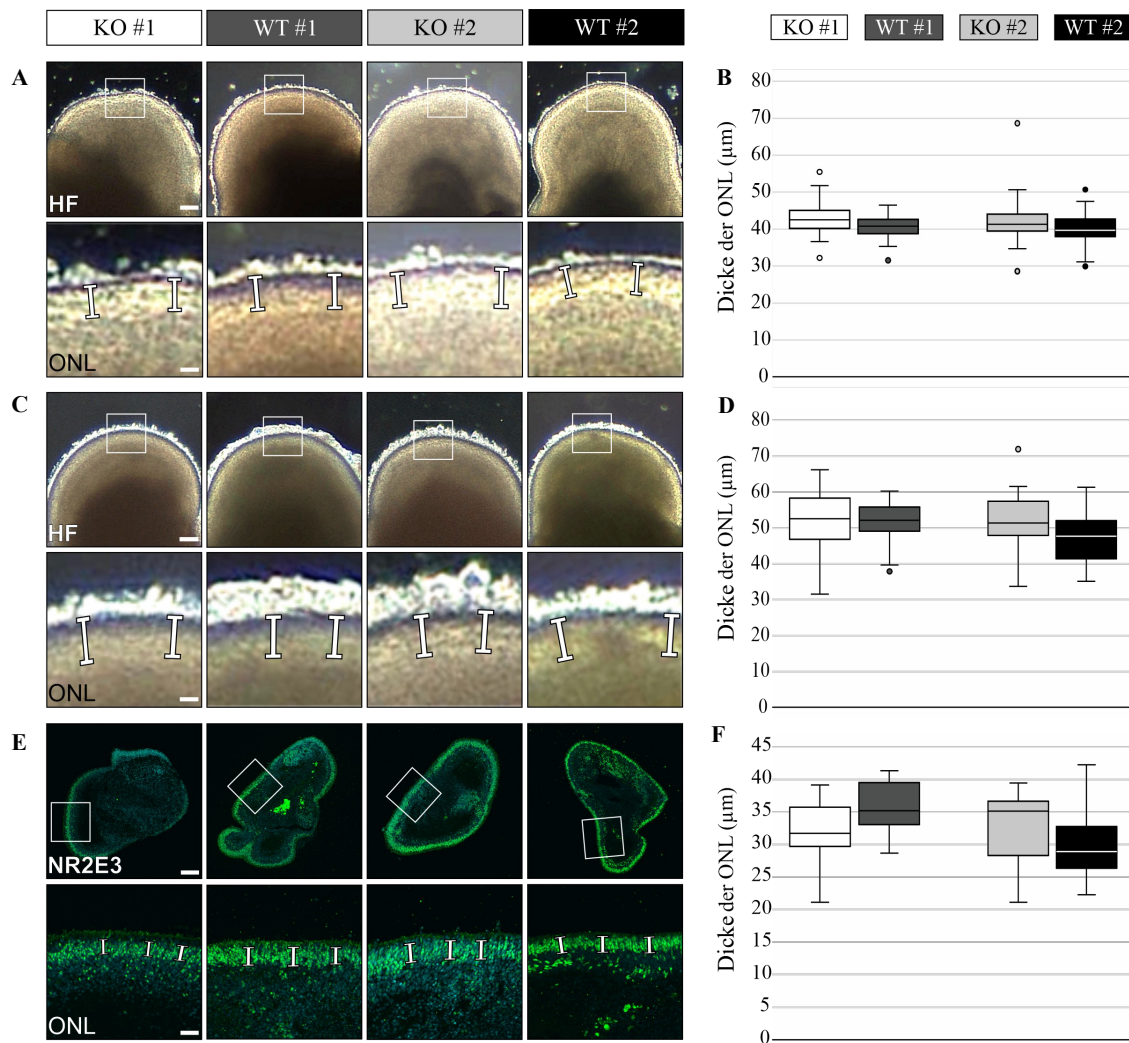


Abbildung 12: Messung der Dicke der ONL in HF und ICC-Aufnahmen an Tag 140 und Tag 180. (A) HF der KO- und WT-RO an Tag 140. (B) Dicke der ONL in μm an Tag 140 anhand von HF. Die Dicke der ONL war für alle vier Genotypen ähnlich (KO #1 $42,65 \mu\text{m} \pm 4,19 \mu\text{m}$, WT #1 $40,62 \mu\text{m} \pm 2,99 \mu\text{m}$, KO #2 $42,00 \mu\text{m} \pm 5,58 \mu\text{m}$, WT #2 $39,92 \mu\text{m} \pm 4,19 \mu\text{m}$). (C) HF der KO- und WT-RO an Tag 180. (D) Dicke der ONL in μm an Tag 180 anhand von HF. Die Dicke der ONL war für alle vier Genotypen ähnlich (KO #1 $51,88 \mu\text{m} \pm 8,42 \mu\text{m}$, WT #1 $51,95 \mu\text{m} \pm 5,14 \mu\text{m}$, KO #2 $51,50 \mu\text{m} \pm 7,73 \mu\text{m}$, WT #2 $47,24 \mu\text{m} \pm 6,83 \mu\text{m}$). (E) ICC-Aufnahmen der KO- und WT-RO von NR2E3 und DAPI-

angefärbten Kryoschnitten an Tag 180. (F) Dicke der ONL in μm an Tag 180 anhand von ICC-Aufnahmen. Die Dicke der ONL war für alle vier Genotypen ähnlich (KO #1 $31,49 \mu\text{m} \pm 5,18 \mu\text{m}$, WT #1 $35,74 \mu\text{m} \pm 3,94 \mu\text{m}$, KO #2 $32,31 \mu\text{m} \pm 6,04 \mu\text{m}$, WT #2 $30,34 \mu\text{m} \pm 5,92 \mu\text{m}$). (A, C, E) Die Vergrößerungen zeigen exemplarische Messungen (Balken) zur Quantifizierung der Dicke der ONL. Die Position der Vergrößerungen ist mit einem weißen Quadrat dargestellt. Messwerte inklusive Median. Maßstäbe: (A) Maßstab Übersicht: $100 \mu\text{m}$; Maßstab Vergrößerung: $25 \mu\text{m}$ (B) Maßstab Übersicht: $100 \mu\text{m}$; Maßstab Vergrößerung: $25 \mu\text{m}$ (C) Maßstab Übersicht: $150 \mu\text{m}$; Maßstab Vergrößerung: $37,5 \mu\text{m}$. (D) $n = 41, 43, 50, 56$ (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2) (E) $n = 44, 43, 49, 54$ (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2) (F) $n = 10, 10, 10, 10$ (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2).

Für die Analyse mittels ICC-Aufnahmen an Tag 180 wurden Bilder von NR2E3-gefärbten Kryoschnitten genutzt, da NR2E3 ein überwiegend in Stäbchen und somit in der ONL vorkommender Transkriptionsfaktor ist ((36,105); **Abbildung 12E**). Während der Versuchsvorbereitung wurden jeweils NRL und NR2E3 als spezifische Antikörper zur Anfärbung der Stäbchen getestet (**Anhang 1**). Schlussendlich wurde sich auf NR2E3 mit Proteinase K zur Demaskierung des Antigenepitops festgelegt. Die Messwerte, die mittels der ICC-Aufnahmen ermittelt wurden, wiesen keinen deutlichen Unterschied zwischen KO- und WT-RO auf. Sie waren jedoch etwas kleiner als die Werte aus der Analyse der HF (KO #1 $31,49 \mu\text{m} \pm 5,18 \mu\text{m}$, WT #1 $35,74 \mu\text{m} \pm 3,94 \mu\text{m}$, KO #2 $32,31 \mu\text{m} \pm 6,04 \mu\text{m}$, WT #2 $30,34 \mu\text{m} \pm 5,92 \mu\text{m}$; **Abbildung 12F**). WT #1-RO wiesen in der Analyse der ICC-Aufnahmen durchschnittlich eine geringfügig größere Dicke der ONL auf als KO #1-RO. Dieser Trend hat sich jedoch bei den WT #2-RO nicht bestätigt (**Abbildung 12F**).

Somit konnte gezeigt werden, dass KO- und WT-RO sowohl an Tag 140 als auch an Tag 180 eine vergleichbare Dicke der ONL aufwiesen. Die Dicke der ONL nahm bei KO- und WT-RO mit zunehmendem Alter der RO zu. Die relative Geschwindigkeit des Wachstums der ONL war dabei vergleichbar.

5.4 Vergleichbare Länge der OS der KO- und WT-RO an Tag 180

Die Länge der OS der KO- und WT-RO wurde an Tag 180 der Ausdifferenzierung mit Hilfe von HF erhoben (**Abbildung 13A**). Bezüglich der Länge der OS befanden sich die Messwerte der einzelnen Genotypen ebenfalls in sehr ähnlichen Bereichen (**Abbildung 13B**). Generell konnte eine große Variabilität zwischen den verschiedenen RO eines Genotyps erfasst werden, sodass für alle Genotypen (außer WT #1) manche der RO überhaupt keine OS präsentierte (**Abbildung 13B**).

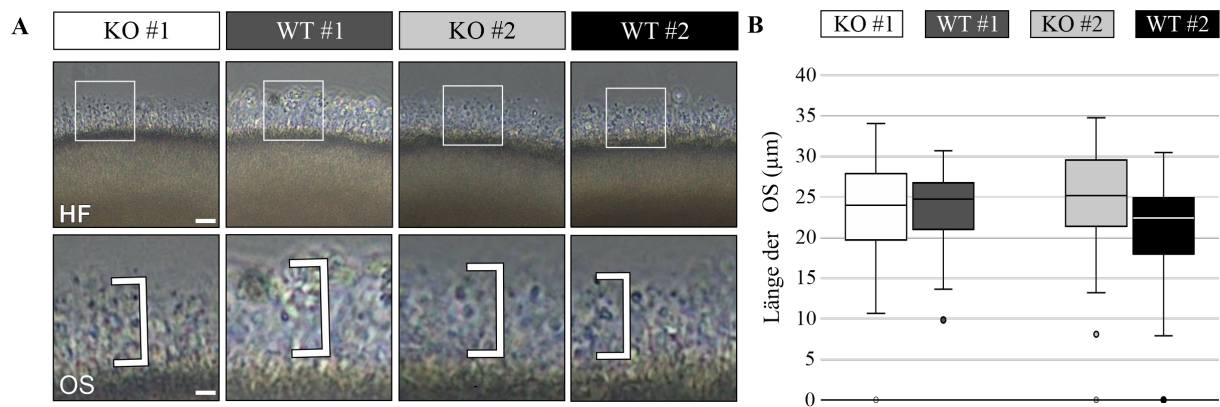


Abbildung 13: Messung der Länge der OS in HF an Tag 180. (A) HF der ONL der KO- und WT-RO mitsamt ihren OS an Tag 180. Die Vergrößerungen zeigen exemplarische Messungen (Balken) zur Quantifizierung der Länge der OS. Die Position der Vergrößerungen ist mit einem weißen Quadrat dargestellt. (B) Länge der OS in µm an Tag 180 anhand von HF. Die Länge war für alle vier Genotype ähnlich (KO #1 23,22 µm ± 7,50 µm, WT #1 23,67 µm ± 4,81 µm, KO #2 24,34 µm ± 6,90 µm, WT #2 20,65 µm ± 6,52 µm). Messwerte inklusive Median. Maßstäbe: (A) Maßstab Übersicht: 20 µm; Maßstab Vergrößerung: 5 µm. n = 44, 43, 50, 58 (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2).

5.5 Vergleichbare Apoptoseraten der KO- und WT-RO an Tag 180

Zur Erhebung der Apoptoserate wurden TUNEL-Assays an Kryoschnitten der KO- und WT-RO angefertigt (106). Die Quantifizierung der Apoptoserate in den KO- und WT-RO wurde anhand von Übersichtsaufnahmen der Tag 180 alten RO durchgeführt (**Abbildung 14A**). Für alle Genotypen konnten ähnliche Apoptoseraten ermittelt werden (**Abbildung 14B**). Hierbei wurde für alle Genotypen eine erhöhte Variabilität zwischen den RO eines Genotyps beobachtet (**Abbildung 14B**). Die apoptotischen Zellen waren dabei für KO- und WT-RO überwiegend in den tieferen Schichten um das Zentrum der RO lokalisiert.

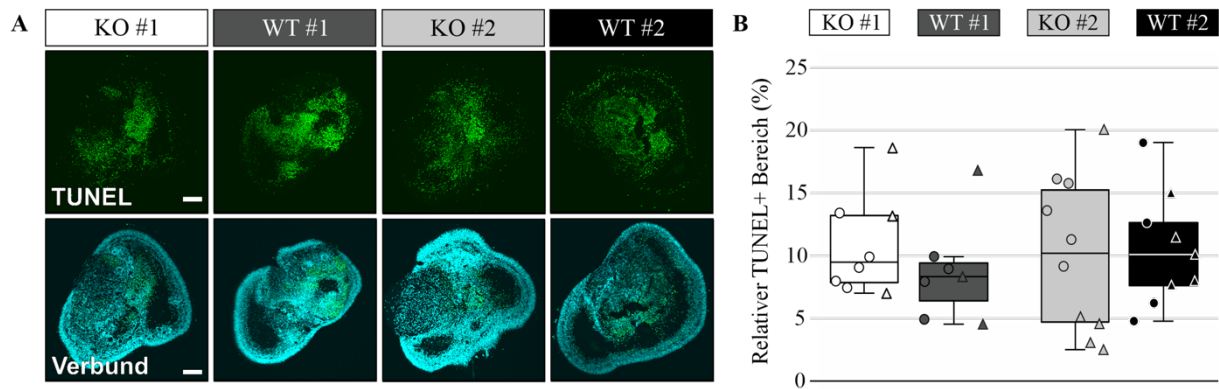


Abbildung 14: Quantifizierung der Apoptoserate an Tag 180. (A) Übersichtsaufnahmen der TUNEL⁺ sowie TUNEL⁺ und DAPI⁺-Fläche (Verbund). (B) Quotient aus der TUNEL⁺ und der DAPI⁺-Fläche. Die Apoptoserate war für alle vier Genotype ähnlich (KO #1 10,82 $\mu\text{m} \pm 3,72 \mu\text{m}$, WT #1 8,76 $\mu\text{m} \pm 3,78 \mu\text{m}$, KO #2 10,12 $\mu\text{m} \pm 5,86 \mu\text{m}$, WT #2 10,53 $\mu\text{m} \pm 4,27 \mu\text{m}$). Es zeigte sich eine hohe Variabilität zwischen den RO eines Genotyps. Ein RO wurde je nach Ausdifferenzierungsbeginn entweder mit einem Kreis oder mit einem Dreieck dargestellt. RO, die mit demselben Symbol dargestellt wurden, wurden parallel analysiert. Messwerte inklusive Median. Maßstäbe: (A) 150 μm . n = 8, 7, 10, 9 (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2).

5.6 Vergleichbarer Anteil der Photorezeptorzellen der KO- und WT-RO an Tag 180

Um der Frage nach Unterschieden in der Apoptoserate weiter auf den Grund zu gehen, wurde der Anteil der Photorezeptoren in den KO- und WT-RO quantifiziert.

Dafür wurde die immunzytochemische Färbung zweier Marker in den Kryoschnitten von Tag 180 alten RO durchgeführt: CRX zur Anfärbung aller Photorezeptorzellen und NR2E3 zur alleinigen Anfärbung der Stäbchen.

Die Verteilung der CRX⁺-Zellen innerhalb der RO war für alle Genotype vergleichbar. Die CRX⁺-Zellen siedelten sich sowohl für KO- als auch für WT-RO überwiegend im Bereich der ONL der RO an. Jedoch konnte bei allen Genotypen ein vergleichbarer Anteil an mislokalisierten Zellen in den tieferen Schichten der RO beobachtet werden (**Abbildung 15A**). Die NR2E3⁺-Zellen siedelten sich in den RO aller Genotypen ebenfalls überwiegend auf Ebene der ONL an. Dabei konnte sowohl für KO- als auch WT-RO eine geringere Fehllokalisation der NR2E3⁺-Zellen Richtung Zentrum der RO beobachtet werden als das für die CRX⁺-Zellen der Fall war (**Abbildung 15A**). Die gleichen Beobachtungen konnten für die Verteilung der RCVRN⁺ und RHO⁺-Zellen gemacht werden (**Abbildung 15B**).

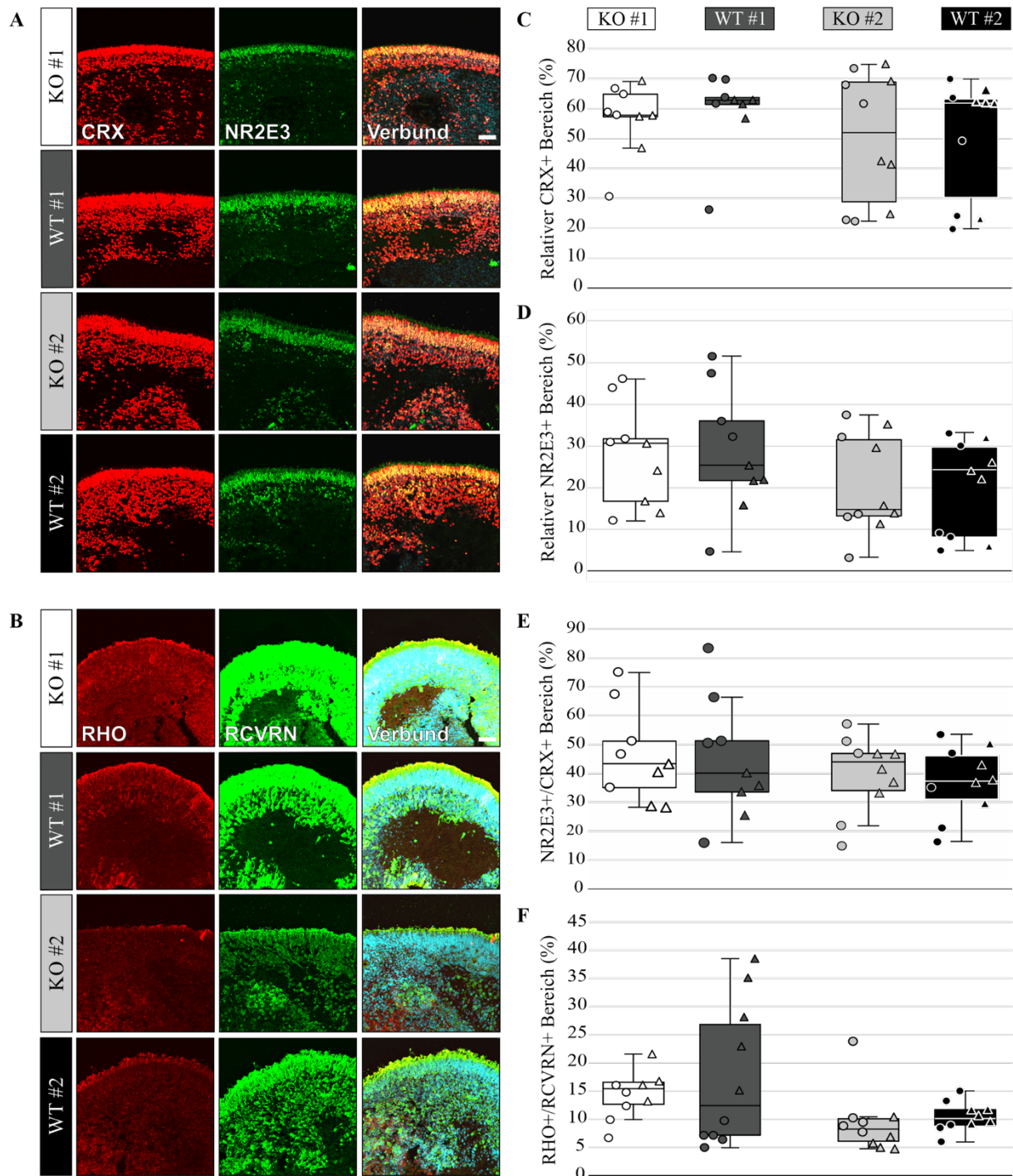


Abbildung 15: Quantifizierung der Photorezeptorzellen an Tag 180. (A) Immunzytochemische Färbung der Kryoschnitte mit NR2E3 und CRX sowie Verbundaufnahme beider Färbungen mit DAPI. (B) Immunzytochemische Färbung der Kryoschnitte mit RHO und RCVRN sowie Verbundaufnahme beider Färbungen mit DAPI. (C) Quotient aus der CRX⁺ und der DAPI⁺-Fläche. Für alle Genotypen konnten vergleichbare Werte erhoben werden (Medianwerte KO #1 57,85 %, WT #1 62,78 %, KO #2 51,98 %, WT #2 61,91 %). (D) Quotient aus der NR2E3⁺ und der DAPI⁺-Fläche. Für alle Genotypen konnten vergleichbare Werte erhoben werden (Medianwerte KO #1 30,65 %, WT #1 25,41 %, KO #2 14,76 %, WT #2 24,36 %). (E) Quotient aus der NR2E3⁺ und der CRX⁺-Fläche. Die Quantifizierung

ergab für alle Genotypen vergleichbare Werte (Medianwerte KO #1 43,36 %, WT #1 40,15 %, KO #2 46,64 %, WT #2 36,98 %) (**F**) Quotient aus der RHO^+ und der RCVRN^+ -Fläche. Die Quantifizierung ergab für alle Genotypen vergleichbare Werte (Medianwerte KO #1 15,42 %, WT #1 12,43 %, KO #2 8,25 %, WT #2 10,12 %). Ein RO wurde je nach Ausdifferenzierungsbeginn entweder mit einem Kreis oder mit einem Dreieck dargestellt. RO, die mit demselben Symbol dargestellt wurden, wurden parallel analysiert. Messwerte inklusive Median. Maßstäbe: (**A**) 50 μm (**B**) 50 μm . (**C-E**) $n = 9, 9, 10, 10$ (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2) (**F**) $n = 10, 10, 10, 10$ (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2).

Es wurde einerseits die CRX^+ -Fläche relativ zur DAPI^+ -Fläche erfasst, um den relativen Anteil der Photorezeptorzellen gegenüber allen Zellen zu quantifizieren. Bezüglich dieser Quantifizierung ergaben sich für KO- und WT-RO vergleichbare Werte (**Abbildung 15C**). Die Spannbreite der Werte pro Genotyp zeigte eine deutliche Variabilität. Diese Variabilität war für die Daten von KO #2 und WT #2 höher als von KO #1 und WT #1 (**Abbildung 15C**). Andererseits wurde die NR2E3^+ -Fläche relativ zur DAPI^+ -Fläche zur Erfassung des relativen Anteils der Stäbchen gegenüber allen Zellen quantifiziert. Die Werte für die relative NR2E3^+ Fläche waren ebenfalls vergleichbar (**Abbildung 15D**). Erneut zeichneten sich die Werte durch eine hohe Variabilität aus. Diesmal betraf die Variabilität alle Genotypen (**Abbildung 15D**). Des Weiteren wurde der Quotient zwischen der NR2E3^+ und der CRX^+ -Fläche errechnet, um den Prozentsatz der Stäbchen innerhalb aller Photorezeptorzellen zu erfassen. Diese Quantifizierung ergab für alle Genotypen einen ähnlichen relativen Anteil der NR2E3^+ - zur CRX^+ -Fläche (**Abbildung 15E**). NR2E3 und CRX sind beides nukleäre Marker. Da RHO ebenfalls einen spezifischen Marker für Stäbchen darstellt (31) und RHO und RCVRN zytoplasmatische Marker sind, wurden diese verwendet, um das Verhältnis der Stäbchen innerhalb der Photorezeptorzellen zu bestätigen. Dafür wurde der Quotient zwischen der RHO^+ - und der RCVRN^+ -Fläche genommen. Erneut ergab die Quantifizierung vergleichbare Werte für alle Genotypen (**Abbildung 15F**). Die Quantifizierung des Anteils an Stäbchen innerhalb aller Photorezeptorzellen mit Hilfe von RHO und RCVRN im Vergleich zur Quantifizierung mit Hilfe von NR2E3 und CRX ergab jedoch für alle Genotypen ein tendenziell geringeres Verhältnis an Stäbchen innerhalb der Photorezeptorzellen. Da RHO im Gegensatz zu RCVRN jedoch nicht immer einheitlich in der ganzen Zelle exprimiert wird (107,108), kann dies möglicherweise zu einem Unterschied in der Erhebung der relativen Anteile der Marker zueinander führen.

5.7 Vergleichbarer Anteil an transportiertem RHO bzw. RCVRN in den Bereich der IS und OS der KO- und WT-RO

RP1 ist ein Protein, welches auf Ebene des Axonems der Photorezeptorzellen lokalisiert ist, und dessen Aufgabe u.a. der Transport von RHO von den IS in die OS ist (81,83). In *RPI*-KO Mäusen konnte ein gestörter Transport von RHO von den IS in die OS beobachtet werden und stellte sich in Form von mislokalisierten RHO-Signalen in der ONL und in den IS dar (83). Das Ziel dieser Analysen war die Charakterisierung des RHO-Transports in den KO-RO. Des Weiteren sollte der Transport von RCVRN in den KO-RO analysiert werden.

Dafür wurden Kryoschnitte von Tag 180 alten KO- und WT-RO für die Marker RHO und RCVRN angefärbt und analysiert, um eine Aussage treffen zu können, wieviel Prozent von dem insgesamt produzierten RHO bzw. RCVRN vom Produktionsort in den Bereich der IS und OS transportiert wurde. Da sich die genaue Analyse des Transports von den IS in die OS in den Vorarbeiten als nicht möglich erwies, wurde in dieser Arbeit das vorhandene RHO bzw. RCVRN in der ONL und folglich auch in den IS und OS gemessen. Hieraus wurde die gesamte Menge des jeweiligen Markers sowie der Anteil, der in die IS und OS transportiert wurde, errechnet.

Die Nahaufnahmen der RCVRN- und RHO-gefärbten Kryoschnitte zeigten, dass sich sowohl RCVRN als auch RHO in allen Bereichen der Photorezeptorzelle lokalisierten. Dabei war die Lokalisation der jeweiligen Marker in den KO- und WT-RO vergleichbar (**Abbildung 16A**).

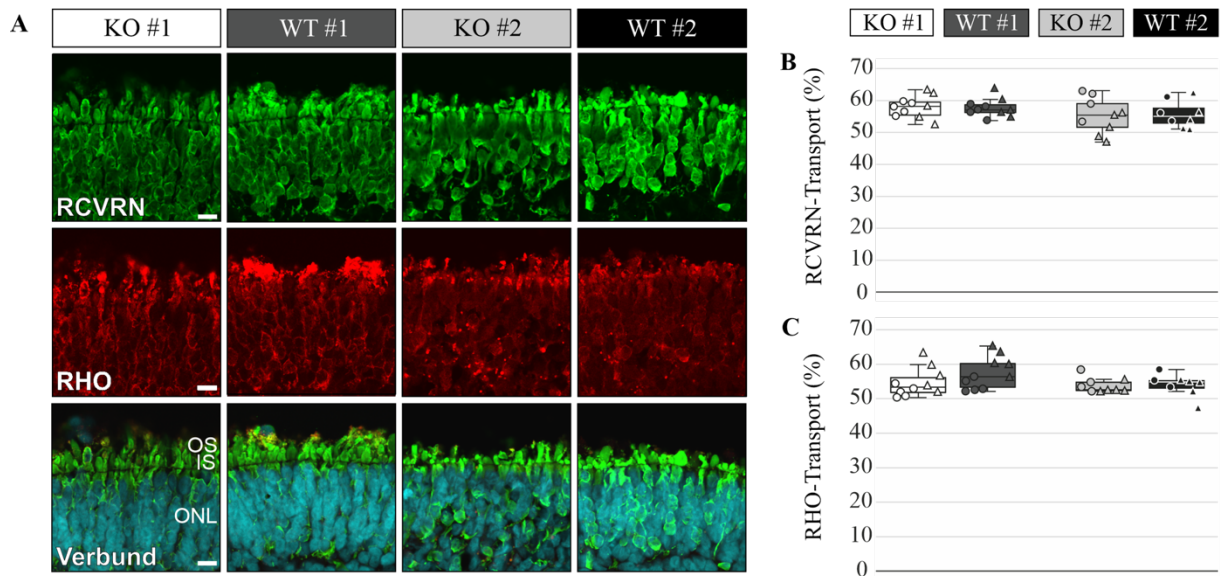


Abbildung 16: Quantifizierung des RHO und RCVRN Transports in den Bereich der IS und OS an Tag 180. (A) Immunzytochemische Färbung der Kryoschnitte mit RCVRN und RHO. Nahaufnahmen der ONL samt IS und OS wurden angefertigt und die Intensität an (B) RCVRN bzw. (C) RHO in den IS und OS relativ zur Gesamtintensität an RCVRN bzw. RHO in der ONL wurde quantifiziert. Die Prozentsätze an den jeweiligen transportierten Markern waren für alle Genotypen vergleichbar (RCVRN: Medianwerte KO #1 58,16 %, WT #1 57,06 %, KO #2 55,47 %, WT #2 55,07 %; RHO: Medianwerte KO #1 53,39 %, WT #1 56,35 %, KO #2 52,57 %, WT #2 54,87 %). Ein RO wurde je nach Ausdifferenzierungsbeginn entweder mit einem Kreis oder mit einem Dreieck dargestellt. RO, die mit demselben Symbol dargestellt wurden, wurden parallel analysiert. Messwerte inklusive Median Maßstäbe: (A) 10 μ m. n = 10, 10, 9, 8 (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2).

Die quantitativen Analysen ergaben, dass die Prozentsätze an transportierten Markern nahezu identisch für KO- und WT-RO waren. Ca. 57 % der RCVRN-Färbung (Medianwerte KO #1 58,16 %, WT #1 57,06 %, KO #2 55,47 %, WT #2 55,07 %) wurden sowohl in KO- als auch in WT-RO von dem Ort der Produktion in den Bereich der IS und OS transportiert (**Abbildung 16B**), während ca. 55 % der RHO-Färbung (Medianwerte KO #1 53,39 %, WT #1 56,35 %, KO #2 52,57 %, WT #2 54,87 %) befördert wurden (**Abbildung 16C**). Es waren somit keine großen Differenzen zwischen den jeweiligen Prozentsätzen an transportiertem RHO oder RCVRN für die KO- und WT-RO sichtbar und für beide Analysen konnte nur eine geringe Variabilität der Werte eines Genotyps beobachtet werden (**Abbildung 16B, C**). Dementsprechend konnte anhand dieser Analysen dargestellt werden, dass weder für KO- noch für WT-RO an Tag 180 der Ausdifferenzierung ein vollständiger Transport von RHO oder RCVRN aus dem Bereich der ONL in den Bereich der IS und OS stattgefunden hat.

6 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Charakterisierung *RPI*-defizienter RO. Dafür wurden zunächst mittels CRISPR-Cas9 Technologie homozygote Mutationen mit Leserasterverschiebung im *RPI*-Gen in hiPSC induziert. Diese Zellen wurden zu RO differenziert und die *RPI*-defizienten RO mittels HF und ICC zu drei Zeitpunkten analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass an Tag 69 der Ausdifferenzierung der Entwicklungsstand der KO- und der WT-RO bezüglich der untersuchten Zelltypen vergleichbar war und sich alle Genotypen erwartungsgemäß entwickelten. An Tag 140 war die anhand von HF gemessene Dicke der ONL zwischen den KO- und WT-RO vergleichbar. An Tag 180 wurden ebenfalls ähnliche Ergebnisse anhand von HF sowie ICC-Aufnahmen bezüglich der Dicke der ONL für die KO- und WT-RO erhoben. Des Weiteren waren die anhand von HF erhobenen Werte für die Länge der OS vergleichbar. Die KO- und WT-RO zeigten an Tag 180 ähnliche Werte bezüglich der Apoptoserate sowie der relativen Quantität an Stäbchen und Zapfen. Des Weiteren wurde sowohl in den KO- als auch in den WT-RO ein unvollständiger Transport von RHO und RCVRN vom Bereich der ONL in den Bereich der IS und OS beobachtet. Somit zeigte sich bei den KO-RO kein deutlich abgrenzbarer Phänotyp bezüglich der untersuchten Zielparameter.

Da ein defizientes oder fehlerhaftes RPI-Protein sowohl in Mäusen (83) als auch bei Menschen (90,109) zum Untergang von Stäbchen führt, stellt die fehlende Entwicklung eines Phänotyps in den *RPI*-KO RO ein unerwartetes Ergebnis dar. Analog zu den Beobachtungen von Gao et al. (2002) anhand des Modells *RPI*-defizienter Mäuse (83), wäre zu erwarten gewesen, dass *RPI*-defiziente RO eine verschmälerte ONL mit einer verringerten Anzahl an Photorezeptorzellen aufweisen. Auch die Entwicklung verkürzter OS und ein unvollständiger Transport von RHO in den Bereich der IS und OS wären zu erwartende Beobachtungen gewesen.

Eine mögliche Erklärung für die fehlende Beobachtung eines Phänotyps an Tag 180 ist, dass sich ein Phänotyp erst zu einem späteren Zeitpunkt der Ausdifferenzierung manifestiert. Hierzu gibt es zwei verschiedene Hypothesen. Einerseits muss die Degeneration der Zellen der RO zur deutlichen Erfassbarkeit möglicherweise noch weiter voranschreiten. Auch bei den *RPI*-defizienten Mäusen war der beschriebene Phänotyp nicht direkt postpartum beobachtbar, sondern kristallisierte sich erst - im Sinne einer degenerativen Erkrankung - im Laufe der Entwicklung heraus (83). Somit zeigten die *RPI*-defizienten Mäuse beispielsweise noch bis P21 die gleiche Anzahl an Photorezeptoren sowie bis P25 OS mit der gleichen Länge wie

wildtypische Mäuse. Das progressive Absterben der Photorezeptoren und die Abnahme der Länge der OS wurden v.a. zwischen Tag 30 und Tag 270 beschrieben. Beim Menschen beginnt die Symptommanifestation von arRP1, wie Khaliq et al. 2005 anhand der betroffenen Mitglieder dreier Familien berichteten, ebenfalls nicht bei Geburt, sondern erst in der frühen Kindheit und benötigt einige Jahre bis zur vollständigen Ausprägung (87). Andererseits könnte der Alterungsprozess einen fehlenden Stressfaktor auf die Zellen der RO zur Ausbildung eines Phänotyps darstellen. Somit ist auch bei der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) das Alter der betroffenen Individuen eines der wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung und das Fortschreiten der Erkrankung ((110); zusammengefasst in (111)). Ein über die Jahre kumulierender oxidativer Stress schädigt dabei das RPE, zentrale Struktur für die Krankheitsentstehung der AMD (zusammengefasst in (111)), und führt somit im Zusammenspiel mit zahlreichen weiteren Faktoren wie Genetik und Umwelteinflüsse zur Ausprägung der Erkrankung (zusammengefasst in (112)). Durch die weitere Ausdifferenzierung der RO könnte ein solcher altersabhängiger Einflussfaktor ebenfalls im Rahmen der RP1-Erkrankung zu tragen kommen.

Ein noch schwach ausgeprägter und somit schwer fassbarer Phänotyp könnte eine weitere mögliche Erklärung für unsere Ergebnisse zwischen KO- und WT-RO an Tag 180 bieten. In RO wurden die beschriebenen Auswirkungen von anderen RP-spezifischen Mutationen, wie z.B. *RP2*- oder *RPGR*-Mutationen, durchschnittlich schon zwischen Tag 120 und Tag 180 der Ausdifferenzierung beobachtet (77,78,113). Eventuell wiesen die *RP1*-KO RO an Tag 180 einen vorhandenen, aber noch milde ausgeprägten und somit schwer objektivierbaren Phänotyp auf. Gao et al. (2020) beschrieb beispielsweise anhand von RO, die durch die Ausdifferenzierung patientenspezifischer hiPSC mit einer homozygoten arRP-Mutation im *Phosphodiesterase 6B (PDE6B)*-Gen gewonnen wurden, dass eine schwere Ausprägung des Phänotyps erst an Tag 230 der Differenzierung erfassbar war (114). Die Erhöhung der zyklischen Guanosinmonophosphat (cGMP)-Konzentrationen war schon an Tag 195 erfassbar, die Konzentrationen steigerten sich jedoch noch bis zum Erreichen der zehnfachen Konzentrationen im Vergleich zu den WT-RO an Tag 230. Die Beschreibungen von Gao et al. (2020) zeigen, dass manche Phänotypen erst zu späteren Zeitpunkten in den RO eine fortgeschrittene Ausprägung erreichen.

Die Überschattung eines milden Phänotyps durch mögliche Faktoren wie die Organoidvariabilität erschwert die Erfassung des Phänotyps noch zusätzlich. Generell stellt die Variabilität einen wichtigen Aspekt im Gebiet der Organoidforschung sowie bei unserer

Fragestellung dar. Ob bei Gehirnorganoiden, Nierenorganoiden, RO oder sonstigen Organoidformen konnten diverse Forschungsgruppen eine Intervariabilität zwischen einzelnen Organoiden sowie eine regionale Intravariabilität innerhalb eines Organoids beobachten (115–117); zusammengefasst in (118)). Hallam et al. (2018) differenzierten beispielsweise fünf verschiedene hiPSC-Linien zu RO und beobachteten Unterschiede zwischen den Zelllinien u.a. bezüglich ihrer Fähigkeit zur Differenzierung zu RO, ihrer zellulären Zusammensetzung, ihrer Größe und ihrer Genexpression (117). Die Variabilität mindert die Reliabilität der RO als Krankheitsmodell und die Optimierung der Reproduzierbarkeit der Organoiddifferenzierung stellt eine wichtige Herausforderung in der Organoidforschung dar.

Velasco et al. gelang 2019 die Veröffentlichung eines Protokolls zur reproduzierbaren Differenzierung dorsaler Vorderhirnorganoide aus hiPSC und setzte somit einen Meilenstein in der Organoidforschung (119). Mittels Einzellzell-RNA-Sequenzierung konnte eine 95 % Übereinstimmung in der zellulären Zusammensetzung zwischen den einzelnen Organoiden sowie eine hohe Übereinstimmung der Organoide mit der *in vivo* Gehirnzellentwicklung nachgewiesen werden. Auch in dieser Arbeit wurden diverse Ansätze zur Optimierung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse angewandt. Die Wahl der gleichen hiPSC-Linie als Ausgangspunkt der Analysen und deren anschließende Manipulation via CRISPR-Cas9 zur Genese eines mutierten Genotyps stellte einen wichtigen ersten Faktor zur Reduktion der Intervariabilität dar. Durch die Nutzung isogener hiPSC können Einflussfaktoren wie Unterschiede im genetischen Hintergrund, in der Genexpression oder in der Aktivierung von endogenen Signalwegen, wie sie bei der Nutzung unterschiedlicher hiPSC-Linien gesunder und erkrankter Proband*innen beobachtet werden können (120), gemieden werden ((121,122); zusammengefasst in (123)). Kamarudin et al. (2018) zeigten beispielsweise, dass die Differenzierung verschiedener hiPSC-Linien zu Hornhautepithelzellen von der endogenen BMP4-Aktivität der hiPSC abhängt (120). hiPSC mit einer geringeren BMP4-Aktivität konnten im Gegensatz zu hiPSC mit einer hohen BMP4-Aktivität mit dem angewandten Protokoll nicht zu Hornhautepithelzellen differenziert werden. Diese Ergebnisse sind auch dahingehend interessant, dass im Rahmen dieses Projektes ebenfalls BMP4 zur Ausdifferenzierung der RO genutzt wurde. Institutsintern konnte nachgewiesen werden, dass die Nutzung von BMP4 innerhalb der Differenzierungsprotokolle der hiPSC zu RO zu zahlreicheren und qualitativ hochwertigeren RO führt (29).

Die Durchführung der Arbeit mit isogenen hiPSC stellte im Rahmen dieses Projektes nicht die einzige Stellschraube zur Optimierung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse dar. Die

Anwendung spezifischer Qualitätskriterien während der Kulturzeit zum Ausschluss unzureichend entwickelter RO stellte ebenfalls eine wichtige Methode zur Reduktion der Intervariabilität dar. Die Umsetzung der im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Qualitätskriterien basierte dabei auf den Empfehlungen von Capowski et al. (2019). Das Forschungsteam hat ein Klassifikationssystem der Entwicklungsstadien RO eingeführt (genannt Stadium 1-3), um zusätzlich zu der Kulturzeit weitere Kriterien zum Vergleich der RO anwenden zu können und somit (hoffentlich) die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erhöhen (36). Im Stadium 1 präsentieren sich die RO mit einem hellen neuroepithelialen Außenrand. Während sich die RO in Stadium 2 durch eine zunehmende Größe, einen verschmälerten Außenrand sowie ein lobuläres Erscheinungsbild charakterisieren, präsentieren RO im Stadium 3 eine Oberfläche mit einem haarähnlichen Saum. Neben ihren eigenständig etablierten Klassifizierungsstadien, unterstrich Capowski et al. (2019) die generelle Wichtigkeit morphologischer Kriterien in der Differenzierung und Selektion der RO. Da sogar isogene Stammzelllinien eine Variabilität in dem zeitlichen Ablauf ihrer Entwicklungsstadien aufwiesen, ermöglichen laut Capowski et al. (2019) zusätzliche morphologische Kriterien zu einer rein zeitlichen Selektion der RO eine bessere Vergleichbarkeit. Solche Kriterien beinhalteten im Rahmen dieser Arbeit die Ausbildung einer Augenbläschenstruktur sowie die Präsenz einer hellen, deutlich ausgebildeten neuronalen Domäne und wurden bei jeder Umstellung des Differenzierungsmediums zur Selektion angewandt. In der späteren Ausdifferenzierung wurde zudem die altersgerechte Ausbildung von IS und OS als Kriterium angewandt. RO, die diese Qualitätskriterien nicht erfüllten, wurden aussortiert.

Auch die parallele Ausdifferenzierung unter gleichen Bedingungen und die parallele Durchführung der Analyseverfahren der KO- und WT-RO ermöglichte, einen Einfluss exogener Störfaktoren während der Kulturzeit zu minimieren. Für RO eines definierten Genotyps sowie eines direkt gepaarten wildtypischen Genotyps wurden sämtliche Schritte der Ausdifferenzierung sowie der Versuchsdurchführung und Analyse möglichst zeitgleich durchgeführt. Somit unterlagen alle direkt miteinander verglichenen RO den gleichen Bedingungen bezüglich u.a. Temperatur, Luftdruck, Luftfeuchtigkeit während der Ausdifferenzierung sowie ähnlichen menschlichen Störfaktoren und Fehlerquellen während der Analyse. Des Weiteren wurden zur Reduktion der regionalen Intravariabilität mindestens drei Kryoschnitte pro RO in die immunzytochemische Analyse sowie mindestens drei Positionen pro RO in die Auswertung der HF einbezogen. Somit sollte der Einfluss von Artefakten, die durch regionale Entwicklungsdiskrepanzen verursacht werden können, reduziert werden.

Trotz der vielen Vorkehrungen waren jedoch auch in dieser Arbeit nicht alle Variabilitätsquellen vermeidbar. Trotz der parallelen Ausdifferenzierung und Analyse der RO ist ein Batch-Effekt, gleichzusetzen mit einer Beeinflussung der Experimente durch äußere Einflussfaktoren, nicht auszuschließen. Solch ein Batch-Effekt kann die Organoidvariabilität fördern. Auch fehlende *in vivo* Faktoren können eine Auswirkung auf die Organoidvariabilität haben. *In vivo* ist die Retinogenese ein streng regulierter Prozess (124), der wenig Variabilität zwischen einzelnen Individuen zulässt und meist auch bei einem Individuum ein nahezu identisch ausgebildetes Augenpaar generiert (zusammengefasst in (125)). Einen Beweis dafür stellen die einheitlichen Maße eines gesunden Menschauges dar. Wie Bekerman et al. (2014) durch Computertomographie-basierte Messungen zeigen konnte, weisen die durchschnittlichen Maße eines normalsichtigen Auges keine signifikanten Unterschiede zwischen Individuen verschiedenen Geschlechts oder verschiedener Herkunft auf (126). *In vitro* bestehen jedoch zahlreiche Differenzen bezüglich der Umstände der Retinogenese. Somit fehlt *in vitro* eine direkte Verbindung der sich entwickelnden Retina zur Linse oder zum Vorderhirn (zusammengefasst in (127)). Auch die fehlende Anbindung der RO zu einem direkten versorgenden Gefäßsystem stellt einen grundlegenden Unterschied dar (zusammengefasst in (127)). Diese Differenzen können eine manifeste Auswirkung auf die *in vitro* Retinogenese haben und die Organoidvariabilität fördern. Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit aber auch im Rahmen anderer Arbeiten RO verschiedener Größe und Form beobachtet werden (30,117). Die Organoidvariabilität hat dementsprechend einen direkten Einfluss auf die Untersuchungsergebnisse und kann somit einen an Tag 180 möglicherweise vorhandenen Phänotyp überlagern und für die Analysen unzugänglich machen.

Neben dem Einfluss auf die Organoidvariabilität kann die Inkongruenz zwischen *in vivo* und *in vitro* Bedingungen auch einen direkten Einfluss auf das Ausbleiben eines sichtbaren Phänotyps haben. *In vivo* befindet sich das menschliche Auge und die Retina ab der Geburt unter einem regelmäßigen Lichteinfluss. Dieser Stimulus ist bedeutend für die korrekte Entwicklung der Retina, wie es auch die Arbeit von Rao et al. (2013) zeigte (128). Rao et al. (2013) bewiesen, dass bei Mäusen Lichteinfluss entscheidend für die postnatale Regression der Hyaloidgefäße und simultane Ausbildung eines Retina-versorgenden Vaskularisationsnetzes ist. In seinen Versuchen zeigten ab Tag 16 der embryonalen Entwicklung (durch die Haltung der trächtigen Mäuse in lichtgeschützten Räumen) in Dunkelheit aufgezogene Mäusewelpen an P8 eine verspätete Regression der Hyaloidgefäße und eine fehlerhafte Vaskularisation. Vor Gestationsende fehlender Lichteinfluss oder eine Defizienz des Melanopsin-kodierenden *Opn4*

4 (*Opn4*)-Gens führten zu erhöhten Konzentrationen an vascular endothelial growth factor A (VEGF-A)-messenger RNA (mRNA) und Protein mit anschließender Persistenz der Hyaloidgefäße. Verantwortlich für die zeitgemäße Regression der Hyaloidgefäße ist somit ein lichtaktivierter und Melanopsin-abhängiger Signalweg. Diese Beobachtung unterstreicht welchen Impact fehlender Lichteinfluss auf die Entwicklung der Retina haben kann. Die Kultivierung der RO fand jedoch zur Kontrolle der Umgebungsparameter (Temperatur, CO₂-Partialdruck, Luftfeuchtigkeit) sowie aufgrund der lichtempfindlichen Differenzierungsmedien in dunklen Inkubatoren statt, sodass lediglich während der Durchführung des Mediumwechsels ein Lichteinfluss auf die RO bestand. Diese Abschirmung von regelmäßigen Lichtreizen stellt einen erheblichen Unterschied zwischen den *in vivo* und *in vitro* Entwicklungsbedingungen dar und kann somit ursächlich für die fehlende *in vitro* Entwicklung eines erfassbaren Phänotyps an Tag 180 der Differenzierung der *RPI*-defizienten RO sein.

Evidenz für die Unterschiede zwischen den *in vitro* und den *in vivo* Entwicklungsbegebenheiten bildet auch die fehlerhafte Lokalisation von RHO in den RO. *In vivo* ist RHO nach seiner Bildung in den IS der Photorezeptoren und dem Transport über das CC vollständig in den OS der Photorezeptoren lokalisiert (83). Wie schon *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen, kann ein Fehler im Transportweg von den Zellkörpern in die OS zu einer fehlerhaften Anreicherung des Opsins in den IS führen (83,129). In RO lokalisiert sich RHO jedoch auch in gesunden RO u.a. in den IS sowie in den Zellkörpern (77,129,130). Karam et al. (2022) konnten beispielsweise anhand von RO aus den Fibroblasten von Patient*innen mit einer intronischen *RPGR*-Mutation darstellen, dass diese Mutation die Funktionalität von RPGR im CC einschränkt und vermehrt fehllokalisiertes RHO in den Zellkörpern der Photorezeptoren verursacht (129). Nichtsdestotrotz konnten sie ebenfalls eine geringere, aber vorhandene Quantität an RHO in den Zellkörpern der Photorezeptoren der WT-RO beobachten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine ähnliche Transportrate von RHO von der ONL in den Bereich der IS und OS der Photorezeptoren zwischen den KO- und WT-RO beobachtet werden. Diese ähnlichen Ergebnisse könnten einerseits auf eine Überdeckung der möglichen Auswirkung der *RPI*-Defizienz auf den RHO-Transport in den KO-RO durch den generell inhibierten RHO-Transport in den RO zurückgeführt werden. Zum anderen könnte auch die Effektivität der Auswertung des Transportes von RHO vom Bereich der ONL in den Bereich der IS und OS anstelle der Auswertung des Transportes von RHO von den IS in die OS angezweifelt werden. Im Mausmodell konnte eine Fehllokalisierung von RHO durch die Lokalisierung des immunzytochemisch angefärbten Opsins innerhalb der Retina identifiziert werden (83). Eine

deutliche Unterscheidung zwischen IS und OS zeigte sich in RO jedoch entsprechend des Mausmodells in institutsinternen Versuchen als nicht möglich, da sich beide Strukturen in RO zum Teil auf einer Ebene lokalisieren. Eine Unterscheidung anhand des CC als Trennstruktur zeigte sich in den institutsinternen Vorarbeiten außerdem als sehr herausfordernd, da trotz multipler Versuche keine funktionierende immunzytochemische Anfärbung des CC etabliert werden konnte. Solche eingeschränkten Untersuchungsbedingungen könnten die vergleichbaren Ergebnisse zwischen den KO- und WT-RO mitbeeinflusst haben und schwächen somit die Aussagekraft dieser Ergebnisse. Bezüglich der Beobachtungen von Karam et al. (2022) einer vermehrten Fehllokalisierung von RHO in den *RPGR*-defizienten RO, ist es jedoch auch plausibel, dass die Beobachtung dieses Phänotyps aus der Wahl einer kleineren Stichprobe an defizienten RO resultiert. Karam et al. (2022) analysierten für ihre Versuche drei RO pro Zelllinie (129), während im Rahmen dieser Arbeit für ähnliche Analysen acht bis zehn RO pro Zelllinie verwendet wurden, um eine noch höhere Teststärke zu gewährleisten. Durch die geringe Größe der Stichprobe und die Beeinflussung durch die Organoidvariabilität könnte der beobachtete Phänotyp bei den *RPGR*-defizienten RO vorgetäuscht worden sein.

Eine weitere Inkongruenz zwischen den *in vivo* und *in vitro* Begebenheiten stellt die Entwicklung korrekt ausgebildeter OS der Photorezeptoren dar. *In vivo* weisen die OS einen einzigartigen Aufbau aus opsinhaltigen, gestapelten Membranscheiben auf, der ihnen ihre Funktionalität gewährt (131). Die Protokolle zur Differenzierung der RO resultieren jedoch lediglich in einem rudimentären Ansatz dieser Zellstruktur mit verkürzten OS und fehlerhaft gestapelten Membranscheiben (132–134). Ein Einflussfaktor auf die *in vitro* Entwicklung der OS der Photorezeptoren sind dabei die Scherkräfte, die während der Kultivierung auf die OS wirken. Während *in vivo* das RPE eine schützende Schicht um die OS der Photorezeptoren bildet (135), befindet sich das RPE *in vitro* lediglich als Zellaggregat an einem Pol der RO. Trotz wesentlicher Vorsichtsmaßnahmen, wie der sehr behutsame Umgang mit den RO während des Mediumwechsels sowie während der Ernte, birgt jede Manipulation der RO das Risiko der Abscherung eines Teiles der OS. Ein Ansatz zum Schutz der OS der Photorezeptoren während der Ernte der RO, der nach Abschluss dieser Arbeit am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg entwickelt wurde, besteht aus der Einbettung der RO in Matrigel (136). RO, die direkt nach der Ernte für 24h in Matrigel eingebettet wurden, zeigten in den anschließenden ICC-Analysen den höchsten Anteil konservierter OS im Vergleich zu kürzeren oder längeren Einbettungszeiten. Dieser Ansatz könnte ebenfalls zur Verbesserung des Versuchsprotokolls dieser Arbeit zukünftig angewendet werden. Die eingeschränkte

Entwicklung der OS *in vitro* sowie die Präsenz der Scherkräfte auf diese instabilen Strukturen erschweren jedoch weiterhin die Anwendung von RO als Krankheitsmodell.

Die Verbesserung der Ausbildung der OS stellt im Forschungsbereich der RO eine wichtige Herausforderung dar ((137,138); zusammengefasst in (127)). Ein erfolgreicher Ansatz war dabei der Versuchsaufbau von West et al. (2022) (137). Das Ziel von West et al. (2022) war es, den erhöhten metabolischen Verbrauch sowie die fehlende Nährstoffzufuhr aus der Blutversorgung der choroidalen Gefäße und aus der Wiederverwertung der Fettsäuren durch das RPE durch ein verbessertes Nährmedium auszugleichen. Durch die Kultivierung der RO in einem mit Antioxidantien und Docosahexaensäure (DHA) angereicherten Medium konnten die OS bezüglich der Häufigkeit ihrer Ausbildung sowie bezüglich ihrer Länge und ihrer Organisation verbessert werden. Die Ultrastruktur vereinzelter OS der RO bestand aus diskreten Membranscheiben, die eng gestapelt waren. Kawai et al. (2024) berichteten, dass die Zugabe von Hyaluronan - einem Bestandteil der interphotorezeptorischen Matrix, der die IS und OS umschließt (139) - zum Nährmedium während der Differenzierung von RO die Ausbildung ultrastrukturelle ausgereifterer, wenn auch kürzerer OS förderte (140). Auch wenn die Stapelung der Membranscheiben der OS durch die Antioxidantien und das DHA oder durch das Hyaluronan noch nicht das Organisationsniveau der *in vivo* OS erreicht hat, könnte diese Verbesserung der Ausbildung und der Organisation der OS bei ausreichender Reproduzierbarkeit einen eindrucksvollen Durchbruch darstellen. Solche Versuchsansätze könnten auch für die hier beschriebene Arbeit ein wertvoller zukünftiger Ansatz sein, um das aktuell verwendete Protokoll zu optimieren und den Schweregrad der phänotypischen Ausprägung der *RPI*-Defizienz zu erhöhen.

Eine Umstellung des Differenzierungsprotokolls auf das von West et al. (2022) benutzte Medium könnte einerseits die Entwicklung der OS fördern und somit die Detektion einer möglichen, durch die *RPI*-Defizienz verursachten Differenz in der OS-Länge oder der OS-Organisation erleichtern. Andererseits beschrieben West et al. (2022) ebenfalls eine deutlichere Lokalisation von RHO in den OS gesunder RO durch die Nutzung des angereicherten Mediums (137). Im Versuch mit RO, die aus den *RPGR*-defizienten hiPSC von X-chromosomale Retinitis Pigmentosa Typ 3 (XLRP3)-Patient*innen differenziert wurden, war eine Abgrenzung zwischen den Phänotypen der KO- und WT-RO möglich. Da *RPGR* ebenfalls im CC der Photorezeptoren lokalisiert und im Proteintransport involviert ist (141,142), konnte West et al. (2022) bei den *RPGR*-defizienten RO eine Mislokalisierung von RHO im gesamten Photorezeptor und v.a. im Zellkörper beobachten, während sich in den WT-RO das RHO

größtenteils in den OS lokalisierte. Auch wenn dieser Effekt von West et al. (2022) nicht quantifiziert wurde, könnte die Umstellung des in dieser Arbeit verwendeten Differenzierungsprotokolls auf das von West et al. (2022) eingesetzte Medium dazu beitragen, den vollständigen Transport von RHO in die OS der WT-RO zu fördern und dadurch die Differenz in der Transportrate zwischen KO- und WT-RO zu verdeutlichen.

Die aktuelle Forschung rund um Organoide bemüht sich stetig um eine Verringerung der Diskrepanz zwischen *in vitro* und *in vivo*. Fernando et al. (2022) konnten zeigen, dass durch die parallele Differenzierung retinaler und kortikaler Organoide aus hiPSCs sogenannte Netzhaut-Hirn-Organoide entstehen, die zum Teil über nervenähnliche Strukturen in Form axonaler Projektionen retinaler Ganglienzellen miteinander verbunden sind (143). Dadurch wird eine nähere Nachbildung der retino-zerebralen Interaktion *in vitro* ermöglicht. Ein Lösungsansatz bezüglich der fehlenden Vaskularisierung der RO könnte die Kultur der RO in Form einer ‘retina-on-a-chip’ Plattform darstellen (138). Die Forschungsgruppe um K. Achberger (2019) hat eine Ko-Kultur von RO und RPE mit gleichzeitiger künstlicher Vaskularisierungs-ähnlicher Perfusion der RO durch ihre Version der ‘retina-on-a-chip’ Plattform ermöglicht (138). Ihre Plattform bestand dabei aus zwei durch eine dünne, poröse, endothelähnliche Membran getrennten Kompartimenten. Das untere Kompartiment bestand aus einem kontinuierlichen Kanal, der durch eine konstante Perfusion einen Zufluss von Nährstoffen und einen Abfluss von Metaboliten ermöglichte und somit eine Form der Vaskularisierung imitierte. Solche Lösungsansätze sind vielversprechend und bieten einen weiteren Ansatz, um Inkongruenzen zwischen den *in vivo* und *in vitro* Bedingungen zu reduzieren.

Die Inauguration spezifischer Erntekriterien zur Reduktion der Organoidvariabilität könnte ebenfalls einen interessanten Angriffspunkt im Rahmen dieses Projektes darstellen. Zur Festlegung der genauen Erntekriterien könnte ein computerbasiertes Verfahren zur Förderung der Präzision angewandt werden. Im Jahr 2020 hat Kegeles et al. ein „faltendes neuronales Netzwerk“ (Convolutional Neural Network, CNN), also ein künstliches neuronales Netzwerk, angelernt, um eine auf künstlicher Intelligenz basierende Klassifikation neuronaler Domänen in frühen Entwicklungsstadien hinsichtlich ihrer Wahrscheinlichkeit zur Differenzierung in RO zu ermöglichen (144). Dafür wurden neuronale Domänen aus murinen ESC differenziert und die Unterscheidung zwischen einer Retina-spezifischen Differenzierung und einer nicht Retina-spezifischen Differenzierung durch das CNN anhand von HF Tag 5 alter neuronaler Domäne erlernt. Als Basisindikator für eine frühe retinale Differenzierung fungierte die Expression von

für retinale Progenitorzellen spezifischen Markern in ICC-Aufnahmen der Tag 9 alten neuronalen Domänen. Im finalen Vergleich zwischen dem CNN und Experten auf dem Gebiet der RO war das CNN den Experten in der Genauigkeit der Detektion potenzieller RO anhand von HF überlegen. Eine auf CNN basierte Selektion der zu analysierenden RO anhand des Kriteriums der Entwicklung von IS und OS in einem bestimmten Zeitraum könnte den menschlichen Fehler in der Selektion minimieren und somit die Organoidvariabilität zusätzlich reduzieren. Ein solches Verfahren wäre jedoch äußerst aufwendig. Kegeles et al. (2020) benötigten beispielsweise 3000 RO zum Anlernen, Validieren und Testen ihres CNN-Systems (144). Die erfolgreiche Umsetzung eines solchen CNN-Systems innerhalb dieses Projektes würde dementsprechend ebenfalls eine sehr hohe Anzahl an RO benötigen.

Zukünftig könnte ebenfalls die längere Kultivierung und spätere Ernte der RO einen Ansatz darstellen, um die Entwicklung eines ausgeprägten Phänotyps bei den KO-RO zu fördern. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Differenzierungsprotokoll ermöglicht eine Differenzierung der RO bis zum Alter von zwei Jahren, wie es im Rahmen anderer Institutsarbeiten bewiesen wurde (145). Eine längere Kultivierung ist jedoch mit einem gesteigerten Aufwand und einem gesteigerten Kontaminationsrisiko verbunden. Den wichtigsten Aspekt stellt die Änderung der zellulären Zusammensetzung mit zunehmendem Alter der RO dar. Capowski et al. (2019) gelang es RO über einen längeren Zeitraum bis vereinzelt zu einem Differenzierungsalter von Tag 470 zu kultivieren (36). Im Stadium 3 der Differenzierung präsentierten die älteren RO eine zunehmende Disorganisation der inneren Schichten, gleichzusetzen mit den Schichten unterhalb der OPL, mit ektopen Photorezeptorzellen sowie absterbenden Ganglienzellen und absterbenden amakrinen Zellen. Während die gut entwickelten Ganglienzellen in den frühen Stadien (v.a. Stadium 1) der Entwicklung reichlich vorhanden waren, präsentierten die spärlichen Ganglienzellen in Stadium 3 ungerichtete und stumpfe Fortsätze. Im Gegensatz zu den degenerierenden Ganglienzellen, konnte Capowski et al. (2019) Photorezeptoren mit ausgebildeten OS bis Tag 470 der Ausdifferenzierung beobachten. Es ist also somit denkbar, dass eine längere Kultivierungszeit gleichzeitig auch eine zusätzliche Reifung der Photorezeptoren erlaubt. Die zusätzliche Reifungszeit könnte die Ausprägung eines möglichen Phänotyps in den KO-RO fördern. Institutsinterne Analysen zeigten jedoch, dass längere Kultivierungszeiten mit einer eingeschränkten Funktionalität der Photorezeptoren einhergehen und sich die RO von der nativen Retina distanzieren (145). Bei der prolongierten Kultivierungszeit müsste dementsprechend ein zeitlicher Mittelweg zwischen der zusätzlichen Reifung der

Photorezeptoren und der Degeneration der zellulären Bestandteile der RO angestrebt werden. Die längere Kultivierung der RO wäre somit ein möglicher jedoch aufwendiger und mit gewissen Limitationen verbundener Ansatz. Eine vielversprechende Alternative zur prolongierten Kultivierung stellt die gezielte Beschleunigung der Photorezeptorreifung dar. Kawai et al. (2024) konnten zeigen, dass die Zugabe von Hyaluronan in das Nährmedium 14 Wochen alter RO bereits nach zwei Wochen zu einer deutlichen Verschiebung des zellulären Gleichgewichts führte. So fanden sich signifikant weniger proliferierende (Ki67⁺) Zellen, während gleichzeitig die Anzahl ausgereifter Photorezeptorzellen im Vergleich zu Kontroll-RO ohne Hyaluronan deutlich erhöht war (140). Eine gezielte Modulation der extrazellulären Umgebung hat somit eine schnelleren Photorezeptorreifung induziert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in diesem Projekt das Ausbleiben eines sichtbaren Phänotyps in den *RPI*-defizienten RO ein unerwartetes Ergebnis darstellt. Einen Erklärungsansatz stellt die Hypothese dar, dass sich der Phänotyp erst zu einem späteren Zeitpunkt der Ausdifferenzierung der RO exprimiert und/oder an Tag 180 noch zu milde ausgeprägt ist, um mit der angewandten Methodik erfasst zu werden. Auch die Beeinflussung durch Faktoren wie die Organoidvariabilität oder die Differenzen zwischen der *in vivo* und der *in vitro* Entwicklung der Retina erschwert die Erfassung eines solchen Phänotyps zusätzlich. Neben der Anpassung des verwendeten Differenzierungsprotokolls könnten die Anwendung spezifischer Qualitätskriterien bei der Auswahl der untersuchten RO sowie die längere Kultivierung und spätere Ernte der RO die Ausprägung und Erfassung der Auswirkungen der *RPI*-Defizienz erleichtern.

Auch wenn die dargestellten Optimierungsansätze für die hier beschriebene Arbeit vielversprechend sind, darf man dennoch die vorherrschenden Grenzen im Bereich der Forschung mit RO nicht außer Acht lassen. Forschungsprojekte, die RO beinhalten, sind mit einem hohen zeitlichen sowie arbeitstechnischen Aufwand verbunden ((29,36), zusammengefasst in (146)). *In vitro* fehlt außerdem das Zusammenspiel des retinalen Gewebes mit *in vivo* vorhandenen okulären Geweben wie dem RPE oder der Linse sowie die synaptischen Verbindungen der Ganglienzellen mit Neuronen der Sehbahn (zusammengefasst in (147)). Durch die fehlende Vaskularisierung werden die inneren Schichten der RO nur mangelhaft mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Dieses Phänomen aggraviert sich durch die eingeschränkte Diffusion mit zunehmender Größe der RO und führt somit u.a. zur oben beschriebenen Disorganisation der inneren Schichten der RO (zusammengefasst in (127)). Wären RO ein optimales Krankheitsmodell hätten die zahlreichen Charakterisierungen retinaler

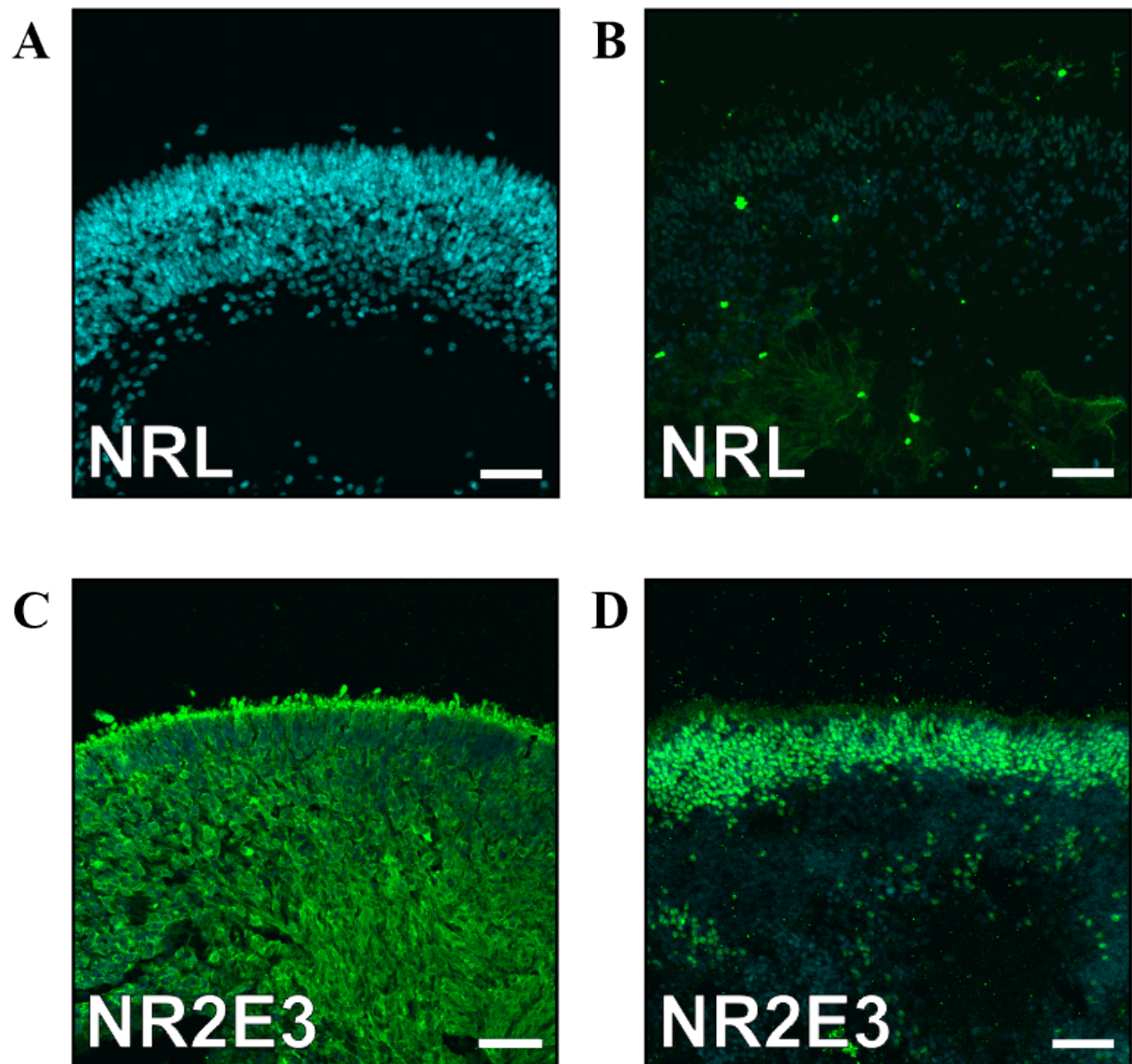
Erkrankungen anhand von RO im Vergleich zu den Tiermodellen Neuerkenntnisse geschaffen. Bislang erlaubte die Forschung mit RO als Krankheitsmodell jedoch v.a. die erneute Beschreibung bekannter Krankheitsmerkmale anhand eines neuen Modellsystems (77,78,141,148).

Trotz ihrer aktuellen Grenzen stellen RO ein vielversprechendes Feld im Bereich der Erforschung der humanen Retinogenese sowie bezüglich der Charakterisierung retinaler Erkrankungen dar. Die RO ermöglichen v.a. die Erforschung der frühen Stadien der Entwicklung der Retina, die durch die Differenzierung der RO aus humanen ESC oder hiPSC mit hoher Übereinstimmung rekapituliert werden (149). Im Gegensatz zum Tiermodell bieten sie den Vorteil, dass sie eine hohe anatomische und physiologische Ähnlichkeit zur humanen Retina aufweisen. Somit kann es vorteilhafter sein, Ergebnisse aus der Organoidforschung auf den Menschen zu übertragen als Ergebnisse, die anhand von Tiermodellen erhoben wurden (zusammengefasst in (45)). Als Krankheitsmodell „in einer Petrischale“ weisen sie eine hohe Zugänglichkeit auf und können durch Manipulation der ursprünglichen hiPSC via CRISPR-Cas9 sowie durch die Reprogrammierung patienteneigener Zellen spezifische Anforderungen auf Ebene des Genoms erfüllen und die Auswirkungen von Genkorrekturen charakterisieren (zusammengefasst in (45,150)). Zahlreiche Forschungsgruppen arbeiten durch Projekte wie der Kultur der RO in Form einer ‘retina-on-a-chip’ Plattform an der Behebung der aktuellen Limitationen.

RO stellen somit ein vielversprechendes aber noch auszubauendes Krankheitsmodellsystem dar. Innerhalb dieser Arbeit konnten KO- und WT-RO erfolgreich aus hiPSC differenziert und mit der angewandten Methodik ausführlich bezüglich der Dicke der ONL, der Länge der OS, dem relativen Anteil an Photorezeptoren und dem Transport von RHO in die IS und OS analysiert werden. In allen analysierten Parametern waren die KO- und WT-RO vergleichbar. Dies kann an dem noch jungem Alter der RO liegen, es kann durch die Verdeckung eines möglichen Phänotyps durch die Organoidvariabilität verursacht sein, oder es kann an den Unterschieden zwischen den *in vitro* und den *in vivo* Entwicklungsbedingungen liegen. Mit der Integration der hier beschriebenen Ansätze sowie den zukünftigen Fortschritten auf dem Gebiet der Organoidforschung könnte eine Charakterisierung *RPI*-defizienter RO jedoch möglich werden und somit einen weiteren Pflasterstein auf dem Weg zum Verständnis der phänotypischen Auswirkungen von Mutationen im *RPI*-Gen legen.

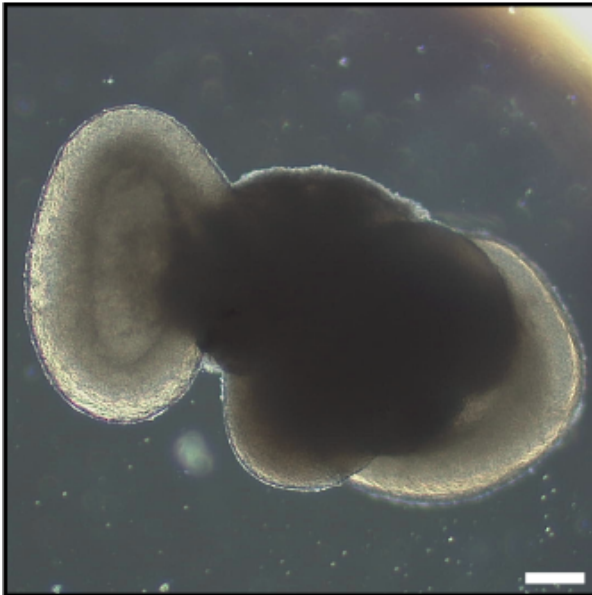
7 Anhang

7.1 Zusätzliche Abbildungen

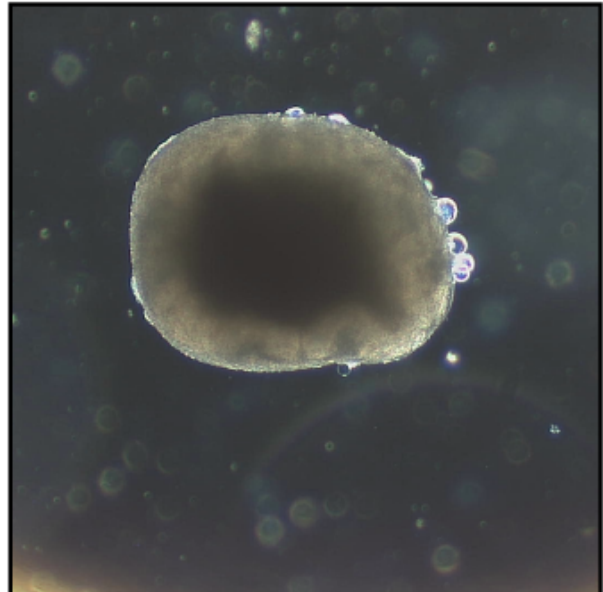
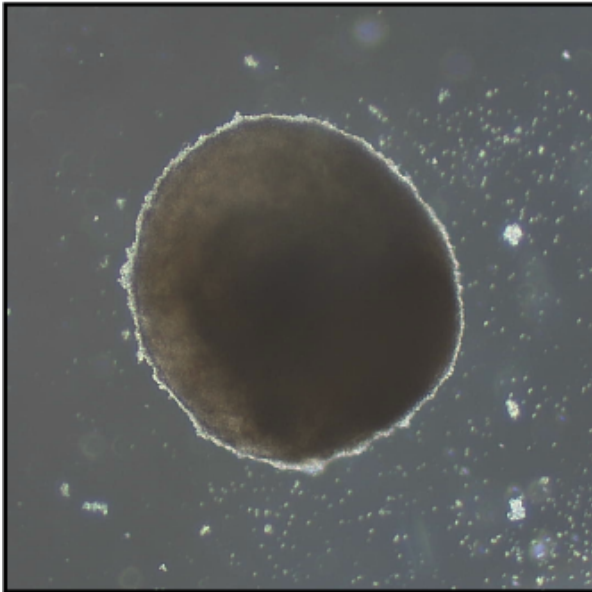
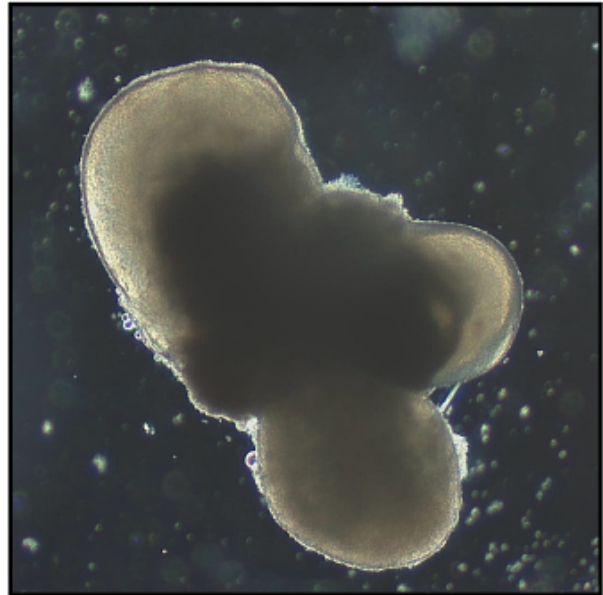


Anhang 1: Färbung der Stäbchen mit NRL und NR2E3. (A) NRL ohne Proteinase K. Keine deutliche Färbung ist erkennbar. (B) NRL mit 9 min Proteinase K. Eine schwach ausgeprägte Färbung ist erkennbar. (C) NR2E3 mit Citrat. Eine unspezifische Färbung ist erkennbar. (D) NR2E3 mit 1 min Proteinase K. Eine deutliche spezifische Färbung der Stäbchen in der ONL ist erkennbar. (A-D) Proteinase K und Citrat dienten dem Versuch der Antigen-Demaskierung. Maßstäbe: (A-D) 50 μ m.

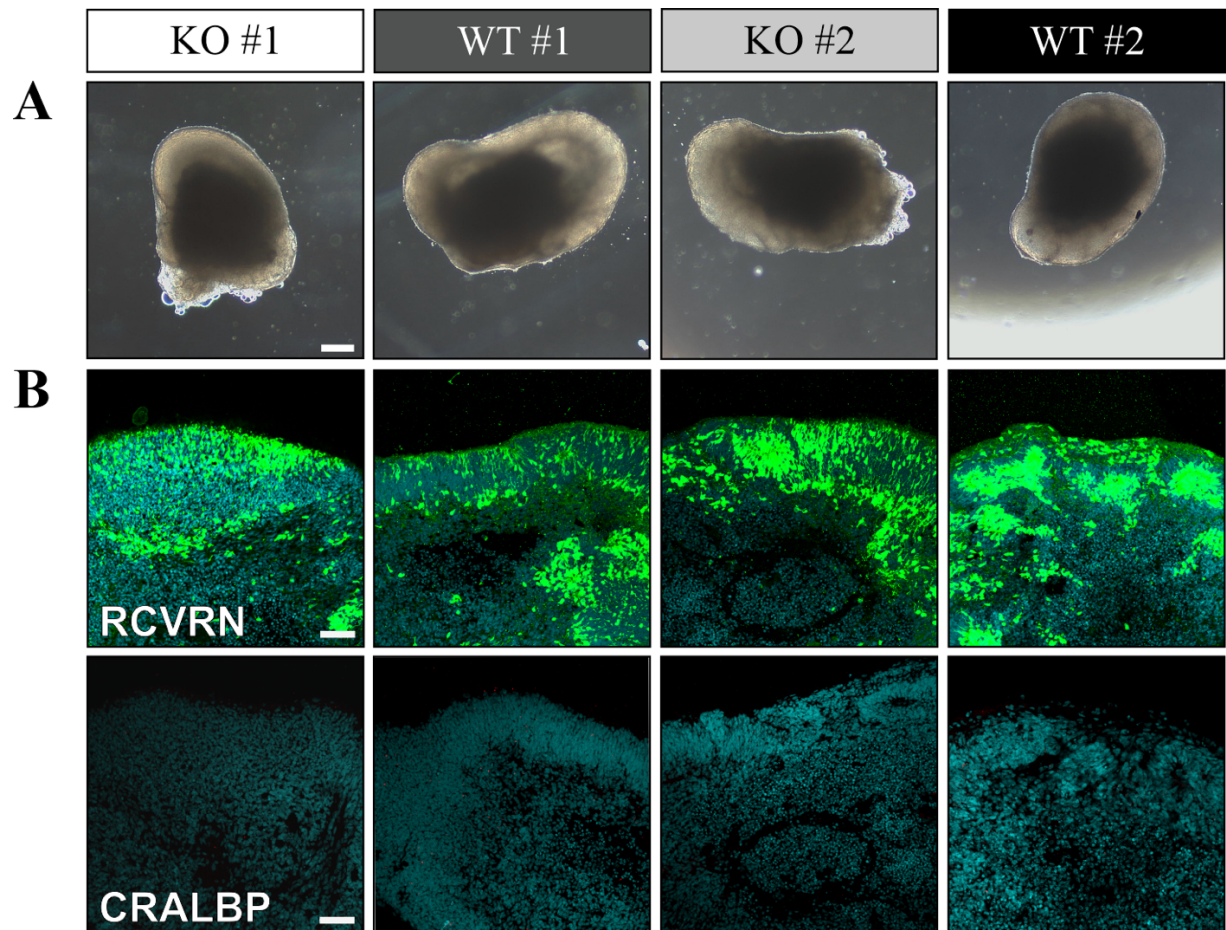
KO #2



WT #2



Anhang 2: Darstellung der RO und ihrer Variabilität an d91. Exemplarisch sind jeweils zwei RO für KO #2 und WT #2 dargestellt. Die RO unterscheiden sich in ihrer Form, ihrer Größe und ihrer Qualität und zeigen die Variabilität zwischen einzelnen RO. RO mit einer hellen, kompakten Außenzone und einem dunkleren Kern erfüllten die nötigen Qualitätskriterien (obere Reihe). RO ohne helle, kompakte Außenzone wurden aussortiert (untere Reihe). Maßstab: 250 μm .



Anhang 3: Qualitätskontrolle von *RPI*-KO- und WT-RO an d69 der Ausdifferenzierung. (A) HF der RO. (B) Immunzytochemische Färbung der Kryoschnitte mit RCVRN und CRALBP. Von diesen Markern wurde keine Quantifizierung vorgenommen. Maßstäbe: (A) 300 μm (B) 50 μm .

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
3D	dreidimensional
AAV	adeno-assoziierte Viren
adRP	autosomal-dominante Retinitis Pigmentosa
adRP1	autosomal-dominante Form der RP durch eine Mutation im RP1-Gen
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
arRP	autosomal-rezessive Retinitis Pigmentosa
arRP1	autosomal-rezessive Form der RP durch eine Mutation im RP1-Gen
BB	Basalkörper
BMP4	bone morphogenetic protein 4
bzw	beziehungsweise
c-Myc	Cellular myelocytomatosis oncogene
ca.	circa
CC	Verbindungscilium
cDNA	complementary DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	centimeter
CNN	Faltendes neuronales Netzwerk
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CRALBP	Retinaldehyde binding protein 1
crRNA	CRISPR-RNA

CRX	Cone-rod homeobox
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Stain-Lösung
dest.	destilliert
DHA	Docosahexaensäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ESC	embryonale Stammzellen
FBS	Fötales Kälberserum, nicht hitzeinaktiviert
FCS	Fötales Kälberserum, hitzeinaktiviert
GCL	Stratum ganglionicum
GFR	Growth Factor Reduced
gRNA	guide-RNA
h	Stunde
HDR	homologe Rekombination
hESC	humane embryonalen Stammzellen
HF	Hellfeldaufnahmen
hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzellen
ICC	Immunocytochemie
INL	Stratum nucleare internum
IPL	Stratum plexiforme internum
IS	Innensegment
Klf4	Krüppel-like factor 4
KO	Defizienter Genotyp
<i>Lhx2</i>	<i>LIM homeobox 2</i>

m	milli
mAK	monoklonaler Antikörper
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
min	Minute
MKi67	Marker of proliferation Ki-67
ml	milliliter
mm	millimeter
MRA	Mycoplasma Removal Agent
mRNA	messenger RNA
mtRP	mitochondrial verursachte RP
NEAA	Nicht essenzielle Aminosäuren
NHEJ	nicht homologe Endverknüpfung
NIM	Neuronal Induction Medium
NR2E3	Nuclear receptor subfamily 2 group E member 3
NRL	Neural retina leucine zipper
Oct3/4	Octamer-binding transcription factor $\frac{3}{4}$
OLM	Stratum limitans externum
ONL	Stratum nucleare externum
OPL	Stratum plexiforme externum
<i>Opn4</i>	<i>Opsin 4</i>
OS	Außensegment
<i>Otx2</i>	<i>Orthodenticle homeobox 2</i>
P	postpartum

pAK	polyklonaler Antikörper
<i>Pax6</i>	<i>paired box gene 6</i>
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE6B	Phosphodiesterase 6B
PFA	Paraformaldehydlösung
RA	Retinsäure
RB1	RB transcriptional corepressor 1
RC1	Retinal Cup 1
RC2	Retinal Cup 2
RCVRN	Recoverin
RDM	Retinal Differentiation Medium
RHO	Rhodopsin
RNP	Ribonucleinprotein
RO	Retinale Organoide
RP	Retinitis Pigmentosa
<i>RP1</i>	<i>Retinitis Pigmentosa 1 Axonemal Microtubule Associated</i>
<i>RP2</i>	<i>Retinitis Pigmentosa 2 activator of ARL3 GTPase</i>
RPE	Stratum pigmentosum
<i>RPE65</i>	<i>Retinoid isomerohydrolase RPE65</i>
<i>RPGR</i>	<i>Retinitis Pigmentosa GTPase regulator</i>
<i>RS1</i>	<i>Retinoschisin 1</i>

RT	Raumtemperatur
<i>Rx1</i>	<i>retinal homeobox gene 1</i>
SFEBq	serumfreie schwimmende Bildung von Embryoidkörper-ähnlichen Aggregaten mit schneller Reaggregation
sgRNA	single guide RNA
<i>SIX3</i>	<i>SIX homeobox 3</i>
SNCG	Synuclein gamma
Sox2	SRY-box transcription factor 2
TFAP2A	Transcription factor AP-2 alpha
tracrRNA	trans-activating CRISPR-RNA
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A
VSX2	Visual system homeobox 2
WT	Wildtyp
XLRP	X-chromosomale Retinitis Pigmentosa
XLRS	X-chromosomale Retinoschisis
z.B.	zum Beispiel
μ	micro
μl	microliter

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten hiPSC-Linien.....	23
Tabelle 2: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Zellkulturmedien und Zusätze....	23
Tabelle 3: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....	25
Tabelle 4: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Enzyme.....	25
Tabelle 5: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Kit- und Reaktionssysteme	26
Tabelle 6: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen mit jeweiliger Zusammensetzung und Mengenangabe	26
Tabelle 7: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten primären Antikörper mit jeweiligem Antikörpertyp sowie jeweiliger Herkunft und Verdünnung	28
Tabelle 8: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten sekundären Antikörper mit jeweiliger Verdünnung	30
Tabelle 9: Aufgelistet ist das in der Arbeit verwendete Verbrauchsmaterial.....	30
Tabelle 10: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendeten Laborgeräte	33
Tabelle 11: Aufgelistet sind alle in der Arbeit verwendete Computerprogramme	34
Tabelle 12: Aufgelistet sind alle in der Arbeit benutzten Differenzierungsmedien zur Ausdifferenzierung der hiPSC zu RO mit Zusammensetzung und Mengenangabe	37
Tabelle 13: Aufgelistet ist der Wochenablauf für die Kultur der RO mit RC2 und RA	39
Tabelle 14: Aufgelistet sind die Analysen, die mit Hilfe eigenständig ausdifferenzierter RO durchgeführt wurden. Gegenübergestellt sind die Analysen, die mit Hilfe vorab ausdifferenzierter RO durchgeführt wurden.	40
Tabelle 15: Aufgelistet ist die Zusammensetzung der DNase I-Lösung mit Volumenangabe	43
Tabelle 16: Aufgelistet ist die Zusammensetzung der TUNEL-Reaktionsmischung mit Volumenangabe.....	44

7.4 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Aufbau der humanen Retina.** Makroskopische und mikroskopische Darstellung der Retina mit ihren verschiedenen Schichten und Zelltypen. Die Retina lässt sich in eine Pars caeca und eine Pars optica unterteilen. In der Pars optica befindet sich ganz außen das RPE bestehend aus den RPE-Zellen. In der ONL befinden sich die Perikaryen der Stäbchen und Zapfen. In der INL lokalisieren sich die Bipolarzellen, die amakrinen Zellen, die Horizontalzellen und die Perikaryen der Müllerzellen. Die Müllerzellen erstrecken sich dabei von der GCL bis zur ONL. Die GCL setzt sich aus den Ganglienzellen zusammen. Die verschiedenen Zellschichten werden durch die IPL und die OPL miteinander verbunden und bilden zusammen das Stratum nervosum der Retina, auch noch neuronale Retina genannt. Modifizierte Abbildung nach Dr. Dr. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg. 10
- Abbildung 2: Struktur der Stäbchen und Zapfen.** (A) Stäbchen samt OS, IS, Zellkörper und Synapse. (B) Zapfen samt OS, IS, Zellkörper und Synapse. Beide Photorezeptortypen beinhalten einen Nukleus im Zellkörper und Mitochondrien im IS. Die OS bestehen jeweils aus gestapelten Membranscheiben (C) Darstellung der Lokalisation des CC anhand eines Stäbchens. Das CC besteht aus einem Basalkörper (BB) und dem sich daraus entwickelnden Axonem (zusammengefasst in (4)). Modifizierte Abbildung nach Dr. Dr. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg. 11
- Abbildung 3: Entwicklung der humanen Retina.** (A-E) Entwicklung der Netzhaut während der Embryogenese bis hin zur erwachsenen Netzhaut. (A) Das Augenbläschen erstreckt sich in Richtung des Oberflächenektoderms. Die Ausbreitungsrichtung des Augenbläschens ist mit einem schwarzen Pfeil dargestellt. (B) Die Entstehung der Linsenplakode aus dem Oberflächenektoderm und die Invagination des Augenbläschens werden initiiert. Der Augenblasenstiel verbindet den Augenbecher mit dem Diencephalon und entwickelt sich später zum Sehnerv. Die Invaginationsrichtung ist mit einem schwarzen Pfeil dargestellt (C-D) Durch die Invagination entsteht ein zweischichtiger Augenbecher. Die äußere Schicht entwickelt sich zum RPE. Die innere Schicht entwickelt sich zum Stratum nervosum der Retina (neuronale Retina). Die Kornea entwickelt sich aus dem Oberflächenektoderm (E) Das Auge eines erwachsenen Individuums nach der prä- und postnatalen Entwicklungsphase mit Markierung der neuronalen Retina und der Linse, die sich aus der Linsenplakode entwickelt hat, ist dargestellt. Modifizierte Abbildung nach Dr. Dr. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg. 12

- Abbildung 4: Retinale Abfolge der Zelldifferenzierung.** (A) Schematische Darstellung der humanen Retina. (B) Darstellung der zeitlichen Abfolge der Differenzierung der verschiedenen Zelltypen in der humanen Retina. In der humanen Retina entwickeln sich in der frühen Phase der Zelldifferenzierung die Ganglienzellen, die amakrinen Zellen, die Horizontalzellen und die Zapfen. In der späteren Phase werden die Stäbchen, die Müllerzellen und die Bipolarzellen gebildet. Modifizierte Abbildung nach Dr. Dr. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg..... **13**
- Abbildung 5: RO.** (A) Schematische Darstellung der humanen Retina. (B) Schematische Darstellung eines RO mitsamt seinen Zelltypen. RO weisen einen ähnlichen histoarchitekturellen und zellulären Aufbau wie die humane Retina auf. (C-D) Die humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) werden durch die Reprogrammierung humaner Fibroblasten generiert. Der Prozess der Reprogrammierung benötigt 2 bis 2,5 Monate. (D-E) Differenzierung der hiPSC in RO. Die Dauer der anschließenden Differenzierung der hiPSC in RO ist abhängig von der Fragestellung. Je nach gewähltem Erntezeitpunkt befinden sich die verschiedenen Zelltypen der RO gemäß der zeitlichen Zelldifferenzierung der humanen Retina in einem spezifischen Entwicklungsstand. Modifizierte Abbildung nach Dr. Dr. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg. **14**
- Abbildung 6:** Darstellung der mikroskopischen und makroskopischen Auswirkungen von RP. (A) Sagittalschnitt eines Auges mit Unterteilung in ein gesundes und ein erkranktes Auge. Im erkrankten Auge wurde die RP-typische Bildung knochennadel-ähnlicher Strukturen und die Beeinträchtigung der retinalen Blutgefäße dargestellt. (B) Schematische Darstellung der humanen Retina im gesunden und im erkrankten Zustand. Im erkrankten Auge sind die absterbenden Stäbchen und die absterbenden weiteren Zelltypen wie z.B. Zapfen dargestellt. (C) Ein uneingeschränktes Blickfeld in einem gesunden Auge und die Manifestation der RP in einem erkrankten Auge sind dargestellt. Das symptomatische Korrelat bei der RP besteht aus Nachtblindheit und einem progressiven Tunnelblick. Modifizierte Abbildung nach Dr. Dr. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg. **18**
- Abbildung 7: *RPI*.** Darstellung des *RPI*-Gens mit seinen 4 Exonen. In rosa ist die adRP1-spezifische Region im Exon 4 dargestellt. In flücker sind die arRP1-spezifischen Regionen im Exon 2,3 und 4 dargestellt. Die arRP1-spezifischen Regionen im Exon 4 lokalisieren sich rundherum der adRP1-spezifischen Region. Modifizierte Abbildung nach Dr. Dr. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg. **21**

Abbildung 8: *RPI*-Gen mit Gensequenz des *RPI*-Gens aus KO #1 und KO #2 nach Sanger-Sequenzierung. (A) Darstellung des *RPI*-Gens und seiner kodierenden Exone. Die sgRNA, die für die CRISPR-Cas9 Behandlung eingesetzt wurde, wurde gegen das zweite Exon im *RPI*-Gen gerichtet. (B) Darstellung der verursachten Mutation mit Leserasterverschiebung durch Insertion einer Cytosin-Base in die *RPI*-Gensequenz von KO #1 (c.295insC/c.295insC) (C) Darstellung der verursachten Mutation mit Leserasterverschiebung durch Deletion einer Cytosin-Base in die *RPI*-Gensequenz von KO #2 (c.295delC/c.295delC). (B-C) Die Sequenzierung wurde anhand der DNA von den hiPSC KO #1 und KO #2 durchgeführt. Die sgRNA ist in grün und das PAM in grau dargestellt. Modifizierte Abbildung nach Dr. Dr. Patricia Berber, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg. 35

Abbildung 9: Darstellung der Auswertungsmethode der Nahaufnahmen von RCVRN und RHO. (A) Methode zur Messung der Intensität von RHO bzw. RCVRN in den IS und OS. 1- Die Region der IS und OS wurde in einer im RCVRN-Kanal aufgenommen Nahaufnahme im 16-bit Format lokalisiert. 2- Bereiche unterhalb der OLM und oberhalb der OS wurden entfernt. 3- Die gefärbte Fläche wurde mit Hilfe eines Schwellenwerts identifiziert. 4- Der Bereich der IS und OS wurde selektioniert. 5- Die Selektion wurde auf ein 16-bit Bild im RHO-Kanal sowie im RCVRN-Kanal überlagert. (B) Methode zur Messung der Intensität von RHO bzw. RCVRN in der ONL. 1- Die Region der ONL wurde in einer im RCVRN-Kanal aufgenommen Nahaufnahme im 16-bit Format lokalisiert. 2- Die Region der ONL wurde manuell selektioniert. 3- Die Selektion wurde auf ein Bild im 16-bit Format im RHO-Kanal sowie im RCVRN-Kanal überlagert. 46

Abbildung 10: Zeitliche Darstellung der Ausdifferenzierung der hiPSC zu RO. Dargestellt sind die verwendeten Differenzierungsmedien und -zusätze sowie die Abfolge der Kultivierungsbedingungen. Die RO wurden in vier verschiedenen Differenzierungsmedien kultiviert. Von Tag 1 bis Tag 16 fand die Kultivierung in NIM statt, von Tag 16 bis 42 in RDM, von Tag 42 bis 91 in RC2 und abschließend von Tag 91 bis 180 in RC1. An Tag 0 wurden die hiPSC mit Blebbistatin behandelt. An Tag 6 wurde BMP4 zur Kultur hinzugegeben und von Tag 62 bis 180 wurde RA als Zusatz zur Kultur hinzugegeben. Das Differenzierungsprotokoll folgte einem 3D-2D-3D-Prinzip. 49

Abbildung 11: Qualitätskontrolle von KO- und WT-RO an Tag 69 der Ausdifferenzierung. (A) HF der RO. (B, D, F, H, J) Immunzytochemische Färbung der Kryoschnitte mit respektive MKi67, VSX2, CRX, SNCG und TFAP2A. (C, E, G, I, K) Quotient aus der MKi67⁺ (C), VSX2⁺ (E), CRX⁺ (G), SNCG⁺ (F) oder TFAP2A⁺ (K) und

der DAPI⁺-Fläche. Angegeben ist der Mittelwert pro Genotyp mit Standardabweichung.

Maßstäbe: (A) 300 µm (B) 50 µm. n = 1, 1, 1, 3 (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2)..... **51**

Abbildung 12: Messung der Dicke der ONL in HF und ICC-Aufnahmen an Tag 140 und Tag 180. (A) HF der KO- und WT-RO an Tag 140. (B) Dicke der ONL in µm an Tag 140 anhand von HF. Die Dicke der ONL war für alle vier Genotypen ähnlich (KO #1 42,65 µm ± 4,19 µm, WT #1 40,62 µm ± 2,99 µm, KO #2 42,00 µm ± 5,58 µm, WT #2 39,92 µm ± 4,19 µm). (C) HF der KO- und WT-RO an Tag 180. (D) Dicke der ONL in µm an Tag 180 anhand von HF. Die Dicke der ONL war für alle vier Genotypen ähnlich (KO #1 51,88 µm ± 8,42 µm, WT #1 51,95 µm ± 5,14 µm, KO #2 51,50 µm ± 7,73 µm, WT #2 47,24 µm ± 6,83 µm). (E) ICC-Aufnahmen der KO- und WT-RO von NR2E3 und DAPI-angefärbten Kryoschnitten an Tag 180. (F) Dicke der ONL in µm an Tag 180 anhand von ICC-Aufnahmen. Die Dicke der ONL war für alle vier Genotypen ähnlich (KO #1 31,49 µm ± 5,18 µm, WT #1 35,74 µm ± 3,94 µm, KO #2 32,31 µm ± 6,04 µm, WT #2 30,34 µm ± 5,92 µm). (A, C, E) Die Vergrößerungen zeigen exemplarische Messungen (Balken) zur Quantifizierung der Dicke der ONL. Die Position der Vergrößerungen ist mit einem weißen Quadrat dargestellt. Messwerte inklusive Median. Maßstäbe: (A) Maßstab Übersicht: 100 µm; Maßstab Vergrößerung: 25 µm (B) Maßstab Übersicht: 100 µm; Maßstab Vergrößerung: 25 µm (C) Maßstab Übersicht: 150 µm; Maßstab Vergrößerung: 37,5 µm. (D) n = 41, 43, 50, 56 (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2) (E) n = 44, 43, 49, 54 (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2) (F) n = 10, 10, 10, 10 (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2). **53**

Abbildung 13: Messung der Länge der OS in HF an Tag 180. (A) HF der ONL der KO- und WT-RO mitsamt ihren OS an Tag 180. Die Vergrößerungen zeigen exemplarische Messungen (Balken) zur Quantifizierung der Länge der OS. Die Position der Vergrößerungen ist mit einem weißen Quadrat dargestellt. (B) Länge der OS in µm an Tag 180 anhand von HF. Die Länge war für alle vier Genotype ähnlich (KO #1 23,22 µm ± 7,50 µm, WT #1 23,67 µm ± 4,81 µm, KO #2 24,34 µm ± 6,90 µm, WT #2 20,65 µm ± 6,52 µm). Messwerte inklusive Median. Maßstäbe: (A) Maßstab Übersicht: 20 µm; Maßstab Vergrößerung: 5 µm. n = 44, 43, 50, 58 (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2). **55**

Abbildung 14: Quantifizierung der Apoptoserate an Tag 180. (A) Übersichtsaufnahmen der TUNEL⁺ sowie TUNEL⁺ und DAPI⁺-Fläche (Verbund). (B) Quotient aus der TUNEL⁺ und der DAPI⁺-Fläche. Die Apoptoserate war für alle vier Genotype ähnlich (KO #1 10,82 µm ± 3,72 µm, WT #1 8,76 µm ± 3,78 µm, KO #2 10,12 µm ± 5,86 µm, WT #2 10,53 µm ± 4,27 µm). Es zeigte sich eine hohe Variabilität zwischen den RO eines Genotyps. Ein

RO wurde je nach Ausdifferenzierungsbeginn entweder mit einem Kreis oder mit einem Dreieck dargestellt. RO, die mit demselben Symbol dargestellt wurden, wurden parallel analysiert. Messwerte inklusive Median. Maßstäbe: (A) 150 μm . n = 8, 7, 10, 9 (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2). 56

Abbildung 15: Quantifizierung der Photorezeptorzellen an Tag 180. (A) Immunzytochemische Färbung der Kryoschnitte mit NR2E3 und CRX sowie Verbundaufnahme beider Färbungen mit DAPI. (B) Immunzytochemische Färbung der Kryoschnitte mit RHO und RCVRN sowie Verbundaufnahme beider Färbungen mit DAPI. (C) Quotient aus der CRX⁺ und der DAPI⁺-Fläche. Für alle Genotypen konnten vergleichbare Werte erhoben werden (Medianwerte KO #1 57,85 %, WT #1 62,78 %, KO #2 51,98 %, WT #2 61,91 %). (D) Quotient aus der NR2E3⁺ und der DAPI⁺-Fläche. Für alle Genotypen konnten vergleichbare Werte erhoben werden (Medianwerte KO #1 30,65 %, WT #1 25,41 %, KO #2 14,76 %, WT #2 24,36 %). (E) Quotient aus der NR2E3⁺ und der CRX⁺-Fläche. Die Quantifizierung ergab für alle Genotypen vergleichbare Werte (Medianwerte KO #1 43,36 %, WT #1 40,15 %, KO #2 46,64 %, WT #2 36,98 %) (F) Quotient aus der RHO⁺ und der RCVRN⁺-Fläche. Die Quantifizierung ergab für alle Genotypen vergleichbare Werte (Medianwerte KO #1 15,42 %, WT #1 12,43 %, KO #2 8,25 %, WT #2 10,12 %). Ein RO wurde je nach Ausdifferenzierungsbeginn entweder mit einem Kreis oder mit einem Dreieck dargestellt. RO, die mit demselben Symbol dargestellt wurden, wurden parallel analysiert. Messwerte inklusive Median. Maßstäbe: (A) 50 μm (B) 50 μm . (C-E) n = 9, 9, 10, 10 (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2) (F) n = 10, 10, 10, 10 (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2). 57

Abbildung 16: Quantifizierung des RHO und RCVRN Transports in den Bereich der IS und OS an Tag 180. (A) Immunzytochemische Färbung der Kryoschnitte mit RCVRN und RHO. Nahaufnahmen der ONL samt IS und OS wurden angefertigt und die Intensität an (B) RCVRN bzw. (C) RHO in den IS und OS relativ zur Gesamtintensität an RCVRN bzw. RHO in der ONL wurde quantifiziert. Die Prozentsätze an den jeweiligen transportierten Markern waren für alle Genotypen vergleichbar (RCVRN: Medianwerte KO #1 58,16 %, WT #1 57,06 %, KO #2 55,47 %, WT #2 55,07 %; RHO: Medianwerte KO #1 53,39 %, WT #1 56,35 %, KO #2 52,57 %, WT #2 54,87 %). Ein RO wurde je nach Ausdifferenzierungsbeginn entweder mit einem Kreis oder mit einem Dreieck dargestellt. RO, die mit demselben Symbol dargestellt wurden, wurden parallel analysiert. Messwerte inklusive Median Maßstäbe: (A) 10 μm . n = 10, 10, 9, 8 (KO #1, WT #1, KO #2, WT #2). 60

7.5 Bilderrecht

Mehrere Bilder, die in der Einleitung sowie im Methodenteil dieser Arbeit gezeigt sind, wurden von Dritten übernommen und gegebenenfalls modifiziert. Das Recht zur Nutzung und Modifizierung dieser Bilder wurde mir vom jeweiligen Urheber gewährt. Die Bilder wurden entsprechend in der Bilderlegende gekennzeichnet und das Bilderrecht wurde wie folgt gewährt:

Ich gewähre hiermit Anne-Sophie Pieger das Recht zur Nutzung und Modifizierung folgender Bilder in ihrer Dissertation:

- Abbildung 1: Aufbau der humanen Retina
- Abbildung 2: Struktur der Stäbchen und Zapfen.
- Abbildung 3: Entwicklung der humanen Retina
- Abbildung 4: Retinale Abfolge der Zelldifferenzierung
- Abbildung 5: RO
- Abbildung 6: Darstellung der mikroskopischen und makroskopischen Auswirkungen von RP
- Abbildung 7: *RPI*
- Abbildung 8: *RPI*-Gen mit Gensequenz des *RPI*-Gens aus KO #1 und KO #2 nach Sanger-Sequenzierung



Regensburg, 17.06.22

Dr.med Patricia Berber

7.6 Selbstständigkeitserklärung

Eidesstattliche Erklärung zur Prüfungsleistung

Hiermit versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen benützt habe. Die Stellen, die anderen Werken (gilt ebenso für Werke aus elektronischen Datenbanken oder aus dem Internet) wörtlich oder sinngemäß entnommen sind, habe ich unter Angabe der Quelle und Einhaltung der Regeln wissenschaftlichen Zitierens kenntlich gemacht. Diese Versicherung umfasst auch in der Arbeit verwendete bildliche Darstellungen, Tabellen, Kartenskizzen und gelieferte Zeichnungen. Mir ist bewusst, dass Täuschungen nach der für mich gültigen Studien- und Prüfungsordnung geahndet werden.

Regensburg, den 26.08.2025

Ort, Datum

Afeger

Unterschrift des Verfassers/der Verfasserin

8 Literaturverzeichnis

1. Montaigne M de. Essais. 1595.
2. Osterberg G. Topography of the Layer of Rods and Cones in the Human Retina. J Am Med Assoc [Internet]. 1937 Jan 16;108(3):232. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1937.02780030070033>
3. Jonas JB, Schneider U, Naumann GOH. Count and density of human retinal photoreceptors. Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol [Internet]. 1992 Oct;230(6):505–10. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00181769>
4. Khanna H. Photoreceptor sensory cilium: Traversing the ciliary gate. Cells [Internet]. 2015 Oct 15;4(4):674–86. Available from: <http://www.mdpi.com/2073-4409/4/4/674>
5. Young RW. Passage of newly formed protein through the connecting cilium of retinal rods in the frog. J Ultrastructure Res [Internet]. 1968 Jun;23(5–6):462–73. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002253206880111X>
6. Hsu SC, Molday RS. Glucose metabolism in photoreceptor outer segments: Its role in phototransduction and in NADPH-requiring reactions. J Biol Chem [Internet]. 1994 Jul 8;269(27):17954–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32402-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32402-X)
7. Dartnall HJA. The interpretation of spectral sensitivity curves. Br Med Bull [Internet]. 1953;9(1):24–30. Available from: <https://academic.oup.com/bmb/article-lookup/doi/10.1093/oxfordjournals.bmb.a074302>
8. Nathans J, Thomas D, Hogness DS. Molecular genetics of human color vision: The genes encoding blue, green, and red pigments. Science (80-) [Internet]. 1986 Apr 11;232(4747):196–202. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.2937147>
9. Hussey KA, Hadyniak SE, Johnston RJ. Patterning and Development of Photoreceptors in the Human Retina. Front Cell Dev Biol [Internet]. 2022 Apr 14;10(April):1–21. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.878350/full>
10. Li HS, Tierney C, Wen L, Wu JY, Rao Y. A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. Development [Internet]. 1997 Feb 1;124(3):603–15. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/124/3/603/39697/A-single-morphogenetic->

field-gives-rise-to-two

11. Quinn PMJ, Wijnholds J. Retinogenesis of the human fetal retina: An apical polarity perspective. *Genes (Basel)* [Internet]. 2019 Nov 29;10(12):987. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4425/10/12/987>
12. Kenyon KL, Zaghoul N, Moody SA. Transcription factors of the anterior neural plate alter cell movements of epidermal progenitors to specify a retinal fate. *Dev Biol* [Internet]. 2001 Dec 1 [cited 2022 May 12];240(1):77–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160601904646>
13. Zuber ME, Gestri G, Viczian AS, Barsacchi G, Harris WA. Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* [Internet]. 2003 Nov 1 [cited 2022 May 12];130(21):5155–67. Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/130/21/5155/52150/Specification-of-the-vertebrate-eye-by-a-network>
14. O’Rahilly R. The prenatal development of the human eye. *Exp Eye Res* [Internet]. 1975 Aug 8;21(2):93–112. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0014483575900755>
15. Young RW. Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* [Internet]. 1985 Jun 1;212(2):199–205. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ar.1092120215>
16. Carter-Dawson LD, Lavail MM. Rods and cones in the mouse retina. II. Autoradiographic analysis of cell generation using tritiated thymidine. *J Comp Neurol* [Internet]. 1979 Nov 15;188(2):263–72. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.901880205>
17. Sidman RL, Smelser GK. Histogenesis of the mouse retina studied with thymidine 3-H. Vol. New York, The structure of the eye. 1961. 487–506 p.
18. Amini R, Rocha-Martins M, Norden C. Neuronal migration and lamination in the vertebrate retina. *Front Neurosci* [Internet]. 2018 Jan 9;11(JAN):742. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2017.00742/full>
19. Hendrickson AE, Yuodelis C. The Morphological Development of the Human Fovea. *Ophthalmology* [Internet]. 1984 Jun;91(6):603–12. Available from:

[http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420\(84\)34247-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0161-6420(84)34247-6)

20. Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* (80-) [Internet]. 2014 Jul 18;345(6194):1247125. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1247125>
21. Cowan CS, Renner M, De Gennaro M, Gross-Scherf B, Goldblum D, Hou Y, et al. Cell Types of the Human Retina and Its Organoids at Single-Cell Resolution. *Cell* [Internet]. 2020 Sep 17 [cited 2022 May 14];182(6):1623-1640.e34. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867420310047>
22. Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, Kawada M, Sakakura E, Okuda S, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* [Internet]. 2011 Apr 7;472(7341):51–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09941>
23. Nakano T, Ando S, Takata N, Kawada M, Muguruma K, Sekiguchi K, et al. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2012 Jun 14 [cited 2022 May 14];10(6):771–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590912002421>
24. Kruczek K, Swaroop A. Pluripotent stem cell-derived retinal organoids for disease modeling and development of therapies. *Stem Cells* [Internet]. 2020 Oct 1;38(10):1206–15. Available from: <https://academic.oup.com/stemcells/article/38/10/1206/6409281>
25. Eiraku M, Watanabe K, Matsuo-Takasaki M, Kawada M, Yonemura S, Matsumura M, et al. Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2008 Nov 6 [cited 2022 May 14];3(5):519–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1934590908004554>
26. Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A, Katayama T, Nozaki S, Kawasaki H, et al. Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells. *Nat Neurosci* [Internet]. 2005 Mar 6 [cited 2021 Nov 29];8(3):288–96. Available from: <http://www.nature.com/articles/nn1402>
27. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2007 Jun 27;25(6):681–6. Available from:

<http://www.nature.com/articles/nbt1310>

28. Meyer JS, Shearer RL, Capowski EE, Wright LS, Wallace KA, McMillan EL, et al. Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 Sep 29 [cited 2022 May 14];106(39):16698–703. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0905245106>
29. Berber P, Milenkovic A, Michaelis L, Weber BHF. Retinal organoid differentiation methods determine organoid cellular composition. *J Transl Genet Genomics* [Internet]. 2021;5(3):292–303. Available from: <http://dx.doi.org/10.20517/jtgg.2021.35>
30. Wahlin KJ, Maruotti JA, Sripathi SR, Ball J, Angueyra JM, Kim C, et al. Photoreceptor Outer Segment-like Structures in Long-Term 3D Retinas from Human Pluripotent Stem Cells. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Apr 10;7(1):766. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-00774-9>
31. Li G, Xie B, He L, Zhou T, Gao G, Liu S, et al. Generation of retinal organoids with mature rods and cones from urine-derived human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Int* [Internet]. 2018 Jun 13;2018:1–12. Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/4968658>
32. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* [Internet]. 2006 Aug 25 [cited 2022 May 17];126(4):663–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867406009767>
33. Gatinois V, Desprat R, Becker F, Pichard L, Bernex F, Corsini C, et al. Reprogramming of Human Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) from a patient suffering of a Werner syndrome resulting in iPSC line (REGUi003-A) maintaining a short telomere length. *Stem Cell Res* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2022 May 21];39:101515. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S187350611930145X>
34. Zhou T, Benda C, Dunzinger S, Huang Y, Ho JC, Yang J, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nat Protoc* [Internet]. 2012 Dec 8;7(12):2080–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/nprot.2012.115>
35. Zhong X, Gutierrez C, Xue T, Hampton C, Vergara MN, Cao LH, et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat*

- Commun [Internet]. 2014 Jun 10;5(1):4047. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms5047>
36. Capowski EE, Samimi K, Mayerl SJ, Phillips MJ, Pinilla I, Howden SE, et al. Reproducibility and staging of 3D human retinal organoids across multiple pluripotent stem cell lines. *Dev* [Internet]. 2019 Jan 9 [cited 2021 Nov 11];146(1). Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/doi/10.1242/dev.171686/264861/Reproducibility-and-staging-of-3D-human-retinal>
 37. Mesch L, Pashkovskaia N, Cora V, Pars S, Corti S, Cipriano M, et al. Aged human iPSC-RPE organoid cultures display hallmarks of drusen formation. *bioRxiv* [Internet]. 2021;2021.10.12.463899. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.10.12.463899v1.full>
 38. Saha A, Capowski E, Fernandez Zepeda MA, Nelson EC, Gamm DM, Sinha R. Cone photoreceptors in human stem cell-derived retinal organoids demonstrate intrinsic light responses that mimic those of primate fovea. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2022 Mar 3 [cited 2025 Aug 17];29(3):460-471.e3. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9093561/>
 39. Cheng L, Kuehn MH. Human Retinal Organoids in Therapeutic Discovery: A Review of Applications. *Handb Exp Pharmacol* [Internet]. 2023;281(January):157–87. Available from: https://link.springer.com/10.1007/164_2023_691
 40. Ito S ichiro, Onishi A, Takahashi M. Chemically-induced photoreceptor degeneration and protection in mouse iPSC-derived three-dimensional retinal organoids. *Stem Cell Res* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited 2022 May 14];24:94–101. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1873506117301812>
 41. He XY, Zhao CJ, Xu H, Chen K, Bian BSJ, Gong Y, et al. Synaptic repair and vision restoration in advanced degenerating eyes by transplantation of retinal progenitor cells. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2021 Jul 18 [cited 2022 May 14];16(7):1805–17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213671121003088>
 42. Hiram Y, Mandai M, Sugita S, Maeda A, Maeda T, Yamamoto M, et al. Safety and stable survival of stem-cell-derived retinal organoid for 2 years in patients with retinitis pigmentosa. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2023 Dec 7 [cited 2025 Aug 16];30(12):1585-1596.e6. Available from:

<https://www.cell.com/action/showFullText?pii=S193459092300396X>

43. Kruczek K, Qu Z, Gentry J, Fadl BR, Gieser L, Hirianna S, et al. Gene Therapy of Dominant CRX-Leber Congenital Amaurosis using Patient Stem Cell-Derived Retinal Organoids. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2021 Feb 9 [cited 2022 May 15];16(2):252–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213671120305130>
44. Deng X, Iwagawa T, Fukushima M, Watanabe S. Characterization of human-induced pluripotent stem cells carrying homozygous RB1 gene deletion. *Genes to Cells* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2023 Mar 5];25(7):510–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/gtc.12771>
45. Zhang X, Wang W, Jin ZB. Retinal organoids as models for development and diseases. *Cell Regen* [Internet]. 2021 Nov 1;10(1):33. Available from: <https://cellregeneration.springeropen.com/articles/10.1186/s13619-021-00097-1>
46. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Dusko Ehrlich S. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* [Internet]. 2005 Aug 1 [cited 2023 Mar 7];151(8):2551–61. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.28048-0>
47. Jansen R, Van Embden JDA, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* [Internet]. 2002 Mar;43(6):1565–75. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
48. Xu Y, Li Z. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2023 Mar 5];18:2401–15. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2001037020303846>
49. Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* (80-) [Internet]. 2013 Feb 15;339(6121):823–6. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1232033>
50. Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys* [Internet]. 2017 May 22 [cited 2023 Mar 7];46(1):505–29. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>

51. Le Rhun A, Escalera-Maurer A, Bratovič M, Charpentier E. CRISPR-Cas in *Streptococcus pyogenes*. *RNA Biol* [Internet]. 2019 Apr 3 [cited 2023 Mar 7];16(4):380–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1582974>
52. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Sep 25 [cited 2023 Mar 7];109(39). Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1208507109
53. Heidenreich E, Novotny R, Kneidinger B, Holzmann V, Wintersberger U. Non-homologous end joining as an important mutagenic process in cell cycle-arrested cells. *EMBO J* [Internet]. 2003 May 1;22(9):2274–83. Available from: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/cdg203>
54. Chen F, Pruett-Miller SM, Huang Y, Gjoka M, Duda K, Taunton J, et al. High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. *Nat Methods* [Internet]. 2011 Jul 17;8(9):753–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nmeth.1653>
55. Lee YJ, Jo DH. Retinal Organoids from Induced Pluripotent Stem Cells of Patients with Inherited Retinal Diseases: A Systematic Review. *Stem Cell Rev Reports* [Internet]. 2025 Jan 18 [cited 2025 Aug 13];21(1):167–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39422807/>
56. Huang KC, Wang ML, Chen SJ, Kuo JC, Wang WJ, Nhi Nguyen PN, et al. Morphological and Molecular Defects in Human Three-Dimensional Retinal Organoid Model of X-Linked Juvenile Retinoschisis. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2019 Nov 12 [cited 2021 Nov 11];13(5):906–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221367111930339X>
57. Liu H, Zhang Y, Zhang YY, Li YP, Hua ZQ, Zhang CJ, et al. Human embryonic stem cell-derived organoid retinoblastoma reveals a cancerous origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2020 Dec 29;117(52):33628–38. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2011780117>
58. F D. Pigmentbildung in der Netzhaut. In: *Beiträge zur pathologischen Anatomie des Auges*. 1857. p. 139–65.
59. GRøNDAHL J. Estimation of prognosis and prevalence of retinitis pigmentosa and

- Usher syndrome in Norway. *Clin Genet* [Internet]. 1987 Apr 28;31(4):255–64. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-0004.1987.tb02804.x>
60. Haim M. The epidemiology of retinitis pigmentosa in Denmark. *Acta Ophthalmol Scand Suppl* [Internet]. 2002 Feb;80(233):1–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1395-3907.2002.00001.x>
 61. Galan A, Chizzolini M, Milan E, Sebastiani A, Costagliola C, Parmeggiani F. Good Epidemiologic Practice in Retinitis Pigmentosa: From Phenotyping to Biobanking. *Curr Genomics* [Internet]. 2011 Jun 1;12(4):260–6. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2029&volume=12&issue=4&spage=260>
 62. VERHOEFF FH. Microscopic Observations in a Case of Retinitis Pigmentosa. *Arch Ophthalmol* [Internet]. 1931 Mar 1;5(3):392–407. Available from: <http://archophth.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=608981>
 63. Hamel C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis* [Internet]. 2006 Oct 11 [cited 2022 May 30];1(1):40. Available from: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-1-40>
 64. Fahim A. Retinitis pigmentosa: Recent advances and future directions in diagnosis and management. *Curr Opin Pediatr* [Internet]. 2018 Dec [cited 2021 Nov 11];30(6):725–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30234647/>
 65. Massof RW, Finkelstein D, Starr SJ, Kenyon KR, Fleischman JA, Maumenee IH. Bilateral symmetry of vision disorders in typical retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 1979 Feb 1 [cited 2023 Mar 8];63(2):90–6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1043404/>
 66. Jauregui R, Chan L, Oh JK, Cho A, Sparrow JR, Tsang SH. Disease asymmetry and hyperautofluorescent ring shape in retinitis pigmentosa patients. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Feb 25;10(1):3364. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-60137-9>
 67. Ran X, Cai WJ, Huang XF, Liu Q, Lu F, Qu J, et al. “RetinoGenetics”: A comprehensive mutation database for genes related to inherited retinal degeneration. *Database* [Internet]. 2014 Jun 17;2014:bau047–bau047. Available from: <https://academic.oup.com/database/article-lookup/doi/10.1093/database/bau047>

68. Nguyen XTA, Moekotte L, Plomp AS, Bergen AA, van Genderen MM, Boon CJF. Retinitis Pigmentosa: Current Clinical Management and Emerging Therapies. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Apr 19 [cited 2025 Aug 13];24(8):7481. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/8/7481>
69. Mansergh FC, Millington-Ward S, Kennan A, Kiang AS, Humphries M, Farrar GJ, et al. Retinitis pigmentosa and progressive sensorineural hearing loss caused by a C12258A mutation in the mitochondrial MTTS2 gene. *Am J Hum Genet* [Internet]. 1999 [cited 2023 Aug 1];64(4):971–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10090882/>
70. Cross N, van Steen C, Zegaoui Y, Satherley A, Angelillo L. Current and Future Treatment of Retinitis Pigmentosa. *Clin Ophthalmol* [Internet]. 2022 Aug 29;16(3):2909–21. Available from: <https://www.dovepress.com/current-and-future-treatment-of-retinitis-pigmentosa-peer-reviewed-fulltext-article-OPHTH>
71. Russell S, Bennett J, Wellman JA, Chung DC, Yu ZF, Tillman A, et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* [Internet]. 2017 Aug 26;390(10097):849–60. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31868-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31868-8)
72. Maguire AM, Russell S, Wellman JA, Chung DC, Yu ZF, Tillman A, et al. Efficacy, Safety, and Durability of Voretigene Neparvovec-rzyl in RPE65 Mutation–Associated Inherited Retinal Dystrophy: Results of Phase 1 and 3 Trials. *Ophthalmology* [Internet]. 2019 Sep [cited 2023 Oct 11];126(9):1273–85. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2019.06.017>
73. Maguire AM, Russell S, Chung DC, Yu ZF, Tillman A, Drack A V., et al. Durability of Voretigene Neparvovec for Biallelic RPE65-Mediated Inherited Retinal Disease: Phase 3 Results at 3 and 4 Years. *Ophthalmology* [Internet]. 2021 Oct [cited 2023 Oct 11];128(10):1460–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2021.03.031>
74. Cehajic-Kapetanovic J, Xue K, Martinez-Fernandez de la Camara C, Nanda A, Davies A, Wood LJ, et al. Initial results from a first-in-human gene therapy trial on X-linked retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR. *Nat Med* [Internet]. 2020 Mar 24;26(3):354–9. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0763-1>

75. Pawar YB, Thool AR. Navigating the Genetic Landscape: A Comprehensive Review of Novel Therapeutic Strategies for Retinitis Pigmentosa Management. *Cureus* [Internet]. 2024 Aug 16 [cited 2025 Aug 16];16(8):e67046. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11405069/>
76. McClements ME, Elsayed MEAA, Major L, de la Camara CMF, MacLaren RE. Gene Therapies in Clinical Development to Treat Retinal Disorders. *Mol Diagnosis Ther* [Internet]. 2024 Sep 2 [cited 2025 Aug 16];28(5):575–91. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11349810/>
77. Lane A, Jovanovic K, Shortall C, Ottaviani D, Panes AB, Schwarz N, et al. Modeling and Rescue of RP2 Retinitis Pigmentosa Using iPSC-Derived Retinal Organoids. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2020 Jul 14;15(1):67–79. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221367112030179X>
78. Deng WL, Gao ML, Lei XL, Lv JN, Zhao H, He KW, et al. Gene Correction Reverses Ciliopathy and Photoreceptor Loss in iPSC-Derived Retinal Organoids from Retinitis Pigmentosa Patients. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2018 Apr 10 [cited 2021 Nov 11];10(4):1267–81. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213671118300948>
79. Pierce EA, Quinn T, Meehan T, McGee TL, Berson EL, Dryja TP. Mutations in a gene encoding a new oxygen-regulated photoreceptor protein cause dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet* [Internet]. 1999 Jul;22(3):248–54. Available from: https://www.nature.com/articles/ng0799_248
80. Blanton SH, Heckenlively JR, Cottingham AW, Friedman J, Sadler LA, Wagner M, et al. Linkage mapping of autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP1) to the pericentric region of human chromosome 8. *Genomics* [Internet]. 1991 Dec;11(4):857–69. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0888754391900083>
81. Liu Q, Zhou J, Daiger SP, Farber DB, Heckenlively JR, Smith JE, et al. Identification and subcellular localization of the RP1 protein in human and mouse photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2002 Jan;43(1):22–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11773008>
82. Liu Q, Zuo J, Pierce EA. The retinitis pigmentosa 1 protein is a photoreceptor microtubule-associated protein. *J Neurosci* [Internet]. 2004 Jul 21;24(29):6427–36.

Available from: <https://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.1335-04.2004>

83. Gao J, Cheon K, Nusinowitz S, Liu Q, Bei D, Atkins K, et al. Progressive photoreceptor degeneration, outer segment dysplasia, and rhodopsin mislocalization in mice with targeted disruption of the retinitis pigmentosa-1 (Rp1) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002 Apr 16 [cited 2021 Nov 11];99(8):5698–703. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11960024/>
84. Liu Q, Lyubarsky A, Skalet JH, Pugh EN, Pierce EA. RP1 is required for the correct stacking of outer segment discs. *Investig Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2003 Oct 1 [cited 2021 Nov 11];44(10):4171–83. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1904498/>
85. Martin-Merida I, Aguilera-Garcia D, Fernandez-San Jose P, Blanco-Kelly F, Zurita O, Almoguera B, et al. Toward the mutational landscape of autosomal dominant retinitis pigmentosa: A comprehensive analysis of 258 Spanish families. *Investig Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2018 May 1;59(6):2345–54. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.18-23854>
86. Van Cauwenbergh C, Coppieters F, Roels D, De Jaegere S, Flipts H, De Zaeytijd J, et al. Mutations in splicing factor genes are a major cause of autosomal dominant retinitis pigmentosa in belgian families. Lewin AS, editor. *PLoS One* [Internet]. 2017 Jan 11;12(1):e0170038. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0170038>
87. Khaliq S, Abid A, Ismail M, Hameed A, Mohyuddin A, Lall P, et al. Novel association of RP1 gene mutations with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *J Med Genet* [Internet]. 2005 May 1;42(5):436–8. Available from: <https://jmg.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jmg.2004.024281>
88. Payne A, Vithana E, Khaliq S, Hameed A, Deller J, Abu-Safieh L, et al. RP1 protein truncating mutations predominate at the RP1 adRP locus. *Investig Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2000 Dec;41(13):4069–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11095597>
89. Siemiatkowska AM, Astuti GDN, Arimadyo K, den Hollander AI, Faradz SMH, Cremers FPM, et al. Identification of a novel nonsense mutation in RP1 that causes autosomal recessive retinitis pigmentosa in an Indonesian family. *Mol Vis* [Internet].

- 2012;18:2411–9. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3472925/>
90. Silva RS, Salles MV, Motta FL, Sallum JMF. Retinitis Pigmentosa Due to Rpl Biallelic Variants. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Jan 31;10(1):1603. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-58243-9>
 91. Chen LJ, Lai TYY, Tam POS, Chiang SWY, Zhang X, Lam S, et al. Compound heterozygosity of two novel truncation mutations in RP1 causing autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Investig Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2010 Apr 1;51(4):2236–42. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.09-4437>
 92. Chassine T, Bocquet B, Daien V, Avila-Fernandez A, Ayuso C, Collin RWJ, et al. Autosomal recessive retinitis pigmentosa with RP1 mutations is associated with myopia. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 2015 Oct;99(10):1360–5. Available from: <https://bjo.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bjophthalmol-2014-306224>
 93. Brandl C, Zimmermann SJ, Milenkovic VM, Rosendahl SMG, Grassmann F, Milenkovic A, et al. In-depth characterisation of retinal pigment epithelium (RPE) cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC). *NeuroMolecular Med* [Internet]. 2014 Sep 7;16(3):551–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24801942>
 94. Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep* [Internet]. 2013 Nov 27 [cited 2023 Mar 25];3(1):3355. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep03355>
 95. Cho K in, Haque ME, Wang J, Yu M, Hao Y, Qiu S, et al. Distinct and Atypical Intrinsic and Extrinsic Cell Death Pathways between Photoreceptor Cell Types upon Specific Ablation of Ranbp2 in Cone Photoreceptors. Orr HT, editor. *PLoS Genet* [Internet]. 2013 Jun 20 [cited 2022 Apr 9];9(6):e1003555. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1003555>
 96. Welby E, Lakowski J, Di Foggia V, Budinger D, Gonzalez-Cordero A, Lun ATL, et al. Isolation and Comparative Transcriptome Analysis of Human Fetal and iPSC-Derived Cone Photoreceptor Cells. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2017 Dec 12 [cited 2022 Apr 5];9(6):1898–915. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29153988>
 97. Tobias OJ, Seara R. Image segmentation by histogram thresholding using fuzzy sets.

- IEEE Trans Image Process [Internet]. 2002 Dec;11(12):1457–65. Available from: <http://ieeexplore.ieee.org/document/1176934/>
98. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* [Internet]. 1983 Jan 15;31(1):13–20. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.2910310104>
 99. Wright LS, Pinilla I, Saha J, Clermont JM, Lien JS, Borys KD, et al. VSX2 and ASCL1 Are Indicators of Neurogenic Competence in Human Retinal Progenitor Cultures. Hitchcock PF, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Aug 20;10(8):e0135830. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0135830>
 100. Surgucheva I, Weisman AD, Goldberg JL, Shnyra A, Surguchov A. Gamma-synuclein as a marker of retinal ganglion cells. *Mol Vis* [Internet]. 2008 Aug 22;14:1540–8. Available from: <http://www.molvis.org/molvis/v14/a184>
 101. Bassett EA, Pontoriero GF, Feng W, Marquardt T, Fini ME, Williams T, et al. Conditional Deletion of Activating Protein 2 α (AP-2 α) in the Developing Retina Demonstrates Non-Cell-Autonomous Roles for AP-2 α in Optic Cup Development. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2007 Nov;27(21):7497–510. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MCB.00687-07>
 102. Bunt Milam AH, Saari JC. Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina. *J Cell Biol* [Internet]. 1983 Sep 1 [cited 2022 Apr 27];97(3):703–12. Available from: <https://rupress.org/jcb/article/97/3/703/56696/Immunocytochemical-localization-of-two>
 103. Sridhar A, Hoshino A, Finkbeiner CR, Chitsazan A, Dai L, Haugan AK, et al. Single-Cell Transcriptomic Comparison of Human Fetal Retina, hPSC-Derived Retinal Organoids, and Long-Term Retinal Cultures. *Cell Rep* [Internet]. 2020 Feb 4 [cited 2022 Nov 28];30(5):1644–1659.e4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124720300164>
 104. Ning R, Zheng D, Xie B, Gao G, Xu J, Xu P, et al. Spatial and Temporal Development of Müller Glial Cells in hiPSC-Derived Retinal Organoids Facilitates the Cell Enrichment and Transcriptome Analysis. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2022 May

- 19;16(May):1–15. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2022.820396/full>
105. Cheng H, Khanna H, Oh ECT, Hicks D, Mitton KP, Swaroop A. Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2004 Aug 1;13(15):1563–75. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article/13/15/1563/581552>
 106. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* [Internet]. 1992 Nov 1 [cited 2022 Nov 29];119(3):493–501. Available from: <https://rupress.org/jcb/article/119/3/493/14516/Identification-of-programmed-cell-death-in-situ>
 107. Dizhoor AM, Ray S, Kumar S, Niemi G, Spencer M, Brolley D, et al. Recoverin: a Calcium Sensitive Activator of Retinal Rod Guanylate Cyclase. *Science* (80-) [Internet]. 1991 Feb 22;251(4996):915–8. Available from: <https://www.jstor.org/stable/2874900>
 108. Jan LY, Revel JP. Ultrastructural localization of rhodopsin in the vertebrate retina. *J Cell Biol* [Internet]. 1974 Aug 1 [cited 2023 Feb 28];62(2):257–73. Available from: <https://rupress.org/jcb/article/62/2/257/1980/ULTRASTRUCTURAL-LOCALIZATION-OF-RHODOPSIN-IN-THE>
 109. Verbakel SK, Van Huet RAC, Den Hollander AI, Geerlings MJ, Kersten E, Klevering BJ, et al. Macular dystrophy and cone-rod dystrophy caused by mutations in the RP1 gene: Extending the RP1 disease spectrum. *Investig Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2019 Mar 1;60(4):1192–203. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.18-26084>
 110. Connolly E, Rhatigan M, O’Halloran AM, Muldrew KA, Chakravarthy U, Cahill M, et al. Prevalence of age-related macular degeneration associated genetic risk factors and 4-year progression data in the Irish population. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 2018 Dec;102(12):1691–5. Available from: <https://bjo.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bjophthalmol-2017-311673>
 111. Chen Y, Bedell M, Zhang K. Age-related macular degeneration: Genetic and environmental factors of disease. *Mol Interv* [Internet]. 2010 Oct 1;10(5):271–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21045241>

112. Ehrlich R, Harris A, Kheradiya NS, Winston DM, Ciulla TA, Wirostko B. Age-related macular degeneration and the aging eye. *Clin Interv Aging* [Internet]. 2008 Sep [cited 2023 Apr 28];3(3):473–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18982917>
113. Quinn PM, Buck TM, Mulder AA, Ohonin C, Alves CH, Vos RM, et al. Human iPSC-Derived Retinas Recapitulate the Fetal CRB1 CRB2 Complex Formation and Demonstrate that Photoreceptors and Müller Glia Are Targets of AAV5. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2019 May 14 [cited 2022 Jun 18];12(5):906–19. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213671119300876>
114. Gao ML, Lei XL, Han F, He KW, Jin SQ, Zhang YY, et al. Patient-Specific Retinal Organoids Recapitulate Disease Features of Late-Onset Retinitis Pigmentosa. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2020 Mar 6 [cited 2023 Mar 15];8:128. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2020.00128/full>
115. Phipson B, Er PX, Combes AN, Forbes TA, Howden SE, Zappia L, et al. Evaluation of variability in human kidney organoids. *Nat Methods* [Internet]. 2019 Jan 20;16(1):79–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41592-018-0253-2>
116. Quadrato G, Nguyen T, Macosko EZ, Sherwood JL, Yang SM, Berger DR, et al. Cell diversity and network dynamics in photosensitive human brain organoids. *Nature* [Internet]. 2017 May 4;545(7652):48–53. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature22047>
117. Hallam D, Hilgen G, Dorgau B, Zhu L, Yu M, Bojic S, et al. Human-Induced Pluripotent Stem Cells Generate Light Responsive Retinal Organoids with Variable and Nutrient-Dependent Efficiency. *Stem Cells* [Internet]. 2018 Oct 1;36(10):1535–51. Available from: <https://academic.oup.com/stmcls/article/36/10/1535/6423915>
118. Hofer M, Lutolf MP. Engineering organoids. *Nat Rev Mater* [Internet]. 2021 Feb 19;6(5):402–20. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41578-021-00279-y>
119. Velasco S, Kedaigle AJ, Simmons SK, Nash A, Rocha M, Quadrato G, et al. Individual brain organoids reproducibly form cell diversity of the human cerebral cortex. *Nature* [Internet]. 2019 Jun 5;570(7762):523–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41586-019-1289-x>
120. Kamarudin TA, Bojic S, Collin J, Yu M, Alharthi S, Buck H, et al. Differences in the

- Activity of Endogenous Bone Morphogenetic Protein Signaling Impact on the Ability of Induced Pluripotent Stem Cells to Differentiate to Corneal Epithelial-Like Cells. *Stem Cells* [Internet]. 2018 Mar 1;36(3):337–48. Available from: <https://academic.oup.com/stemcells/article/36/3/337/6453107>
121. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* [Internet]. 2013 Nov 24 [cited 2023 Mar 12];8(11):2281–308. Available from: <http://www.nature.com/articles/nprot.2013.143>
 122. Wang Y, Liang P, Lan F, Wu H, Lisowski L, Gu M, et al. Genome editing of isogenic human induced pluripotent stem cells recapitulates long QT phenotype for drug testing. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2014 Aug 5 [cited 2023 Mar 12];64(5):451–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.04.057>
 123. Li XF, Zhou YW, Cai PF, Fu WC, Wang JH, Chen JY, et al. CRISPR/Cas9 facilitates genomic editing for large-scale functional studies in pluripotent stem cell cultures. *Hum Genet* [Internet]. 2019 Dec 12;138(11–12):1217–25. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00439-019-02071-z>
 124. Hernandez J, Matter-Sadzinski L, Skowronska-Krawczyk D, Chiodini F, Alliod C, Ballivet M, et al. Highly conserved sequences mediate the dynamic interplay of basic helix-loop-helix proteins regulating retinogenesis. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Dec 28 [cited 2023 May 16];282(52):37894–905. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925820777446>
 125. Zagozewski JL, Zhang Q, Eisenstat DD. Genetic regulation of vertebrate eye development. *Clin Genet* [Internet]. 2014 Nov;86(5):453–60. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cge.12493>
 126. Bekerman I, Gottlieb P, Vaiman M. Variations in Eyeball Diameters of the Healthy Adults. *J Ophthalmol* [Internet]. 2014;2014:1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/503645>
 127. Singh RK, Nasonkin IO. Limitations and Promise of Retinal Tissue From Human Pluripotent Stem Cells for Developing Therapies of Blindness. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2020 Sep 10;14:179. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2020.00179/full>
 128. Rao S, Chun C, Fan J, Kofron JM, Yang MB, Hegde RS, et al. A direct and melanopsin-

- dependent fetal light response regulates mouse eye development. *Nature* [Internet]. 2013 Feb 14;494(7436):243–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11823>
129. Karam FC, Loi TH, Ma A, Nash BM, Grigg JR, Parekh D, et al. Human iPSC-Derived Retinal Organoids and Retinal Pigment Epithelium for Novel Intronic RPGR Variant Assessment for Therapy Suitability. *J Pers Med* [Internet]. 2022 Mar 21;12(3):502. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-4426/12/3/502>
 130. Gonzalez-Cordero A, West EL, Pearson RA, Duran Y, Carvalho LS, Chu CJ, et al. Photoreceptor precursors derived from three-dimensional embryonic stem cell cultures integrate and mature within adult degenerate retina. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2013 Aug 21;31(8):741–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2643>
 131. SJOSTRAND FS. The ultrastructure of the outer segments of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscope. *J Cell Comp Physiol* [Internet]. 1953 Aug;42(1):15–44. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.1030420103>
 132. Ovando-Roche P, West EL, Branch MJ, Sampson RD, Fernando M, Munro P, et al. Use of bioreactors for culturing human retinal organoids improves photoreceptor yields. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2018 Jun 13;9(1):156. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0907-0>
 133. Gonzalez-Cordero A, Kruczek K, Naeem A, Fernando M, Kloc M, Ribeiro J, et al. Recapitulation of Human Retinal Development from Human Pluripotent Stem Cells Generates Transplantable Populations of Cone Photoreceptors. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2017 Sep 12 [cited 2022 Jul 5];9(3):820–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213671117303326>
 134. Lukovic D, Artero Castro A, Kaya KD, Munezero D, Gieser L, Davó-Martínez C, et al. Retinal Organoids derived from hiPSCs of an AIPL1-LCA Patient Maintain Cytoarchitecture despite Reduced levels of Mutant AIPL1. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Mar 25 [cited 2022 Jul 5];10(1):5426. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-62047-2>
 135. Burnside B, Laties AM. Actin filaments in apical projections of the primate pigmented epithelial cell. *Invest Ophthalmol* [Internet]. 1976 Jul [cited 2023 Mar 13];15(7):570–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/819393/>

136. Berber P, Bondarenko S, Michaelis L, Weber BHF. Transient Retention of Photoreceptor Outer Segments in Matrigel-Embedded Retinal Organoids. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2022 Nov 28 [cited 2023 Mar 13];23(23):14893. Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms232314893>
137. West EL, Majumder P, Naeem A, Fernando M, O'Hara-Wright M, Lanning E, et al. Antioxidant and lipid supplementation improve the development of photoreceptor outer segments in pluripotent stem cell-derived retinal organoids. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2022 Apr 12;17(4):775–88. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2022.02.019>
138. Achberger K, Probst C, Haderspeck JC, Bolz S, Rogal J, Chuchuy J, et al. Merging organoid and organ-on-a-chip technology to generate complex multi-layer tissue models in a human retina-on-a-chip platform. *Elife* [Internet]. 2019 Aug 27;8:1–26. Available from: <https://elifesciences.org/articles/46188>
139. Hollyfield JG, Rayborn ME, Tammi M, Tammi R. Hyaluronan in the interphotoreceptor matrix of the eye: Species differences in content, distribution, ligand binding and degradation. *Exp Eye Res* [Internet]. 1998 Feb;66(2):241–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001448359790422X>
140. Kawai K, Ho MT, Ueno Y, Abdo D, Xue C, Nonaka H, et al. Hyaluronan improves photoreceptor differentiation and maturation in human retinal organoids. *Acta Biomater* [Internet]. 2024 Jun 1 [cited 2025 Aug 13];181:117–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38705224/>
141. Hong DH, Pawlyk BS, Shang J, Sandberg MA, Berson EL, Li T. A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2000 Mar 28;97(7):3649–54. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.97.7.3649>
142. Hong DH, Pawlyk B, Sokolov M, Strissel KJ, Yang J, Tulloch B, et al. RPGR isoforms in photoreceptor connecting cilia and the transitional zone of motile cilia. *Investig Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2003 Jun 1;44(6):2413–21. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.02-1206>
143. Fernando M, Lee S, Wark JR, Xiao D, Lim BY, O'Hara-Wright M, et al. Differentiation of brain and retinal organoids from confluent cultures of pluripotent stem cells connected

- by nerve-like axonal projections of optic origin. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2022 Jun 14 [cited 2025 Aug 19];17(6):1476–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35523177/>
144. Kegeles E, Naumov A, Karpulevich EA, Volchkov P, Baranov P. Convolutional Neural Networks Can Predict Retinal Differentiation in Retinal Organoids. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2020 Jul 3;14(July):1–11. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncel.2020.00171/full>
 145. Berber P. Retinal Organoid Differentiation, Characterization, and Adaptation as a Model for Retinitis Pigmentosa [Internet]. 2022. Available from: <https://epub.uni-regensburg.de/53143>
 146. Li X, Zhang L, Tang F, Wei X. Retinal Organoids: Cultivation, Differentiation, and Transplantation. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2021 Jun 28 [cited 2023 Mar 15];15:243. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fncel.2021.638439/full>
 147. O'Hara-Wright M, Gonzalez-Cordero A. Retinal organoids: A window into human retinal development. *Dev* [Internet]. 2020 Dec 24 [cited 2021 Nov 11];147(24). Available from: <https://journals.biologists.com/dev/article/147/24/dev189746/226019/Retinal-organoids-a-window-into-human-retinal>
 148. Li L, Khan N, Hurd T, Ghosh AK, Cheng C, Molday R, et al. Ablation of the X-linked retinitis pigmentosa 2 (Rp2) gene in mice results in opsin mislocalization and photoreceptor degeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2013 Jul 2;54(7):4503–11. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.13-12140>
 149. Völkner M, Zschätzsch M, Rostovskaya M, Overall RW, Busskamp V, Anastassiadis K, et al. Retinal Organoids from Pluripotent Stem Cells Efficiently Recapitulate Retinogenesis. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2016 Apr 12;6(4):525–38. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213671116000825>
 150. Zhang XH, Jin ZB. Patient ipsc-derived retinal organoids: Observable retinal diseases in-a-dish. *Histol Histopathol* [Internet]. 2021;36(7):705–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33491763/>