

Aus dem Department für Anatomie Tübingen
Institut für Klinische Anatomie und Zellanalytik

**Verbesserung der Photorezeptorsegmententwicklung in
humanen Retinaorganoiden durch Überexpression
des Mikro-RNA Clusters 183/96/182**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Hawlik, Rainer Christian

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. D. Fischer

Tag der Disputation: 22.09.2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis..... I

Tabellenverzeichnis IV

Abbildungsverzeichnis V

Abkürzungsverzeichnis VI

1. Einleitung 1

 1.1. Das Auge 1

 1.2. Makroskopie des Auges 1

 1.3. Retina 2

 1.3.1. Photorezeptoren 5

 1.3.2. Phototransduktion 7

 1.4. Frühe Embryonale Entwicklung des Auges 8

 1.5. Stammzellen 10

 1.5.1. Embryonale Stammzellen 10

 1.5.2. Induziert Pluripotente Stammzellen (hiPS-Zellen) 11

 1.5.3. Verwendung der hiPS-Zellen in der Retina Forschung 11

 1.6. Zellentwicklung und Zellsteuerung durch Mikro-RNA 13

 1.7. Das miRNA Cluster 183/96/182 14

 1.7.1. Auswirkung von miRNA Cluster 183/96/182 auf Retina 15

 1.8. Ziel der Studie 16

2. Material und Methoden 17

 2.1. Material 17

 2.1.1. Zellkultur 17

 2.1.2. Software und Internetressourcen 22

 2.1.3. Oligonukleotide 23

 2.1.4. Vektoren 24

 2.1.5. Antikörper 26

 2.1.6. Gebrauchsfertige Reaktionslösungen 28

mirVana™ miRNA Isolation Kit 28

TaqMan Universal Master Mix II 29

 2.1.7. Geräte 29

2.1.8.	Verbrauchsmaterialien	32
2.2.	Methoden	34
2.2.1.	Zellkultur	34
2.2.2.	Retinadifferenzierung.....	37
2.2.3.	Immunofluoreszenz an Kryoschnitten	40
2.2.4.	Immunhistochemische Färbung	41
2.2.5.	Polymerasekettenreaktion und Agarose Gelelektrophorese.....	42
2.2.6.	Restriktionsverdau und Ligation.....	43
2.2.7.	RNA Isolation	46
2.2.8.	miRNA Isolation und Quantifizierung mittels quantitativer Reverse- Transkriptase PCR	47
2.2.9.	Quantitative Reverse Transkriptase PCR.....	48
2.2.10.	Calcium Imaging	49
2.2.11.	Transmissionselektronenmikroskop.....	50
2.2.12.	Statistik	51
3.	Ergebnisse	52
3.1.	Überexpression des RNA Cluster 183/96/182 unter einem konstitutiven CMV Promoter.....	52
3.2.	Transfektion von retinalen Organoiden mit CMV-miRNA-ZsGreen während der Differentiation	55
3.3.	Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf die Photorezeptorentwicklung anhand des Pan-Photorezeptormarkers Recoverin	58
3.4.	Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf die Stäbchenentwicklung	60
3.5.	Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf die Zapfen- Photorezeptorentwicklung anhand des Zapfen-Photorezeptormarkers Arrestin 3	62
3.6.	Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf die Außensegmententwicklung anhand des Filamentproteinmarkers Peripherin	64
3.7.	Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf das Phototransduktions Enzym cGMP Phosphodiesterase PDE6B.....	66
3.8.	Ultrastrukturelle Untersuchung von CMV-miR transfizierten Organoiden	68
3.9.	Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf die innerzelluläre Calciumdynamik und Lichtsensibilität in RO	71
3.10.	Expression des miRNA Clusters 183/96/182 unter dem Photorezeptor-spezifischen Promoters IRBP.....	73

3.11. Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 unter einem IRBP-Promoter auf die Stäbchenentwicklung	76
3.12. Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 unter einem IRBP-Promoter auf die Außensegmententwicklung anhand des Filamentproteinmarkers Peripherin	76
4. Diskussion.....	79
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	79
4.2. Intention für diese Studie	79
4.3. Auswertung der immunocytochemischen Analyse der Überexpression von miRNA183/96/182 in Bezug auf die Retinaentwicklung	80
4.4. Evaluation der ultrastrukturellen Untersuchung von CMV-miR transfizierten Organoiden	81
4.5. Evaluation des miRNA Clusters 183/96/182 auf die innerzelluläre Calciumdynamik und Lichtsensibilität in RO	82
4.6. Notwendigkeit für eine verbesserte Außensegmentreifung für Medikamenten- und Krankheitsstudien	82
4.7. Ausblick.....	84
5. Zusammenfassung	85
6. Referenzen	87
7. Eigenanteilserklärung.....	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Zelllinien
Tabelle 2:	alle Basismedien
Tabelle 3:	Chemikalien- und Zusätzeverzeichnis
Tabelle 4:	alle Software und Internetressourcen
Tabelle 5:	Oligonukleotide für qRT-PCR
Tabelle 6:	Oligonukleotide für Genexpressionsanalyse
Tabelle 7:	Vektoren
Tabelle 8:	primäre Antikörper
Tabelle 9:	sekundäre Antikörper
Tabelle 10:	gebrauchsfertige Reaktionslösungen
Tabelle 11:	verwendete Geräte
Tabelle 12:	Verbrauchsmaterialien

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema des Auges

Abbildung 2: Retinaschema

Abbildung 3: Zapfen und Stäbchen

Abbildung 4: Embryonal Body Generierung/ hiPS-Zellen Dissoziation

Abbildung 5: Transfektion und Nachweis von HEK-Zellen mit dem miRNA Cluster 183/96/182

Abbildung 6: untransfizierter Organoide im Vergleich an Tag 80 mit CMV-miR transfizierten Organoiden

Abbildung 7: Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf die Photorezeptorenentwicklung anhand des Pan-Photorezeptormarkers Recoverin

Abbildung 8: allg. Photorezeptornachweis mit dem Photorezeptormarker Rhodopsin

Abbildung 9: Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf die Zapfen-Photorezeptorenentwicklung anhand des Zapfen-Photorezeptormarkers Arrestin 3

Abbildung 10: Spezifischer Segmentnachweis mit dem Segmentenmarker Lectin und Außensegmentfilamentmarker Peripherin

Abbildung 11: Nachweis vom Phototransduktionsprotein PDE6B

Abbildung 12: Ultrastrukturelle Untersuchung von CMV-miR transfizierten Organoiden

Abbildung 13: Bewertung von innerzelluläre Kalziumdynamik und Lichtsensibilität der Photorezeptoren in CMV-miR und CMV-scr Organoiden

Abbildung 14: Expression des miRNA Clusters 183/96/182 unter dem photorezeptorspezifischen Promoters IRBP

Abbildung 15: Immunocytochemische Analyse der Überexpression von miRNA183/96/182 unter dem photorezeptor-spezifischen IRBP Promoter

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
3D	Drei-Dimensional
AA	Antibiotika-Antimykotika
AAV	Adeno-assoziierte Virus
Abb	Abbildung
Arr3	Arrestin3
Ago	Agonaut Protein
AS	Außensegmente
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
CDL	Chemisches definiertes Lipidkonzentrat
Ca ²⁺	Kalzium-Ionen
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	cyclic guanosine monophosphat
CMV	Zytomegalievirus
CMV-miR	pLVX-CMV-miRNA-ZsGreen
CMV-scr	pLVX- CM- Scrambled-ZsGreen
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EB	Embryoid Bodies
EGF	Epidermal growth factor
EM	Elektronenmikroskop

ESC	Embryonale Stammzelle
e.coli	escheria coli
<i>et al.</i>	und andere
FBS	fetal bovine serum
FGF	Fibroblast growth factor
G	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
hIPS-Zellen	humane induzierte pluripotente Stammzellen
HCl	Salzsäure
HEK	Human Embryonic Kidney
hESZ	humanen embryonalen Stammzellen
HMBS	Hydroxymethylbilane synthase
HSA	Human Serum Albumin
IF	Immunfluoreszenz
hiPS	induced pluripotent Stem Cells
IRBP	Interphotoreceptor retinoid-binding protein
IRBP-miR	pLVX-IRBP- miRNA- mCherry
IRBP-scr	pLVX-IRBP- Scrambled-mCherry
IS	Innensegmente
ITS	Insulin/Transferrin/Selenit
KLF4	Kruppel Like Factor 4
L-,S-,M- opsin	Long-wave sensitive opsin, short-wave sensitive opsin, middle-wave sensitive opsin

LCA	Leber's congenital amaurosis
Lect	Lectin
LED	Light-emitting diode
mESC	Mäuse embryonale Stammzellen
MG	Matrigel
Min	Minuten
miRNA/miR	Mikro-RNA
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor
MR2	Metarhodopsin2
mRNA	Messenger RNA
mTOR	Mechanistic Target of rapamycin
Na ⁺	Natrium-Ion
NEAA	Nonessential amino acids
nm, µm, mm	Nanometer, Mikrometer, Millimeter
nM, µM, mM, M	Nanomolar, Mikromolar, Millimolar
mV	Millivolt
nl, µl, ml, l	Nanoliter, Mikroliter, Milliliter, Liter
NVZ	neuronale Vorläuferzellen
O ₂	Sauerstoff
OLN	outer nuclear layer
K	Kalium
Pax6	paired-box-gene
PBS -/-	Phosphate-buffered Aaline ohne Magnesium and Kalzium
PCR	Polymerase chain reaction
PDE	Phosphodiesterase
PDMS	Polydimethylsiloxane
PEI	Polyethylenimine

Peri	Peripherin
PFA	Paraformaldehyde
pH	Potentia hydrogenii
PNA	peanut agglutinin
Rec	Recoverin
Rhod	Rhodopsin
RISC	RNA induced silencer complex
RO	Retina Organoid
RPE	retinale Pigmentepithel
Rpm	rapids per minute
Rx	Retinal homeobox protein
scr	scrambled
S.E.M	Standard error of the mean
SHH	Sonic-Hedghog
SIX	Homeobox protein
SLE	Stratum limitans externum
TF	Transfektionsfaktor
TGF	Transforming growth factor
qRT-PCR	Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction
UT	untransfiziert
UV	Ultra-violett

1. Einleitung

1.1. Das Auge

Das Sinnesorgan Auge erleichtert es dem Menschen sich in seiner Umgebung zurecht zu finden und mit dieser zu interagieren. Das Auge warnt uns vor auftretenden Gefahren und kann zum Beispiel über die Pupillengrößen Emotionen zum Ausdruck bringen (Kolb H., 1995).

1.2. Makroskopie des Auges

Der Augapfel (bulbus oculi) kann in zwei Anteile gegliedert werden, in den Lichtbrechenden und den Lichtwahrnehmenden. Das Licht wird von Hornhaut, Linse und Glaskörper gebrochen und in der Netzhaut wahrgenommen. Makroskopisch betrachtet, besitzt das Auge die inneren Strukturen Linse, Pupille, Teile der Iris, Corpus ciliare, vordere und hintere Augenkammer und Glaskörperraum, die von einer dreischichtigen Wand umhüllt werden. Die dreischichtige Wand setzt sich zusammen aus Tunica fibrosa bulbi (Sklera und Kornea), Tunica vasculosa bulbi (Uvea: Iris, corpus ciliare und Choroidea) und Tunica interna bulbi (Retina) (Trepel, 2008).

Das Auge besitzt einen vorderen und hinteren Pol. Der vordere Augenpol ist stärker gekrümmt als der Hintere. In der vorderen Krümmung liegt die lichtdurchlässige Kornea (=Hornhaut), die zu allen Seiten in die derbe, fast lichtundurchlässige Sklera (= Lederhaut) übergeht. 85% des Augapfels wird von der Sklera umgeben.

An die Sklera lagert sich von innen die Uvea an. Die Uvea (=Tunica vasculosa bulbi) bildet im vorderen Augenpol zum Auginneren Iris und Corpus ciliare verlaufend die Choroidea (= Aderhaut) (Aumüller, Aust, et al., 2010a).

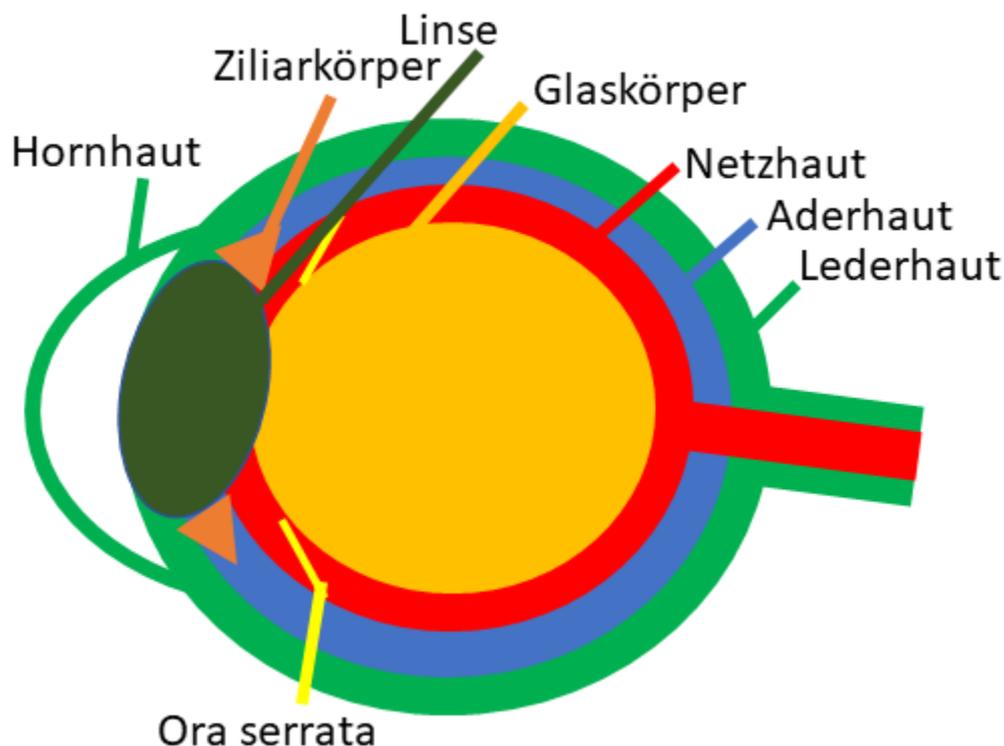


Abbildung 1: Schema des Auges

1.3. Retina

Die Netzhaut (Retina), auch Tunica interna bulbi genannt, ist die innerste Wandschicht des Auges. Sie wird in eine Pars optica und eine Pars caeca unterteilt. Beide Retinaanteile gehen in der Ora serrata ineinander über (Trepel, 2008).

Pars caeca besteht nur aus Pigmentepithel, welches sich dem Ziliarkörper und der Irisrückwand anlegt. Pars optica kleidet den restlichen Teil des Auges aus. Man kann die Retina weiter in ein äußeres Stratum pigmentosum und ein inneres Stratum nervosum unterteilen. Die innere Schicht Stratum nervosum ist der lichtwahrnehmende Teil des Auges. Dort besitzt die Netzhaut die Fähigkeit optische Signale in neuronale/elektrische Impulse umzuwandeln (Trepel, 2008) (Kolb, 2005; Update 2012).

Mikroskopisch betrachtet, besteht das Pars pigmentosum aus einem einschichtigen kubischen Epithel (RPE= Retinales Pigmentepithel), das in den Zellen melaninhaltige Pigmentkörnchen enthält und fest mit der Bruchmembran (= Basalmembran der

Aderhaut) verbunden ist (Bok, 1993). Es hat eine Filter- und Ernährungsfunktion für das Pars nervosum. Bevor es Substanzen weiterleitet, werden die schädlichen Stoffe herausgefiltert (Strauss, 2005). Eine weitere Aufgabe ist durch Phagozytose abgestoßene Zellmembrane von den AS der Stäbchen und Zapfen aufzunehmen und diese zu verdauen (Finnemann, 2003). Stratum pigmentosum und Stratum nervosum liegen locker aufeinander auf, bis an den Stellen, wo Pars caeca und Pars optica ineinander übergehen und an der Austrittsstelle des Nervus opticus, dort sind sie fest miteinander verbunden (Aumüller, Aust, et al., 2010a).

Stratum nervosum ist eine durchsichtige (aufgrund des fehlenden Pigmentepithels) 0,6 mm dicke Schicht, die sich vom Augapfelinneren betrachtet an das Pigmentepithel anlegt. In der äußersten Zellschicht, zum Pigmentepithel gerichtet, sind die lichtwahrnehmenden Zellen, die Photorezeptoren, lokalisiert (Trepel, 2008). Mikroskopisch kann man die Pars optica in 10 Schichten einteilen (Aumüller, Aust, et al., 2010a).

Wenn Lichtstrahlen durch Hornhaut, Linse und Glaskörper in das Auge fallen, gehen die Lichtstrahlen erst einmal durch alle Schichten der Retina hindurch, bis sie in der 1. Schicht und der 2. Schicht angelangen. In der 1. Schicht Stratum pigmentosum werden die Lichtstrahlen absorbiert und in der 2. Schicht dem Stratum segmentorum externorum et internorum, wo sich die äußeren und inneren Segmente der Photorezeptoren (IS,AS) befinden, werden die physikalischen Reize durch photochemische Reize umgewandelt (siehe Kapitel 1.3.2.) und als elektronischer Impuls weitergeleitet. Die Sinneszellen sind Primärsinneszellen und die ersten Neurone der Sehbahn, da sie den Reiz direkt umwandeln.

Die 3. Schicht Stratum limitans externum (SLE) besteht vor allem aus Fortsätzen der retinalen Gliazellen (Müller-Glia). Diese dient der Retina als Stützgerüst und wird von den Photorezeptoren siebartig durchbohrt. In der 4. Schicht dem Stratum nucleare externum findet man die Zellkerne der Photorezeptoren. Die 5. Schicht Stratum plexiforme externum setzt sich zusammen aus kurzen Axonen der Photorezeptoren, Fortsätze der Bipolarzellen und Horizontalzellen. Der elektrische Impuls wird über Synapsen von den Photorezeptoren auf die Bipolarzellen, die als zweite Neurone der Sehbahn zwischen den Photorezeptoren und Ganglienzellen zwischengeschaltet sind, vertikal weitergeleitet. Über die Horizontalzellen, die mit ihren dendro-dendritischen

Verbindungen zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen geschaltet sind, wird der Impuls seitlich abgeleitet, um durch laterale Hemmung benachbarte Regionen zu modulieren und so Lichtadaption und Bildkontrast zu beeinflussen [4, 9, 10]. In der 6. Schicht, dem Stratum nucleare internum, liegen die Zellkerne der Bipolarzellen, Horizontalzellen und Amakrinzellen. In dem Stratum plexiforme internum, der 7. Schicht der Netzhaut, gibt es viele Zellfortsätze und Synapsen zwischen Bipolarzellen, Horizontalzellen, Amakrinzellen und Ganglienzellen (Ogden, 1992). Der elektrische Impuls wird hier über Synapsen von den Bipolarzellen auf die Ganglienzellen vertikal geleitet und über die horizontalverlaufenden Amakrinzellen und Horizontalzellen werden die benachbarten Regionen über laterale Hemmung zum zweiten Mal moduliert (Mangel, 1991). Im Stratum ganglionicum, der 8. Schicht, findet man die Zellkerne der Ganglienzellen, die dritten Neurone der Sehbahn. Im Stratum neurofibrarum, der neunten Schicht, ziehen die markhaltigen Axone der Ganglienzellen, an denen der elektrische Reiz fortgeleitet wird, radial zu dem Discus nervi optici. Dort werden die Axone als Nervus opticus myelinisiert und ziehen über Chiasma opticus zu dem Corpus geniculatum laterale. Die innerste Schicht, Stratum limitans internum, bildet die Grenze zum Corpus vitreum. Diese setzt sich aus den Endfortsätzen der Müller-Glia Zellen und Basalmembran zusammen (Aumüller, Aust, Doll, Engele, Kirsch, & Reißig, 2010).

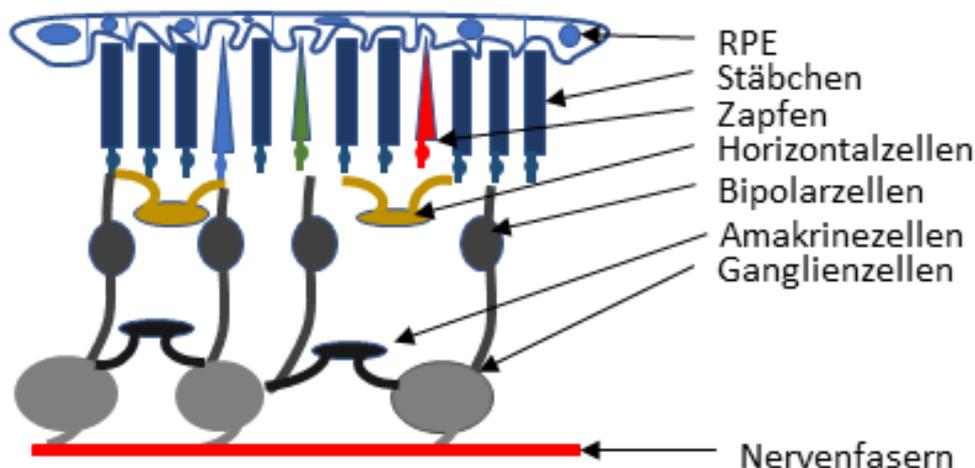


Abbildung 2: Retinaschema

1.3.1. Photorezeptoren

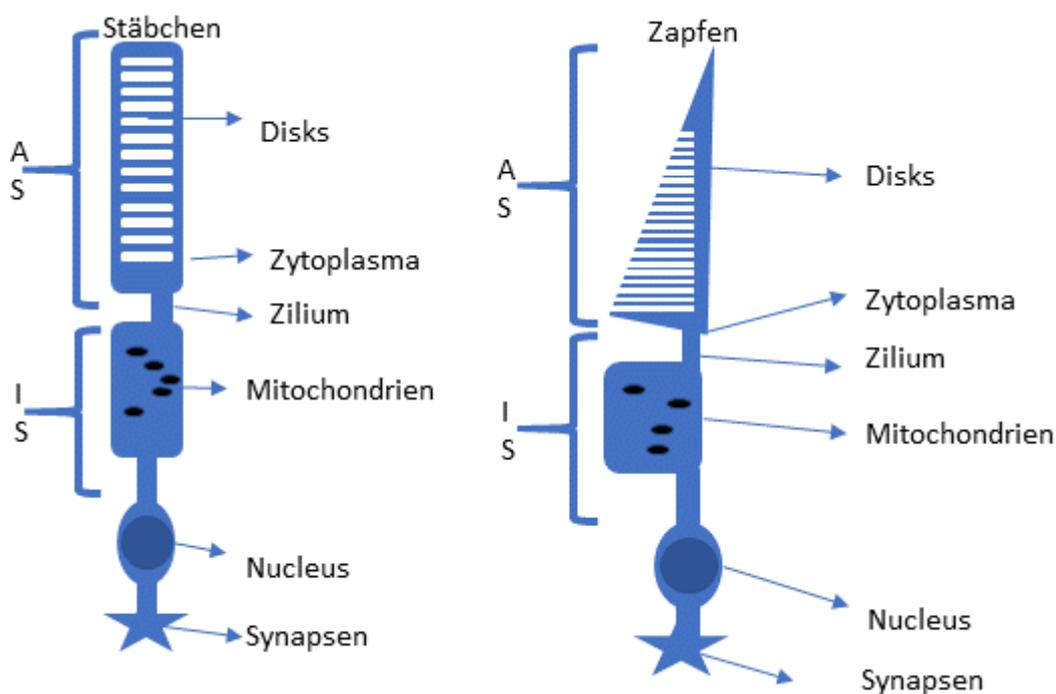


Abbildung 3: Zapfen und Stäbchen

„Die Photorezeptoren sind bipolare, langgestreckte Nervenzellen, deren reizaufnehmender Anteil (Dendriten) zur Absorption von Lichtquanten spezialisiert ist“ (Aumüller, Aust, et al., 2010b; Aumüller, Aust, Doll, Engele, Kirsch, & Reißig, 2010).

Die 120 Mio. helligkeitsempfindlichen Stäbchen in der menschlichen Netzhaut sind für das skotopische Sehen (Dämmerungssehen) zuständig. Die Stäbchen sind besonders stark in der Peripherie der Netzhaut lokalisiert (Aumüller, Aust, et al., 2010b; Purves & Williams, 2001).

Für das photopische Sehen (Tages- und Farbsehen) sind 6 Mio. farbempfindliche Zapfen in der Netzhaut verantwortlich. Vorwiegend sind die Zapfen in der Fovea centralis lokalisiert, weswegen hier auch am schärfsten gesehen wird. Es gibt drei

Typen von Zapfen. Den S-Typ, der sensibel auf kurze Wellenlängen (zwischen 400 – 500 nm) mit Absorptionsmaximum von 420 nm reagiert. Der vom Menschen als Blau-Ton wahrgenommen wird. Den M-Typ, der auf mittellange Wellen (450-630 nm) mit Absorptionsmaximum 530 nm am sensibelsten reagiert. Dieser Wellenbereich entspricht dem Grün-Ton. Der dritte Typ ist der L-Typ, der sensibel auf längere Wellenlängen (500-700nm) reagiert und sein Absorptionsmaximum bei 560nm hat, was einem grünlichen Gelb/Rot entspricht (Neitz & Neitz, 2011).

Der Grundbauplan von Zapfen und Stäbchen ist fast identisch. Das bedeutet, dass die AS über ein unbewegliches Zilium mit einer Anordnung aus neun Mikrotubuli-Dupletts ohne zentralen Mikrotubuli (Aumüller, Aust, et al., 2010a; COHEN, 1963) mit dem Innensegment verbunden sind. Die Zellkerne liegen in dem Stratum nucleare externum, von denen ein kurzes Axon mit Endknötchen (Terminalien) in das Stratum plexiforme externum zieht. Die Endknötchen der Stäbchen sind mit Gap junctions untereinander elektrisch gekoppelt.

Die AS der Stäbchen sehen zylinderförmig aus und der Membranstapel, der Membrandisks (= Lichtsensors) ist im intrazellulär Raum, „ähnlich wie die Münzen einer Geldrolle übereinander gestapelt“ (Aumüller, Aust, Doll, Engele, Kirsch, & Reißig, 2010). Die Membrandisks sind hier wie „in sich geschlossene Membransäckchen“, die Rhodopsin, bestehend aus 11-cis-Retinal Opsin, enthalten (Aumüller, Aust, et al., 2010b). Bei den Zapfen sind die AS kürzer, kegelförmiger und die Membrandisks sind regelmäßige Einstülpungen der Plasmamembran, die das Sehpigment Jodopsin enthalten und sich in Richtung des Pigmentepithels verjüngen. Jeder Zapfen Typ (S-,M-,L-) besitzt eine eigene/andere Opsin Zusammensetzung (Aumüller, Aust, et al., 2010a, 2010b).

Bei Beiden (Zapfen und Stäbchen) werden die äußersten Membrandisks durchgehend abgestoßen und vom RPE phagozytiert (D. H. Anderson, Fisher, & Steinberg, 1978).

Im distalen Ellipsoid des Innensegments befinden sich vor allem Mitochondrien. Im proximalen Myoid, in dem die Proteinbiosynthese/Opsine (Rezeptorprotein für den Lichtsensor) und die Bildung der photosensiblen Membran stattfinden, findet man viele freie Ribosomen, das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat (Aumüller, Aust, et al., 2010b; Aumüller, Aust, Doll, Engele, Kirsch, & Reißig, 2010; Young, 1967).

1.3.2. Phototransduktion

Wie in Kapitel 1.3. genannt, werden physikalische Reize in photochemische Reize umgewandelt. Diesen Schritt nennt man Phototransduktion. Wenn ein Lichtreiz auf ein AS der Photorezeptoren fällt, wird eine Kaskade in Gang gesetzt, um diesen Reiz zu verstärken. Der erste Schritt dieser Kaskade ist, dass das Sehpigment-Protein der Photorezeptoren, das zur Familie der Opsine gehört, auf diesen Lichtreiz reagiert. In dem folgenden Text wird am Beispiel des Rhodopsin, das Sehpigment der Stäbchen, die Phototransduktion erläutert. Das Rhodopsin-Protein ist in den Membrandisks verankert und teilt sich auf in das integral Membranprotein (Rhod)Opsin und das Aldehyd 11-cis-Retinal.

Bei Lichteinfall/Lichtquanten findet eine Konformationsänderung des 11-cis-Retinal im Rhodopsin statt und wird zu einem all-trans-Retinal. Daraufhin wird Rhodopsin über mehrere Zwischenschritte zu Metarhodopsin2 (MR2) umgewandelt. MR2 interagiert mit dem Gs-Protein, Transducin. Durch eine Konformationsänderung wird an der α -Untereinheit das Guanosindiphosphat (GDP) mit einem Guanosintriphosphat getauscht und die α - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten spalten sich. Die α -GTP-Untereinheit bindet an und deaktiviert die inhibitorische Untereinheit der cGMP-Phosphodiesterase (PDE). Die daraufhin aktivierte cGMP-PDE senkt die zyklischen Guanosinmonophosphate (cGMP) im Zytoplasma. cGMP bindet im Zytosol an (Na^+ - Ca^{2+}) Kationen-Kanäle und hält diese offen. Durch den stetigen Einstrom der Na^+ und Ca^{2+} und den Ausstrom der K^+ -Ionen wird das Ruhemembranpotential im Dunkeln bei ca. -40mV gehalten. Das eingeströmte Ca^{2+} wird durch einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austauscher in der Plasmamembran sofort wieder aus dem Zytosol transportiert und so die Ca^{2+} -Konzentration konstant auf 350-500 nmol/l gehalten.

Wenn bei einem Lichtreiz die cGMP-Konzentration sinkt, werden die cGMP abhängigen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Kationen-Kanäle geschlossen und es kommt zu einer Hyperpolarisation von ca. -70 mV. Durch die Hyperpolarisation wird die ständige Freisetzung des inhibitorischen Neurotransmitter Glutamat in der Präsynapse unterbrochen und in den nachfolgenden Neuronen kommt es zu einer Potentialänderung.

Um zurück zu dem ursprünglichen Ruhewert des Membranpotentials zu kommen, wird ein Regenerationszyklus vollzogen indem MR2 wieder in Rhodopsin umgewandelt wird. Die Rhodopsinkinase (RK) konkurriert um die Bindungsstelle an MR2 mit Transducin. Wenn ein RK an ein MR2 bindet, phosphoryliert es MR2 und die Affinität zu Transducin sinkt. Arrestin bindet sich an das phosphorylierte MR2 und verhindert, dass sich ein Transducin an das MR2 binden kann. Vom Opsin löst sich das all-trans Retinal und ein neues 11-cis-Retinal bindet sich an das Opsin. Das gelöste all-trans Retinal wird zu dem Pigmentepithel transportiert und dort wieder in ein 11-cis-Retinal umgewandelt.

In der Phototransduktion spielt Recoverin in der Helligkeitsadaption eine wichtige Rolle. Bei einer erhöhten Calciumkonzentration intrazellulär, bindet Recoverin dieses und phosphoryliert MR2 (Silbernagl, 2003).

1.4. Frühe Embryonale Entwicklung des Auges

Für die Generierung von Retinazellen *in vitro*, ist es notwendig die ersten Schritte der frühen embryonalen Augenentwicklung *in vivo* zu imitieren, in dem man mit den bis jetzt bekannten Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren (TF) eine ähnliche Umgebung schafft. Dazu wird die frühe Embryonale Augenentwicklung genauer beschrieben.

Die frühe embryonale Augenentwicklung beginnt in der 3. Woche der Embryogenese. Durch Botenstoffe „organizer“ (Noggin, Chordin) des Chordafortsatzes wird eine Verdickung der Neuralplatte des darüberliegenden Ektoderms induziert (R. M. Anderson, Lawrence, Stottmann, Bachiller, & Klingensmith, 2002).

Die Ränder der Neuralplatte formen sich über Neuralwülsten zu Neurfalten und grenzen in ihrer Mitte die liegende Neuralrinne ein. Die zwei Neurfalten verschmelzen mittig oberhalb der Neuralrinne. Durch das Verschmelzen, Falten und Ablösen vom Ektoderm entsteht aus der Neuralrinne ein Neuralrohr (Lowery & Sive, 2004).

Der rostrale Anteil des Neuralrohrs bildet mit den drei primitiven Hirnbläschen, Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon die Vorstufen des Gehirns.

Der caudale Anteil entwickelt sich zum Rückenmark. Das Prosencephalon Bläschen teilt sich in der Entwicklung in das Telencephalon und das Diencephalon auf.

Bevor sich aber das Neuralrohr verschließt, induziert die Prächordalplatte durch Botenstoffe wie FGF (Esteve & Bovolenta, 2006) die Aktivierung der „eye field transkriptions-Faktoren“ (Pax6, Rx, LHX2, Six3 und Six6 (Chow & Lang, 2001)) und die Entstehung der Augenanlage (Eye field) zentral auf der anterioren Neuralplatte (Zuber, Gestri, Viczian, Barsacchi, & Harris, 2003) (Adler & Canto-Soler, 2007; Zhong et al., 2014).

Die darunter liegende Prächordalplatte hat einen wichtigen Einfluss auf die anschließende Teilung des „eye field“, indem es das Cyc und SHH Protein sezerniert (Krauss, Concordet, & Ingham, 1993) (Marti, Takada, Bumcrot, Sasaki, & McMahon, 1995). Ebenso wird das SHH Protein mittig der anterioren Neuralplatte sezerniert (Echelard et al., 1993; Ericson et al., 1997; Krauss et al., 1993). Cyc fördert die Expression von SHH (Muller et al., 2000). SHH spielt zum einen eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Neuralrohrs, sowie in der Separierung des „single eye fields“ (Echelard et al., 1993; H. Li, Tierney, Wen, Wu, & Rao, 1997; Macdonald et al., 1995). SHH führt zu einer Unterdrückung von Pax6 des umliegenden Gewebes und somit zur Teilung (Macdonald et al., 1995).

Nach der Teilung entstehen zwei Ausstülpungen um den 19. Tag der Embryogenese auf der Innenseite der Neuralrinne als Augengruben (Foveolae opticae) am Boden des prospektiven Prosencephalon (Graw, 2010).

Die Augengruben evaginieren nach Verschluß des Neuralrohrs und formen die Augenblasen („Optic Vesicle“), die über die Augenblasenstiele („Optic stalk“) mit ihrem Ursprungsgebiet, der künftigen Grenze zwischen Boden und Seitenwand des Diencephalons, verbunden bleiben (Chow & Lang, 2001).

Das Augenbläschen induziert eine regionale Verdickung des nahegelegenen Ektoderms im Kopfbereich mit dem Signal Molekül BMP4, welches den TF Pax6 aktiviert, aus der sich die Linsenplakode entwickelt (Furuta & Hogan, 1998). Die Linsenplakode invaginiert, schnürt sich von dem Ektoderm ab, wird von dem Augenbecher umhüllt und entwickelt sich zur Linse. Der zweischichtige Augenbecher

entsteht aus dem Augenbläschen, indem sich der distale Bereich in den proximalen stülpt.

Die innere Schicht des Augenbechers differenziert sich unter Einfluss des Ektodermalen Signal Moleküls FGF in die neurale Retina, indem sie durch intrazelluläre Signaltransduktion den Transkriptionsfaktor CHX10 aktivieren. CHX10 unterdrückt die Expression von MITF (Horsford et al., 2005). Die äußere Schicht steht unter den Einflüssen des proximalen Mesenchymalen Signal Moleküls TGF- β und den Signalmolekülen BMP und Wnt, abstammend von der Oberfläche des Ektoderms (Steinfeld et al., 2013). Der Transkriptionsfaktor MITF wird aktiviert und Pigmentepithel (RPE) entsteht (Steinfeld et al., 2013). Nach der Invagination des Augenbläschens, nähern sich die innere und äußere Schicht dicht an, bis auf die „choroid fissure“. In die Fissur wachsen die Fortsätze der Ganglienzellen bis zum Vorderhirn und bilden später den Sehnerv (Adler & Canto-Soler, 2007; Graw, 2010).

1.5. Stammzellen

1.5.1. Embryonale Stammzellen

Stammzellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich durch Mitose symmetrisch oder asymmetrisch teilen können (Obernier et al., 2018; Potten & Loeffler, 1990). Bei einer symmetrischen Teilung entstehen aus der Stammzelle zwei neue Stammzellen, die identisch zu der Mutterzelle sind (Zon, 2008). Bei der asymmetrischen Teilung entstehen eine Stammzelle und eine differenzierte Gewebezelle (Inaba & Yamashita, 2012).

Stammzellen kann man in zwei Kriterien einteilen: Differenzierungspotential und Entwicklungsstadium des Organismus. Je nachdem in welchem Entwicklungsstadium sich der Organismus befindet, spricht man von einer embryonalen, fetalen oder adulten Stammzelle. Das Differenzierungspotential wird unterteilt in toti-/omni-, pluri- und multipotent. Aus einer totipotenten Stammzelle, die bis zum 8-Zell Stadium gefunden werden kann, kann ein ganzer Organismus/Mensch entstehen (Mitalipov & Wolf, 2009).

Bei den aus der Blastozyste gewonnenen embryonalen Stammzellen (ESC) handelt es sich um pluripotente Stammzellen, die sich in die drei Keimblätter differenzieren können, also in mehr als 200 verschiedene Gewebe. Aus ihr kann allerdings kein Organismus mehr entstehen, da sie kein extra-embryonales Plazentagewebe bilden kann (Martin, 1981). Die multipotente Stammzelle verfügt über ein geringeres Potential und kann sich nur noch in bestimmte Gewebezellen differenzieren (Nichols et al., 1998; S. Yamanaka & Blau, 2010; Y. Yamanaka, Ralston, Stephenson, & Rossant, 2006).

1.5.2. Induziert Pluripotente Stammzellen (hiPS-Zellen)

2006 gelang es Shinya Yamanaka und Kazutoshi Takahashi in das Genom einer adulten fibroblastischen Mäusezelle mit Hilfe von Retroviren vier Transkriptionsfaktoren, Oct3/4, Sox2, c-Myc und KLF4, den sogenannten Yamanaka Faktoren, zu implizieren und diese dann zu einer induzierten Pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) zu reprogrammieren. 2012 erhielt Yamanaka für seine Entdeckung den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin (Pressemeldung zum Nobelpreis für Medizin 2012, The Nobel Assembly at Karolinska Institutet, 8. Oktober 2012, abgerufen am 8. Oktober 2012) (Takahashi & Yamanaka, 2006; S. Yamanaka & Blau, 2010).

Ein Jahr später gelang es mehreren Forschergruppen hiPS-Zellen aus humanen Zellen herzustellen (Park et al., 2008; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Mittlerweile ist es möglich, dass man hiPS-Zellen aus fast allen anderen Gewebearten wie zum Beispiel Blut, Haut, fibroblasten-ähnliche Synovialzellen herstellen kann (Park et al., 2008; Rim et al., 2018).

1.5.3. Verwendung der hiPS-Zellen in der Retina Forschung

Für die Stammzellforschung war es ein entscheidender Fortschritt als Evans und Thomson es schafften menschliche ESCs und Mäuse ESCs *in vitro* zu kultivieren, ebenso die Entdeckung der hiPS-Zellen brachte neue Möglichkeiten retinale Grundlagenforschung zu betreiben, ohne Versuche *in vivo* durchführen zu müssen. Mehrere Forschergruppen (Lamba, Karl, Ware, & Reh, 2006; Osakada et al., 2008)

versuchten in den ersten Anläufen Retinazelle aus Stammzellen in 2D Kulturen zu generieren. Sie konnten retina-typische Zellen wie Photorezeptoren und RPE mit adäquaten Markern nachweisen, aber die Zellen zeigten in der 2D Kultur weder eine retinal-typische Anordnung, noch eine Interaktion unter diesen Zellen. 2011 gelang es Eiraku aus embryonalen Mäusestammzellen (mESC) eine drei dimensionale Retina *in vitro* herzustellen (Eiraku et al., 2011). Er generierte aus Rx-positiven ESC in Suspension homogene ES-Zellen-Aggregate und schaffte es, die frühe Augenentwicklung zu imitieren. Er konnte zeigen, dass auf/in dem homogenen Aggregat eine Evagination zu sehen war, die dem Optic vesicle ähnelte und im distalen sowie proximalen Bereich dieselben Transkriptionsfaktoren nachweisen. NRE bildete sich ohne äußere Einflüsse spontan und zeigte die gleich angeordnete mehrschichtige Struktur wie bei der postnatalen Retina (siehe Kapitel 1.3.). Für die Bildung des RPE waren Induktionsfaktoren nötig. Mit Wnt-inhibitoren wurde die RPE Bildung gehemmt und mit Wnt-Agonisten gefördert (Eiraku et al., 2011).

Aus derselben Arbeitsgruppe untersuchte ein Jahr später, 2012, Nakano (Nakano et al., 2012) die Entwicklung des Optic Cups/neurale Retina anhand von humanen embryonalen Stammzellen (hESZ). Um eine kaudale Bewegung der neuronalen Vorläuferzellen zu verhindern, wurden Wnt- Inhibitoren (Lu et al., 2009) verwendet. Der Rock-Inhibitor kam zum Einsatz, um eine Apoptose aufgrund einer Dissoziation zu verhindern (Watanabe et al., 2007). Die verlängerte Gabe von FBS (fetale bovine serum) zeigte in seinen Versuchen einen positiven Effekt auf die retinale Differenzierung. Er konnte in seinem Experiment innere Segmente und Ansätze von Zilien unter dem Elektronenmikroskop erkennen, aber die äußeren Segmente waren nicht klar darstellbar.

Zhong (Zhong et al., 2014) fügte in das Protokoll von Nakano 2012 einen adhären 2D Kultur Zwischenschritt ein, als er es mit humanen induzierten Pluripotenten Stammzellen (hiPS) durchführte. Durch Hinzugabe von Retinsäure erreichte er eine erhöhte Rhodopsin Expression im distalen Bereich der Photorezeptoren. Ab der 25. Woche zeigten die Zellkörper der Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen) eine starke Ähnlichkeit zu postnatalen Zellen. Ebenso konnte er ab der 25. Woche Ansätze von äußeren Segmenten im Elektronenmikroskop (EM) erkennen und eine schwache Lichtsensibilität nachweisen (Zhong et al., 2014).

1.6. Zellentwicklung und Zellsteuerung durch Mikro-RNA

In dem menschlichen Körper gibt es rund 200 Zellen mit unterschiedlichem Aussehen und Funktionen wie zum Beispiel Herz- und Leberzellen, obwohl jede dieser Zellen dieselbe genetische DNA in ihrem Zellkern besitzt (Jaenisch & Bird, 2003). Durch unterschiedliche Mechanismen können Zellen wie zum Beispiel epigenetische Veränderungen und Mikro-RNA (miRNA) die Aktivität von Genen beeinflussen (Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993).

miRNA wurde initial 1993 von der Gruppe von Ambros entdeckt und ist eine Untergruppe der RNA-Interferenz (Lee et al., 1993). Studien zeigten, dass miRNA eine wesentliche Rolle in dem Metabolismus, Stammzellen einteilen, Entwicklung der Zelle, Apoptose, Zellproliferation, Zellzyklus, Stammzellendifferenzierung und eine Rolle in Tumorzellen spielen (Bueno & Malumbres, 2011; Cheng, Byrom, Shelton, & Ford, 2005; Wang, Medvid, Melton, Jaenisch, & Blelloch, 2007; Weeraratne et al., 2012).

Im Zellkern wird die miRNA von der RNA Polymerase 2 von dem DNA Strang abgelesen. Die primäre miRNA faltet sich zu einem Doppelstrang, der von dem Mikroprozessorkomplex, bestehend aus dem Protein DGCR8 und dem Enzym Drosha, in die precursor miRNA geschnitten wird (Gregory et al., 2004). Nachdem die precursor miRNA mit dem Transportmolekül Export 5 aus dem Zellkern in das Zytoplasma geschleust wurde, heftet sich das Dicer Protein daran und kürzt es mit Hilfe des TRBP2 Proteins (Gatignol, Buckler-White, Berkhout, & Jeang, 1991) auf eine Nukleotid Länge von ca. 22 (Bartel, 2004) zur reifen miRNA (Bernstein, Caudy, Hammond, & Hannon, 2001). Das Argonaut Protein AGO2 interagiert mit dem Dicer Protein und übernimmt die reife miRNA. Das Argonaut Protein entwindet den Doppelstrang und spaltet diesen. Der Leitstrang bleibt mit dem Argonauten Protein verbunden und bildet den RNA induced silencer Complex (RISC) (Meister et al., 2004). Der RISC Complex kann sich mit seiner SEED Sequenz an über 100 verschiedene Stellen von messenger RNA's (mRNA) heften, indem sich die komplementäre Nukleotid Seed Sequenz an den 3' untranslatierten Bereich der Ziel mRNA bindet. Der RISC Komplex kann somit die Stabilität der mRNA reduzieren und/oder die Proteintranslation unterdrücken (Lai, 2002).

1.7. Das miRNA Cluster 183/96/182

Das miRNA Cluster 183/96/182 wurde 2003 von Jim und Lagos-Quintana entdeckt (Lagos-Quintana, Rauhut, Meyer, Borkhardt, & Tuschl, 2003; Lim, Glasner, Yekta, Burge, & Bartel, 2003). Aufgrund der gemeinsamen nahen Lage auf dem Chromosom 7q32.2 (NCBI, updated on 23-Apr-2019), ihrer erhöhten Expression in der Retina (Lagos-Quintana et al., 2003) und sehr ähnlichen Seed Sequenzen (Weston, Pierce, Rocha-Sanchez, Beisel, & Soukup, 2006; Xu, Witmer, Lumayag, Kovacs, & Valle, 2007) wurden die drei miRNA-183, -96 und -182 zu einem Cluster klassifiziert. Im gesunden Gewebe ist das miRNA Cluster 183 notwendig für die Entwicklung von den sensorischen und mechanosensorischen Organen, wie zum Beispiel Nase, Ohr, Retina und Gehirn (Lumayag et al., 2013; Pierce et al., 2008; Weston et al., 2006; Weston et al., 2018; Wienholds et al., 2005). In der Maus wird das miRNA Cluster 183 in dem olfaktorischen Bulbus und im Auge exprimiert (Bak et al., 2008; Xu et al., 2007) und wird vor allem in den retinalen Photorezeptoren, Bipolarzellen und Amakrinzellen erhöht exprimiert (Bak et al., 2008; Xu et al., 2007).

In den Photorezeptoren variiert die Anzahl des miRNA Cluster 183 je nach Lichtadaptation. Bei wenig Licht nimmt die Anzahl ab, bei viel Licht zu. Durch die Konzentrationsunterschiede werden spannungsabhängige Glutamattransporter, SLC1A1, reguliert und somit die Neurotransmitteranzahl beeinflusst (Krol et al., 2010). Ebenso findet man das miRNA Cluster 183 in hESZ (Houbaviy, Murray, & Sharp, 2003), sowie in gutartigen Prostataepithelzellen. In der Prostata beeinflussen sie den Zinkhaushalt über eine Regulation der Zink Transporter (Mihelich et al., 2011).

Normalerweise findet man in dem nicht-sensorischen adulten Gewebe keine erhöhte Expression des Clusters. Immer mehr Studien zeigen eine erhöhte Expression in pathogenen Geweben wie zum Beispiel von Neuronen, Autoimmunerkrankungen und vielen Krebsarten (Brust, Lunge, Prostata) (Dai et al., 2010; Dave et al., 1995; X. Li et al., 2013; Lin et al., 2010; Neville et al., 2002). Eine Überexpression des Clusters kann einen onkogenen Faktor haben, indem eine antiapoptotische Wirkung (Fendler et al., 2013) eine Herunterregulierung von mRNA für DNA Repair-Proteine bewirkt (Krishnan et al., 2013) und den Energiehaushalt einer Zelle verändert, sodass die mRNA reguliert wird, die für den Citratzyklus und Lipidmetabolismus wichtig ist.

1.7.1. Auswirkung von miRNA Cluster 183/96/182 auf Retina

Eine wichtige Rolle spielen miRNA in der Entwicklung von Neurosensorischen Zellen wie zum Beispiel in der Netzhaut. Das Fehlen aller oder teilweise einzelner miRNA's zeigten während der Entwicklung Defekte in der Retina (Sundermeier & Palczewski, 2012) sowie frühe retinale Degenerationen (Damiani et al., 2008). Gezieltes Ausschalten der miRNA124 zeigte eine Veränderung in der Reifung von Zapfen, sowie eine beschleunigte Apoptose der Photorezeptoren und eine nicht korrekt stattfindende Wanderung der Zapfen (Sanuki et al., 2011).

An einem sogenannten anti-RNA „sponge mouse“ Modell, bei der die Aktivität des neurosensorischen spezifischen miRNA Clusters 183/96/182 herabgesetzt war (Xu et al., 2007), wurde gezeigt, dass ein Retina Degeneration stattfand und eine beschleunigte Schädigung der Retina durch helles Licht induziert wurde (Zhu et al., 2011).

Eine weitere Studie von Jin (Jin et al., 2009) zeigte, dass das Ausschalten der in den Photorezeptoren am häufigsten exprimierten miRNA 182 keinen großen Effekt hatte. Man vermutet, dass die anderen miRNA wie miRNA 183 durch ihre ähnlichen „Seed Sequenzen“ dies kompensieren konnten (Jin et al., 2009).

Buskamp (Buskamp et al., 2014) entwickelten ein Mausmodell bei der das miRNA Cluster 183/96/182 ausgeschaltet werden konnte. Ab Tag 30 postnatal konnte innerhalb eines Monats ein Rückgang der äußeren Segmente nachgewiesen werden, ohne dass die Morphologie und Struktur der restlichen Zapfen verändert wurde. Bei äußerlicher Hinzugabe des Clusters ab Tag 45 konnte ein weiterer Rückgang verhindert werden.

Nach der Feststellung, dass das miRNA Cluster 183/96/182 eine wichtige Rolle in der AS-Entwicklung und Aufrechterhaltung spielt, wurde ein zweites Experiment mit ESC nach Eiraku's Protokoll durchgeführt. Die embryonalen Zellen RO wurden mit AAV Viren transfiziert, um das miRNA Cluster 183/96/182 in Kombination mit GFP in die Test-RO's zu schleusen und zu überexprimieren. Die GFP-positiven Zellen mit dem miRNA Cluster zeigten eine Beschleunigung der Segmententwicklung, eine

Verbesserung durch reife Zilien und außensegmentartige Membrandisks, die mehrfach auf Lichtreize reagierten (Buskamp et al., 2014).

1.8. Ziel der Studie

Diese Arbeit sollte untersuchen, ob mithilfe der Überexpression des miRNA Clusters 183/96/182 in retinalen Organoiden die Reifung der AS von Photorezeptoren beschleunigt und verbessert werden kann. Um diese Studie durchführen zu können, wurden vier Plasmidringe konzipiert. Zwei Plasmidringe enthielten ein Konstrukt aus einem unspezifischen mammalischen CMV-Promoter und einem immunfluoreszierenden Protein ZsGreen. In das eine Konstrukt wurde das miRNA Cluster 183/96/182 hineinkloniert, in ein weiteres Konstrukt eine non-sense scrambled Variante der miRNA 183. Die CMV-miR-ZsGreen und CMV-scr-ZsGreen Konstrukte wurden an Tag 80 mithilfe von Lentiviren in RO transfiziert. An Tag 190 wurden die transfizierten Organoide mithilfe von immunhistochemischen Färbungen, Elektronenmikroskop und Calcium Imaging verglichen und analysiert.

Die anderen zwei konzipierten Plasmidringe enthielten den Photorezeptor-spezifischen Promoter des Gens IRBP, das miRNA Cluster 183/96/182 und das immunfluoreszierende mCherry Protein, während die Kontrollversion eine non-sense scrambled Variante enthielt. Diese zwei Konstrukte wurden in eine hiPS-Zelllinie transfiziert und mithilfe einer Puromycin-Resistenz selektiert. Anschließend wurden aus dieser Zelllinie RO differenziert und an Tag 125 mithilfe der oben genannten Hilfsmittel ebenso verglichen und analysiert.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkultur

2.1.1.1. Zelllinien

Tabelle 1: Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Organismus	Verwendung
hiPS-Zellen K3	hiPS-Zellen aus reprogrammierten Keratinozyten von K3	Mensch	Ausgangszellen für die Differenzierung
hiPS-Zellen K8	hiPS-Zellen aus reprogrammierten Keratinozyten von K8	Mensch	Ausgangszellen für die Differenzierung
Lenti-X 293T	Nierenzellen HEK293 (Takara)	Mensch	Virusproduktion

2.1.1.2. Basismedien

Tabelle 2: alle Basismedien

Basismedium	Hersteller
Animal-Free Growth Factor Component	PeptoTech, Hamburg, Deutschland
DMEM (+ 4,5 g/l D-Glucose, + L-Glutamin, - Pyruvat)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMEM/F-12, GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

EpiLife®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
hESC Embryonic Stem Cell Media	PeptoTech, Hamburg, Deutschland
Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Knockout™ DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Opti-MEM™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Animal-Free Growth Factor Component	PeptoTech, Hamburg, Deutschland
DMEM (+ 4,5 g/l D-Glucose, + L-Glutamin, - Pyruvat)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMEM/F-12, GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
EpiLife®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
hESC Embryonic Stem Cell Media	PeptoTech, Hamburg, Deutschland
Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Knockout™ DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Opti-MEM™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Animal-Free Growth Factor Component	PeptoTech, Hamburg, Deutschland

DMEM (+ 4,5 g/l D-Glucose, + L-Glutamin, - Pyruvat)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DMEM/F-12, GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.1.3. Chemikalien und Zusätze

Tabelle 3: Chemikalien- und Zusätzeverzeichnis

Chemikalienbezeichnung	Hersteller
Accumax™	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Activin A	Cell Guidance Systems, Cambridge, Großbritannien
Antibiotikum-Antimykotikum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
(±)-Blebbistatin	BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland
B-27® Supplement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Cryostem	Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel
Chemisch definiertes Lipidkonzentrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
D(+)- Saccharose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Dispase	Corning, Amsterdam, Niederlande
Dorsomorphin	Abcam, Cambridge, Großbritannien
DPBS ohne Kalzium, ohne Magnesium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FGF2	Cell Guidance Systems, Cambridge, Großbritannien
Fötale Kälberserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GDNF	Cell Guidance Systems, Cambridge, Großbritannien
GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hexadimethrinbromid (Polybrene)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Holo-Transferrin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Humanes Serumalbumin	Biological Industries, Kibbutz Beit-Haemek, Israel
Insulin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
ITS Premix	Corning, Amsterdam, Niederlande
KnockOut™ Serum Replacement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lenti-X Konzentrierer	Takara Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich

Matrigel® hESC-Qualified Matrix	Corning, Amsterdam, Niederlande
MEM Non-Essential Amino Acids Solution	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
β-Mercaptoethanol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Natriumselenit	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Normal Donkey Serum (Eselserum)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Polyethylenimin linear (PEI)	Polysciences GmbH, Eppelheim, Deutschland
Progesteron	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Purmorphamin	Phoenix GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Putrescin Dihydrochlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Retinsäure	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
SB431542	Selleckchem, München, Deutschland
Taurine	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

TGF-β1	PeproTech, Hamburg, Deutschland
Trichostatin A	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Tris-HCl	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Triton® X 100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TrypLE™ Express	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vitamin C	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Y-27632 2HCl (ROCK-Inhibitor)	Selleckchem, München, Deutschland

2.1.2. Software und Internetressourcen

Tabelle 4: alle Software und Internetressourcen

Software	Bezugsquelle
AxioVision SE64 Rel 4.9	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
StepOne Software V 2.3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GraphPad Prism	Graphpad Software, La Jolla, USA
Serial Cloner	http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html
Internetressourcen	Homepage
NCBI PubMed Publikationsdatenbank	www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

Invivo Gen	http://www.invivogen.com/sirnazard/construct3.php
Switch Gear	http://switchgeargenomics.com/genecards.php

2.1.3. Oligonukleotide

Die für die qRT-PCR verwendeten Referenz-Oligonukleotidprimer wurden bei der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland bezogen. qPCR Primer für miRNA183, 96 und 182 wurden von Busskamp 2013 modifiziert.

Tabelle 5: Oligonukleotide für qRT-PCR

Bezeichnung	Firma	Bestellnummer
Hs_HMBS_1_SG	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00014462
GAPDH	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT00079247
pri-miR-182	Modifiziert von Busskamp <i>et al.</i> 2013	Forwärts-Primer CCCGGCATCCCATAATAAAAAC Rückwärts-Primer AGTTGGCAAGTCTAGAACCAC
pri-miR-183	Modifiziert von Busskamp <i>et al.</i> 2013	Forwärts-Primer GACTCAGATCTCGAGCTCAA Rückwärts-Primer TATGGCCCTTCGGTAATTCA
pri-miR-96	Busskamp et al 2013	Forwärts-Primer GTGCCAGGGTACAAAGACCT Rückwärts-Primer

		GGCACTACACATGATTGCTCA
--	--	-----------------------

Die miRNA- Taqman Sonden wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA synthetisiert

Tabelle 6: Oligonukleotide für Genexpressionsanalyse

Genname	Bestellnummer
hsa-miR-183-5p	477937_mir, A25576
hsa-miR-96-5p	478215_mir, A25576
hsa-miR-182-5p	477935_mir, A25576
hsa-miR-320a-3p	4427975_mir, A25576

2.1.4. Vektoren

Diese Plasmide kamen zur Herstellung von lentiviralen Partikeln zur Verwendung:

Tabelle 7: Vektoren

Bezeichnung	Verwendung
pLVX-EF1a-mCherry	Takara Bio, Kusatsu, Japan Antibiotika-resistenz (Bakteriell): Ampicilin Antibiotika-resistenz (Tierisch): Puromycin

pLVX-IRBP-mCherry	Takara Bio, Kusatsu, Japan Antibiotika-resistenz (Bakteriell): Ampicillin Antibiotika-resistenz (Tierisch): Puromycin
pLVX-IRES-ZsGreen1	Takara Bio, Kusatsu, Japan Antibiotika-resistenz (Bakteriell): Ampicillin Antibiotika-resistenz (Tierisch): Puromycin
scAAV-efa primr183/96/182	Geschenk von Botond Roska ((Buskamp et al., 2014))
pJG-IRPB-eGFP	Geschenk von Deepak Lamba & Thomas Reh ((Lamba et al., 2006))

CMV-miR-ZsGreen Konstrukt

Vektor: pLVX-IRES-ZSGREEN1
Promoter: CMV-F
miRNA: Cluster 183/96/182 bestehend aus 500 bp

CMV-scr-ZsGreen Konstrukt

Vektor: pLVX-IRES-ZSGREEN1
miRNA: Nonsense- scrambled miRNA von 183
 Ziel miRNA183 besteht aus:
 5' TATGGCACTGGTAGAATTCCTACT 3'
 Scrambled miRNA183 besteht aus:
 5' GAGGACATTCGGCATATTCTAT 3'
Promoter: CMV-F

IRBP-miR-mCherry Konstrukt und IRBP-scr-mCherry Konstrukt: Für die Viren IRBP-miR-mCherry Konstrukt und IRBP-scr-mCherry Konstrukt wurde aus dem

Vektor pLVX-EF1a-mCherry der Promoter EF1a herausgeschnitten und der humane Promoter des Gens IRBP hineinkloniert. Dieser wurde aus einem Konstrukt gewonnen, das von Thomas Reh und Deepak Lamba als Geschenk gegeben wurde (Lamba et al., 2006) .

IRBP-miR-mCherry Konstrukt

Vektor: pLVX-IRBP-mCherry
Promoter: Promoter des IRBP-Gens
miRNA: miRNA Cluster 183/96/182 (~520bp) von CMV-miR-ZsGreen Konstrukt in pLVX-IRBP-mCherry kloniert

IRBP-scr-mCherry Konstrukt

Vektor: pLVX-IRBP-mCherry
Promoter: Promoter des IRBP-Gens
miRNA: scrambled miRNA von CMV-scr-ZsGreen
 Konstrukt in den Vektor pLVX-EF1a mCherry kloniert

2.1.5. Antikörper

Für die Immunofluoreszenz-Färbungen wurden folgende Primär- und Sekundärantikörper benutzt:

Tabelle 8: primäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
ABCA4	Ziege		Novus Biologicals, Littleton, USA
Arrestin 3 (ARR3) (I17)	Ziege	1:100	Santa-Cruz, Santa Cruz, USA
CD90/Thy1	Ziege		Abcam, Cambridge, Großbritannien
Cralbp	Maus	1:250	Abcam, Cambridge, Großbritannien

Chx10	Ziege	1:200	Santa-Cruz, Santa Cruz, USA
PNA Lectin Alexa Fluor 647	-	1:1000	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Na⁺/K⁺ ATPase α3	Maus	1:100	Abcam, Cambridge, Großbritannien
PDE6β	Hase	1:200	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Peripherin	Maus	1:1000	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Recoverin	Hase	1:1000	Merck Millipore, Darmstadt, Germany
Rhodopsin	Maus	1:200	Santa-Cruz, Santa-Cruz, USA
ROM1	Ziege	1:200	Proteintech, Chicago, USA
VAMP3			Novus Biologicals, Littleton, CO, USA
ZsGreen	Hase	1:200	Takara Bio, Kusatsu, Japan

Tabelle 9: sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
Anti-Kaninchen-IgG H+L (Alexa Fluor® 488)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-Kaninchen-IgG H+L (Alexa Fluor® 568)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-Kaninchen-IgG +L (Alexa Fluor® 647)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-Maus-IgG H+L (Alexa Fluor® 488)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, Großbritannien

Anti-Maus-IgG H+L (Alexa Fluor® 568)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-Maus-IgG H+L (Alexa Fluor® 647)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-Ziege-IgG H+L (Alexa Fluor® 488)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-Ziege-IgG H+L (Alexa Fluor® 568)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-Ziege-IgG H+L (Alexa Fluor® 647)	Esel	1:1000	Abcam, Cambridge, Großbritannien

2.1.6. Gebrauchsfertige Reaktionslösungen

Tabelle 10: gebrauchsfertige Reaktionslösungen

Gebrauchsfertige Reaktionslösung	Bezugsquelle
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
DNA-CleanUp Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
JetQuick™, gel extraction kit	Genomed, Leesburg, Finnland
mirVana™ miRNA Isolation Kit	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
NucleoBond® Xtra Midi / Maxi Kit	MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland
QuantiFast SYBR® Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Isolationskit	Qiagen, Hilden, Deutschland

PreAmp Master Mix	Fluidigm, San Francisco, USA
TaqMan Universal Master Mix II	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

2.1.7. Geräte

Tabelle 11: verwendete Geräte

Gerät	Firma
Analysenwaage BP2218-0CE	Satorius, Göttingen, Deutschland
Axio Imager M2 Forschungsmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Biomark™	Fluidigm, South San Francisco, USA
Eppendorf Multipette Stream	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus Pipette 0,1 – 2,5 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus Pipette 0,5 – 10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus Pipette 0,5 – 5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus Pipette 10 – 100 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus Pipette 100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus Pipette 20 – 200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Plus Pipette 500 – 5000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
EVOS® FL Cell Imaging System	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 1 – 10 µl	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 10 – 100 µl	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
F1-ClipTip™ Einkanalpipetten 100 – 1000 µl	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Flockeneisbereiter AF-103	Scotsman, Great Blakenham, UK
Gefrierschrank GN 4113-20K	Liebherr, Biberach, Deutschland
Heracell 240i CO₂ Inkubator	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Heraeus™ Fresco™ Zentrifuge	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Heraeus™ Megafuge™ 16 Universalzentrifuge	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
InoLab® Labor-pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Kryostat	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Kühl-Gefrierkombination CUN 3933-21B	Liebherr, Biberach, Deutschland
Mikrowelle MW13145W	Amica, Wronki, Polen
Minizentrifuge Sprout	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
MSC-Advantage™ biologische Sicherheitswerkbank, Klasse 2	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Nanophotometer™ P-Class	Implen, München, Deutschland

NeoVortex D-6012	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Odyssey FC Imaging System	Li-Cor, Lincoln, USA
PCR-Cycler 732-1210	Gene Technologies, Charlotte, USA
Pipetus®	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
PowerPac™ 200	BioRad, Hercules, USA
Primovert inverses Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Quantum ST4	Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany
Schüttelinkubator 3031	GFL, Burgwedel, Deutschland
StepOnePlus™ Real-time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermomixer Pro	CellMedia, Elsteraue, Deutschland
Ultraschallgerät Transsonic 460/H	Elma®, Singen, Deutschland
Ultra-Tiefkühlschrank Forma 900 Series	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Vacuum Pump, Integra Vacusafe	Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland
Zeiss EM 900 Transmission Elektronen Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

2.1.8. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
0,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
1,5 ml Reaktionsgefäß	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
12 Well Kulturplatten	Corning, Amsterdam, Niederlande
15 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
24 Well Kulturplatten	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
25 cm² Kulturflaschen	Corning, Amsterdam, Niederlande
250 ml Zellkulturflasche	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
50 ml Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
6 Well Kulturplatten	Corning, Amsterdam, Niederlande
6 Well Kulturplatten non tissue	Corning, Amsterdam, Niederlande
96 Well Kulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96 V Well Kulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
BD Plastipak 50 ml Spritzen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Clip Tip™ Pipettenspitzen 1- 10 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Clip Tip™ Pipettenspitzen 10- 100 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Clip Tip™ Pipettenspitzen 100- 1000 µl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kryoröhrchen 1,2 ml	Corning, Amsterdam, Niederlande
Nitril powderfree Handschuhe	ABENA, Zörbig, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl	Biozym, Hessich Oldendorf, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 25 ml	Corning, Amsterdam, Niederlande
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Zellkultur wurde unter sterilen Bedingungen unter einer sterilen biologischen Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Inkubation der hiPS-Zellen erfolgte in einem Inkubator mit 5% O₂ und 5% CO₂ und 37°C, die retinalen Zelldifferenzierungen in einem Inkubator mit 20% O₂ und 5% CO₂ und 37°C. Alle Medien, außer FTDA, wurden in einem Wasserbad auf 37°C vorgewärmt.

Der Gebrauch von menschlichen Materialien wurde von der Ethik-Kommission der Universität Tübingen (No. 841/2016BO2) genehmigt.

2.2.1.1. hiPS-Zellkultur

Humane iPS-Zellen wurden in FTDA ++ Medium auf beschichteten 6-Well Platten als Kolonien kultiviert. Die Beschichtung erfolgte mit 500µl Matrigel (hESC qualified) / 6-Well 1h bei 37°C im Inkubator. Das Medium der hiPS-Zellen wurde täglich gewechselt und sobald die Zellpopulation 60-80% Konfluenz erreichte auf neue Platten gesplittet. Für das Splitten wurden die Kolonien 1x PBS -/- gewaschen und dann mit 500µl /6- Well hESC-Dispase (1 mg/ml) für 25 Sek. inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in Falcons gesammelt. Danach wurde frisches FTDA++ hinzugegeben und auf neue 6 Wells verteilt.

FTDA

- DMEM/F12+ GlutaMAX™
- 1:1000 ITS
- 1:100 Humanes Serumalbumin
- 1:100 Chemisches definiertes Lipidkonzentrat
- 10 ng/ml FGF2
- 0.5 ng/ml TGFβ1
- 50 nM Dorsomorphin
- 5 ng/ml Activin A
- 1x Antibiotikum-Antimykotikum (100X)

2.2.1.2. hiPS-Zellen auftauen und einfrieren

Zum Einfrieren wurden pro Kryotube 2-3 90%> konfluente 6-Wellen wie s.o. hiPS-Zellen gelöst und mit FTDA ++ in ein Falcon überführt. Nach 5 Minuten bei 300G-Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen, die Zellen mit mFrSR (800µl/Cryotube) resuspendiert und in ein Kryotube überführt. Das Kryotube wurde bei -80°C über Nacht gelagert und am folgenden Tag in den -196°C Stickstofftank umgelagert.

Das gefrorene Kryotube wurde in dem 37°C Wasserbad aufgetaut und mit FTDA ++ aufgefüllt. Durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 300G wurden die Zellen von dem Medium getrennt und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in FTDA ++ resuspendiert und in ein zuvor beschichtetes 6-Well überführt.

2.2.1.3. Produktion von Lentiviren

Für die Produktion der Lentiviren wurden LentiX-Zellen verwendet, die eine Passage <25 aufwiesen. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion gesplittet, sodass am Transfektionstag 50-80% der Petrischalenoberfläche, ca. $4,5 \times 10^6$ Zellen pro 94 mm bedeckt waren. Für die Lentiviren Produktion mit HEK-Zellen wurde pro transfizierte Schale ein Transfektionsmix mit 400 µl Opti-MEM, 12 µg Transfektionsvektor, 5,5µg pSPAX2-Vektor (GAG/Pol-Vektor), 2 µg pMD2-G Vektor (und 70 µl PEI) hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen wurde der Mix für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend mit 1 ml DMEM vermischt. Das alte HEK-Medium in der Petrischale wurde mit frischen 6,5 ml DMEM ersetzt und die obere Mischung wurde vorsichtig gleichmäßig in der Schale verteilt. Nach 4-stündiger Inkubation bei 37°C, 20% O₂ wurde das Medium erneut abgenommen, 1x mit PBS -/- gewaschen und 8 ml neues HEK-Medium hinzugefügt. Am 2. und 4. Tag der Transfektion wurde das Medium abgenommen, durch ein frisches Medium ersetzt (bzw. am 4. Tag die Schale verworfen), in einem 50 ml Falcon gesammelt und bei 4°C gelagert. Als Nächstes wurden die im Medium enthaltenen Viren aufkonzentriert.

2.2.1.4. **Lentivirus konzentrieren**

Für das Konzentrieren der Lentiviren wurde das gesammelte Medium bei 1500rpm 2 Minuten zentrifugiert, um enthaltene Zellfragmente abzupelletieren. Der Überstand wurde mit einem 0,45 µm Filter gefiltert anschließend in einem 50 ml Falcon gesammelt und mit einem Lenti-X Konzentrator im Verhältnis 1:3 (Konzentrator/Überstand) vermischt. Die Mischung wurde bei 4°C über Nacht inkubiert und am nächsten Tag 45 Minuten bei 1500 g/rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Zhong2 Medium resuspendiert. Für das Resuspendieren wurde pro gesammelter Petrischale 1 ml Zhong 2 Medium verwendet. Die Resuspension wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80 C gelagert.

2.2.1.5. **hiPS-Zellen Transfektion**

Ein Tag vor der Transfektion wurden die hiPS-Zellen mit Accutase oder TrypLE von der Well-Platte gelöst und in DEF-C Medium auf 12 Wells gesplittet. Am Tag der Transfektion wurde das Medium mit 2 ml Transfektionscocktail (DEF-C Medium + 8µg/ml Polybrene + X µl Virus) ersetzt und danach wurde die Platte bei 37°C, 1000G 30 Minuten lang zentrifugiert und anschließend 3,5 Stunden im Inkubator gelassen. Anschließend wurde 2-3x mit PBS -/- gewaschen und neues DEF-C Medium + 10µM ROCK 1:1000 hinzugegeben. Nach zwei bis drei Tagen wurden Zellen mit Puromycin selektiert.

2.2.1.6. **Organoid Transfektion**

Am 1. Tag der Transfektion wurden die zu transfizierenden Organoide in Wells einer unbeschichteten 96V Platte verteilt. Die Organoide wurden pro Well in einen 200µl Transfektionscocktail (Zhong2 Medium + x µL Viren + 8µg/ml Polybrene) gelegt. Wie bei der Spinfektion der hiPS-Zellen wurden die Organoide bei 37°C, 1000G 30 Minuten lang zentrifugiert und anschließend für 3,5 Stunden im Inkubator kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Organoide wiederum 2-3x

mit PBS-/- gewaschen und mit dem entsprechenden Differenzierungsmedium versorgt.

2.2.2. Retinadifferenzierung

Differenzierung Tag 1 bis Tag 16

N2 Medium:

- DMEM/F12 (1:1) + GlutaMAX™
- 24 nM Natrium Selenit
- 16 nM Progesteron
- 80 µg/ml Human Holotransferrin
- 20 µg/ml Human Insulin
- 88 µM Putrescin
- 1x Nonessential amino acids (100x)
- 1x Antibiotika-Antimykotika (100x)

Differenzierung Tag 16 bis 40

Zhong2 Medium/RDM Medium:

- DMEM/F12 (3:1) + GlutaMAX™: DMEM, high glucose (1:1)
- 1x B-27™ (w/o vitamin A)
- 1x Nonessential amino acids (100x)
- 1x Antibiotic-antimycotic (100x)

Differenzierung Tag 40 bis Tag 70

Zhong2 FBST / RDM FBST:

- 50% DMEM/F-12, GlutaMAX™ 50% DMEM
- 10% FBS (fetal bull serum)
- 2% B27 without Vit. A
- 1% NEAA Nonessential amino acids
- 1% Antibiotika/ Antimykotika
- 100µM Taurin

Differenzierung Tag 70 bis Tag 100

„1 RA“-Medium:

- „Zhong2 FBST“-Medium
- 1µM Retinsäure

Differenzierung Tag 100 bis Tag 190

„1/2 RA“-Medium:

- „Zhong2 FBST“-Medium
- „1/2 RA“-Medium

Die Zhong (2014) und Nakano (2012) Protokolle wurden als Vorlagen verwendet und für die Arbeit an einigen Stellen optimiert.

Embryonal Body Generierung/ hiPS-Zellen Dissociation

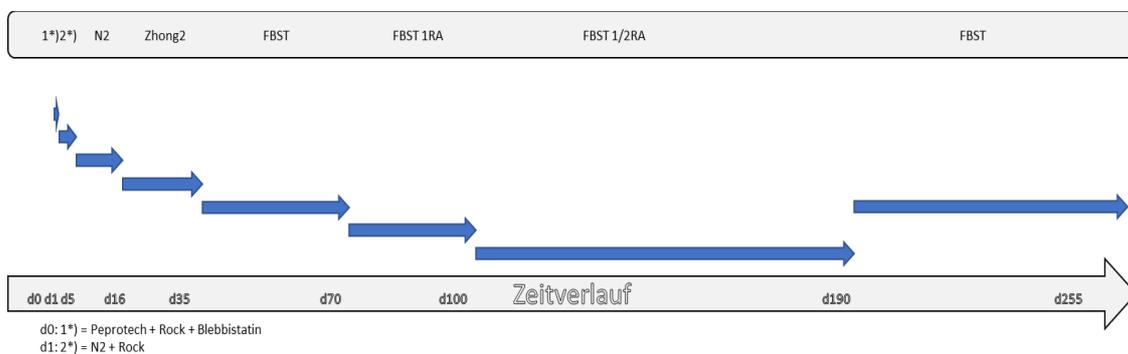


Abbildung 4: Embryonal Body Generierung/ hiPS-Zellen Dissoziation

Tag 0

Am Tag der Differenzierung wurden 3-4 80%-90% konfluente 6-Well (ca. 30.000 Zellen/ 96V Well) für eine 96V-Platte verwendet. Die Zellen wurden mit vorgewärmten 500µl TrypLE/Well nach 6-8 Minuten von der Platte abgelöst. Mit Zugabe von 1ml FTDA - - Medium (FTDA ohne Ergänzungen) wurde die enzymatische Wirkung von TrypLE gestoppt und in ein 15 ml Falcon überführt. Das Well wurde mit einem weiteren ml FTDA - - gespült und ebenfalls in das 15ml

Falcon gegeben. Nach 2 Minuten 1500rpm Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen, das Pellet mit dem Mix 10 ml Peprotech + 1mM Rock 1:000 + Blebbistatin 1:000 resuspendiert und mit der Multipipette 0,1 ml/96V Well verteilt. Durch das Zentrifugieren (1600rpm, 4 min) der 96V Well Platte wurden die Zellen zu Embryoid Bodies (EB) geformt. Die EB's wurden im Inkubator bei 37°C, 20% Sauerstoff kultiviert.

Tag 1

Die Medien der 96V-Wells wurden mit 100µl N2 + 1 mM Rock 1:1000 gewechselt.

Tag 4/5

Die Medien der 96V-Wells wurden mit 100µl N2 gewechselt.

Tag 7

Auf zuvor mit GFR-Matrigel beschichtete 6-Wells wurden 24-32 EB's/Well ausplattiert und im Inkubator bei 37°C und 20% Sauerstoff kultiviert.

Differenzierung Medium wechseln

Die Differenzierung wurde nach dem Schema des oberen Schaubildes täglich mit 1,5ml der angezeigten Medien gewechselt (am Wochenende mit 2ml).

Retinales Feld ablösen

Die Retinalen Felder, die sich um die EB's gebildet hatten, wurden am 24. Tag mit einer 10µl Pipettenspitze unter dem Mikroskop abgelöst, mit 10 ml Zhong 2 + Rock (1:1000) in eine 10 cm Petrischale überführt und über Nacht im 37°C-warmen Inkubator bei 20% Sauerstoff kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Organoide in einem 15 ml Falcon gesammelt, die Platte mit 5 ml PBS -/- gewaschen, der Überstand abpipettiert/verworfen und die Organoide wieder mit 10 ml Zhong 2 ohne Rock zurück in die Petrischale überführt.

Organoide Medium wechseln

Ab Tag 24 wurden die Organoiden 3-4x pro Woche gewechselt, indem 5 ml abgenommen und 6 ml frisches Medium aufgefüllt wurden. Ab dem 45. Tag wurden die Organoiden 2x pro Woche gewechselt.

Organoide selektieren und schneiden

Im Zeitraum von Tag 24 bis 60 wurden die Organoiden regelmäßig selektiert und geschnitten. Stellen, die bei den Organoiden keine retinalen Strukturen aufwiesen, wurden abgeschnitten und mit Organoiden, die keine retinalen Strukturen besaßen, abpipettiert und verworfen.

Organoide transfizieren

An Tag 80 wurden die Organoiden mit Viren, die die Plasmide die CMV-miR-ZsGreen und CMV-scr-ZsGreen Konstrukte enthielten, transfiziert. Siehe oben.

2.2.3. Immunfluoreszenz an Kryoschnitten

2.2.3.1. Kryo- Einbettung Vorbereitung/ Organoid Fixierung

An Tag 125, 190 und 255 wurden Transfizierte- und Kontroll-Organoiden in PBS +/- befüllten 6-Wellen, getrennt gesammelt. Die Organoiden wurden anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, mit PBS +/- einmal gewaschen und 20 Minuten lang bei Raumtemperatur mit einer 4% PFA + 10% Saccharose Lösung bedeckt.

Nach der Lösung wurden die Organoiden mit PBS +/- gewaschen, mit 30% Saccharose Lösung bedeckt und im Kühlschrank bei +4°C mindestens eine Nacht gelagert.

2.2.3.2. Organoid Einbettung

Für das Einbetten wurden 10 mm x 10 mm x 5 mm Tissue-Tek Kryomolds verwendet. Die Organoiden wurden ohne Saccharose Lösung in die Kryomolds

überführt und mit O.C.T. Masse bedeckt. In einem -80°C kalten mit Isopropanol befüllten Metallbehälter wurden die Kryomolds mit Organoiden eingefroren und in dem -80°C Gefrierschrank mindestens 1h gelagert.

2.2.3.3. Kryosektion

Vor dem Schneiden der Kryoschnitte wurde das Kryostat auf die Einstellungen Objekt -20°C; Messer -20°C; Schnittdicke fein: 14 µm gestellt, die Tissue-Tek Blöcke mit Organoiden auf -20°C erwärmt. Pro Objektträger wurden jeweils mindestens eine Kontrollprobe und eine behandelte Probe aufgetragen und bis zu den immunhistochemischen Färbungen bei -80°C gelagert.

2.2.4. Immunhistochemische Färbung

Durch die Immunhistochemie ist es möglich spezifisch Proteine und Bindungsepitope mit einem Immunfluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Die Technik basiert auf der Nutzung von Antikörpern, die sich spezifisch an Antigene und Epitope binden können, auch Erst-Antikörper genannt. Mittels eines zweiten Antikörpers, der sich gegen den konstanten, speziesspezifischen Fc-Teil des ersten Antikörpers richtet, werden die Epitop-Erst-Antikörper-Komplexe sichtbar gemacht. Dies geschieht, indem das Fluorophor des zweiten Antikörpers durch spezifische Anregungswellenlängen unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird. Durch die Nutzung von Erst-Antikörpern, die in verschiedenen Tieren produziert wurden, lassen sich mehrere Antikörper in einer Färbung kombinieren. Die hier benutzen Erst- und Fluorophor gekoppelten Zweit-Antikörper sind in Tabelle 8 aufgelistet und ersichtlich.

Die auf dem Super Frost Plus Objektträger platzierten Schnitte wurden mit einem hydrophoben Stift (Dako Pen, Dako) umfahren. Zum Abwaschen vom überschüssigen „Dako Pen“ und Rehydrieren der Schnitte, wurden die Objektträger für 5 min in ein mit PBS +/- befüllten Glasbehälter gestellt. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden wurde eine Blockierlösung bestehend

aus PBS +/- und 4% PFA / 20% Saccharose für 20 min auf die Objektträger gegeben. Für die Zell-Permeabilisierung wurde 0.2% Triton-X hinzugegeben. Erst-Antikörper wurden in die Blockierlösung über Nacht bei 4°C hinzugegeben.

Vor und nach der Verwendung der Zweit-Antikörperlösung wurde das Feld 3x 3 Minuten mit PBS +/- gewaschen. Die Zweit-Antikörper wurden in 1:2 verdünnter Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dem Waschen wurden die Schnitte getrocknet, mit dem Mounting Medium ProLong Anti-Fade + der Zellkernfärbesubstanz DAPI versetzt, mit einem Menzel-Deckglas abgedeckt und bei 4°C in einer Mappe gelagert. Fluoreszenzbilder wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 mot plus mit vier verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffkanälen 488, 568, 647 und AMCA und mit 20facher Vergrößerung untersucht. Mit der Software Zeiss AxioVision (Version 4.9) wurden die Bilder aufgenommen und verarbeitet.

2.2.5. Polymerasekettenreaktion und Agarose Gelelektrophorese

PCR Lösung für Ligation von Vektor und PCR Produkt

- 2 µl 10xT4 DNA ligase Buffer
- 0,2 µl T4 Ligase
- 20-100 ng Vektor DNA
- X µl H₂O
- 1:1 oder 5:1 Verhältnis von Insert DNA

Gesamtvolumen 20 µl

PCR Programm:

98°C	2 min	

98°C	10 sek	
55°C oder 60°C	15sek	30 Zyklen
68°C	1 min /kb	

68°C	5 min	
8°C	hold	

Nach durchlaufenem Programm wurde das PCR-Produkt, neben der mit Kontroll-DNA Ladder gefüllten Tasche, in eine Agarosegel-Tasche geladen. Bei dem Agarosegel wurden an die Seite der Taschen Anoden befestigt, an das andere Ende Kathoden und es wurde 120V Strom für 30-45 Minuten durch das Gel geleitet. Mit dem Computerprogramm und UV-Licht konnten die DNA-Banden sichtbar gemacht werden und anhand der Kontrollbanden konnte die Größe der Banden abgelesen werden. Die gewünschte DNA-Bande wurde ausgeschnitten und die DNA wurde mit dem Gel Extraktionskit aufgereinigt und zum Schluss mit 20 µl H₂O eluiert.

2.2.6. Restriktionsverdau und Ligation

Die gewonnenen PCR-Produkte sowie die jeweiligen Zielvektoren wurden anschließend mittels Restriktionsverdau geschnitten. Die jeweiligen Schnittstellen sind in Kapitel (siehe Kapitel 2.1.4.) ersichtlich.

Der allgemein Restriktionsverdauansatz lautete:

- <1µg DNA
- 1 µl pro Restriktionsenzym
- 2µl 10x Fast Digest Puffer
- X µl H₂O

Gesamtvolumen 20 µl

Anschließend wurden die geschnittenen PCR-Produkte mittels DNA-CleanUp Kit nach Anleitung aufgereinigt. Die Vektoren wurden über ein Gel (siehe Kapitel 2.2.5.) aufgereinigt.

2.2.6.1. E. Coli Elektro-Kompetente Zellen Transformation

Nachdem elektro-kompetente e.Coli Bakterien langsam auf Eis auftauten, wurden 1 µl/100ng Plasmidringe zu den Bakterien hinzugefügt. Die Finale Konzentration betrug dann 100ng/50 µl Zellen = 2 ng Plasmid/ µl Zellen. Der Mix wurde vorsichtig durchmengt und in vorgekühlte Küvetten überführt. Die Elektroporation wurde mit 1800V durchgeführt. Zügig nach der Elektroporation

wurden 800 µl Soc-Medium in die Küvette hinzugefügt, vermengt und zurück in das Eppendorfer Reaktionsgefäß geführt.

Die Bakterien wurden bei 37°C für 1 Stunde in den Shaker bei 500 rpm zum Inkubieren gelegt, danach wurden die Bakterien bei 5000rpm (2380g) für 3 Minuten zu einem Zell-Pellet herunterzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf einen kleinen Rest verworfen. Mit dem kleinen Überstand wurde das Pellet resuspendiert, auf einer Ampicillin Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.2.6.2. Extraktion von bakterieller Vektoren-DNA (Minipräp, Midipräp)

Für die Vermehrung und Extraktion von bakterieller Vektoren-DNA wurde entweder das NucleoBond® Xtra Midi / Maxi Kit oder das JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit (Genomed) nach Anleitung verwendet. Die dafür verwendeten Bakterien wurden über Nacht in LB-Medium + 50 µg/ml Ampicilin kultiviert. Für Minipräps wurde eine Menge von 1.5 ml Medium in 15 ml Reaktionsgefäßen verwendet, für Midipräps eine Menge von 200 ml in einem Erlenmeyerkolben. Die Bakterienkolonien wurde mittels einer 100 µl Pipettenspitze von einer Agarplatte abgekratzt.

2.2.6.3. Oligonukleotid-Annealing-Reaktion

Um ein doppelsträngiges Oligo-Nukleotid mit überhängenden 5'-Enden zu generieren wurde folgende Reaktion durchgeführt. Zunächst wurden beide Oligonukleotide in Wasser gelöst und je 11.25 µl jedes Oligos in einem Reaktionsgefäß zusammengebracht (Konzentration von 0.1 nmol/µl). Dazu wurde 2.5 µl eines 10x Annealing Puffers hinzugegeben (1 M NaCl, 100 mM Tris-HCl, pH=7.4). Die Mischung wurde in kochendes Wasser gelegt und dann über 2-3 h auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde 1 µl des Reaktionsgemisches 1:400 in 0.5x Annealing Puffers verdünnt. Diese konnte dann für weitere Reaktionen verwendet werden.

2.2.6.4. Klonierung der verwendeten Konstrukte

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Konstrukte verwendet

pLVX-CMV-miRNA-ZsGreen = CMV-miR

pLVX- CM- Scrambled-ZsGreen = CMV-scr

pLVX-IRBP- miRNA- mCherry = IRBP-miR

pLVX-IRBP- Scrambled-mCherry = IRBP-scr

Das miRNA Cluster 183/96/182-Konstrukte wurde aus dem Vektor AAV-miRNA183/96/182 kloniert, das von Botond Roska zur Verfügung gestellt wurde (Busskamp *et al.*). Das miRNA Fragment wurde über eine PCR und anschließender Agarose-Gelextraktion mit folgenden Primern extrahiert.

Vorwärts (mit **SPEI**-Schnittstelle) TAT **ACTAGT**

AAAGCTAGCGCTACCGGACTC

Rückwärts (mit **NOTI**- Schnittstelle) ATA **GCGGCCGC**

GGTGGCGACCGGTGGATC

Anschließend wurden die Enden des Konstrukts sowie der Akzeptor-Vektor (pLVX-CMV-zsGreen (Takara Bio)) mittels der oben genannten Methoden mit den Restriktionsenzymen SPEI und NOTI verdaut. Nach erfolgter Ligation des Inserts und des Akzeptor-Vektors wurde das Konstrukt über Elektroporation in Bakterien eingebracht. Positive Klone wurden gepickt, mit einer Übernachtskultur vermehrt und anschließend mittels Minipröp aufgereinigt. Die gewonnene DNA dann durch die Firma Eurofins (Luxemburg) sequenziert. Pro Konstrukt wurde dann ein positiver Klon mittels Midipröp vermehrt und für die Virusproduktion verwendet.

Für die Herstellung des Nonsense-Scrambled Konstrukt wurde aus der miRNA 183 mittels eines Online-Tools

(<http://www.invivogen.com/sirnowizard/construct3.php>) eine Nonsense-Variante generiert: 5' GAGGACATTCGGCATATTCTAT 3' .

Diese wurde dann über zwei Oligos synthetisiert. Die Oligos enthielten jeweils Schnittstellen bzw. Überhänge für eine Anlagerung an ein mit einem passenden Restriktionsenzym geschnittenen Vektor.

Scrambled-Oligonukleotide:

5'

**CGAATCGAGGACATTCGGCATATTCTATTCAAGAGATAGAATATGCCGAAT
GTCCTCTTTTGGGAAGC 3' Überhang/Schnittstelle von Bsp119i**

5'

**TCAGCTTCCAAAAGAGGACATTCGGCATATTCTATCTCTTGAATAGAATAT
GCCGAATGTCCTCGATT 3' Überhang/Schnittstelle von Bpu110II**

Die beiden Oligos wurden mittels Oligo-Annealing-Reaktionen aneinander angelagert (siehe Kapitel 2.2.6.) und mittels Ligation in einen Zielvektor eingebracht. Die nachfolgenden Schritte erfolgten wie bereits für das Konstrukt pLVX-CMV-miRNA-ZsGreen beschrieben.

Für die Herstellung der Konstrukte pLVX-IRBP-miRNA-mCherry bzw. pLVX-IRBP- Scrambled-mCherry wurde jeweils das miRNA Cluster 183/96/182 wie oben beschrieben in einen pLVX-EF1a-mCherry-N1 Vektor über die oben beschriebenen Schnittstellen eingebracht. Anschließend wurde der Promoter des IRBP- Gens aus dem Vektor pJG-IRBP-eGFP extrahiert, welcher von Thomas Reh und Deepak Lamba (Lamba et al., 2006) zur Verfügung gestellt wurde. Dafür wurde eine PCR Reaktion mit folgenden Primern Forward 5' Clai ATA ATCGAT TCAAATTTTATCGGG und Reverse 5' ECO47iii CTAA AGCGCT CCTGGTGGACAGAAGGTCT durchgeführt und in den Backbone Vektor pLVX-EF1 α -miRNA- mCherry-N1 bzw. pLVX-EF1 α -Scrambled-mCherry-N1 kloniert.

2.2.7. RNA Isolation

Die RNA Aufbereitung wurde entweder mit dem RNeasy® Mini Kit oder Micro Kit durchgeführt. Während der Aufbereitung wurde die beigelegte Kit-Anleitung

befolgt. Zur RNA Aufbereitung wurde jede Probe 2x mit PBS +/- gewaschen, resuspendiert und lysiert in 350µl RLT Puffer. Beim Homogenisieren wurden Shredder Columns von QiaShredder verwendet. Die RNA wurde bei Hinzugabe von Ethanol an die Säule gebunden. In weiteren Schritten wurden die Proben noch mal gewaschen, um Verunreinigungen (wie zum Beispiel Proteine) zu beseitigen. Zum Schluss wurde die RNA mit RNase-freiem Wasser in 1,5ml Reaktion Tuben eluiert.

2.2.8. miRNA Isolation und Quantifizierung mittels quantitativer Reverse-Transkriptase PCR

Prozessierte miRNA wurden mithilfe des mirVana miRNA-Isolation-Kits (Thermo Fisher Scientific) nach Befolgung der Anleitung aus Zellpelets isoliert. Für das Umschreiben in cDNA wurde das High-Capacity cDNA-Reverse-Transcription-Kit (Thermo Fisher) mit folgendem Reaktionsansatz gewählt:

- 0,15 µl dNTPs
- 1 µl Multiscripte RT Enzym
- 1,5 µl 10x RVT Buffer
- 0,19 µl RNase Inhibitor
- 4,16 µl H₂O
- 5 µl RNA (10ng)
- 3µl 5x RT Assay Mix der jeweiligen miRNA-Taqman Assays

Gesamtvolumen 15µl

Die cDNA Umschreibung erfolgte mittels des StepOne Plus Systems (Thermo Fisher) und folgenden Programms:

16°C	30 min

42°C	30 min

85°C 5 min

Anschließend wurde 1µl cDNA mit folgendem Reaktionsansatz in einer quantitativen PCR verwendet (StepOne Plus System):

- 1 µl 20x miRNA Taqman Assays
- 10µl 10x Universal PCR Master Mix II (Thermo Fisher)
- 8 µl H₂O

Gesamtvolumen 20µl

Das Programm lautete:

95°C 10 min

 95°C 1 sek 30 Zyklen

 60°C 1 min

Für die Quantifizierung der relativen miRNA Menge wurde die Software StepOne v2.3 verwendet. Damit wurde der Cycle threshold (CT) ermittelt, welcher den Beginn des exponentiellen Anstiegens der DNA darstellt. Mit der Formel $2^{(CT(\text{Zielgen})/CT(\text{Referenzgen}))}$ wurde die relative Genexpression ermittelt. Als bona fide unveränderte Referenz miRNA wurde die miRNA320 gewählt.

2.2.9. Quantitative Reverse Transkriptase PCR

Um Gen- und miRNA Expression zu ermitteln wurde eine quantitative Reverse Transkriptase PCR durchgeführt. Mittels des StepOne Plus Systems (Thermo Fisher Sc) wurde die RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben und mittels PCR Reaktion vervielfältigt (OneStep Reaktion). Quantifizierung der DNA Menge wurde mittels des DNA-interkalierenden Farbstoffs SYBR Green nach jedem PCR Zyklus ermittelt. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 5 aufgelistet und wurden entweder nach Anweisung des Herstellers (QuantiTect Primer, Qiagen) oder in Konzentration 10nm eingesetzt. Als Referenzgene wurden HMBS und

GAPDH verwendet. Zur Überprüfung der resultierenden PCR-Fragmente wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, welche die Anzahl der entstandenen PCR-Produkte ermittelte. Reaktionen bei denen mehr als ein Produkt entstanden war, wurden verworfen. Für die Quantifizierung der relativen RNA-Menge wurde die Software StepOne v2.3 verwendet. Damit wurde der CT ermittelt, welcher den Beginn des exponentiellen Anstiegs der DNA darstellt. Mit der Formel $2^{(CT(\text{Zielgen})/CT(\text{Referenzgen}))}$ wurde die relative Genexpression ermittelt.

Das verwendete qPCR- Programm:

50°C	10 min	RT Reaktion

95°C	5 min	Denaturierung
95°C	1 sek	Denaturierung 40 Zyklen
60°C	30 sek	Primer Annealing und Elongation 40 Zyklen

PCR wurde wie oben beschrieben mit dem StepOne Gerät durchgeführt. Es wurde das QuantiFast SYBR Green RT-PCR Kit anhand des beiliegenden Protokolls verwendet. Die relative Genexpression wurde anhand des Verhältnisses zwischen Zielgen und des Housekeepinggens GAPDH oder HMBS errechnet.

2.2.10. Calcium Imaging

Calcium Imaging wurde von Rainer Hawlik, Kevin Achberger und Dr. Wadood Haq (Institut für Augenheilkunde, Tübingen) durchgeführt. Im ersten Schritt wurden die RO's mit Fura-2-AM (0.27 μM) beladen und für 35 Minuten bei 37°C inkubiert. Im zweiten Schritt wurden die RO's mit DMEM/F12+GlutaMAX™ gewaschen und zum Aufnehmen in eine Mikroskopkammer gelegt. Für die Aufnahmen wurde ein Fluoreszenzmikroskop verwendet. Bei der Aufnahme wurde die Fura-2-AM Fluoreszenz der Photorezeptoren bei 10 Hz ($\lambda_{\text{exc}} = 340$ and 380 nm; 30 ms exposure time, 8-pixel binning) mithilfe der VisiView Software

ermittelt. Es wurde eine LED (Thomsen LED-5-14000W/75°) Lampe für die Belichtung verwendet. Die Lichtintensität betrug 5.3 Candela (gemessen von USB400-UV-VIS-ES, OceanOptics, Deutschland), die Dauer der Belichtung betrug 5 Sekunden (5 Reize, 120 Sekunden pro Reiz bei der Kontrollaufnahme und 60 Sekunden Reizintervall). I/O-Box von dem Multi-Channel System wurde für das Aufnehmen des Lichtstimulationsprotokoll verwendet. Die Bilder wurden mit den Wellenlängen von F340 und F380 erzeugt und mit dem Bildverarbeitungsprogramm ImageJ verarbeitet (ImageJ, RatioPlus, (<https://imagej.nih.gov>)).

Aktivitätendetektion:

Bei den Calcium Imaging Aufnahmen wurden die 170x128 Pixel Bilder in 10x10pixel-bins aufgeteilt. In jedem 10x10µm Quadrat befanden sich ungefähr 192 „Zellen“. Für jede Zelle wurde auf mehreren Ebenen die Calcium-Konzentration (X_1, \dots, X_m) gemessen. Nach dem Lichtreiz ($Resp(stim)_i$) wurde die Calcium-Konzentrationen erneut gemessen. Die Differenz ($X_n - X_{n-3}$) zwischen diesen zwei Werten wurde während des Reizes sowie eine Sekunde nach dem Reiz gemessen. Eine Zelle galt als positiv, wenn die lichtreizabhängige Antwort ($Resp(stim)_i$) die Schwelle (Schwelle = bedeutet ($X_c - X_{c-1}$)) übertraf. Zur Kontrolle wurden noch 5 Pre-Stimulation-Kontroll-Aufnahmen von der Calcium-Konzentration gemacht. In der „Heat-Map“ wurden die Zellaktivitäten sichtbar gemacht. Dafür wurde diese Gleichung berücksichtigt: $Resp(all)_i \geq Schwelle(all)$, wenn $Resp(all)_i = (X_n - X_{n-3})$ und $Schwelle(all) =$ bedeutet ($X_n - X_{n-1}$).

Für die Statistik wurden die Durchschnittswerte einer Zelle bei den 5 Lichtreizen und den 5 Kontrollzeitpunkten berechnet und evaluiert.

2.2.11. Transmissionselektronenmikroskop

Das Elektronenmikroskop wurde von Rainer Hawlik, Kevin Achberger und Sylvia Bolz (Institut für Augenheilkunde, Tübingen) durchgeführt. An Tag 190 wurden RO's für die Elektronenmikroskop-Analyse selektiert, in einem Karnovsky Puffer bestehend aus 2,5% Glutaraldehyd, 2% Paraformaldehyd, 0,1M Natrium

Cacodylate Puffer, pH7,4 fixiert und über Nacht bei 4°C gelagert. Im nächsten Schritt wurden die Proben 3x mit 0,1M Natrium Cacodylate Puffer (pH7,4) 30 Minuten lang gewaschen und anschließend in 1% OsO₄ für 90 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Im folgenden Schritt wurden die RO's mittels 50% Ethanol dehydriert, und mit 6% Uranyl Acetat gegengefärbt und mit 70% Ethanol gelöst. Danach wurde das Gewebe mit 80% und 96% Ethanol für 30 Minuten pro Durchgang behandelt. Am Schluss wurden nochmal 3 Durchgänge à 10 Minuten mit 100% Ethanol durchgeführt. Anschließend wurden die dehydrierten Proben in einem 2:1 und 1:1 Mix aus Propylene Oxide und Araldite® Resin für jeweils eine Stunde auf einem Shaker inkubiert. Die Organoide wurden über Nacht in pure Araldite® gelegt und bei 60°C polymerisiert. Die in Araldite® gelagerten Organoide wurden in frischem Harz in Block Molds eingebettet, 12 Stunden bei 60°C aufbewahrt und anschließend nochmal für 2 Stunden bei 90°C. Ultradünne Proben (50nm) wurden mit einem Reichert Ultracut S geschnitten und mit einem Copper Grid gesammelt und mit Reynolds Lead Citrate eine Gegenfärbung durchgeführt. Die Proben wurden mit einem Zeiss EM 900 Transmission Elektron Mikroskop ausgestattet mit einem 2kx2k CCD Kamera analysiert.

2.2.12. Statistik

Um auf statistische Signifikanz zu testen wurde der Student's T-Test verwendet, um die Mittelwerte der jeweiligen Gruppen miteinander zu vergleichen. Die jeweiligen p-Values sind in den Abbildungen angegeben. Die Signifikanzen werden anhand von p-Werten dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Überexpression des RNA Cluster 183/96/182 unter einem konstitutiven CMV Promoter

Um eine Überexpression des miRNA Cluster 183/96/182 zu erreichen wurde es aus einem Adeno-assoziierten Virus (AAV)-Plasmid (REFERenz Buskamp) in ein lentivirales Plasmidkonstrukt umklontiert (Plvx-CMV-ZsGreen). Ferner beinhaltet dieses Konstrukt ein C-terminales ZsGreen zur Expressionskontrolle (Abb. 5). Als Überexpressionskontrolle wurde aus der miRNA-Sequenz von 182 eine scrambled-Variante generiert (CMV-scr, siehe M+M).

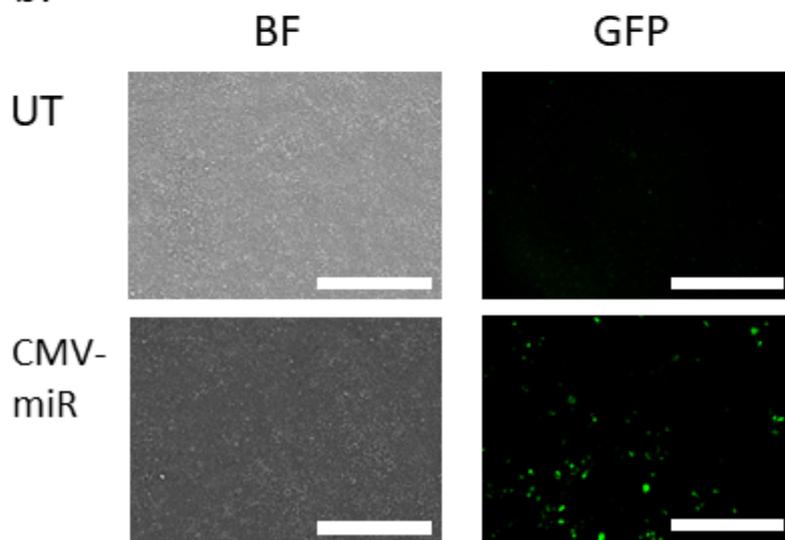
Im ersten Schritt wurden HEK293T-Zellen transfiziert, um die Expression des Konstrukts zu überprüfen (Abb. 5b). Im Fluoreszenzmikroskop zeigten sich hierbei eindeutig positiv transfizierte Zellen. Im zweiten Schritt wurde die Überexpression der miRNA183, miRNA96 und miRNA182 auf mRNA Ebene überprüft (Abb. 5c). Für alle 3 miRNA des Clusters konnte hierbei eine eindeutige und signifikante Überexpression nachgewiesen werden. Da es sich hierbei um eine unreife (immature) miRNA Variante handelt, die eine weitere Prozessierung über den Drosha/DGCR8 Komplex erhält, wurde im Folgenden auch die Expression der reifen prozessierten miRNA Konstrukte mittels Taqman Assay nachgewiesen (siehe Kapitel 2.2.8.). Auch hierbei konnte eine deutliche (miRNA183 15,79x, miRNA96 13x- und miRNA182 48x-fach erhöht) und signifikante Überexpression aller drei miRNAs gezeigt werden (Abb. 5d). Als Referenz wurde hier die miRNA 320 verwendet, die bona fide eine unveränderte Expression in HEK293T Zellen zeigen sollte.

Somit konnte in HEK293T Zellen bestätigt werden, dass eine Überexpression des Konstrukts erreicht werden konnte und auch dass für alle drei miRNA eine reife, prozessierte Variante entsteht. Im Folgenden soll deshalb bei nachweisbarer mRNA Expression der miRNA von einer miRNA-Reifung ausgegangen werden.

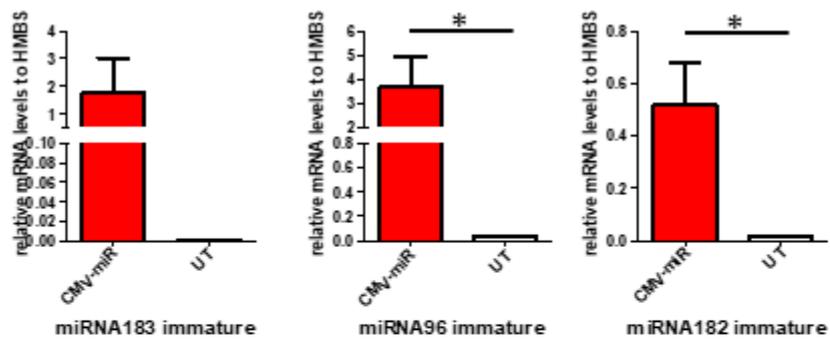
a.



b.



c.



d.

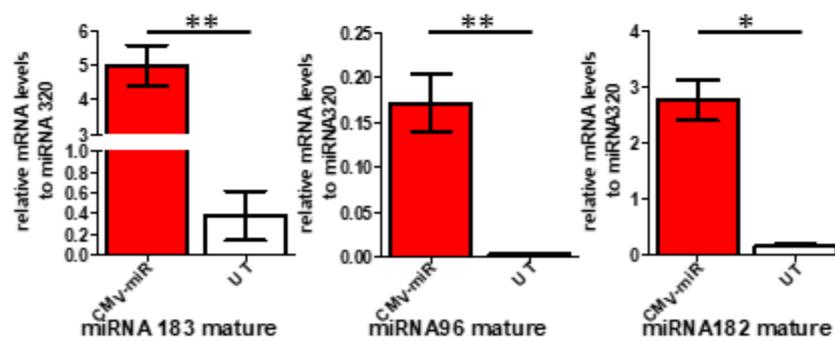


Abbildung 5: Transfektion und Nachweis von HEK-Zellen mit dem miRNA Cluster 183/96/182

- (a) Schematische Darstellung der lentiviralen Konstrukte.
 - (b) Im Vergleich untransfizierte (UT) und transfizierte HEK293T-Zellen (CMV-miR).
 - (c) Nachweis des miRNA 183, 96 und 182 auf mRNA-Level (unreife miRNA = Immature) in HEK293T-Zellen. Verglichen wurden untransfizierte mit CMV-miR transfizierte Zellen. Die Werte wurden auf das Housekeeping Gen *HMBS* normiert.
 - (d) Nachweis des miRNA Levels für miRNA 183, 96 und 182 in HEK293T-Zellen. Verglichen wurden untransfizierte mit CMV-miR transfizierte Zellen. Die Werte wurden auf die Expression von miRNA320 normiert.
- (c) – (d) Fehlerbalken: S.E.M. $p < 0.05 = *$; $p < 0.01 = **$; $p < 0.001 = ***$.
Skalierung: (b) 1 mm.

3.2. Transfektion von retinalen Organoiden mit CMV-miRNA-ZsGreen während der Differentiation

Um den Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf die Entwicklung der retinalen Organoiden und auf die Reifung der Photorezeptoren zu untersuchen, wurde das miRNA Cluster zunächst unter einem konstitutiven Promoter (CMV) lentiviral in retinalen Organoiden an Tag 80 transfiziert (CMV-miR). Zu diesem Zeitpunkt kann bereits eine große Anzahl Photorezeptoren in den Organoiden gefunden werden, ohne dass bereits eine ausgeprägte Photorezeptor-Reifung stattgefunden hat (Daten nicht gezeigt). Um die Effizienz dieser Transfektion zu überprüfen, wurde das n-Terminal gelegene ZsGreen mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 6a-c) und Kryosektion mit anschließender Immunfärbung nachgewiesen (Abb. 6b-c). Für die Immunfärbung wurde ein ZsGreen-gerichteter Antikörper mit dem ZsGreen-Fluoreszenz-Signal verglichen (Abb. 6b). Im Vergleich zur untransfizierten Variante (UT) wurde in den CMV-miR transfizierten Organoiden ein deutliches Fluoreszenz-Signal ermittelt, welches sich ebenfalls mit dem ZsGreen-Antikörper anfärben ließ (Abb. 6b). Ein Vergleich von CMV-miR und CMV-scr ergab für beide ein Fluoreszenz-Signal, welches sich ebenso mit dem ZsGreen-Antikörper anfärben ließ (Abb. 6c).

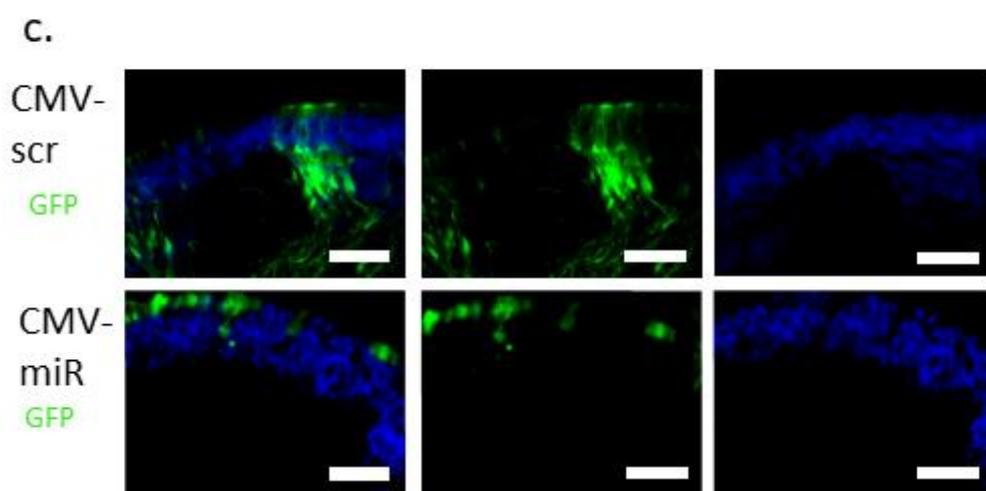
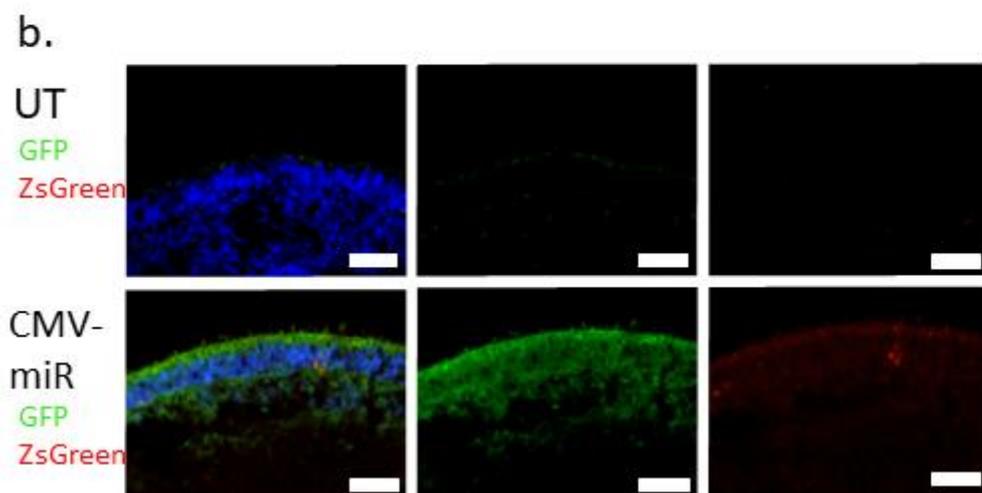
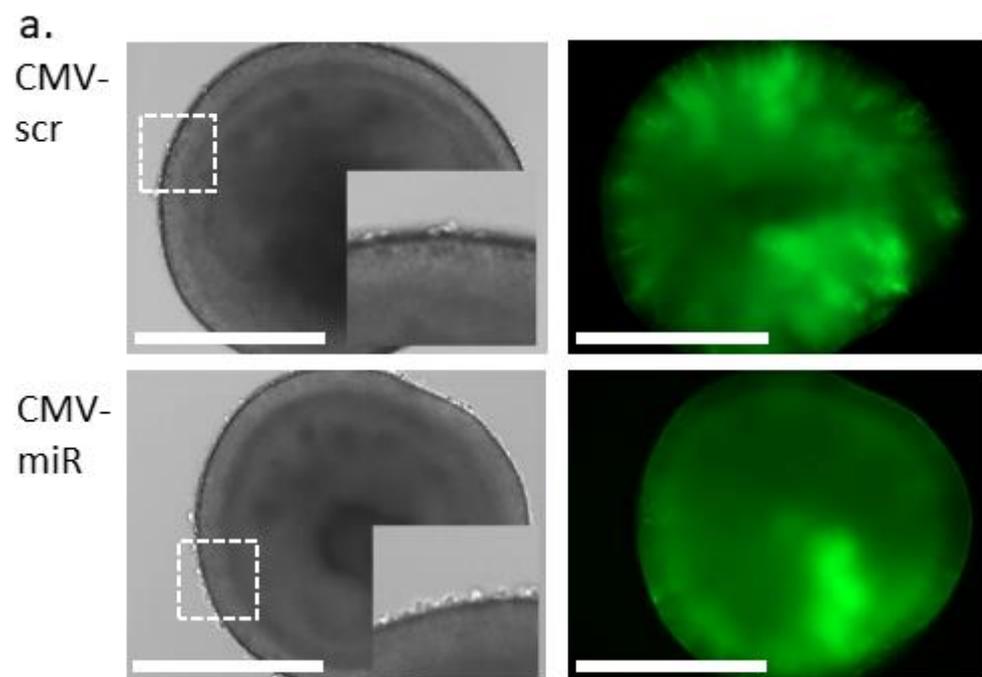


Abbildung 6: untransfizierter Organoide im Vergleich an Tag 80 mit CMV-miR transfizierten Organoiden

- (a) Im Vergleich CMV-scr und CMV-miR- transfizierte Organoide an Tag 190. Brightfieldbilder links; ZsGreen-rechts. Gepunktete Rechtecke sind im Bild vergrößert dargestellt.
- (b) Immunfluoreszenzbilder von untransfizierten und CMV-miR transfizierten Organoiden an Tag 190, welche mit einem zsGreen-Antikörper angefärbt wurden grün = ZsGreen; rot = ZsGreen-Antikörper.
- (c) Immunfluoreszenzbilder von CMV-scr und CMV-miR transfizierten Organoiden an Tag 190, grün = ZsGreen.
- Skalierung: (a) 50 μ m. (b) – (c) 50 μ m. Blau = DAPI

3.3. Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf die Photorezeptorentwicklung anhand des Pan-Photorezeptormarkers Recoverin

Um zu beschreiben wie die Photorezeptorpopulation sich quantitativ und morphologisch unter Einfluss des miRNA Clusters verändert, wurde der Marker Recoverin, welcher bereits in vergangenen Publikationen als Pan-Photorezeptormarker genutzt wurde (Zhong et al., 2014), verwendet. Immunfärbungen an Tag 190 ergaben die Darstellung der Photorezeptor-Schicht (äußere nukleare Schicht) retinaler Organoide (Abb. 7a-b). In einer initialen Versuchsreihe wurden RO verglichen, die entweder untransfiziert waren oder das CMV-miR Konstrukt trugen (Abb. 7a). Beim Vergleich der beiden Bedingungen zeigten sich keine eindeutigen Änderungen der Zellpopulationen: In beiden Fällen waren die Photorezeptoren am äußeren Teil des Organoids angeordnet und bildeten eine überwiegend exklusive Schicht.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden RO miteinander verglichen, die entweder das CMV-scr oder das CMV-miR Konstrukt trugen (Abb. 7b). Hier zeigte sich wie im ersten Versuch bei beiden Bedingungen keine eindeutigen Änderungen der Zellpopulationen.

Zusammenfassend deutet dies darauf hin, dass das miRNA-Konstrukt in den beiden durchgeführten Versuchsreihen keinen Einfluss auf die Anzahl oder Lokalisation der Photorezeptoren hatte.

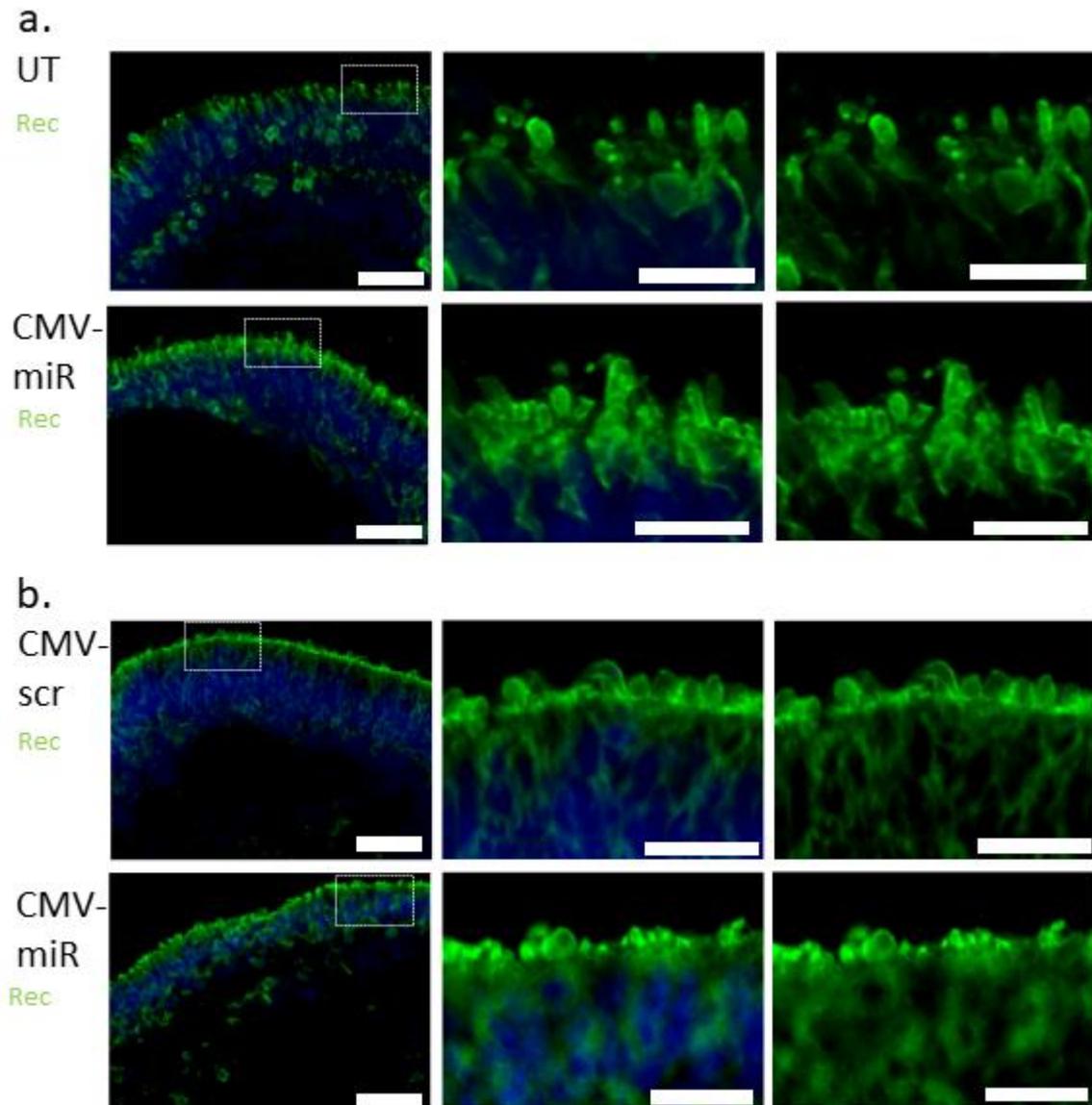


Abbildung 7: Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf die Photorezeptorentwicklung anhand des Pan-Photorezeptormarkers Recoverin

(a) Untransfizierte und mit CMV-miR Konstrukt transfizierte Organoide an Tag 190 mit dem Photorezeptormarker Recoverin (grün) gefärbt. Die links gepunkteten Rechtecke spiegeln die vergrößerten Bereiche rechts wider.

(b) Im Vergleich mit CMV-scr und CMV-miRNA transfizierte Organoide an Tag 190 mit dem Photorezeptormarker Recoverin (grün) angefärbt. Die links gepunkteten Rechtecke spiegeln die vergrößerten Bereiche rechts wider.

Skalierung: (a)–(b) linkes Bild 50µm, vergrößerte Bilder 20µm. blau=DAPI.

3.4. Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf die Stäbchenentwicklung

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Expression des untersuchten miRNA Clusters einen Einfluss auf die Differenzierung und Reifung von Stäbchen-Photorezeptoren hat, wurden 190 Tage alte Organoide mittels Rhodopsin- Immunofärbung analysiert. Hier zeigte sich im Vergleich von untransfizierten und miRNA Cluster überexpressierten Organoiden (Abb. 8a) ein unveränderter Anteil an Rhodopsin-positiven Stäbchen. Die dargestellten Rhodopsin-positiven Zellen zeigten die typische Photorezeptor-Morphologie mit apikalen Segmentbildung und teilweise sichtbaren basalen Endfüßchen (Abb. 8a-b). In der miR-transfizierten RO war diese Struktur und Polarisierung der Zellen unverändert. Dasselbe Resultat zeigte sich ebenfalls beim Vergleich der miR-Überexpression mit CMV-Scr (Abb. 8b). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das miRNA-Konstrukt in der durchgeführten Versuchsreihe keinen Einfluss auf die Anzahl bzw. Lokalisation der Stäbchen hatte.

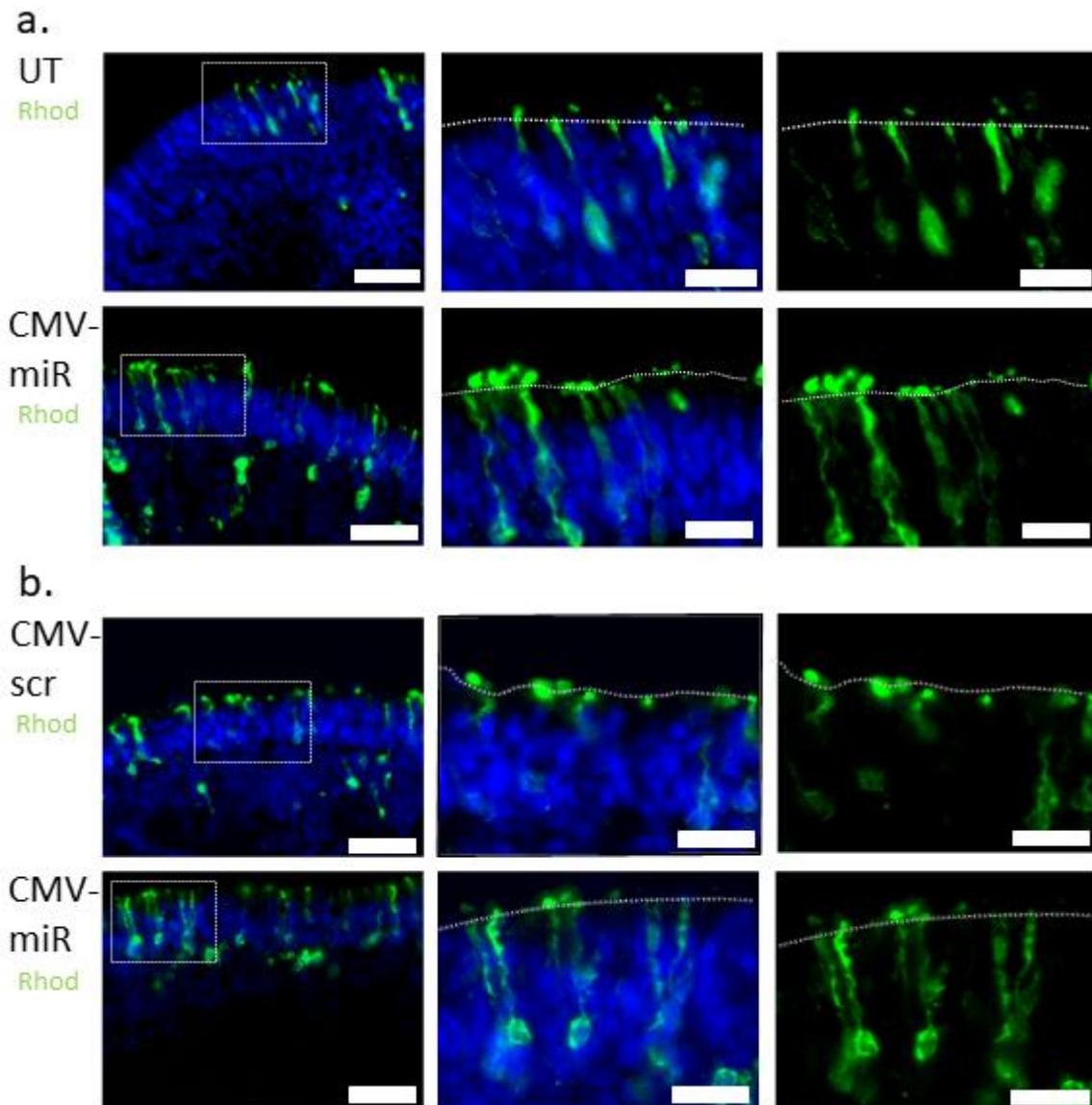


Abbildung 8: allg. Photorezeptornachweis mit dem Photorezeptormarker Rhodopsin

- (a) Untransfizierte und mit CMV-miR Konstrukt transfizierte Organoide an Tag 190 mit dem Photorezeptormarker Rhodopsin (grün) gefärbt
- (b) CMV-scr und CMV-miR transfizierte Organoide an Tag 190 mit dem Photorezeptormarker Rhodopsin (grün) angefärbt.
- (c) Die eingezeichneten gestrichelten Linien repräsentieren die Höhe der SLE und die links gepunkteten Rechtecke spiegeln die vergrößerten Bereiche rechts wider. Skalierung: (a) – (b) linkes Bild 50µm, vergrößerte Bilder 20µm. Blau=DAPI.

3.5. Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf die Zapfen-Photorezeptorentwicklung anhand des Zapfen-Photorezeptormarkers Arrestin 3

Um selektiv die Entwicklung der Zapfen, vor allem unter den quantitativen und morphologischen Aspekten, während der retinalen Organoid- Reifung unter dem Effekt des miRNA Clusters zeigen zu können, wurden die Organoide an Tag 190 mit dem Zapfen-Marker Arrestin-3 immunhistochemisch gefärbt. Arrestin-3 Färbungen an Tag 190 zeigen, ähnlich zum Photorezeptormarker Recoverin, die Photorezeptorschicht (äußere nukleare Schicht) retinaler Organoide (Abb. 9a-b). In der initialen Versuchsreihe wurden RO verglichen, die entweder untransfiziert waren oder das CMV-miR Konstrukt trugen (Abb. 9a). Beim Vergleich der beiden Bedingungen zeigte sich keine eindeutige Änderung der Zellpopulationen: In beiden Fällen waren die Photorezeptoren am äußeren Rand des Organoids angeordnet und bildeten eine exklusive Schicht. In der Morphologie zeigen die RO mit dem CMV-miR Konstrukt ebenfalls eine normale Photorezeptorerscheinung. Die RO, die das CMV-miR Konstrukt enthielten, zeigten ein stärkeres Arrestin Signal, welches bis in die apikalen Spitzen der Photorezeptoren deutlich zu sehen war.

In der zweiten Versuchsreihe wurden RO verglichen, die entweder das CMV-scr Konstrukt oder das CMV-miR Konstrukt trugen (Abb. 9b.) Beim Vergleich der beiden Bedingungen zeigte sich ebenso keine eindeutige Änderung der Zellpopulationen: In beiden Fällen waren die Photorezeptoren am äußeren Rand des Organoids angeordnet und bildeten eine exklusive Schicht. In der Morphologie zeigten die RO mit dem CMV-miR Konstrukt ein helleres, kräftigeres und größeres Signal auf Höhe der Segmente, weshalb die Segmente größer erschienen. Die RO mit dem CMV-miR Konstrukt zeigten ein stärkeres Arrestin-3 Signal, welches bis in die apikalen Spitzen der Photorezeptoren deutlich zu sehen war.

Zusammengefasst scheint die Zellzahl der Zapfen die Überexpression des miRNA Cluster 183/96/182 nicht beeinflusst zu haben. Die Intensität der Arrestin-3 Färbung in den Zellen scheint jedoch erhöht zu sein.

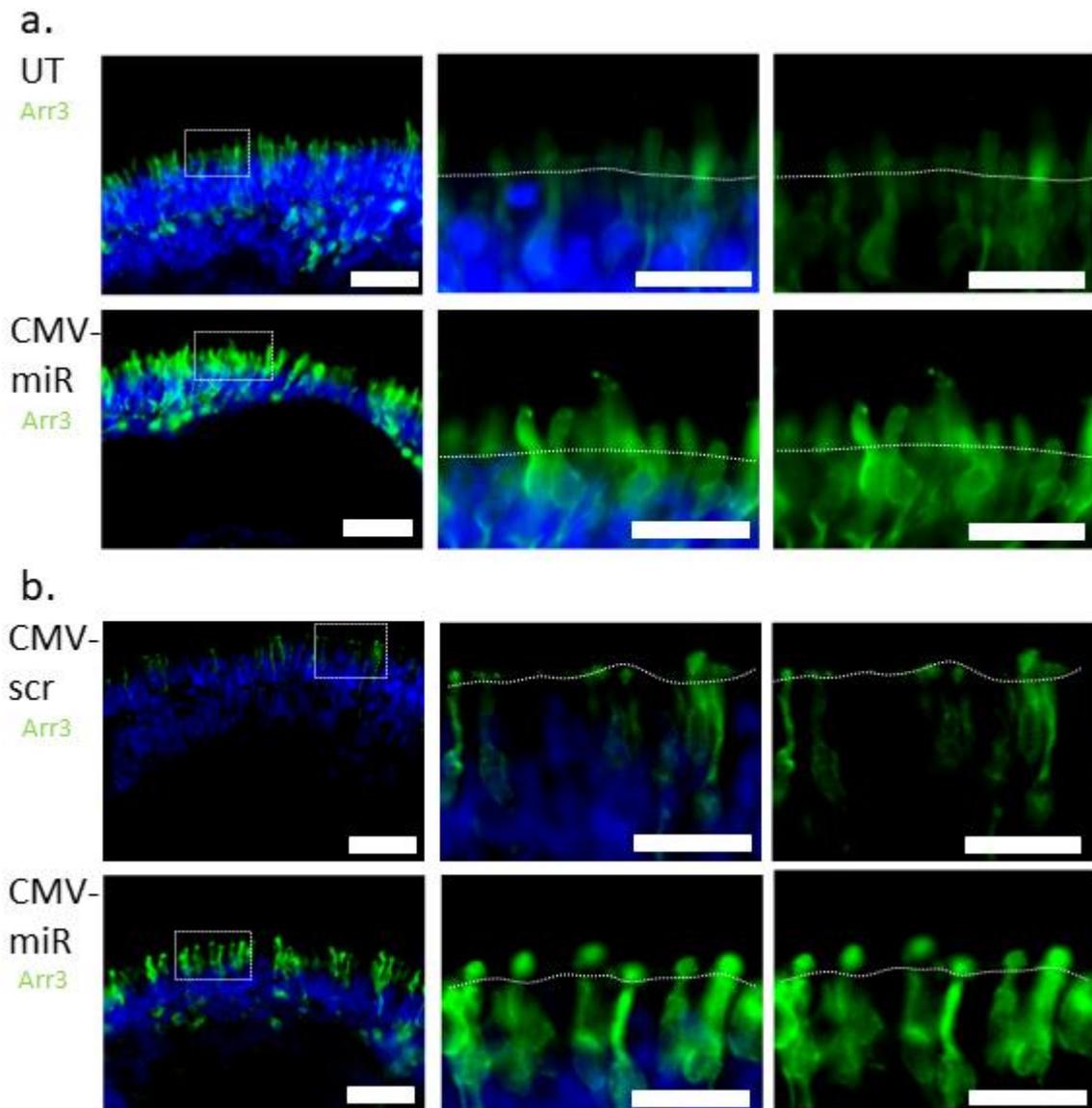


Abbildung 9: Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf die Zapfen-Photorezeptorentwicklung anhand des Zapfen-Photorezeptormarkers Arrestin 3

- (a) Untransfizierte und mit CMV-miR Konstrukt transfizierte Organoide an Tag 190 mit dem Photorezeptormarker Arrestin3 (grün) gefärbt.
- (b) Mit CMV-scr. und CMV-miRNA transfizierte Organoide an Tag 190 mit dem Photorezeptormarker Arrestin3 (grün) angefärbt. Die eingezeichneten Linien ist auf Höhe der SLE und die links gepunkteten Rechtecke spiegeln die vergrößerten Bereiche rechts wider.
- (c) Skalierung: (a) – (b) linkes Bild 50µm, vergrößerte Bilder 20µm. Blau=DAPI.

3.6. Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf die Außensegmententwicklung anhand des Filamentproteinmarkers Peripherin

Zur Überprüfung, ob die erhöhte Expression des untersuchten miRNA Clusters einen Einfluss auf die Differenzierung und Reifung der AS, der Photorezeptoren, hat, wurden 190 Tage alte Organoide mittels Immunfärbung analysiert. Die äußere Membran der Photorezeptoren wurden mit dem Oberflächenmarker PNA Lectin sichtbar gemacht, um die Lokalisation der AS im Verhältnis zu den Photorezeptoren darstellen zu können.

Hier zeigte sich im Vergleich zwischen den untransfizierten und transfizierten Organoiden, welche das miRNA Cluster überexprimierten, ein unveränderter Anteil an Lectin-positiven Photorezeptoroberflächen (Abb. 9a). Die dargestellten Lectin-positiven Zellen zeigten in beiden Bedingungen eine ähnliche Anzahl und typische Photorezeptor Morphologie mit apikalen Segmentbildung (Abb. 10a-b). Im Vergleich dieser Bedingungen konnte man aber einen Unterschied der Lokalisation der Peripherin-2-positiven Signale sehen. In den untransfizierten RO zeigten sich die Peripherin-positiven Signale innerhalb des Oberflächenmarkers der Photorezeptoren und in den miR-überexprimierten RO zeigten sich die Peripherin-2 Signale an den apikalen Spitzen der Photorezeptoren. In den CMV-miR Konstrukt RO konnte man einmal eine höhere Anzahl der positiven-Peripherin-2 Signale sehen und zum anderen zeigten diese auch einen größeren Durchmesser als in den untransfizierten RO.

In der zweiten Versuchsreihe mit CMV-scr und CMV-miR transfizierten RO zeigten sich Unterschiede bei dem Außensegmentoberflächenmarker PNA Lectin. In der CMV-scr RO Bedingung zeigten sich die Signale eher auf Höhe des Oberflächenmarkers PNA Lectin und in der CMV-miR RO Bedingung zeigten sich die Peripherin Signale auf Höhe der apikalen Spitzen der Photorezeptoren. In den CMV-miR RO konnte eine höhere Anzahl der positiven-Peripherin-2 Signale beobachtet werden.

Somit lässt sich folgern, dass das miRNA-183/96/182 in den durchgeführten Experimenten keinen Einfluss auf die Morphologie und die Anzahl der Photorezeptorbildung hatte. Allerdings zeigte sich eine erhöhte Anzahl und apikale Lokalisation des Außensegmentproteins Peripherin-2, was auf eine fortgeschrittene Reifung der AS hindeuten könnte.

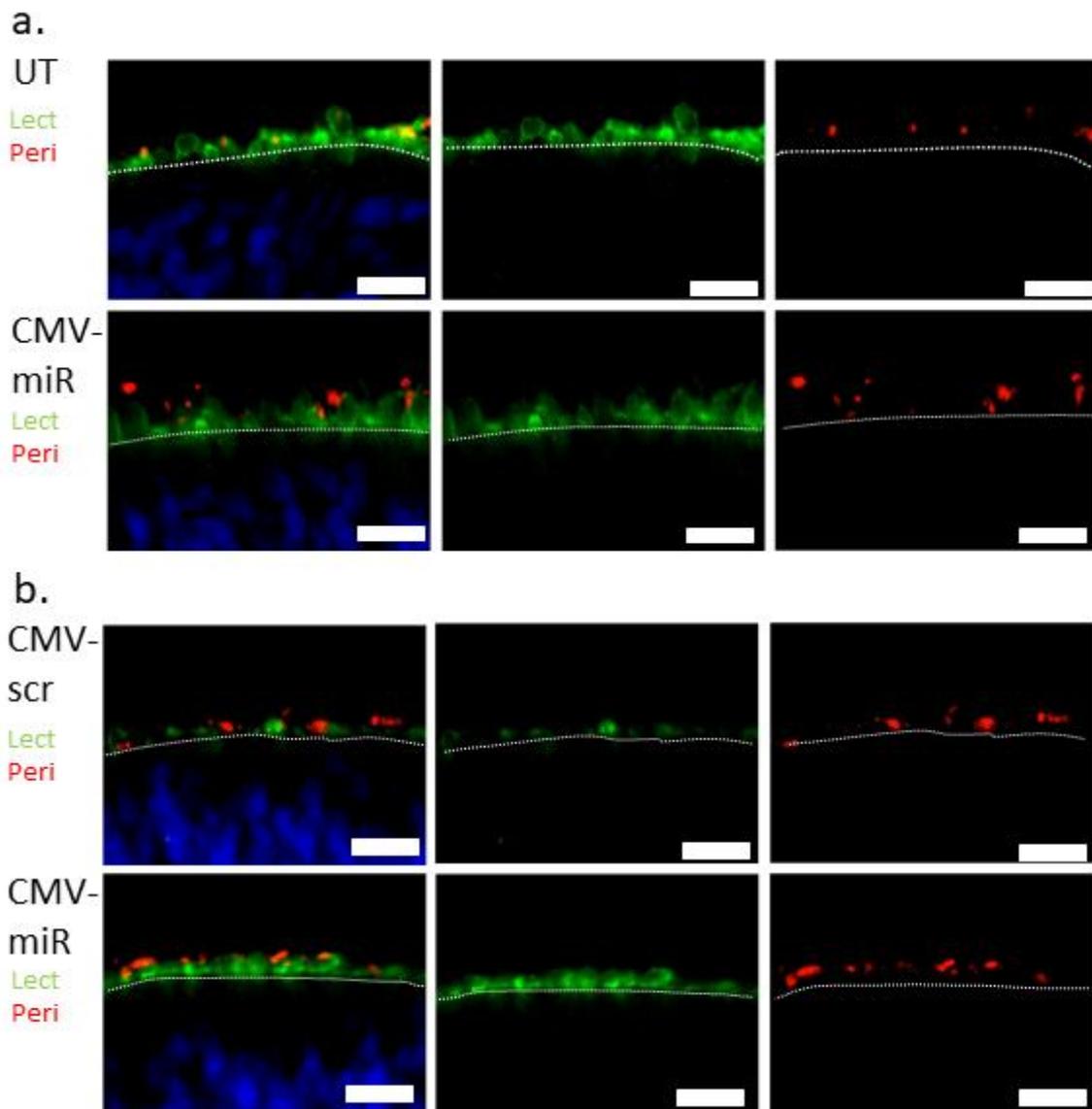


Abbildung 10: Spezifischer Segmentnachweis mit dem Segmentenmarker Lectin und Außensegmentfilamentmarker Peripherin

- (a) Untransfizierte und mit CMV-miR Konstrukt transfizierte Organoide an Tag 190 mit den Segmentenmarker Lectin (grün) und Peripherin (rot) gefärbt.
- (b) Mit CMV-scr. und CMV-miRNA transfizierte Organoide an Tag 190 mit den Segmentenmarker Lectin (grün) und Peripherin (rot) angefärbt. Die eingezeichnete Linie ist auf Höhe der SLE.
- (c) Skalierung: (a) – (b) linkes Bild 50µm. Blau=DAPI.

3.7. Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf das Phototransduktions Enzym cGMP Phosphodiesterase PDE6B

Ein weiterer Aspekt zur Überprüfung, ob das miRNA Cluster 183/96/182 einen Einfluss auf die Reifung und die funktionelle Entwicklung der AS hat, wurde bei Organoiden mittels Immunfärbung an Tag 190 das Phototransduktionsenzym cGMP Phosphodiesterase PDE6B analysiert (Abb.11).

Das Enzym spielt in der Phototransduktionskaskade, welche in den AS ablaufen, eine wichtige Rolle und kann einen Hinweis auf die Funktionalität der AS liefern. In der ersten Versuchsreihe, in der untransfizierte RO und CMV-miR RO verglichen wurden, zeigte sich in beiden Konditionen zu diesem Zeitpunkt eine typische Reifeentwicklung von RO. In diesem Versuch konnte in den CMV-miR ROs eine leicht erhöhte Anzahl von PDE6B-positiven Signalen gezeigt werden.

In der zweiten Versuchsreihe, in der CMV-scr und CMV-miR Konstrukt transfizierte RO miteinander verglichen wurden, zeigte sich ein ähnliches Bild wie in der initialen Versuchsreihe, nur dass hier in den CMV-scr-positiven RO eine vergleichbare Anzahl von PDE6B Signalen gezeigt wurden (Abb. 11a-b).

Als Fazit kann festgehalten werden, dass die Überexpression des miRNA Clusters 183/96/182 keine eindeutige Wirkung auf die Lokalisation und Expression von PDE6b hatte.

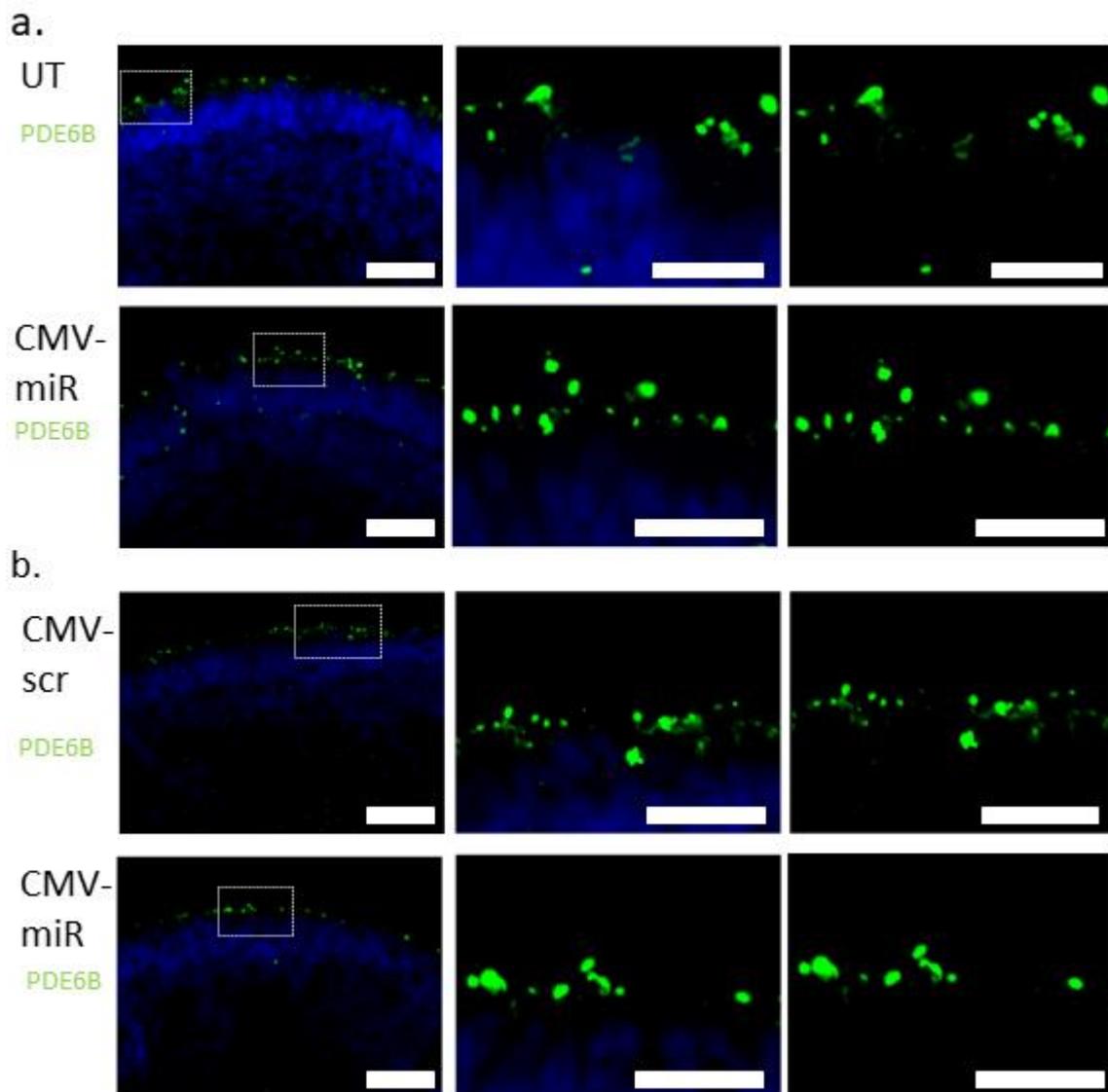


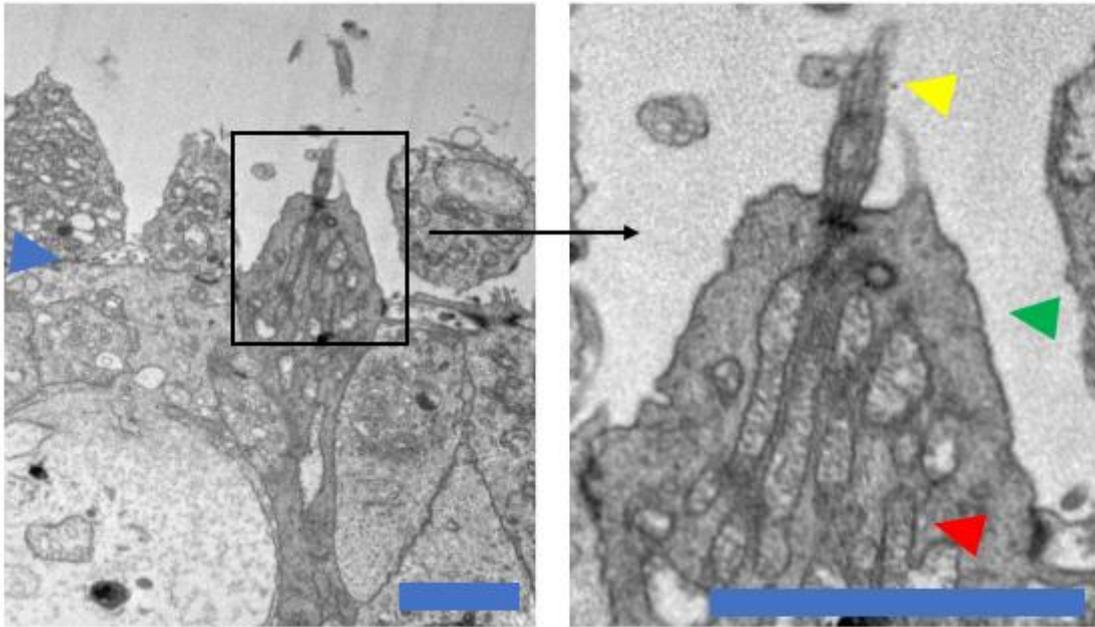
Abbildung 11: Nachweis vom Phototransduktionsprotein PDE6B

- (a) Untransfizierte und mit CMV-miR Konstrukt transfizierte Organoide an Tag 190 mit dem Phototransduktionsprotein PDE6B (grün) gefärbt.
- (b) Im Vergleich mit CMV-scr. und CMV-miRNA transfizierte Organoide an Tag 190 mit dem Phototransduktionsprotein PDE6B (grün) angefärbt. Die links gepunkteten Rechtecke spiegeln die vergrößerten Bereiche rechts wider.
- (c) Skalierung: (a) – (b) linkes Bild 50 μ m, vergrößerte Bilder 20 μ m. Blau=DAPI.

3.8. Ultrastrukturelle Untersuchung von CMV-miR transfizierten Organoiden

Um den Einfluss des miRNA Clusters auf die Außensegmentreifung in ultrastruktureller Hinsicht zu untersuchen, wurde eine Analyse mittels Elektronenmikroskopie durchgeführt. Hierbei zeigte sich im Vergleich der, untransfizierte CMV-scr und CMV-miR überexprimierte RO an Tag 190 große ausgeprägte innensegment-ähnliche Strukturen (Abb. 12a). Die inneren Segmente lokalisierten sich auf der Oberfläche der ROs und lagen über der SLE. Typisch für diese Strukturen zeigten sich viele und große Mitochondrien. Bei einigen inneren Segmenten konnten zilien-artige Auswüchse beobachtet werden. In den untransfizierten Kontrollen war es nicht möglich eindeutig AS-artige Strukturen zu identifizieren (Daten nicht gezeigt). In CMV-miR RO konnten dagegen reife parallel angeordnete Membranstack Strukturen in AS-ähnlichen Strukturen, an den apikalen Spitzen der IS, identifiziert werden (Pfeil in Abb. 12b). Dies lässt vermuten, dass es hier zu einer beschleunigten oder fortgeschrittenen Reifung der AS-Strukturen gekommen ist.

a.



b.

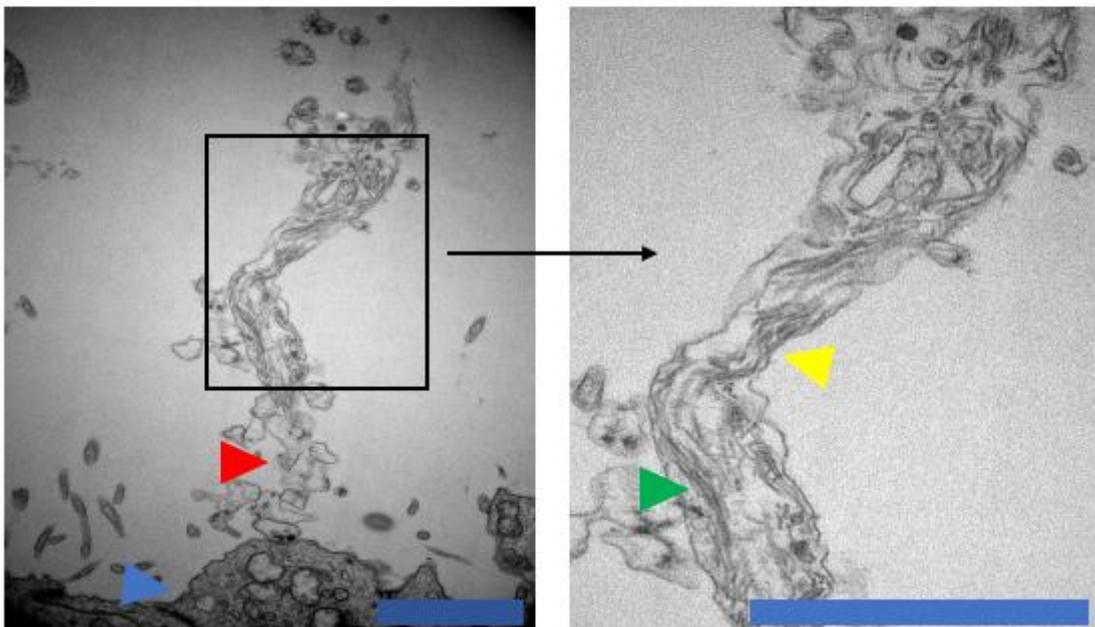


Abbildung 12: Ultrastrukturelle Untersuchung von CMV-miR transfizierten Organoiden

(a) - (b) Repräsentative EM Bilder.

a) EM Bild zeigt Innensegment-ähnliche Struktur am äußeren Rand des RO von

einem 190 Tage alten RO an Tag 100 mit CM-miR-Konstrukt transfiziert (blauer Pfeil = SLE; gelber Pfeil = Zilium; grüner Pfeil = Innensegment; roter Pfeil = Mitochondrium).

b) EM Bild von selben RO, wie in a) zeigt AS-ähnliche Struktur mit Membrandisk ähnlichen Formationen (blauer Pfeil = apikale Spitze von IS; roter Pfeil = Zilium; grüner Pfeil = Membrandisks; gelber Pfeil = AS).

Skalierung: (a) – (b) 2 μ m.

3.9. Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 auf die innerzelluläre Calciumdynamik und Lichtsensibilität in RO

Zur Überprüfung, ob die erhöhte Expression des untersuchten miRNA Clusters 183/96/182 einen Einfluss auf die innerzelluläre Kalziumdynamik und Lichtsensibilität in RO hat, wurden diese mit Hilfe des Kalzium-sensitiven Farbstoff FURA-2-AM angefärbt, um die intrazelluläre Kalziumkonzentration nach Lichtreizen sichtbar zu machen. Individuelle Zellen wurden lokalisiert und die jeweilige Aktivität (Anzahl der Calciumspikes) jeder Zelle wurde gemessen. Die Änderungen der Calciumkonzentration wurden 300 Sekunden lang gemessen. In dieser Zeitspanne wurden 5 Lichtreize mit jeweils 5 Sekunden Dauer auf die Organoide appliziert. In diesem Versuch wurden CMV-scr und CMV-miR positive Organoide miteinander verglichen. Hier zeigte sich, dass die CMV-miR RO im Vergleich zu den CMV-scr RO zur nicht-Aktivierungsphase auf Lichtreize deutlich vermehrt reagierten. Die CMV-scr RO zeigten in der Ruhephase und in der Lichtphase keinen Unterschied (Abb. 13). Hieraus lässt sich vermuten, dass die Überexpression des miRNA Clusters 183/96/182 einen Einfluss auf die Funktionalität der Phototransduktion in den AS hat.

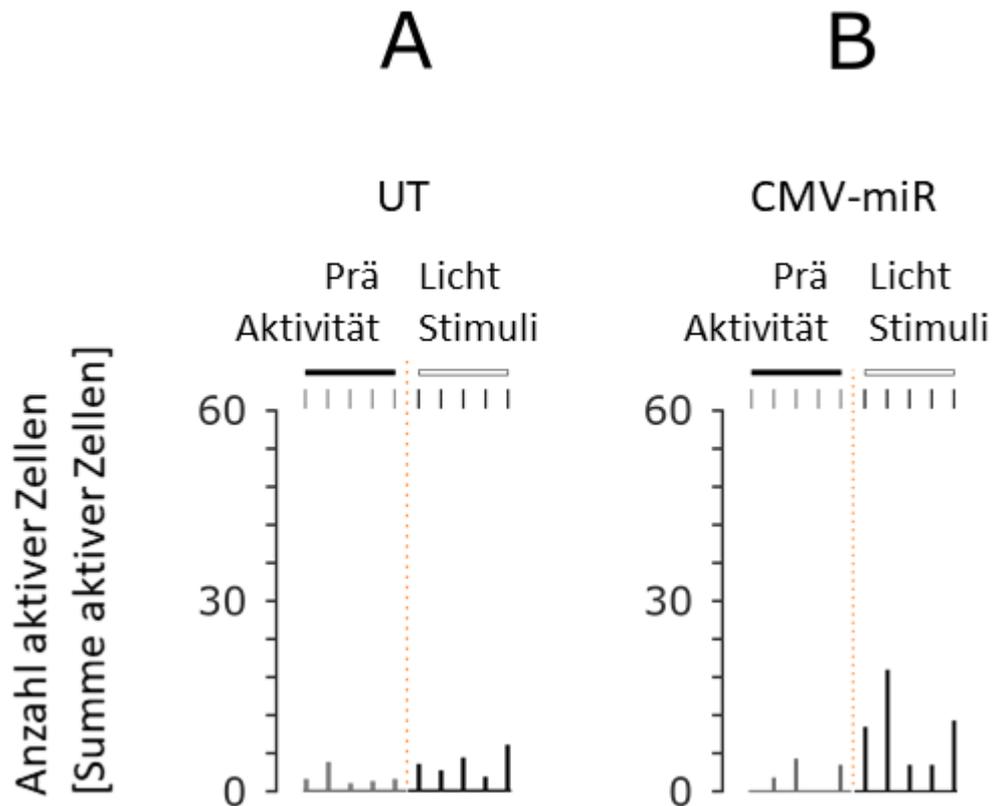


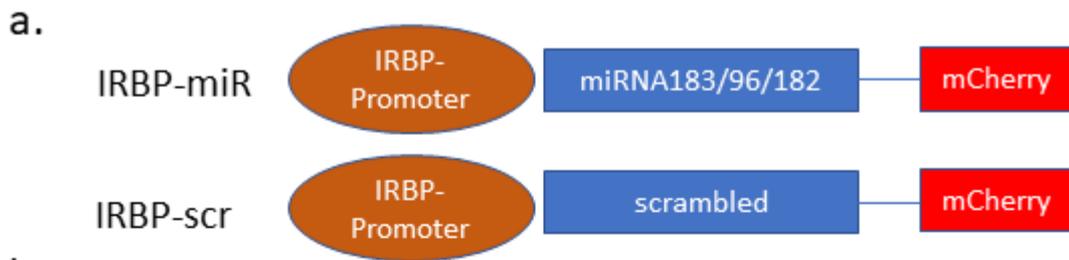
Abbildung 13: Bewertung von innerzelluläre Kalziumdynamik und Lichtsensibilität der Photorezeptoren in CMV-miR und CMV-scr Organoiden

Quantifizierung der Kalziumaktivität von 190 Tage alte CMV-scr und CMV-miR RO. Die Y-Achse gibt die Anzahl der aktiven („reagierende“) Zellen wieder. Die ersten 5 grauen Balken auf der X-Achse zeigen die pre-activity (Basis) Messungen; die letzten 5 Balken (Schwarz) sind während des Belichtungsreizes entstanden.

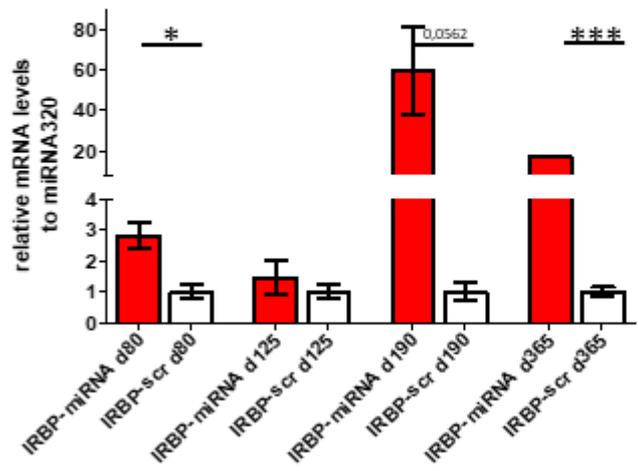
3.10. Expression des miRNA Clusters 183/96/182 unter dem Photorezeptor-spezifischen Promoters IRBP

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das miRNA Cluster 183/96/182 Adeno-assoziierten Virus (AAV)-Plasmid (REFferenz Busskamp) in ein lentivirales Plasmidkonstrukt zur Überexpression unter einem spezifischen IRBP Promoter umkloniert (Plyx-IRBP-mCherry), welches in der neuralen Retina selektiv in Photorezeptoren exprimiert wurde. Ferner beinhaltet dieses zweite Konstrukt ein C-terminales mCherry zur Expressionskontrolle. Als Expressionskontrolle wurde aus der miRNA Sequenz 182 eine scrambled-Variante generiert (IRBP-scr, siehe M+M) (Abb.14a).

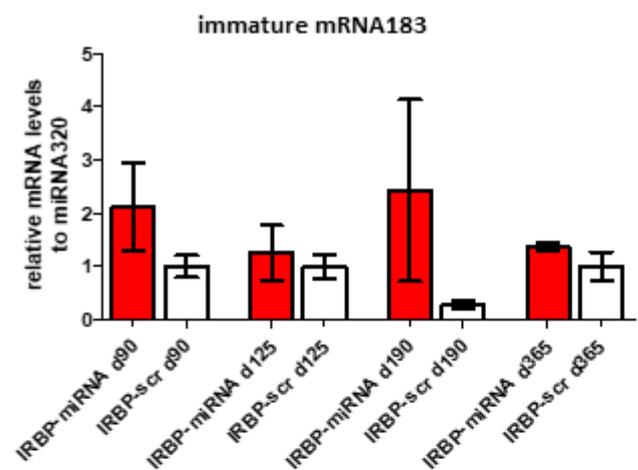
Das Plasmidkonstrukt wurde in hiPS-Zellen transfiziert und anschließend über eine Puromycin- Antibiotika Resistenz selektiert. Die positiv- selektierte hiPS-Zelllinie wurde zu RO differenziert. An Tag 40 konnte man unter dem Fluoreszenz Mikroskop leichte fluoreszierende Signale detektieren (Daten nicht gezeigt). Das Fluoreszenz Signal nahm bis zu dem 190 Tag immer weiter zu. Zum Vergleich der IRBP-scr und IRBP-miR Konstrukte wurden RNA Proben an Tag 80, 125, 190 und 365 RO genommen und mit Hilfe einer qPCR auf die Überexpression des miRNA Clusters 183/96/182 untersucht. Die qPCR zeigte im Vergleich, dass bei dem IRBP-miR Konstrukt bei allen 3 miRNA des Clusters eine Überexpression der miRNA stattfand. Für miRNA183 IRBP-miR konnte an Tag 80 und an Tag 365 eine signifikante Überexpression nachgewiesen werden. Für miRNA182 IRBP-miR konnte an Tag 190 und an Tag 365 eine signifikante Überexpression nachgewiesen werden (Abb. 14b-d). In den IRBP-miR RO zeigte sich, dass die Überexpression bis zu Tag 190 zunahm und ab Tag 365 wieder rückläufig war.



b.



c.



d.

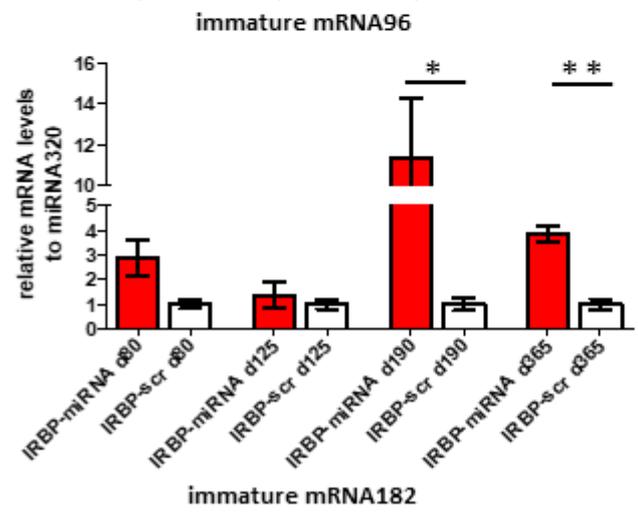


Abbildung 14: Expression des miRNA Clusters 183/96/182 unter dem photorezeptorspezifischen Promoters IRBP

- (a) Schematische Darstellung der lentiviralen Konstrukte IRBP-miR-mCherry und IRBP-scr-mCherry
 - (b) Expression der miRNA 183 auf mRNA-Level in IRBP-miRNA und IRBP-scr differenzierten Organoiden an Tag 80, 125, 190 und 365. Die Werte wurden auf das Housekeeping-Gene HMBS normiert
 - (c) Expression der miRNA 96 auf mRNA-Level in IRBP-miRNA und IRBP-scr differenzierten Organoiden an Tag 80, 125, 190 und 365. Die Werte wurden auf die miRNA320 normiert.
 - (d) Expression der miRNA 182 auf mRNA-Level in IRBP-miRNA und IRBP-scr differenzierten Organoiden an Tag 80, 125, 190 und 365. Die Werte wurden auf die miRNA320 normiert.
- (b) – (d) Fehlerbalken: S.E.M. $p < 0.05 = *$; $p < 0.01 = **$; $p < 0.001 = ***$.

3.11. Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 unter einem IRBP-Promoter auf die Stäbchenentwicklung

Um herauszufinden, ob die erhöhte Expression des untersuchten miRNA Clusters 183/96/182 mit dem IRBP Photorezeptor spezifischen Promoter einen Effekt auf Stäbchen-Photorezeptoren in Hinblick auf Differenzierung und Reifung in RO hat, wurden an Tag 125 Organoide mittels Immunfärbung analysiert. Die RO wurden mit dem Stäbchenmarker Rhodopsin angefärbt, um die Entwicklung der Stäbchen genauer zu analysieren. Im Vergleich zeigten die Organoide mit IRBP-scr und IRBP-miR Konstrukten an Tag 125 (nicht dargestellt), dass die RO mit der miRNA Überexpression hellere und vom Umfang größere Signale als die IRBP-scr RO zeigten. Von der Anzahl der Signale zeigten beide Konditionen keine Unterschiede.

Als Fazit kann festgehalten werden, dass die Anzahl der Stäbchen-Photorezeptoren unverändert war, aber man einen Unterschied in der Größe der Segmente sah, die oberhalb der SLE waren. Die Segmente waren in den miRNA-überexprimierten RO vom Umfang größer und vom Signal heller.

3.12. Einfluss des miRNA Clusters 183/96/182 unter einem IRBP-Promoter auf die Außensegmententwicklung anhand des Filamentproteinmarkers Peripherin

Zur Überprüfung, ob die erhöhte Expression des untersuchten miRNA Clusters unter einem IRBP-Promoter einen Einfluss auf die Differenzierung und Reifung der AS der Photorezeptoren hat, wurden d125 Organoide mittels Immunfärbung analysiert. Die äußere Membran der Photorezeptoren wurde mit dem Oberflächenmarker PNA Lectin sichtbar gemacht, um die Lokalisation der AS im Verhältnis zu den Photorezeptoren darstellen zu können (Abb.15).

Hier zeigte sich im Vergleich IRBP-scr und Überexpression mit dem IRBP-miR Konstrukt (Abb. 15a) ein veränderter Anteil an Lectin-positiven Photorezeptoroberflächen. RO mit dem IRBP-miR zeigten an Tag 125 oberhalb der SLE eine deutliche durchgängige Segment-Schicht, was bei den RO mit IRBP-scr eher nicht kontinuierlich, sondern punktförmig war.

Die Peripherin-2 Signale im Vergleich von IRBP-scr und IRBP-miR Konstrukt transfizierten RO zeigten keinen Unterschied in der Anzahl der Signale, sondern einen Unterschied in der Lokalisation. RO mit Überexpression des miRNA Clusters unter einem IRBP-Promoter zeigten oberhalb der apikalen Spitze der IS der Photorezeptoren die Signale heller und waren somit weiter von der SLE entfernt. Die RO mit dem IRBP-scr Konstrukt zeigten die Peripherin-positiven Signale vorwiegend im mittleren Feld der Innensegmente.

Somit kann man vermuten, dass die miRNA Überexpression unter einem spezifischen Photorezeptor Promoter die Reifung der Photorezeptoren und deren Segmente beschleunigt.

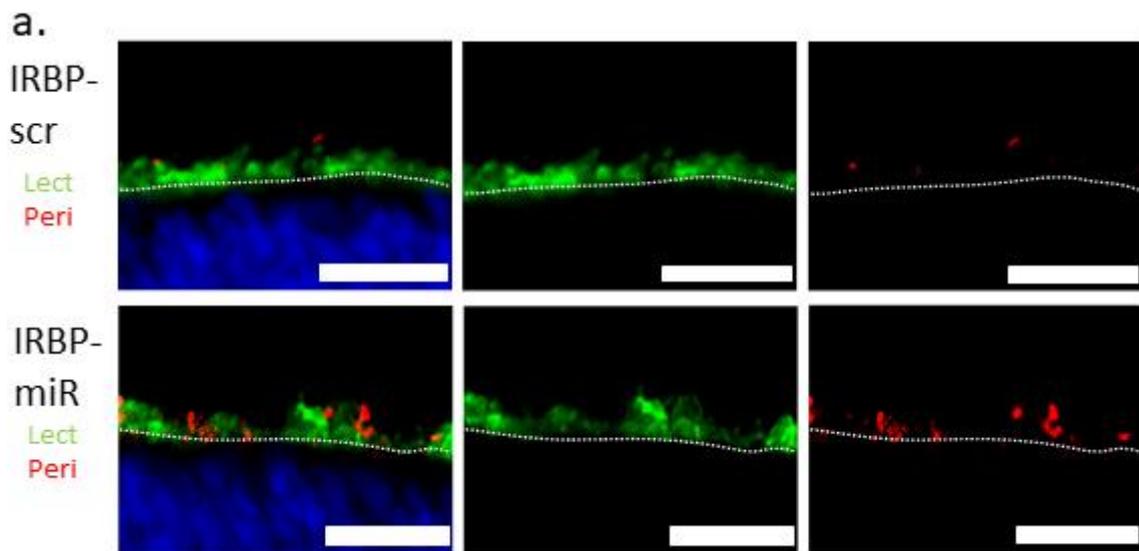


Abbildung 15: Immunocytochemische Analyse der Überexpression von miRNA183/96/182 unter dem photorezeptorspezifischen IRBP-Promoter

- a) Im Vergleich mit IRBP-scr. und IRBP-miRNA transfizierte Organoide an Tag 125 mit den Segmentenmarker Lectin (grün) und Peripherin (rot) angefärbt. Die eingezeichnete Linie ist auf Höhe der SLE. Die eingezeichnete Linie ist auf Höhe der SLE.
- b) Skalierung: (a) linkes Bild 50 μ m, vergrößerte Bilder 20 μ m. Blau=DAPI.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend sind die Ergebnisse meiner Dissertation:

1. Die erfolgreiche Klonierung des miRNA Clusters 182/96/183 und die Generierung einer Kontroll-scrambled-miRNA unter dem konstitutiven CMV-Promoter, 2. Die Transfektion von RO und Überexpression des miRNA Cluster in HEK-Zellen sowie in retinalen Organoiden, 3. Eine Studie über den Einfluss der Überexpression des miRNA Clusters in retinal Organoiden mit besonderem Fokus auf die Photorezeptor- und Segmententwicklung, 4. Die Generierung eines Überexpressionskonstrukts, dass das miRNA Cluster unter einem photorezeptorspezifischen IRBP-Promoter zulässt und einer stabil transfizierten hiPS-Zelllinie, 5. Der Nachweis der Expression dieses Konstrukts zu verschiedenen Zeitpunkten der Organoidentwicklung. Im Folgenden sollen diese Ergebnisse weiter erläutert und diskutiert werden.

4.2. Intention für diese Studie

Seit der Entdeckung der hiPS-Zellen (Takahashi & Yamanaka, 2006) gab es immense Entwicklungssprünge was die Herstellung von in-vitro Retinamodellen anging. Über unterschiedliche Konzepte wie 2D, 3D oder gemischte 2D/3D Entwicklungs-RO oder unterschiedliche Zusätze (Eiraku et al., 2011; Kawasaki et al., 2002; Nakano et al., 2012; Osakada et al., 2008; Wahlin et al., 2017; Zhong et al., 2014) wurde die *in vitro* Retina der *in vivo* Retina immer ähnlicher (Wahlin et al., 2017).

So ist es möglich über morphologische und immunozytochemische Methoden die Ähnlichkeit dieser beiden zu zeigen. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass Müller-Glia Zellen (Singhal et al., 2012), Ribbon-Synapses, verschiedene Stadien der mitochondrienreichen Innen- und Außensegment-ähnliche Segment-Strukturen (Wahlin et al., 2017) und sogar die Phototransduktion (Zhong et al., 2014) in den *in vitro* hergestellten RO zu finden sind. Trotzdem konnten in den bis heute durchgeführten Studien noch keine ausgereiften Strukturen der AS, mit angeordneten Membrandisks, mittels bildgebender Verfahren nachgewiesen werden (Wahlin et al., 2017).

Ein Schritt in diese Richtung machte eine Studie von 2014, die zeigen konnte, dass die Überexpression des miRNA Clusters 183/96/182 in RO aus Mäuse iPS-Zellen, die AS-Entwicklung beschleunigen kann und Ansätze von Membrandisks in EM-Bildern gezeigt werden können (Buskamp et al., 2014). Das Ziel dieser Studie war nun, diese Ergebnisse auf humane RO zu übertragen. Das miRNA Cluster, das in Buskamp *et al.* und auch in dieser Studie verwendet wurde, ist humanen Ursprungs, weshalb angenommen werden kann, dass es in humanen Zellen eine ähnliche Funktionalität aufweist.

4.3. Auswertung der immunocytochemischen Analyse der Überexpression von miRNA183/96/182 in Bezug auf die Retinaentwicklung

In den durchgeführten Versuchen zeigten die mit CMV-miRNA und IRBP-miRNA positiven RO im Vergleich zu den Kontroll-RO eine deutliche Tendenz: Trotz gleichbleibender Anzahl von PRC-Zellen (bei IS Markern) konnte in Punkten Helligkeit und Anzahl der (AS Segment Marker) Signale in den distalen Spitzen der PRC-Zellen eine Steigerung gezeigt werden.

Die genauen Mechanismen des miRNA Clusters 183/96/182 in der Retina wurden noch nicht geklärt, aber dass die miRNA Cluster in der Retina eine wichtige Rolle spielen, wurde in den Studien von Zhu (Zhu et al., 2011), Lumayag (Lumayag et al., 2013) und Buskamp (Buskamp et al., 2014) gezeigt. Zhu *et al.*, 2011 zeigte, dass der Verlust der miRNA mit Degeneration der Retina einherging. 2013 konnte Lumayag *et al.* zeigen, dass das miRNA Cluster eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Ribbon Synapsen in der Retina/miRNA Cluster spielt. 2014 konnte Buskamp *et al.* zeigen, dass beim Untergang des miRNA Clusters intrazelluläre Regelkreise beeinflusst werden, die für den Membrantransport und Proteosomen in den AS eine wichtige Rolle spielen. Es zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Endozytose in den Zellen ohne miRNA Cluster. Ebenso wurden wichtige Proteine, die für den Lipid-Metabolismus, Zilium Formation, Zentrosomen und Mikrotubuli zuständig sind, beeinträchtigt. 2017 zeigte Xiang (Xiang et al., 2017), dass die Bildung des Slc6a6 Taurin Transporter von der miRNA 183 und miRNA 96 reguliert wird. Der Slc6a6 Taurin

Transporter spielt eine wichtige Rolle in der Photorezeptor Formation und Funktionalität.

In den hier durchgeführten Versuchen war es alles in allem nicht möglich explizit positiv-transfizierte Zellen direkt mit dem Vorhandensein größerer AS bzw. Außensegmentproteinexpression zu verknüpfen. Viel mehr zeigte sich eine generelle Erhöhung im Organoid (Daten nicht gezeigt). Dies könnte darauf hindeuten, dass die miRNA Clusterüberexpression vor allem einen generellen positiven Effekt auf die retinalen Organoiden hat, die möglicherweise von Transporter/Ribbon Synapsen/unbekannten Komponenten ausgehen. Da die Expression des miRNA Clusters unter IRBP-Promotoren in Photorezeptoren ein ähnliches Ergebnis zeigte, wie die allgemeine Expression, ist es wahrscheinlich, dass die miRNA Expression in den Photorezeptoren an den Mechanismen beteiligt ist.

4.4. Evaluation der ultrastrukturellen Untersuchung von CMV-miR transfizierten Organoiden

In meiner Studie konnte ich im Elektronenmikroskop deutlich große Innensegmente mit Zilien darstellen. Vereinzelt zeigten Stellen AS-ähnliche Strukturen mit Membrandisks. Die Membrandisks zeigten aber im EM noch nicht die typische horizontale und parallele Anordnung, wie man sie in adulten human AS *in vivo* finden würde. Mit diesem Versuch konnte ich somit keine perfekten Segmente darstellen und Strukturen zeigen, die bisher noch nicht bei *in vitro* Kulturen gezeigt werden konnten.

Eine Erklärung hierfür könnte z.B. die fehlende mechanische Stabilität der Segmente sein, welche *in vivo* durch umgebende extrazelluläre Matrix und retinalen Pigmentepithel gewährleistet wird. Dieser Eindruck bestätigt sich unter dem Elektronenmikroskop, in dem viele Innensegmente und Zilienstrukturen an den Photorezeptoren abgerissen bzw. zerstört wirken. Dies deutet entweder auf eine Beschädigung während der Kultur oder der Probenaufbereitung hin. Ferner spielt die RPE womöglich eine entscheidende Rolle bei der finalen Reifung der Außensegmentstrukturen (Achberger, Haderspeck, Kleger, & Liebau, 2018).

4.5. Evaluation des miRNA Clusters 183/96/182 auf die innerzelluläre Calciumdynamik und Lichtsensibilität in RO

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass in-vitro hergestellte RO nicht nur in der strukturellen Form der Netzhaut *in vivo* immer ähnlicher werden, sondern auch funktionell. In der Studie von Zhong *et al.* konnten 2014 rudimentäre Ansätze von Lichtsensibilität nachgewiesen werden. Busskamp *et al.* 2014 und Wahlin *et al.* 2017 konnten durch ihre Versuche und Modifizierungen in ihren Studien sogar die zelluläre Antwort auf Lichtreize steigern (Busskamp *et al.*, 2014; Wahlin *et al.*, 2017; Zhong *et al.*, 2014). Der Strom innerhalb einer Zelle aufgrund eines Lichtreizes konnte via Patch Clamp gemessen werden und somit die Phototransduktion einzelner Zellen überprüft werden (Mann *et al.*, 2005). In dieser Studie zeigten RO mit miRNA Cluster 183/96/182 Überexpression am selben Tag eine deutlich erhöhte Responsivität nach der Lichtreizung. Dies wurde anhand der Kalziumaktivität gemessen. Da während der Phototransduktion Kalziumkanäle geöffnet werden, kann man indirekt auf die Aktivität der Phototransduktion schließen. Die erzielten Ergebnisse scheinen die Thesen von Busskamp *et al.*, Lumayag *et al.* und Zhu *et al.* (Busskamp *et al.*, 2014; Lumayag *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2011) zu bestätigen: Die miRNA 183/96/182 scheint eine wichtige Rolle für die Reifung der AS und für die Entwicklung der Netzhaut zu spielen. Da es sich um eine verhältnismäßig kleine Studie handelt, sollten noch weitere Tests durchgeführt und insbesondere ein verstärktes Augenmerk auf die Zellen mit zsGreen gelegt werden, um die Aussagekraft meiner These zu bestärken. Ferner wäre eine Patch Clamp Untersuchung mit miRNA-183/96/182-positiven RO im Vergleich mit CMV-scr RO interessant.

4.6. Notwendigkeit für eine verbesserte Außensegmentreifung für Medikamenten- und Krankheitsstudien

Heute spielen die hiPS-Zellen und Organoide in der medizinischen Forschung schon eine wichtige Rolle. In Zukunft könnten sie noch eine größere Rolle einnehmen, beispielweise bei der Entwicklung und Erprobung von Medikamenten. Dabei besteht die Möglichkeit die Anzahl von Tierversuchen zu verringern oder komplett zu ersetzen (Mathur *et al.*, 2015). Studien zeigten, dass die Netzhaut der Ratten/Nagetiere ähnlich, aber letztendlich doch zu verschieden sind, um verlässliche Aussagen über Wirksamkeit und Nebenwirkungen beim Menschen zu erhalten, insbesondere im

Bereich der Wirkung auf adulte Photorezeptoren (Achberger et al., 2018; X. Li et al., 2014; McGivern & Ebert, 2014; Ranga, Gjorevski, & Lutolf, 2014). Das Problem mit den immer noch relativ unreifen Photorezeptoren könnte in naher Zukunft behoben werden, wenn die retinale Ausreifung *in vitro*, zum Beispiel bei Darstellung reifer AS, verbessert wird (Achberger et al., 2018).

Ebenso könnte *in-vitro* im Labor untersucht werden, ob Medikamente organspezifische Nebenwirkungen besitzen. Retinale Organoiden, die eine verbesserte Reifung und eine physiologischere Entwicklung durchlaufen, könnten in Zukunft noch genauere Aussagen über Wirkung und Nebenwirkung geben (Ito, Onishi, & Takahashi, 2017).

Einige systemische Medikamente haben bei Dauermedikation eine augenschädigende Wirkung (Achberger et al., 2018). Biphosphonate zum Beispiel, die bei Knochen- und Calciumstoffwechselkrankheiten eingesetzt werden, induzieren eine entzündliche Augenreaktion (Fraunfelder & Fraunfelder, 2003). Zytostatika, wie Tamoxifen (Lazzaroni et al., 1998) (Bourla, Sarraf, & Schwartz, 2007) und Interferone (Shimura, Saito, Yasuda, & Tamai, 2005) (Neubauer & Hoops, 2000) (Esmali, Koller, Papadopoulos, & Romaguera, 2001), die in der Krebstherapie angewendet werden, wirken ebenfalls augenschädlich (Omoti & Omoti, 2006). Einige dieser Medikamente konnten bereits an iPS-Zellen auf Wirkungen und Nebenwirkungen getestet werden (McGivern & Ebert, 2014).

Die Nebenwirkungen von Tamoxifen wurden bei Maus iPS-RO mit 4-Hydroxytamoxifen gezeigt (Ito et al., 2017).

Ebenfalls können patientenbezogene hiPS-Zellen ein wichtiges Element der personalisierten/individuellen Medizin/Therapie werden. Die spezifischen Netzhautzellen der Patienten können auf die Wirkung unterschiedlicher Medikamente getestet und das effektivste Medikament verabreicht werden. Somit kann ein langwieriges Testen und Einstellen von Medikamenten verhindert werden. Schnellere und effizientere Therapien könnten früher eingeleitet werden.

Nicht nur im Bereich der Medikamententests weitet sich das Anwendungsgebiet aus, sondern auch im Bereich der Krankheitsstudien. Mechanismen von infektiösen, tumorösen und genetischen Erkrankungen können an hiPS-Zellen erforscht werden (Bartfeld & Clevers, 2017). Studien mit ZIKA-Viren an hiPS-Zellen konnten

demonstrieren, wie Viren *in vitro* hergestellte Neuronale-Forebrain-Vorläufer-Zellen infizieren und Mechanismen der Viren in der Zelle veranschaulichen (Dang et al., 2016; Garcez et al., 2016). 2016 forschte Parfitt mit hiPS-Zellen abstammend von Leber's congenital amaurosis (LCA) Patienten. Durch Hinzugabe von Antisense-Morpholino konnte er abweichendes Splicing verhindern und somit den Fortschritt der Erkrankung aufhalten (Parfitt et al., 2016).

4.7. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des miRNA Clusters 183/96/182 Einfluss auf die Reifung der Photorezeptoren nehmen kann. In Zukunft wäre es interessant die IRBP-miR-mCherry-Zelllinie zu RO zu generieren und negative Einflussfaktoren wie zum Beispiel Prozessierung für das EM oder Scherkräfte beim Transport durch Einbettung der RO in Hydrochip auszuschalten und Abfolgen zu optimieren.

Wenn erreicht wird, AS physiologisch *in vitro* darzustellen, wäre es möglich noch aussagekräftigere Studien an Erkrankungen wie z.B. Ziliopathien durchzuführen und die personalisierte Medizin weiter voranzutreiben.

5. Zusammenfassung

Das Sinnesorgan Auge ist ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Lebens. Mit Hilfe des Augenlichtes können Menschen sich in ihrer Umgebung zurechtfinden, orientieren und mit dieser interagieren.

Da Erkrankungen wie zum Beispiel altersbedingte Makuladegenerationen oder genetisch bedingte Leber'sche Kongenitale Amaurose Erkrankungen zu einem verfrühten Verlust des Augenlichtes führen können, benötigt die medizinische Forschung Möglichkeiten an Modellen dieser Erkrankungen zu forschen.

Retina Organoiden sind ein relativ neuer und vielversprechender Ansatz, um an retinalen Erkrankungen zu forschen. Retina Organoiden (RO) sind aus human induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte gewebeähnliche Spheroide, die sich *in vitro* in ähnlicher Anordnung präsentieren wie in der Netzhaut *in vivo*. Sie besitzen unter anderem dieselben generellen Zelltypen wie die Retina und verfügen über eine ähnliche Schichtung.

Verschiedene Forschergruppen konnten zeigen, dass das Mikro-RNA (miRNA) Cluster 183/96/182 einen Einfluss auf die Entwicklung der Netzhaut besitzt. So wurde gezeigt, dass bei Mäusen der Verlust des miRNA Clusters 183/96/182 zu einem Untergang der Außensegmente (AS) von Photorezeptoren führt, während eine Überexpression in retinalen Organoiden aus Maus- induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPS-Zellen) zu einer verbesserten Außensegmententwicklung führt.

Ziel meiner Arbeit war es, zu untersuchen, ob mithilfe der Überexpression des miRNA Clusters 183/96/182 die beschleunigte Reifung und Verbesserung der AS von Photorezeptoren auch bei aus humanen hiPS-Zellen differenzierte ROs erreicht werden kann.

Zu diesem Zweck wurden aus hiPS-Zellen generierte ROs an Tag 80 mit einem lentiviralen miRNA-Überexpressionskonstrukt transfiziert. Danach wurden sie mittels Immunfluoreszenzfärbungen, Elektronenmikroskopie und Calcium-Imaging analysiert.

Die analysierten ROs mit Überexpression zeigten keine Veränderung bei der Morphologie und der Anzahl der Photorezeptorbildung. Jedoch beeinflusste die Überexpression die Reifung der AS, die Lokalisation und Menge der

Außensegmentproteine in den Immunfluoreszenzfärbungen. Mittels Elektronenmikroskops konnten fortgeschrittene reife außensegmentartige Membrandisks ermittelt werden, während im Calcium Imaging eine erhöhte Anzahl von lichtaktiven Zellen detektiert wurde.

Um die Wirkung einer photorezeptorspezifischen Überexpression zu ermitteln, wurde das miRNA Cluster mithilfe eines photorezeptorspezifischen Genpromoters (IRBP) in retinalen Organoiden eingebracht.

Hier zeigte sich eine deutliche Überexpression der messenger RNA-Konzentrationen der jeweiligen miRNAs. Ebenso zeigten die immunfluoreszenz-Färbungen der IRBP-miRNA-mCherry ROs eine gesteigerte Signalanzahl, sowie eine gesteigerte Signalintensität auf Höhe der AS.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass in dieser Studie das miRNA-Konstrukt insgesamt einen positiven Einfluss auf die Entwicklung der AS hat.

Die Arbeit könnte einen Teil dazu beitragen, die RO-Modelle zu verbessern, sodass sie in Zukunft für Medikamententests, Krankheitsstudien und personalisierte Medizin verwendet werden können.

6. Referenzen

- Achberger, K., Haderspeck, J. C., Kleger, A., & Liebau, S. (2018). Stem cell-based retina models. *Adv Drug Deliv Rev*. doi:10.1016/j.addr.2018.05.005
- Adler, R., & Canto-Soler, M. V. (2007). Molecular mechanisms of optic vesicle development: complexities, ambiguities and controversies. *Dev Biol*, 305(1), 1-13. doi:10.1016/j.ydbio.2007.01.045
- Anderson, D. H., Fisher, S. K., & Steinberg, R. H. (1978). Mammalian cones: disc shedding, phagocytosis, and renewal. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 17(2), 117-133.
- Anderson, R. M., Lawrence, A. R., Stottmann, R. W., Bachiller, D., & Klingensmith, J. (2002). Chordin and noggin promote organizing centers of forebrain development in the mouse. *Development*, 129(21), 4975-4987.
- Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., Engele, J., Kirsch, J., Mense, S., & Reißig, D. (2010a). *Duale Reihe: Anatomie* (2nd ed.). Stuttgart: Thieme.
- Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., Engele, J., Kirsch, J., Mense, S., & Reißig, D. (2010b). *Duale Reihe: Anatomie* (Vol. 2nd). Stuttgart: Thieme.
- Aumüller, G., Aust, G., Doll, A., Engele, J., Kirsch, J. M., S, & Reißig, D. (2010). *Duale Reihe: Anatomie* (2nd ed.). Stuttgart: Thieme.
- Bak, M., Silaharoglu, A., Moller, M., Christensen, M., Rath, M. F., Skryabin, B., . . . Kauppinen, S. (2008). MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA*, 14(3), 432-444. doi:10.1261/rna.783108
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281-297.
- Bartfeld, S., & Clevers, H. (2017). Stem cell-derived organoids and their application for medical research and patient treatment. *J Mol Med (Berl)*, 95(7), 729-738. doi:10.1007/s00109-017-1531-7
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., & Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), 363-366. doi:10.1038/35053110
- Bok, D. (1993). The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl*, 17, 189-195.
- Bourla, D. H., Sarraf, D., & Schwartz, S. D. (2007). Peripheral retinopathy and maculopathy in high-dose tamoxifen therapy. *Am J Ophthalmol*, 144(1), 126-128. doi:10.1016/j.ajo.2007.03.023
- Bueno, M. J., & Malumbres, M. (2011). MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim Biophys Acta*, 1812(5), 592-601. doi:10.1016/j.bbadis.2011.02.002
- Busskamp, V., Krol, J., Nelidova, D., Daum, J., Szikra, T., Tsuda, B., . . . Roska, B. (2014). miRNAs 182 and 183 are necessary to maintain adult cone photoreceptor outer segments and visual function. *Neuron*, 83(3), 586-600. doi:10.1016/j.neuron.2014.06.020
- Cheng, A. M., Byrom, M. W., Shelton, J., & Ford, L. P. (2005). Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*, 33(4), 1290-1297. doi:10.1093/nar/gki200
- Chow, R. L., & Lang, R. A. (2001). Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17, 255-296. doi:10.1146/annurev.cellbio.17.1.255
- COHEN, A. I. (1963). VERTEBRATE RETINAL CELLS AND THEIR ORGANIZATION. *Biological Reviews*, 38(4), 427-459. doi:doi:10.1111/j.1469-185X.1963.tb00789.x

- Dai, R., Zhang, Y., Khan, D., Heid, B., Caudell, D., Crasta, O., & Ahmed, S. A. (2010). Identification of a common lupus disease-associated microRNA expression pattern in three different murine models of lupus. *PLoS One*, *5*(12), e14302. doi:10.1371/journal.pone.0014302
- Damiani, D., Alexander, J. J., O'Rourke, J. R., McManus, M., Jadhav, A. P., Cepko, C. L., . . . Strettoi, E. (2008). Dicer inactivation leads to progressive functional and structural degeneration of the mouse retina. *J Neurosci*, *28*(19), 4878-4887. doi:10.1523/JNEUROSCI.0828-08.2008
- Dang, J., Tiwari, S. K., Lichinchi, G., Qin, Y., Patil, V. S., Eroshkin, A. M., & Rana, T. M. (2016). Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell*, *19*(2), 258-265. doi:10.1016/j.stem.2016.04.014
- Dave, B. J., Hopwood, V. L., King, T. M., Jiang, H., Spitz, M. R., & Pathak, S. (1995). Genetic susceptibility to lung cancer as determined by lymphocytic chromosome analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *4*(7), 743-749.
- Echelard, Y., Epstein, D. J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J. A., & McMahon, A. P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*, *75*(7), 1417-1430.
- Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., . . . Sasai, Y. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, *472*(7341), 51-56. doi:10.1038/nature09941
- Ericson, J., Rashbass, P., Schedl, A., Brenner-Morton, S., Kawakami, A., van Heyningen, V., . . . Briscoe, J. (1997). Pax6 controls progenitor cell identity and neuronal fate in response to graded Shh signaling. *Cell*, *90*(1), 169-180.
- Esmaeli, B., Koller, C., Papadopoulos, N., & Romaguera, J. (2001). Interferon-induced retinopathy in asymptomatic cancer patients. *Ophthalmology*, *108*(5), 858-860.
- Esteve, P., & Bovolenta, P. (2006). Secreted inducers in vertebrate eye development: more functions for old morphogens. *Curr Opin Neurobiol*, *16*(1), 13-19. doi:10.1016/j.conb.2006.01.001
- Fendler, A., Jung, M., Stephan, C., Erbersdobler, A., Jung, K., & Yousef, G. M. (2013). The antiapoptotic function of miR-96 in prostate cancer by inhibition of FOXO1. *PLoS One*, *8*(11), e80807. doi:10.1371/journal.pone.0080807
- Finnemann, S. C. (2003). Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *EMBO J*, *22*(16), 4143-4154. doi:10.1093/emboj/cdg416
- Fraunfelder, F. W., & Fraunfelder, F. T. (2003). Bisphosphonates and ocular inflammation. *N Engl J Med*, *348*(12), 1187-1188. doi:10.1056/NEJM200303203481225
- Furuta, Y., & Hogan, B. L. (1998). BMP4 is essential for lens induction in the mouse embryo. *Genes Dev*, *12*(23), 3764-3775.
- Garcez, P. P., Loiola, E. C., Madeiro da Costa, R., Higa, L. M., Trindade, P., Delvecchio, R., . . . Rehen, S. K. (2016). Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*, *352*(6287), 816-818. doi:10.1126/science.aaf6116
- Gatignol, A., Buckler-White, A., Berkhout, B., & Jeang, K. T. (1991). Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science*, *251*(5001), 1597-1600.
- Graw, J. (2010). Eye development. *Curr Top Dev Biol*, *90*, 343-386. doi:10.1016/S0070-2153(10)90010-0

- Gregory, R. I., Yan, K. P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, *432*(7014), 235-240. doi:10.1038/nature03120
- Horsford, D. J., Nguyen, M.-T. T., Sellar, G. C., Kothary, R., Arnheiter, H., & McInnes, R. R. (2005). Chx10 repression of Mitf is required for the maintenance of mammalian neuroretinal identity. *Development*, *132*(1), 177-187. doi:10.1242/dev.01571
- Houbaviy, H. B., Murray, M. F., & Sharp, P. A. (2003). Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell*, *5*(2), 351-358.
- Inaba, M., & Yamashita, Y. M. (2012). Asymmetric stem cell division: precision for robustness. *Cell Stem Cell*, *11*(4), 461-469. doi:10.1016/j.stem.2012.09.003
- Ito, S. I., Onishi, A., & Takahashi, M. (2017). Chemically-induced photoreceptor degeneration and protection in mouse iPSC-derived three-dimensional retinal organoids. *Stem Cell Res*, *24*, 94-101. doi:10.1016/j.scr.2017.08.018
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*, *33 Suppl*, 245-254. doi:10.1038/ng1089
- Jin, Z. B., Hirokawa, G., Gui, L., Takahashi, R., Osakada, F., Hiura, Y., . . . Iwai, N. (2009). Targeted deletion of miR-182, an abundant retinal microRNA. *Mol Vis*, *15*, 523-533.
- Kawasaki, H., Suemori, H., Mizuseki, K., Watanabe, K., Urano, F., Ichinose, H., . . . Sasai, Y. (2002). Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(3), 1580-1585. doi:10.1073/pnas.032662199
- Kolb, H., Fernandez E., Nelson R., editors. (2005; Update 2012). Simple Anatomy of the Retina. *Webvision : The Organization of the Retina and Visual System*. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11533/>
- Kolb H., F. E., Nelson R. (1995). *Introduction*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
- Krauss, S., Concordet, J. P., & Ingham, P. W. (1993). A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*, *75*(7), 1431-1444.
- Krishnan, K., Steptoe, A. L., Martin, H. C., Wani, S., Nones, K., Waddell, N., . . . Grimmond, S. M. (2013). MicroRNA-182-5p targets a network of genes involved in DNA repair. *RNA*, *19*(2), 230-242. doi:10.1261/rna.034926.112
- Krol, J., Busskamp, V., Markiewicz, I., Stadler, M. B., Ribic, S., Richter, J., . . . Filipowicz, W. (2010). Characterizing light-regulated retinal microRNAs reveals rapid turnover as a common property of neuronal microRNAs. *Cell*, *141*(4), 618-631. doi:10.1016/j.cell.2010.03.039
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., & Tuschl, T. (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA*, *9*(2), 175-179.
- Lai, E. C. (2002). Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet*, *30*(4), 363-364. doi:10.1038/ng865
- Lamba, D. A., Karl, M. O., Ware, C. B., & Reh, T. A. (2006). Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(34), 12769-12774. doi:10.1073/pnas.0601990103

- Lazzaroni, F., Scorolli, L., Pizzoleo, C. F., Savini, G., De Nigris, A., Giosa, F., & Meduri, R. A. (1998). Tamoxifen retinopathy: does it really exist? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, *236*(9), 669-673.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, *75*(5), 843-854.
- Li, H., Tierney, C., Wen, L., Wu, J. Y., & Rao, Y. (1997). A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. *Development*, *124*(3), 603-615.
- Li, X., Kroin, J. S., Kc, R., Gibson, G., Chen, D., Corbett, G. T., . . . Im, H. J. (2013). Altered spinal microRNA-146a and the microRNA-183 cluster contribute to osteoarthritic pain in knee joints. *J Bone Miner Res*, *28*(12), 2512-2522. doi:10.1002/jbmr.2002
- Li, X., Nadauld, L., Ootani, A., Corney, D. C., Pai, R. K., Gevaert, O., . . . Kuo, C. J. (2014). Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture. *Nat Med*, *20*(7), 769-777. doi:10.1038/nm.3585
- Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2003). Vertebrate microRNA genes. *Science*, *299*(5612), 1540. doi:10.1126/science.1080372
- Lin, H., Dai, T., Xiong, H., Zhao, X., Chen, X., Yu, C., . . . Song, L. (2010). Unregulated miR-96 induces cell proliferation in human breast cancer by downregulating transcriptional factor FOXO3a. *PLoS One*, *5*(12), e15797. doi:10.1371/journal.pone.0015797
- Lowery, L. A., & Sive, H. (2004). Strategies of vertebrate neurulation and a re-evaluation of teleost neural tube formation. *Mech Dev*, *121*(10), 1189-1197. doi:10.1016/j.mod.2004.04.022
- Lu, J., Ma, Z., Hsieh, J. C., Fan, C. W., Chen, B., Longgood, J. C., . . . Chen, C. (2009). Structure-activity relationship studies of small-molecule inhibitors of Wnt response. *Bioorg Med Chem Lett*, *19*(14), 3825-3827. doi:10.1016/j.bmcl.2009.04.040
- Lumayag, S., Haldin, C. E., Corbett, N. J., Wahlin, K. J., Cowan, C., Turturro, S., . . . Xu, S. (2013). Inactivation of the microRNA-183/96/182 cluster results in syndromic retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(6), E507-516. doi:10.1073/pnas.1212655110
- Macdonald, R., Barth, K. A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I., & Wilson, S. W. (1995). Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development*, *121*(10), 3267-3278.
- Mangel, S. C. (1991). Analysis of the horizontal cell contribution to the receptive field surround of ganglion cells in the rabbit retina. *J Physiol*, *442*, 211-234.
- Mann, M., Haq, W., Zabel, T., Guenther, E., Zrenner, E., & Ladewig, T. (2005). Age-dependent changes in the regulation mechanisms for intracellular calcium ions in ganglion cells of the mouse retina. *Eur J Neurosci*, *22*(11), 2735-2743. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04475.x
- Marti, E., Takada, R., Bumcrot, D. A., Sasaki, H., & McMahon, A. P. (1995). Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development*, *121*(8), 2537-2547.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *78*(12), 7634-7638.
- Mathur, A., Loskill, P., Shao, K., Huebsch, N., Hong, S., Marcus, S. G., . . . Healy, K. E. (2015). Human iPSC-based cardiac microphysiological system for drug screening applications. *Sci Rep*, *5*, 8883. doi:10.1038/srep08883

- McGivern, J. V., & Ebert, A. D. (2014). Exploiting pluripotent stem cell technology for drug discovery, screening, safety, and toxicology assessments. *Adv Drug Deliv Rev*, 69-70, 170-178. doi:10.1016/j.addr.2013.11.012
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., & Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 15(2), 185-197. doi:10.1016/j.molcel.2004.07.007
- Mihelich, B. L., Khramtsova, E. A., Arva, N., Vaishnav, A., Johnson, D. N., Giangreco, A. A., . . . Nonn, L. (2011). miR-183-96-182 cluster is overexpressed in prostate tissue and regulates zinc homeostasis in prostate cells. *J Biol Chem*, 286(52), 44503-44511. doi:10.1074/jbc.M111.262915
- Mitalipov, S., & Wolf, D. (2009). Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 114, 185-199. doi:10.1007/10_2008_45
- Muller, F., Albert, S., Blader, P., Fischer, N., Hallonet, M., & Strahle, U. (2000). Direct action of the nodal-related signal cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS. *Development*, 127(18), 3889-3897.
- Nakano, T., Ando, S., Takata, N., Kawada, M., Muguruma, K., Sekiguchi, K., . . . Sasai, Y. (2012). Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell*, 10(6), 771-785. doi:10.1016/j.stem.2012.05.009
- NCBI. (updated on 23-Apr-2019). MIR183 microRNA 183 [Homo sapiens (human)]. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406959>
- Neitz, J., & Neitz, M. (2011). The genetics of normal and defective color vision. *Vision Res*, 51(7), 633-651. doi:10.1016/j.visres.2010.12.002
- Neubauer, A. S., & Hoops, J. P. (2000). [Bilateral retinal microangiopathy in interferon therapy of malignant melanoma of the skin]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 217(5), 308-311. doi:10.1055/s-2000-10374
- Neville, P. J., Conti, D. V., Paris, P. L., Levin, H., Catalona, W. J., Suarez, B. K., . . . Casey, G. (2002). Prostate cancer aggressiveness locus on chromosome 7q32-q33 identified by linkage and allelic imbalance studies. *Neoplasia*, 4(5), 424-431. doi:10.1038/sj.neo.7900254
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., . . . Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95(3), 379-391.
- Obernier, K., Cebrian-Silla, A., Thomson, M., Parraguez, J. I., Anderson, R., Guinto, C., . . . Alvarez-Buylla, A. (2018). Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell*, 22(2), 221-234 e228. doi:10.1016/j.stem.2018.01.003
- Ogden, T. E. (1992). Primate Retina and Choroid: Atlas of Fine Structure in Man and Monkey. Wolf Krebs , Ingeborg Krebs. *The Quarterly Review of Biology*, 67(2), 234-234. doi:10.1086/417626
- Omoti, A. E., & Omoti, C. E. (2006). Ocular toxicity of systemic anticancer chemotherapy. *Pharm Pract (Granada)*, 4(2), 55-59.
- Osakada, F., Ikeda, H., Mandai, M., Wataya, T., Watanabe, K., Yoshimura, N., . . . Takahashi, M. (2008). Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 26(2), 215-224. doi:10.1038/nbt1384
- Parfitt, D. A., Lane, A., Ramsden, C. M., Carr, A. J., Munro, P. M., Jovanovic, K., . . . Cheetham, M. E. (2016). Identification and Correction of Mechanisms Underlying Inherited

- Blindness in Human iPSC-Derived Optic Cups. *Cell Stem Cell*, 18(6), 769-781.
doi:10.1016/j.stem.2016.03.021
- Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., . . . Daley, G. Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 451(7175), 141-146. doi:10.1038/nature06534
- Pierce, M. L., Weston, M. D., Fritsch, B., Gabel, H. W., Ruvkun, G., & Soukup, G. A. (2008). MicroRNA-183 family conservation and ciliated neurosensory organ expression. *Evol Dev*, 10(1), 106-113. doi:10.1111/j.1525-142X.2007.00217.x
- Potten, C. S., & Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, 110(4), 1001-1020.
- Purves, D., & Williams, S. M. (2001). *Neuroscience* (2nd ed ed.). Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Ranga, A., Gjorevski, N., & Lutolf, M. P. (2014). Drug discovery through stem cell-based organoid models. *Adv Drug Deliv Rev*, 69-70, 19-28. doi:10.1016/j.addr.2014.02.006
- Rim, Y. A., Nam, Y., Park, N., Jung, H., Jang, Y., Lee, J., & Ju, J. H. (2018). Different Chondrogenic Potential among Human Induced Pluripotent Stem Cells from Diverse Origin Primary Cells. *Stem Cells Int*, 2018, 9432616. doi:10.1155/2018/9432616
- Sanuki, R., Onishi, A., Koike, C., Muramatsu, R., Watanabe, S., Muranishi, Y., . . . Furukawa, T. (2011). miR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through Lhx2 suppression. *Nat Neurosci*, 14(9), 1125-1134. doi:10.1038/nn.2897
- Shimura, M., Saito, T., Yasuda, K., & Tamai, M. (2005). Clinical course of macular edema in two cases of interferon-associated retinopathy observed by optical coherence tomography. *Jpn J Ophthalmol*, 49(3), 231-234. doi:10.1007/s10384-004-0176-6
- Silbernagl, S. D., A. (2003). *Taschenatlas der Physiologie* (6th ed.). Stuttgart: Thieme.
- Singhal, S., Bhatia, B., Jayaram, H., Becker, S., Jones, M. F., Cottrill, P. B., . . . Limb, G. A. (2012). Human Muller glia with stem cell characteristics differentiate into retinal ganglion cell (RGC) precursors in vitro and partially restore RGC function in vivo following transplantation. *Stem Cells Transl Med*, 1(3), 188-199.
doi:10.5966/sctm.2011-0005
- Steinfeld, J., Steinfeld, I., Coronato, N., Hampel, M.-L., Layer, P. G., Araki, M., & Vogel-Höpker, A. (2013). RPE specification in the chick is mediated by surface ectoderm-derived BMP and Wnt signalling. *Development*, 140(24), 4959-4969.
doi:10.1242/dev.096990
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*, 85(3), 845-881. doi:10.1152/physrev.00021.2004
- Sundermeier, T. R., & Palczewski, K. (2012). The physiological impact of microRNA gene regulation in the retina. *Cell Mol Life Sci*, 69(16), 2739-2750. doi:10.1007/s00018-012-0976-7
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), 861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676.
doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- Trepel, M. (2008). *Neuroanatomie* (4th ed.). München: Elsevier GmbH.
- Wahlin, K. J., Maruotti, J. A., Sripathi, S. R., Ball, J., Angueyra, J. M., Kim, C., . . . Zack, D. J. (2017). Photoreceptor Outer Segment-like Structures in Long-Term 3D Retinas from

- Human Pluripotent Stem Cells. *Scientific Reports*, 7(1), 766. doi:10.1038/s41598-017-00774-9
- Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., & Blelloch, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet*, 39(3), 380-385. doi:10.1038/ng1969
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., . . . Sasai, Y. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 25(6), 681-686. doi:10.1038/nbt1310
- Weeraratne, S. D., Amani, V., Teider, N., Pierre-Francois, J., Winter, D., Kye, M. J., . . . Cho, Y.-J. (2012). Pleiotropic effects of miR-183~96~182 converge to regulate cell survival, proliferation and migration in medulloblastoma. *Acta Neuropathologica*, 123(4), 539-552. doi:10.1007/s00401-012-0969-5
- Weston, M. D., Pierce, M. L., Rocha-Sanchez, S., Beisel, K. W., & Soukup, G. A. (2006). MicroRNA gene expression in the mouse inner ear. *Brain Res*, 1111(1), 95-104. doi:10.1016/j.brainres.2006.07.006
- Weston, M. D., Tarang, S., Pierce, M. L., Pyakurel, U., Rocha-Sanchez, S. M., McGee, J., . . . Soukup, G. A. (2018). A mouse model of miR-96, miR-182 and miR-183 misexpression implicates miRNAs in cochlear cell fate and homeostasis. *Sci Rep*, 8(1), 3569. doi:10.1038/s41598-018-21811-1
- Wienholds, E., Kloosterman, W. P., Miska, E., Alvarez-Saavedra, E., Berezikov, E., de Bruijn, E., . . . Plasterk, R. H. (2005). MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science*, 309(5732), 310-311. doi:10.1126/science.1114519
- Xiang, L., Chen, X. J., Wu, K. C., Zhang, C. J., Zhou, G. H., Lv, J. N., . . . Jin, Z. B. (2017). miR-183/96 plays a pivotal regulatory role in mouse photoreceptor maturation and maintenance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(24), 6376-6381. doi:10.1073/pnas.1618757114
- Xu, S., Witmer, P. D., Lumayag, S., Kovacs, B., & Valle, D. (2007). MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *J Biol Chem*, 282(34), 25053-25066. doi:10.1074/jbc.M700501200
- Yamanaka, S., & Blau, H. M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*, 465(7299), 704-712. doi:10.1038/nature09229
- Yamanaka, Y., Ralston, A., Stephenson, R. O., & Rossant, J. (2006). Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn*, 235(9), 2301-2314. doi:10.1002/dvdy.20844
- Young, R. W. (1967). The renewal of photoreceptor cell outer segments. *J Cell Biol*, 33(1), 61-72.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., . . . Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917-1920. doi:10.1126/science.1151526
- Zhong, X., Gutierrez, C., Xue, T., Hampton, C., Vergara, M. N., Cao, L. H., . . . Canto-Soler, M. V. (2014). Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat Commun*, 5, 4047. doi:10.1038/ncomms5047
- Zhu, Q., Sun, W., Okano, K., Chen, Y., Zhang, N., Maeda, T., & Palczewski, K. (2011). Sponge transgenic mouse model reveals important roles for the microRNA-183 (miR-183)/96/182 cluster in postmitotic photoreceptors of the retina. *J Biol Chem*, 286(36), 31749-31760. doi:10.1074/jbc.M111.259028

- Zon, L. I. (2008). Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. *Nature*, *453*(7193), 306-313. doi:10.1038/nature07038
- Zuber, M. E., Gestri, G., Viczian, A. S., Barsacchi, G., & Harris, W. A. (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development*, *130*(21), 5155-5167. doi:10.1242/dev.00723

7. Eigenanteilserklärung

Die Arbeit wurde im Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie der Universität Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Stefan Liebau, Leitung des Instituts für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie der Universität Tübingen, durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Dr. Kevin Achberger, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie Tübingen.

Messungen für diese und Messungen für folgende Studien wurden von mir eigenständig und in Zusammenarbeit mit wissenschaftlichen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Instituts für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie der Universität Tübingen, u.a. Dr. Kevin Achberger, Frau Virginia Cora, Herrn Dr. Kevin Achberger am Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie Tübingen, durchgeführt.

Sämtliche Messauswertungen und die statistische Auswertung erfolgte eigenständig, unter Anleitung von Herrn Dr. Kevin Achberger, durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

Unterschrift