

Aus dem Department für Anatomie Tübingen  
Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie

Immunzytochemische Charakterisierung von CRB1  
in humanen iPS-Zell-generierten retinalen Organoiden

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Göppert, Kathrin Elisabeth

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Authenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Liebau

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Ueffing

Tag der Disputation: 14.06.2018

meiner Familie

<b>I. Inhaltsverzeichnis</b>	
<b>II. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>III. Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>IV. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Auge .....	1
1.2 Die Retina .....	1
1.2.1 Die Schichtung der Retina .....	2
1.2.2 Die Photorezeptoren .....	4
1.2.3 Codierung und Weiterleitung .....	7
1.2.4 Frühe Embryonalentwicklung der Retina .....	8
1.3 Das Crb1-Protein .....	9
1.3.1 Entdeckung und Aufbau des Proteins .....	9
1.3.2 Die äGM und die Lokalisation von Crb1 .....	10
1.3.3 Funktionen des Crb1 .....	11
1.3.4 Crb1-Mutationen .....	13
1.3.5 Knockout-Mäuse .....	17
1.4 Induziert pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) .....	18
1.4.1 Definition und Herstellung .....	18
1.4.2 iPS-Zellen der vorliegenden Arbeit .....	20
1.5 Die iPS-Zell generierte Retina .....	20
1.5.1 Generierung von 3D Retina Organoiden .....	20
1.6 Ziel der Studie .....	22
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.1 Materialien .....	24
2.1.1 Maschinen und Geräte .....	24
2.1.2 Werkzeuge und Hilfsmittel .....	25
2.2 Chemikalien .....	26
2.2.1 Zellkultur-Medien .....	26
2.2.2 Zusätze und Chemikalien .....	26
2.2.3 Beschichtungen .....	27

2.2.4	Enzyme.....	28
2.2.5	Antikörper .....	28
2.3	Zellkultur.....	30
2.3.1	Die hiPS-Zell-Kultur .....	30
2.3.2	Die Retinadifferenzierung .....	31
2.4	Kryokonservierung und Kryoschnitte.....	33
2.4.1	Aufarbeitung des Gewebes für Kryoschnitte.....	33
2.4.2	Kryoschnitte .....	33
2.5	Biochemische Methoden .....	34
2.5.1	Die Immunzytochemie .....	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
3.1	Das Protokoll zur Differenzierung der hiPS-Zellen zu retinalen Organoiden.....	37
3.2	Die Zelltypen der mehrschichtigen Neuralen Retina .....	40
3.3	Die Photorezeptoren .....	42
3.3.1	Clusterung innerhalb der Photorezeptorenentwicklung .....	42
3.3.2	Spezialisierungen innerhalb der Photorezeptorenentwicklung .....	44
3.3.3	Die Segmentausbildung der Photorezeptoren .....	46
3.4	Das CRB1-Protein.....	48
3.4.1	Das CRB1-Protein lokalisiert oberhalb der äGM.....	48
3.4.2	Das CRB1-Protein grenzt an die Photorezeptorensegmente .....	50
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>52</b>
4.1	Stammzell-basierte Systeme und Generierung der humanen retinalen Organoiden.....	52
4.2	Die Zellen der retinalen Organoiden.....	53
4.3	Die Reifung der Photorezeptoren: Übersicht und Vergleich .....	55
4.4	Die Expression und Lokalisation von CRB1: Übersicht und Vergleich .....	58
4.5	Schlussfolgerung und Ausblick .....	60
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil</b> .....	<b>72</b>
	<b>Danksagungen</b> .....	<b>73</b>

## II. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	Die Schichtung der Retina
<b>Abbildung 2</b>	Schematische Darstellung der Lokalisation der verschiedenen Proteine in der SAR oder in den AJ
<b>Abbildung 3</b>	Das Protokoll zur Differenzierung der hiPS-Zellen zu retinalen Organoiden
<b>Abbildung 4</b>	Die Zelltypen der mehrschichtigen Neuralen Retina
<b>Abbildung 5</b>	Clusterung innerhalb der Photorezeptorenentwicklung
<b>Abbildung 6</b>	Spezialisierungen innerhalb der Photorezeptorenentwicklung
<b>Abbildung 7</b>	Die Segmentausbildung der Photorezeptoren
<b>Abbildung 8</b>	Die CRB1-Expriemierung oberhalb der äGM
<b>Abbildung 9</b>	Das CRB1-Protein grenzt an die Photorezeptorensegmente

## III. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b>	Primärantikörper
<b>Tabelle 2</b>	Sekundärantikörper

## IV. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
äGM	äußere Grenzmembran
AJ	Adherens Junction
äKS	äußere Körnerschicht
aPKC	atypical protein kinase C
äpS	äußere plexiforme Schicht
ARR	Arrestin
AS	Außensegment
AZ	Amakrinzellen
BZ	Bipolarzellen
CA	California
CALB	Calbindin
Cdc 42	cell division control protein 42
CGL	Corpus geniculatum laterale
CO	Colorado
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRALBP	cellular retinaldehyde-binding protein
Crb1	Crumbs-like Protein 1
Crb2	Crumbs-like Protein 2
Crb3	Crumbs-like Protein 3
CRX	cone-rod homeobox
CT	Connecticut
d	day
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EB	Embryoid Body
EF	Eye Field
EGF	epidermal growth factor
ER	endoplasmatische Retikulum

ERG	Elektroretinogramm
FERM	protein 4.1-ezrin-radixin-moesin
FGF-2	fibroblast growth factor 2
FKS	fetales Kälberserum
GA	Georgia
GZ	Ganglienzellen
GZS	Ganglienzellschicht
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Chlorwasserstoff
hESZ	humane embryonale Stammzellen
HM	Hormonmix
HSA	Human Serum Albumin 27
HZ	Horizontalzellen
IgG	Immunglobulin G
iGM	innere Grenzmembran
iKS	innere Körnerschicht
ipS	innere plexiforme Schicht
iPS-Zellen	induziert pluripotente Stammzellen
IS	Innensegment
IWP-2	Inhibitor of Wnt Production-2
Klf4	Kruppel-like factor 4
KSR	Knockout Serum Replacement
L/M-O	L/M-Opisin
L-/M-Opisin	long-to-middle wavelength opsin
LCA	Lebersche Kongenitale Amaurose
LCA8	Lebersche Kongenitale Amaurose Typ 8
LEC	Lectin
MA	Massachusetts
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MO	Missouri



Mpp4	membrane palmitoylated protein 4
Mpp5	membrane palmitoylated protein 5
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
Mupp1	multi-PDZ domain protein 1
mV	Millivolt
MZ	Müllerzellen
NDS	Normal Donkey Serum
NEAA	non-essential amino acids
NFS	Nervenfaserschicht
NL	Niederlande
nm	Nanometer
NR	Neurale Retina
NY	New York
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
Oct4	octamer-binding transcription factor 4
Pals1	protein associated with Lin-7 1
Patj	crumbs cell polarity complex component
Pax6	paired box 6
PBS	phosphate-buffered saline
Pde6 $\beta$	phosphodiesterase subunit beta
PDZ	PSD95, Dlg1, ZO-1
PER12	Peripherin 2
PFA	Paraformaldehyd
PKC $\alpha$	protein kinase C alpha
PNA	peanut agglutinin
PPRPE	preserved para-arteriolar retinal pigment epithelium
REC	Recoverin
RHO	Rhodopsin
RP	Retinitis pigmentosa
RP12	Retinitis pigmentosa Typ 12
RPE	retinales Pigmentepithel
RPE65	retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein

rpm	revolutions per minute
Rx	retinal homeobox
S	Segmente, Stäbchen
SAG	smoothened agonist
SAR	subapikale Region
sE	synaptisches Endfüßchen
S-O	S-Opsin
S-Opsin	short wavelength opsin
Sox2	SRY (sex determining region Y)-box 2
TGF $\beta$ 1	transforming growth factor beta 1
TULP1	tubby like protein 1
UK	United Kingdom
VC	Verbindungscilium
Vgl.	Vergleich
W	week
Wnt	Wingless
Z	Zapfen
ZA	Zonula adhaerens
ZK	Zellkörper
ZO-1	Zonula occludens-1
ZO-2	Zonula occludens-2
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ M	Mikromol

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Auge

Das Auge ist eines der wichtigsten Sinnesorgane des Menschen und liefert uns in seiner Form einen wertvollen Fernsinn, das Sehen. Über die Augen tritt eine Fülle an Informationen in das visuelle System ein, welches uns ein komplexes Bild mit Formen, Farben und Texturen erschafft (Frings und Müller 2010). Dem Mensch, als optisch orientiertes Wesen, eröffnet sich durch diesen Sinn die Umwelt, welche auf dem lichtempfindlichen, informationsverarbeitenden Teil des Auges, der Netzhaut (Retina), abgebildet wird (Frings und Müller 2010; Kirsch 2010). Diese innere Schicht des Augapfels kleidet den Augenhintergrund aus und liegt von innen der Choroidea an (Kirsch 2010). Die Fülle der sensorischen Daten wird anschließend durch ein hochkomplexes Auswertesystem analysiert, bearbeitet und interpretiert (Frings und Müller 2010). Dieser Prozess beginnt in der Retina und wird über den Nervus opticus zu höher liegende Zentren weitergeleitet. Der größte Anteil der Informationen durchläuft so das Chiasma opticum, wird zum Corpus geniculatum laterale (CGL) übertragen und endet im Kortex, wo die visuelle Informationsverarbeitung abgeschlossen wird (Frings und Müller 2010; Kirsch 2010).

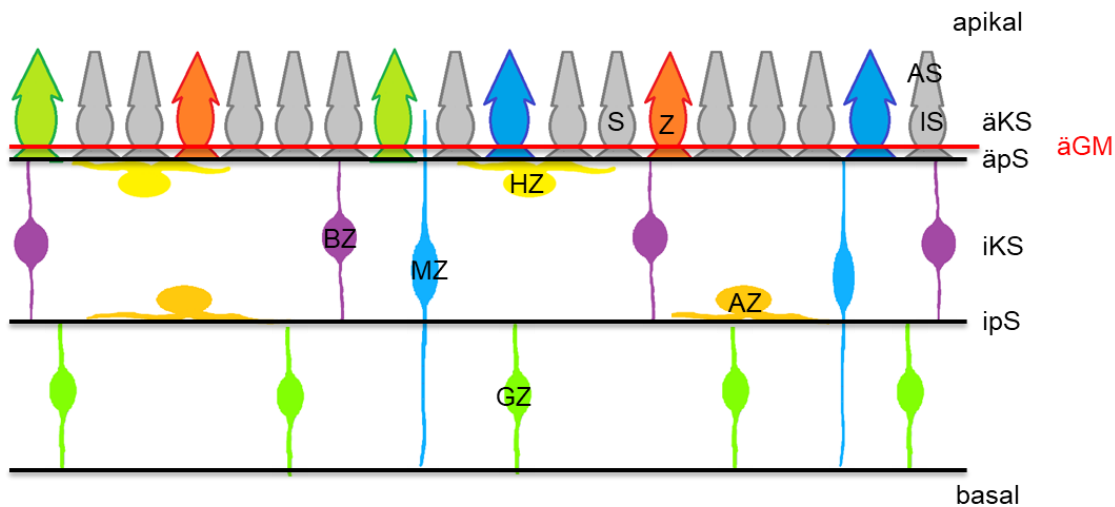
## 1.2 Die Retina

Die Retina, als erster Teil des visuellen Systems, ist für die projizierende Wahrnehmung von elektromagnetischer Strahlung (Licht) und deren Umwandlung in zunächst chemische und später elektrische Impulse verantwortlich (Frings und Müller 2010; Kirsch 2010). Für die lichtempfindlichen Sinneszellen der menschlichen Netzhaut stellt der adäquate Reiz elektromagnetische Strahlung im Spektrum von circa 380 nm (violett) bis 760 nm (rot) dar (Luo 2000).

## Einleitung

Als sensorisches Gewebe ist die Retina anatomisch sehr klar geschichtet und enthält eine Reihe von spezialisierten Zellen. Hierbei sind Struktur und Funktion in enger Korrelation miteinander verzahnt (Frings und Müller 2010; Kirsch 2010).

### 1.2.1 Die Schichtung der Retina



**Abbildung 1: Die Schichtung der Retina.**

S = Stäbchen; Z = Zapfen; HZ = Horizontalzellen; BZ = Bipolarzellen; MZ = Müllerzellen; AZ = Amakrinzellen; GZ = Ganglienzellen; AS = Außensegment; IS = Innensegment; äKS = äußere Körnerschicht; äpS = äußere plexiforme Schicht; iKS = innere Körnerschicht; ipS = innere plexiforme Schicht; äGM = äußere Grenzmembran.

Zunächst wird die Retina in eine äußere und eine innere Retina gegliedert, wobei die innere Retina in weitere Schichten aufgeteilt wird. Die **Abbildung 1** zeigt eine Übersicht der retinalen Schichtung. Im Wesentlichen lassen sich hier drei Zellkörperschichten definieren, welche durch zwei synaptische oder auch plexiforme Schichten getrennt sind (Kirsch 2010).

Die äußere Retina ist ein einschichtiges, isoprismatisches Pigmentepithel (retinales Pigmentepithel, RPE), dessen Zellen an ihrem apikalen Pol mit zahlreichen Mikrovilli und Taschen ausgestattet sind. Der Choroidea anliegend ist das RPE mitverantwortlich für die Blut-Retina-Schranke und sorgt für den

## Einleitung

Stoffaustausch zwischen Choroidea und den Zellen der inneren Retina (Strauss; Kirsch 2010).

Dem RPE schließt sich nach innen die innere Retina an, welche sich lichtmikroskopisch in neun weitere Schichten unterteilen lässt. Sie enthält die ersten drei Neurone der Sehbahn (Photorezeptoren, Bipolarzellen, Ganglienzellen), modulierende Neurone (Horizontal- und Amakrinzellen), sowie die Gliazellen der Retina, genannt Müller-Glia (Kirsch 2010).

Als erste Schicht zeigt sich die Schicht der Photorezeptor-Fortsätze. In ihr befinden sich die Außen- (AS) und Innensegmente (IS) der Photorezeptoren, welche interdigitierend zwischen die Mikrovilli des RPEs reichen (Kirsch 2010).

Die sich anschließende Schicht ist die äußere Grenzmembran (äGM) (Kirsch 2010). Hier bilden die Gliazellen der Netzhaut, die Müllerzellen, sowohl untereinander als auch mit den IS der Photorezeptoren Zonulae adhaerens (ZA) aus (Kolb 2011b). Die Müllerzellen sind in der Retina unter anderem für die metabolische Unterstützung der Neurone und für die Beibehaltung der Zelladhäsion zuständig (van Rossum et al. 2006).

An die äGM grenzt die erste Zellkörperschicht. In dieser äußeren Körnerschicht (äKS) befinden sich die Zellkörper der Photorezeptoren, die sich in Stäbchen und Zapfen unterteilen (Kirsch 2010).

In der äußeren plexiformen Schicht (äpS) bilden sich Synapsen und Gap junctions zwischen Photorezeptorzellen, Bipolar- und Horizontalzellen. Es ist die erste synaptische Schaltstelle der Retina, bei der die von den Photorezeptoren aufgenommenen Lichtsignale auf die nachgeschalteten Nervenzellen (Bipolarzellen) übertragen werden. Hier findet demnach bereits die erste intraretinale Informationsverarbeitung statt (Kirsch 2010).

Die folgende Zellkörperschicht, die innere Körnerschicht (iKS), enthält die Zellkörper der Bipolarzellen, sowie die Zellkörper der Amakrin-, der Horizontal- (Kirsch 2010) und der Müllerzellen (Kolb 2013).

## Einleitung

An die iKS schließt sich die zweite synaptische Schicht an, die innere plexiforme Schicht (ipS). In dieser Schicht befinden sich, wie auch schon in der äpS, viele Zellfortsätze und Synapsen, welche von Bipolar-, Horizontal-, Amakrin- und Ganglienzellen gebildet werden (Kirsch 2010).

Die Schicht des dritten Neurons ist die retinale Ganglienzellschicht (GZS), in welcher sich die Zellkörper der Ganglienzelltypen befinden (Kirsch 2010).

Die Axone der Ganglienzellen bündeln sich in der Nervenfaserschicht (NFS). Die über 1 Million markhaltigen Fasern erhalten ihre Myelinscheiden erst nach Austritt aus dem Bulbus, wo sie die Informationen an höher gestellte Zentren weiterleiten (Kolb 2011a; Kirsch 2010).

Der NFS schließt sich als weitere Grenzschicht die innere Grenzmembran (iGM) an. Sie wird durch die konischen Endfüßchen der Müllerzellen gebildet und stellt die Grenze zum Glaskörper des Auges dar (Kolb 2013; Kirsch 2010).

Die Photorezeptoren, als lichtempfindlicher Teil der Retina, liegen auf der lichtabgewandten Seite. So müssen die Lichtstrahlen zunächst alle Schichten der inneren Retina durchqueren bevor sie durch die AS aufgenommen werden. Die Retina ist nach diesem Prinzip invers aufgebaut (Kirsch 2010).

### **1.2.2 Die Photorezeptoren**

Die Photorezeptoren sind die spezialisierten Sinneszellen des Auges. Sie sind im Dunkeln depolarisiert (-30 mV bis -40 mV) und werden bei Erregung, das heißt bei Belichtung, hyperpolarisiert (Frings und Müller 2010).

Photorezeptoren sind lang gestreckte, stark polarisierte Zellen, deren Dendriten zur Absorption von elektromagnetischer Strahlung geeignet sind. Besondere Bedeutung kommt ihnen als erstes Neuron der Sehbahn zu, da hier die Photo-transduktion abläuft (Kirsch 2010). Im Allgemeinen werden zwei Arten von Photorezeptoren unterschieden. Zum einen die helligkeitsempfindlichen Stäbchen, welche für das Dämmerungssehen (skotopisches Sehen)

## Einleitung

verantwortlich sind, zum anderen die farbempfindlichen Zapfen, die für das Tages- und Farbsehen (photopisches Sehen) zuständig sind (Frings und Müller 2010; Kirsch 2010). Stäbchen sind nicht in der Lage, unterschiedliche Wellenlängen elektromagnetischer Strahlung zu erkennen und liefern daher keine Farbinformation (Frings und Müller 2010). Sie zeigen jedoch eine hervorragende Sensitivität zu Licht und können bereits ein einzelnes Photon detektieren (Rieke 2000; Sampath und Rieke 2004). Zapfen sind im Gegensatz hierzu 100 Mal weniger sensitiv (Hoon et al. 2014). Beim Menschen werden drei Zapfenarten, die jeweils für eine spezifische Wellenlänge sensibilisiert sind, unterschieden (Frings und Müller 2010). Die Absorptionsmaxima ihrer Sehpigmente liegen bei circa 420 nm (blau), 530 nm (grün) und 560 nm (rot) (Bowmaker und Dartnall 1980; Bowmaker et al. 1980). Ein wesentlicher Unterschied zwischen Stäbchen und Zapfen besteht auch in der Anzahl und in deren Verteilung in der menschlichen Retina. Stäbchen sind mit einer Anzahl von 120 Millionen in der Retinaperipherie vertreten und zeigen keinerlei Vorkommen in der Fovea centralis. Zapfen hingegen findet man hauptsächlich in der Fovea centralis, wobei sie auch in geringerer Zahl in der Peripherie auftreten. Mit einer Anzahl von circa 6 Millionen sind sie deutlich weniger häufig als die Stäbchen (Fei 2003; Curcio et al. 1987; Querubin et al. 2009; Yamada 1969; Frings und Müller 2010). In ihrem Grundbauplan und in ihrem Aufbau sind die beiden Photorezeptorarten allerdings fast identisch. Sie erstrecken sich über die Schicht der Photorezeptorfortsätze, die äGM, die äKS und enden in der äpS, wo sie mit Bipolar- und Horizontalzellen Synapsen bilden (Kirsch 2010). Sie bestehen aus zwei Kompartimenten, dem Außensegment (AS) und dem Innensegment (IS) (Frings und Müller 2010; Kirsch 2010) und einer speziellen chemischen Synapse, einer Ribbon-Synapse (Dowling 1987). Das AS und das IS sind über ein Verbindungscilium (VC) miteinander verbunden (Kirsch 2010).

### **1.2.2.1 Das Innensegment**

Das IS besteht aus einem distalen Ellipsoid und einem proximalen Myoid. Während im Ellipsoid zahlreiche Mitochondrien angesiedelt sind, befinden sich im Myoid das endoplasmatische Retikulum (ER), freie Ribosomen und der Golgi-Apparat. In diesem stoffwechselaktiven Segment findet sowohl die Proteinbiosynthese der Rezeptorproteine für den Lichtsensor statt sowie die Bildung der photosensiblen Membranen, welche in den AS benötigt werden (Kirsch 2010).

### **1.2.2.2 Das Verbindungscilium**

Das VC stellt die Verbindungsstelle zwischen IS und AS dar (Pearing et al. 2013). Es ist ein unbewegliches, durch eine Einschnürung des Zellkörpers entstandenes Cilium, welches aus neun Mikrotubuli-Dupletts ohne die beiden zentralen Tubuli besteht (Kirsch 2010). Die Struktur des VCs spielt eine große Rolle im Transport von Substraten zwischen den beiden Segmenten. So scheint die Membran des VCs im Transport von Rhodopsin ausgehend vom IS zum AS wichtig zu sein (Wolfrum und Schmitt 2000).

### **1.2.2.3 Das Außensegment**

Das AS ist ein auf die Absorption von Lichtquanten spezialisiertes Kompartiment. Es enthält die Komponenten zur photoelektrischen Transduktion und bildet so den eigentlichen Lichtsensor (Frings und Müller 2010; Kirsch 2010).

In den AS der Stäbchen befinden sich jeweils circa 1000 flache Membransäckchen, die sogenannten Disks. In der Lipiddoppelschicht dieser Disks ist Rhodopsin, das Sehpigment der Stäbchen, eingelagert. Die Diskmembranen und die Plasmamembran sind in den Stäbchen im Gegensatz zu



den Zapfen vollständig getrennt. In den Zapfen befindet sich das Sehpigment in der Plasmamembran, welche stapelförmig gefaltet ist. Außerdem besitzen die Zapfen für jeden speziellen Zapfentyp ein eigenes Opsin als Sehpigment (Frings und Müller 2010). Im Allgemeinen ist die Grundform der AS bei den Zapfen kürzer und breiter als bei den Stäbchen (Kirsch 2010). Die AS werden circa alle zehn Tage von basal erneuert. Die abgestoßenen Teile werden apikal vom RPE phagozytiert (Frings und Müller 2010; Kirsch 2010).

### **1.2.3 Codierung und Weiterleitung**

Zu Beginn der visuellen Information muss die Codierung von Licht in Membranpotenzialänderungen erfolgen. So wird im ersten Schritt der Lichtreiz in den Photorezeptoren von einem chemischen Signal in ein elektrisches Signal umgewandelt (Frings und Müller 2010). Die Änderung des elektrischen Signals in den Photorezeptoren führt auch in den nachgeschalteten Zellen zu Membranpotenzialveränderungen (Frings und Müller 2010). Den Photorezeptoren nachgeschaltet sind Bipolar-, Horizontal- und Amakrinzellen. Horizontal- und Amakrinzellen sind lateral verschaltete Interneurone, welche vor allem modulierend an der Informationsverarbeitung beteiligt sind. Während die Horizontalzellen synaptisch zwischen die Photorezeptoren und die Bipolarzellen greifen, wirken die Amakrinzellen zwischen den Bipolar- und den Ganglienzellen (Kirsch 2010). Amakrinzellen weisen bis zum heutigen Kenntnisstand mehr als 40 verschiedene Subtypen auf (Kolb 2015). Bei der Informationsweitergabe von Photorezeptoren auf Bipolarzellen können Zapfen mit bis zu 15 verschiedenen Bipolarzellen in Kontakt stehen oder aber auch nur mit zwei kleinen Bipolarzellen (Boycott und Wässle 1991). Die weitere Verschaltung erfolgt von den Bipolarzellen auf die zehn bis 15 verschiedenen Ganglienzelltypen (Masland 2001). Die unmyelinisierten Axone der Ganglienzellen ziehen dann radial zum Discus nervi optici und verlassen die Orbita als myelinisierter Nervus opticus (Kirsch 2010).

### 1.2.4 Frühe Embryonalentwicklung der Retina

Die *in vivo* Entwicklung des Auges beginnt im Embryo in der Neuralplatte mit der Bildung des Augenfeldes (Eye Field, EF). Das EF stellt eine organisierte Domäne aus einer Subpopulation von anterioren, neuroepithelialen Zellen dar, welche in der weiteren Entwicklung zu retinalen Progenitorzellen werden (Adler und Canto-Soler 2007; Zuber et al. 2003). Es ist durch eine Reihe verschiedener Transkriptionsfaktoren charakterisiert, welche unter anderem Pax6 und Rx beinhalten (Zuber et al. 2003; Zuber 2010; Pevny et al. 1998; Zhang et al. 2010). Auch in der *in vitro* Entwicklung lassen sich EF-Strukturen, welche die *in vivo* Prozesse nachahmen, ausfindig machen (Zhong et al. 2014), insbesondere durch die ektodermale Differenzierung von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) oder induziert pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen). Diese zeigen in der frühen neuronalen Entwicklung sogenannte neurale Rosetten, welche strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zur Neuralplatte, bzw. zum Neuralrohr in der Embryogenese zeigen (Elkabetz et al. 2008; Wilson und Stice 2006). Im weiteren Entwicklungsprozess bildet das EF *in vivo* rechts und links die Augenbläschen aus (Zhong et al. 2014). Anschließend stülpt sich der distale Anteil der Bläschen ein um den Augenbecher zu formen. Die äußere Seite dieser Struktur entwickelt sich im weiteren Prozess zum RPE, während sich die innere Seite zur neurosensorischen Schicht, der Neuralen Retina (NR), entwickelt (Eiraku et al. 2011). Auch dieser Prozess der Augenbecher-Bildung wurde *in vitro* bereits beschrieben und wird in Kapitel 1.5.1 detailliert erläutert (Eiraku et al. 2011; Nakano et al. 2012; Zhong et al. 2014).

## 1.3 Das Crb1-Protein

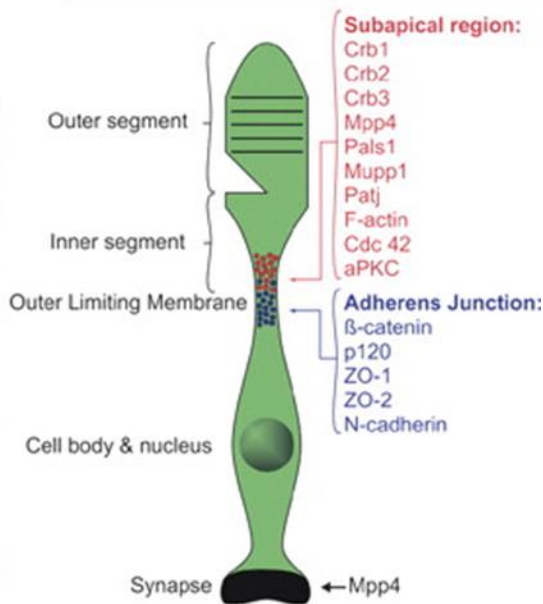
### 1.3.1 Entdeckung und Aufbau des Proteins

Crb1 (Crumbs-like Protein 1), das humane Homolog des Crumbs-Protein in *Drosophila melanogaster*, wird im Menschen vermutlich nur im Gehirn und in der Retina exprimiert (den Hollander et al. 1999; den Hollander et al. 2001). Crumbs in *Drosophila* hingegen scheint in allen Epithelien, welche vom Ektoderm abgeleitet sind, vorzukommen (Tepass et al. 1990; Tepass und Knust 1990). Seit 1999 die Sequenz des *CRB1* publiziert wurde (den Hollander et al. 1999), sind von allen Kernkomponenten des Crumbs-Komplexes Orthologe identifiziert worden. Wie bei vielen anderen Proteinen haben einige Komponenten des Crumbs-Komplexes mehr als nur ein Ortholog in der Wirbeltier-Familie. So besteht die Crb-Familie aus drei Mitgliedern - Crb1, Crb2 und Crb3 (den Hollander et al. 1999). Im Gegensatz zum Expressionsmuster von *CRB1*, seien die Proteine Crb2 und Crb3 in einer großen Anzahl von Geweben exprimiert, die Retina mit eingeschlossen (Lemmers et al. 2002; van den Hurk et al. 2005; Makarova et al. 2003). Der Prototyp des Crbs ist ein Transmembranprotein mit einer großen extrazellulären Domäne mit einer EGF-ähnlichen und laminin-globularen Domäne, einer einzelnen trans-membran-Domäne und einem intrazellulären C-Terminus von 37 Aminosäuren mit einzelnen FERM- und PDZ-Bindungsmotiven (Tepass et al. 1990). Durch diese Bindungsmotive kann Crb1 vermutlich in die Formation der Adherens Junction (AJ) eingreifen und sich mit dem Aktin des Cytoskeletts verbinden (Gosens et al. 2008). Das Crb3 besitzt eine komplett andere extrazelluläre Domäne als die anderen Crb-Proteine, ist jedoch aufgrund der Ähnlichkeit in der cytoplasmatischen Domäne dennoch ein Teil der Crb-Familie (Gosens et al. 2008; Richard et al. 2006). Der Crb-Komplex setzt sich im Einzelnen aus den transmembranen Crb-Proteinen (Crb1-3), dem assoziierten cytoplasmatischen Pals1 und dem Patj oder dem Mupp1 zusammen (Assemat et al. 2013; Bulgakova et al. 2008; Michel et al. 2005). Die verschiedenen Komponenten des Komplexes binden untereinander an verschiedene Strukturen. So bindet wahrscheinlich der

C-Terminus des PDZ-Bindungsmotivs an die PDZ-Domäne von Pals1, welches über seinen N-Terminus der L27-Domäne an Patj und Mupp1 bindet (Roh et al. 2003).

### 1.3.2 Die äGM und die Lokalisation von Crb1

Epithelien sind durch ihre klare apiko-basale Polarität charakterisiert. Diese strukturelle Organisation findet sich in vielen zellulären Bereichen der Gewebeanatomie wieder (Rodriguez-Boulan und Nelson 1989). Die Ausbildung von Zellverbindungen ist für die Funktion und die Integrität der Retina essentiell (Malicki 2004). Neuroepitheliale Zellen sind durch AJ miteinander verbunden, hierdurch wird die apikale Plasmamembran von der basolateralen Domäne abgetrennt. Diese beiden Bereiche besitzen sowohl verschiedene Proteine als auch verschiedene Lipidkomplexe, welche sich auch in ihren Aufgaben unterscheiden (van de Pavert et al. 2007). Durch Zonulae adhaerentes, einer Untergruppe der Adhaerens junctions, zwischen Müllerzellen und Photorezeptoren entsteht eine gürtelähnliche Struktur, die äGM. Apikal des Adhäsionsgürtels liegt eine Region, welche die subapikale Region (SAR) genannt wird (van de Pavert et al. 2004). Wie in der **Abbildung 2** gezeigt, ist in der SAR der menschlichen Retina, Crb1 zusammen mit Mpp5/Pals1 und Mpp4 wahrscheinlich lokalisiert (Kantardzhieva et al. 2005). In der erwachsenen Mausretina, wird *Crb2* sowohl in Müllerzellen als auch in Photorezeptoren exprimiert, während *Crb1* nur in Müllerzellen gefunden wurde (van Rossum et al. 2006). Die Expression des *CRB1*-Gens innerhalb der menschlichen Retina ist nach dem heutigen Forschungsstand auf die Photorezeptoren beschränkt. *CRB2* findet sich in der menschlichen Retina hingegen in den Müllerzellen (Pellissier et al. 2014).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Lokalisation der verschiedenen Proteine in der SAR oder in den AJ.**

Modifiziert nach van de Pavert et al. 2004. Crb1 = Crumbs-like protein 1; Crb2 = Crumbs-like protein 2; Crb3 = Crumbs-like protein 3; Mpp4 = membrane palmitoylated protein 4; Pals1 = protein associated with Lin-7 1; Mupp1 = multi-PDZ domain protein 1; Patj = crumbs cell polarity complex component; Cdc 42 = cell division control protein 42; aPKC = atypical protein kinase C; ZO-1 = Zonula occludens-1; ZO-2 = Zonula occludens-2.

### 1.3.3 Funktionen des Crb1

Die Funktionen des *CRB*-Gens sowohl in der Entwicklung als auch in der Integrität der Retina, sind bei den verschiedenen Tierklassen unterschiedlich gut untersucht. So ist beispielsweise das *CRB*-Gen der *Drosophila melanogaster* besser untersucht als das Wirbeltier-*CRB* oder das humane *CRB*-Gen.

In *Drosophila melanogaster* ist *CRB* ein Schlüsselregulatorgen für die Bildung und die Aufrechterhaltung der apiko-basalen Polarität in ektodermalen Epithelien (Tepass et al. 1990). Es gibt Hinweise darauf das *CRB1* an der Biogenese und der Wahrung der Integrität der ZA beteiligt ist (Klebes und Knust 2000; Izaddoost et al. 2002) auch wenn Crumbs selbst keine Komponente der ZA ist (Tepass 1996). Crb spielt außerdem in der Morphogenese, Struktur und

## Einleitung

Funktion der Photorezeptoren eine Rolle (Izaddoost et al. 2002; Pellikka et al. 2002). So ist *CRB* ein mögliches zentrales Regulatorgen in der Entwicklung des Rhabdomers (Pellikka et al. 2002), ein Mikrovillisaum einer Retinulazelle im Ommatidium des Komplexauges. Diese Struktur ist zu den AS der Vertebraten-Photorezeptoren homolog (Mehalow et al. 2003).

Es wurde vermutet, dass das Säugetier-Crb1 bzw. das Vertebraten-Crb1 die gleichen Funktionen wie Crumbs in *Drosophila* haben könnte (Johnson et al. 2002; Pellikka et al. 2002). Die Studien in den letzten Jahren, zeigten zwar einige Übereinstimmungen, jedoch auch mehrere Unterschiede.

Zunächst trägt das Vertebraten-Crb1 wesentlich zum Gerüst des mehrteiligen Crb-Komplexes bei (van de Pavert et al. 2004). Wie auch in *Drosophila melanogaster* spielt das Crb-Homolog 1 in Vertebraten eine Rolle in der Organisation der epithelialen Morphologie und der Entwicklung der Polarität (Roh et al. 2003). Es könnte hierbei für die Integrität der AJ und somit für die Manifestation der äGM in der neuralen Retina verantwortlich sein (Mehalow et al. 2003). Auch in der Entwicklung der IS und AS der Photorezeptoren spielt Crb1 eine wichtige Rolle (Mehalow et al. 2003) und ist vermutlich bei anhaltender Belichtung für die Beibehaltung einer einzelnen organisierten Schicht von Photorezeptoren verantwortlich (van de Pavert et al. 2004). Außerdem schützt es die Photorezeptoren bei Belichtung vor physiologischem Stress (van de Pavert et al. 2004). Eine andere Studie zeigt, dass Crb-Proteine ebenfalls in der Bildung und Stabilität des primären Ciliums beteiligt sind (Bulgakova und Knust 2009). Dieses primäre Cilium stellt in den Photorezeptoren das VC dar. Des Weiteren soll Crb1 ebenso auf die Regulierung der apikalen Zottengröße der Müllerzellen Einfluss üben (van de Pavert et al. 2007).

Es wird vermutet, dass Proteine, welche an der Zelladhäsion und an der Zellpolarität beteiligt sind, wie z.B. das Crb1, eine kritische Rolle in der Proliferation und Entwicklung von Vorläuferzellen spielen (Martin-Belmonte und Perez-Moreno 2012). So scheint das Crb1 bei Verlust in der Entwicklung auf die

natürlichen Prozesse der Apoptose Einfluss zu nehmen (Aleman et al. 2011; Jacobson et al. 2003).

Dem Crb1-Protein werden ebenfalls Funktionen in verschiedenen genetischen Signalwegen zugeschrieben, welche die Zellproliferation und das Zellschicksal bestimmen (Pellissier et al. 2013). Einer dieser Signalwege ist beispielsweise der Notch1-Signalweg, welcher in der Retinaentwicklung eine äußerst wichtige Rolle spielt (Rocha et al. 2009; Jadhav et al. 2006b; Yaron et al. 2006; Riesenberg et al. 2009; Jadhav et al. 2006a; Zheng et al. 2009; Takatsuka et al. 2004; Hojo et al. 2000). Auch im Wingless-Signalweg (Wnt-Signalweg) agiert der Crb-Komplex möglicherweise als Regulator-Protein (Bulgakova und Knust 2009). Dieser Signalweg ist in vielen Ebenen der Retinaentwicklung, z.B. bei der Entstehung des „retinalen Felds“ oder der Erhaltung der retinalen Vorläuferzellen, wichtig (Lad et al. 2009). Auch im Hippo-Signalweg scheint Crb1 eine interagierende und beeinflussende Rolle zu besitzen (Chen et al. 2010; Robinson et al. 2010). Die Bedeutung des Hippo-Signalwegs in der Retinaentwicklung ist trotz den Forschungen in den letzten Jahren noch immer größtenteils unklar (Alves et al. 2014). Auch die Tragweite des mTOR-Signalwegs in der Retinaentwicklung ist noch nicht genau bekannt, obwohl ihm eine Funktion in der Homöostase und der Ernährungsausgewogenheit der Photorezeptoren zugeschrieben wird (Alves et al. 2014). Der Crb-Komplex greife in diesen Signalweg über Patj ein (Massey-Harroche et al. 2007).

Auch nach vielen durchgeführten Studien ist heute immer noch unklar, wie ein einzelnes Gen wie *CRB1* Form, Polarität und Funktion von verschiedenen Zelltypen beeinflussen kann (Bulgakova und Knust 2009).

### **1.3.4 Crb1-Mutationen**

Mutationen im humanen *CRB1*-Gen rufen progressive, degenerative Erkrankungen der Retina hervor, welche schwere visuelle Beeinträchtigungen oder sogar Blindheit von Geburt oder Kindheit an verursachen können. Zwei dieser Erkrankungen sind Lebersche Kongenitale Amaurose (LCA) und Retinitis

pigmentosa (RP) (den Hollander et al. 1999; den Hollander et al. 2001; Lotery et al. 2001). Die verschiedenen Mutationen in diesem Gen sind für circa 10 bis 15 % aller LCA-Fälle und für circa 4 % aller RP-Fälle verantwortlich (den Hollander et al. 2008; Richard et al. 2006). Obwohl im *CRB1*-Gen bereits über 150 verschiedene Mutationen entdeckt worden sind, gibt es bisher immer noch keine klare Genotyp-Phänotyp Korrelation (Bujakowska et al. 2012). Der Schweregrad und die Ausprägung der Krankheiten scheinen wesentlich vom genetischen Hintergrund abhängig zu sein (Richard et al. 2006). Andere Komponenten des Crb-Komplexes könnten den Schweregrad der Krankheiten ebenfalls beeinflussen (Bujakowska et al. 2012; Mehalow et al. 2003; van de Pavert et al. 2004). In Studien mit Mäusen führten *Crb1*-Mutationen ebenfalls zu Retinaanomalien, jedoch waren diese weniger schwerwiegend als die Mutationen im menschlichen Genom (Mehalow et al. 2003; van de Pavert et al. 2004). Interessanterweise sind bisher keine LCA- oder RP-Patienten mit Mutationen im *CRB2*-Gen gefunden worden (van den Hurk et al. 2005).

### **1.3.4.1 Lebersche Kongenitale Amaurose**

Die LCA gehört zu den retinalen Erbkrankheiten und wurde 1869 erstmals von dem deutschen Augenarzt Theodor Carl Gustaf von Leber beschrieben (Leber 1869). Diese Krankheitsgruppe umfasst circa 5 % aller retinalen Dystrophien und ist einer der Hauptgründe für Erblindungen im Kindesalter (Schappert-Kimmijser et al. 1959; Kaplan et al. 1990; Perrault et al. 1999). Die LCA ist die schwerste aller retinaler Erbkrankheiten und hat eine geschätzte Prävalenz von eins zu 81000 (Stone 2007).

Die Krankheit manifestiert sich bereits bei Geburt und zeigt sich durch ein nicht aufzeichnenbares Elektroretinogramm (ERG), Nystagmus, einen trägen oder fehlenden Pupillenreflex, Erblindung (den Hollander et al. 2008) oder schwerer visueller Beeinträchtigung, zum Beispiel Hyperopie mit über fünf Dioptrien (Heckenlively 1988). Allerdings ist die LCA klinisch sehr heterogen, so dass



diese Merkmale in unterschiedlichen Ausprägungen vorliegen können (Cremers et al. 2002).

Im Jahr 2009 waren bereits Mutationen in 14 Genen bekannt, welche alle unterschiedliche Formen der LCA verursachen (Bulgakova und Knust 2009). Zum jetzigen Zeitpunkt sind 22 Gene beschrieben (Chacon-Camacho und Zenteno 2015). Der Großteil der LCA-Fälle wird rezessiv weitervererbt, auch wenn einige dominante Erbgänge bereits entdeckt wurden (Sohocki et al. 1998; Heckenlively 1988).

Für 10 % aller LCA-Fälle sind Mutationen im *CRB1*-Gen verantwortlich (den Hollander et al. 2008), man nennt diesen Typ LCA8. Jacobson et al. (2003) zeigen, dass Retinas von LCA8-Patienten im Vergleich zu normalen Retinas oder im Vergleich zu Retinas von anderen LCA-Typen wesentlich dicker sind (Jacobson et al. 2003). Außerdem zeigt sich in den Retinas der LCA8-Patienten eine ungewöhnliche, unreife Schichtung im Vergleich zu normalen adulten Retinas, was für die Annahme einer Unterbrechung des natürlichen Prozesses der Apoptose während der retinalen Entwicklung spricht (Aleman et al. 2011; Jacobson et al. 2003).

### **1.3.4.2 Retinitis pigmentosa**

Retinitis pigmentosa ist eine häufige, vererbare retinale Dystrophie welche in Verbindung mit Syndromen und unabhängig davon auftreten kann (Hamel 2006). Die Prävalenz der RP der nicht von Syndromen betroffenen Patienten beträgt in etwa eins zu 4000 Menschen weltweit (Sung und Chuang 2010; Ammann et al. 1965; Boughman et al. 1980; Jay 1982; Puech et al. 1991; Berson et al. 1993). Zurzeit sind 73 Gene bekannt, welche für einen Typ von RP verantwortlich sein können. Die RP ist also eine genetisch sehr heterogene Krankheit und kann sowohl autosomal dominant, autosomal rezessiv als auch X-chromosomal vererbt werden (Kabir et al. 2016; Hamel 2006). Von diesen RP auslösenden Genen sind einige auch für andere Dystrophien verantwortlich. Gene, die sowohl RP als auch LCA auslösen können, sind beispielsweise

## Einleitung

*CRB1*, *RPE65*, *CRX* und *TULP1* (Hanein et al. 2005). Die RP ist nicht nur genetisch sehr variabel, sondern zeigt sich auch klinisch in einem sehr heterogenen Bild. Sie geht mit einer progressiven Degeneration der Photorezeptoren einher und führt zu einer sehr unterschiedlich ausgeprägten visuellen Beeinträchtigung, die auch Erblindung miteinschließt (Bujakowska et al. 2012). In den meisten Fällen betrifft die Degeneration der Photorezeptoren zunächst die Stäbchen und erst später die Zapfen. Dies erklärt das frühe Auftreten von Nachtblindheit der betroffenen Patienten (Hamel 2006). Auch der Beginn der Krankheit und der Verlauf sind sehr variabel. So kann die RP schon in früher Kindheit, aber auch erst viel später auftreten (Bujakowska et al. 2012). Eine besonders früh auftretende Form der RP ist die „early onset RP“, welche diagnostiziert wird, sobald Symptome wie Nachtblindheit, Verlust des peripheren Sehens auftreten oder sich nicht aufnehmbare ERG-Ergebnisse zeigen (Heckenlively 1982; Hamel 2006). Im Gegensatz hierzu ist die „late onset RP“ diagnostiziert, wenn sich leichte Symptome der RP augenscheinlich erst in der Mitte des Lebens zeigen. In den meisten Fällen ist die RP eine lang andauernde Krankheit, welche sich über mehrere Jahrzehnte erstreckt. Es gibt aber auch Fälle in denen die Progression der Krankheit sehr langsam verläuft, sodass sie nie zur vollkommenen Blindheit führt. Ein weiteres Charakteristikum der RP sind die retinalen Pigmentablagerungen, welche vor allem in der peripheren Retina auftreten (Hamel 2006).

Mutationen im *CRB1*-Gen lösen eine schwere autosomal rezessive Form der RP aus. Sie ist als Retinitis pigmentosa Typ 12 bekannt (RP12) (den Hollander et al. 1999). Die RP12 ist durch ein para-arteriell erhaltenes RPE (preserved para-arteriolar retinal pigment epithelium, PPRPE) in der frühen zur mittleren Phase der Krankheit charakterisiert (Heckenlively 1982; den Hollander et al. 1999; den Hollander et al. 2001). Eine mantelartige, exsudative Vaskulopathie kann sowohl bei RP-Patienten mit und ohne PPRPE als Komplikation auftreten, sind aber mit der RP12 häufiger vergesellschaftet (Khan et al. 1988; van den Born et al. 1994; den Hollander et al. 1999; den Hollander et al. 2001; Lotery et al. 2001). Diese Vaskulopathie zeigt sich durch vaskuläre Abnormitäten wie

zum Beispiel durch aneurysmatische Dilatationen oder teleangiektatische Retinavenen (den Hollander et al. 2001).

### 1.3.5 Knockout-Mäuse

#### 1.3.5.1 Die *Crb1*- und *Crb2*-Knockout-Mäuse

In den bisher beschriebenen *Crb1*<sup>-/-</sup> Knockout-Mäusen zeigen sich in den verschiedenen Studien Unterbrechungen der äGM und Dislokationen der Photorezeptoren. Der Beginn dieser Abnormitäten geht mit dem Verlust der Verbindung zwischen den Photorezeptoren und den Müllerzellen einher. Die einzelnen Läsionen und Fehlbildungen fanden sich hier ausschließlich im inferioren Quadrant der Retina (van de Pavert et al. 2004; van de Pavert et al. 2007). Die Funktion und Aktivität der Retina scheint nicht beeinflusst zu sein (van de Pavert et al. 2007). In den *Crb1*<sup>-/-</sup> Knockout-Mäusen zeigen sich zusammenfassend große Unterschiede in den Dystrophien zwischen Maus und Mensch (Aleman et al. 2011).

Bis heute wurden im Menschen keine Mutationen im *CRB2*-Gen gefunden, welche zu LCA oder RP führen (van den Hurk et al. 2005). *Crb2*-Knockout-Retinas zeigen im Gegensatz hierzu einen stärkeren Phänotyp mit retinalen Aktivitätseinschränkungen, ganz ähnlich dem Phänotyp, der bei RP-Patienten mit *CRB1*-Mutationen beobachtet wird (Alves et al. 2013a). Es zeigen sich ungewöhnliche Schichtungsmuster (Alves et al. 2013b), dislozierte Zellkerne von Photorezeptoren und Störungen in den AJs der äGM (Alves et al. 2014). Des Weiteren sind die AS der Zapfen verkürzt (Alves et al. 2013b). In den *Crb2*-Knockout-Mäusen zeigen sich diese Veränderungen der Retina in allen vier Quadranten (Alves et al. 2014). Pellissier et al. (2014) stellen die Vermutung auf, dass in der humanen Retina die Expressionsmuster von *CRB1* und *CRB2* im Gegensatz zur Maus vertauscht sind und sie in gegensätzlichen Zelltypen exprimiert werden (Pellissier et al. 2014; van Rossum et al. 2006).

## **1.4 Induziert pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen)**

### **1.4.1 Definition und Herstellung**

Als Stammzellen bezeichnet man alle Zellen, welche das Potenzial besitzen Zellen mit höherer oder gleicher Spezialisierung hervorzubringen. Diese Tochterzellen gehen durch mitotische Teilung aus den Stammzellen hervor und können ebenfalls Stammzellen sein (Selbsterneuerung) oder gewebespezifisch differenziert vorliegen (Bongso und Lee 2005).

Eine Klassifizierung der Stammzellen erfolgt entweder nach ihrer Herkunft beziehungsweise nach ihrem ontogenetischen Alter oder nach ihrem Differenzierungspotential (Bongso und Lee 2005). Die Einteilung nach der Ontogenese unterscheidet die Stammzellen anhand der verschiedenen Stadien der menschlichen Entwicklung. So wird hier zwischen embryonalen und adulten Stammzellen klassifiziert. Während die embryonalen Stammzellen nur während der Embryonalentwicklung existieren und deren Nutzung für Forschungszwecke ethisch sehr umstritten sind, bleiben die adulten Stammzellen ein Leben lang im Körper vorhanden und stellen als Reservepopulation die Neugenerierung von Körperzellen sicher. Die Einteilung anhand des Differenzierungspotentials umfasst die Totipotenz, die Pluripotenz, die Multipotenz, die Oligopotenz und die Unipotenz. Diese Begriffe beschreiben die Fähigkeit verschiedener Stammzellen sich in unterschiedlich viele Zelltypen zu entwickeln (Sharma et al. 2014).

Pluripotente Stammzellen sind in der Lage sich in Zellen aller drei Keimblätter zu entwickeln: Ektoderm, Entoderm und Mesoderm (Thomson et al. 1998; Thomson und Odorico 2000) und können deshalb alle Zellen eines erwachsenen Körpers bilden. Die Pluripotenz unterscheidet sich dahingehend von der Totipotenz, dass keine extraembryonalen Gewebe (wie zum Beispiel die Plazenta) gebildet werden können und daher kein komplett neuer Organismus aus pluripotenten Stammzellen entstehen kann (Can 2008).

## Einleitung

Induziert pluripotente Stammzellen stellen eine künstlich erzeugte Variante pluripotenter Stammzellen dar. Diese Zellen werden durch einen sogenannten Reprogrammierungsprozess von nicht-pluripotenten somatischen Zellen eines Organismus hergestellt. Die ersten iPS-Zellen aus der Maus wurden von den Wissenschaftlern Takahashi und Yamanaka im Jahr 2006 produziert (Takahashi und Yamanaka 2006). Ein Jahr später gelang dies ebenfalls für humane Zellen (Takahashi et al. 2007). Sie erhielten 2012 für die Entwicklung dieser Stammzellen den Nobelpreis für Medizin (Nobelprize.org). Die Technik, welche von Takahashi und Yamanaka entwickelt wurde, basiert auf dem Prinzip, dass regulatorische Gene, welche in embryonalen Stammzellen essentiell sind, für die Rückführung in den pluripotenten Zustand entscheidend sind. Der genaue Mechanismus der direkten Reprogrammierung ist komplex und bisweilen noch nicht genau untersucht und verstanden (Patel und Yang 2010). In dieser Technik werden somatische Zellen mit vier Transkriptionsfaktoren, den sogenannten Yamanaka-Faktoren (Oct4, Klf4, Sox2 und c-Myc), dazu angeregt den pluripotenten Status erneut zu erreichen (Takahashi und Yamanaka 2006). Während Takahashi und Yamanaka zunächst Fibroblasten reprogrammierten (Takahashi und Yamanaka 2006), konnten bis heute viele weitere somatische Zellen wie zum Beispiel Blutzellen (Staerk et al. 2010) oder humane Keratinozyten (Aasen et al. 2008; Maherli et al. 2008) reprogrammiert werden. Für das Einbringen der Potenzgene stehen mittlerweile mehrere Systeme zur Verfügung. So werden unter anderem retrovirale Vektoren (Takahashi et al. 2007; Takahashi und Yamanaka 2006) oder protein-basierte Systeme (Zhou et al. 2009; Kim et al. 2009) benutzt. Nachdem der Prozess der Reprogrammierung abgeschlossen ist, gilt es die reprogrammierten Zellen mit verschiedenen Methoden zu identifizieren. Hier kann beispielsweise die *in vitro* Differenzierung der drei Keimblätter und die Expression von pluripotenzspezifischen Markergenen als Beleg der Pluripotenz dienen. Ein weiterer Nachweis ist die Teratombildung *in vivo* durch die iPS-Zellen (Patel und Yang 2010).

Vergleicht man die iPS-Zellen mit den pluripotenten embryonalen Stammzellen, so stellt man fest, dass obwohl kleinere Unterschiede bestehen, iPS-Zellen in

fast allen Aspekten sehr ähnlich sind (Mallon et al. 2014). So zeigen beispielsweise die Morphologie der Kolonien, die Oberflächenantigene oder die Fähigkeit der Teratombildung viele Gemeinsamkeiten auf (Yamanaka 2008). Studien der letzten Jahre zeigen unter anderem den Vergleich der Genexpression und des Methylierungsprofils von iPS-Zellen und embryonalen Stammzellen (Bock et al. 2011; Chin et al. 2009; Lister et al. 2011; Mallon et al. 2013). Hierbei zeigt sich, dass humane embryonale Stammzellen und humane iPS-Zellen keine relevanten Unterschiede in der Genexpression vorzuweisen haben (Mallon et al. 2013; Guenther et al. 2010). Zwar berichten einige Studien über kleine Unterschiede im Methylierungsprofil (Bock et al. 2011; Deng et al. 2009; Doi et al. 2009; Kim et al. 2010; Lister et al. 2009), die jedoch ein Ausdruck der genetischen Vielfalt (Lo et al. 2003; Yan et al. 2002) oder das Produkt des artifiziellen Reprogrammierungsprozesses sein könnten (Mallon et al. 2014).

### **1.4.2 iPS-Zellen der vorliegenden Arbeit**

Die in der Arbeit vorliegenden iPS-Zellen wurden durch Reprogrammierung von humanen Keratinozyten gewonnen. Die Zellen wurden durch ein polycistronisches Lentivirus, welcher die Faktoren Oct4, Klf4, Sox2 und c-Myc trägt, transduziert (Kuh et al. 2012).

## **1.5 Die iPS-Zell generierte Retina**

### **1.5.1 Generierung von 3D Retina Organoiden**

Erste Versuche retinale Zellen aus pluri- oder multipotenten Vorläuferzellen zu gewinnen hatten zunächst das Ziel einzelne Zelltypen, vor allem Photorezeptoren, zu generieren. Diese Protokolle, wie beispielsweise bei

## Einleitung

Tucker et al. (2013) und Hirami et al. (2009) unterscheiden sich dahingehend von den Protokollen der dreidimensionalen Kultivierung, dass sie unter adhärennten Bedingungen, im Gegensatz zur Suspensionslösung, wachsen. Auch wenn die zweidimensionalen Kulturen wenig physiologisch sind und viele Aspekte, wie zum Beispiel die organspezifische Anordnung, sich nicht ausreichend untersuchen lassen, so können doch Retina-spezifische Vorläuferzellen unter solchen Bedingungen hergestellt werden (Tucker et al. 2013; Hirami et al. 2009).

Eiraku et al. entwickelten 2011 ein Protokoll, welches erlaubte aus einer dreidimensionalen Kultur von embryonalen Maus-Stammzellaggregaten selbstorganisierte Augenbläschen und sogar Augenbecher zu bilden (Eiraku et al. 2011). Im Jahr 2012 konnte dies die Gruppe um Nakano für humane Zellen ebenfalls entwickeln (Nakano et al. 2012). Das aus den Stammzellen gereifte retinale Epithelium formte spontan hemisphärische epitheliale Bläschen. Während sich in der weiteren Entwicklung die proximale Seite zum RPE entwickelte, faltete sich die distale Seite ein um eine Struktur zu bilden, die vergleichbar zu einem embryonalen Augenbecher war (**Vergleich mit Kapitel 1.2.4**). Sie vermuten, dass die Morphogenese des embryonalen Augenbechers von einem intrinsischen selbstorganisierten Programm abhängig ist, jedoch den Einsatz extrinsischer Morphogene verlangte. (Eiraku et al. 2011). Um aber zunächst die Ausbildung des aus dem Diencephalon stammenden Augenbläschens zu bewirken, benutzten die Protokolle einen Wnt-Inhibitor, welcher die hierfür notwendige Kranialisierung des primären Neuroepitheliums einleitet. Das spätere Hinzugeben des Wnt-Agonisten förderte hingegen die Bildung von RPE und unterdrückte die Entwicklung der NR (Eiraku et al. 2011). Wnt-Aktivator und Inhibitor müssen also in einer zeitlich bestimmten Abfolge ergänzt werden, um eine gleichgewichtete Differenzierung von RPE und NR zu erreichen (Eiraku et al. 2011; Eiraku et al. 2012). Die so gebildeten geschichteten retinalen Gewebe enthielten alle wichtigen neuronalen Retinakomponenten, welche in der korrekten apiko-basalen Anordnung wie im frühen neonatalen Auge auftraten. Hierbei wiesen die unterschiedlichen Protokollansätze spezienspezifische Unterschiede, wie zum Beispiel in der

Größe der embryonalen Augenbecher, auf. Bei Nakano et al. (2012) konnte in der näheren Betrachtung neben der primitiven Schichtung die Ausbildung einer äGM beobachtet werden. Die differenzierte Darstellung der Photorezeptoren ließ sowohl Stäbchen und Zapfen erkennen, welche mit Strukturen, die den inneren Segmenten mit dem VC ähnlich waren, erkennen. Außensegmente konnten hier nicht beobachtet werden (Nakano et al. 2012).

Im Protokoll von Zhong et al. (2014) nutzten sie, im Gegensatz zu Nakano, ein Wechsel aus adhärenter und Suspensionskultur um eine retinale Augenbläschendifferenzierung zu erreichen (Nakano et al. 2012; Zhong et al. 2014). Aufgrund dieses adhärennten Zwischenschritts lässt sich zwischen der entstehenden NR und des RPEs keine räumliche Nähe erzeugen sodass hiermit keine Augenbecher, sondern nur Augenbläschen hergestellt werden konnten. Sie stellen fest, dass neural differenzierte hiPS-Zellen in der Lage sind jeden wichtigen Schritt der retinalen Entwicklung *in vivo* räumlich und zeitlich *in vitro* nachzuahmen ohne das externe Morphogene zur Entwicklungssteuerung notwendig sind. Die dreidimensionalen Augenbläschen enthielten ebenfalls alle retinalen Zelltypen und eine primitive Form der Schichtung. Aufgrund leichter Protokollanpassungen wie die Gabe von fetalem Kälberserum (FKS) zur Förderung des Zellüberlebens und der zeitlich definierten Zugabe von Retinsäure, waren sie in der Lage ein bisher unerreichtes Reifestadium der Photorezeptoren zu erreichen, in welchem der Beginn der AS-Bildung beobachtet wurde und in welchem einige Zellen sogar Photosensitivität zeigten (Zhong et al. 2014).

### **1.6 Ziel der Studie**

Ziel der Studie war es zunächst eine allgemeine Charakterisierung des verwendeten Protokolls und der entstehenden Zelltypen innerhalb der Organoide vorzunehmen. Des Weiteren wird das humane *CRB1* hinsichtlich der Lokalisation in den Zellen und insbesondere innerhalb der Photorezeptoren



## Einleitung

untersucht und seine Expression innerhalb der Entwicklung betrachtet. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf *CRB1* innerhalb der Photorezeptorenentwicklung gelegt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Maschinen und Geräte

Eismaschine, AF103	Scotsman, Great Blakenham, UK
Gefrierschrank	
<ul style="list-style-type: none"><li>• -20 °C</li><li>• -80 °C</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Liebherr, Biberach, Deutschland</li><li>• Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA</li></ul>
Inkubator 37 °C, Heracell 240i	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kryostat, Microm HM 560	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Biberach, Deutschland
Mikroskope	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"><li>• Axioskop 2 mot plus</li><li>• Evos FL</li><li>• Primo Vert</li></ul>	
Sterilbank, MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vakuumpumpe, Integra Vacusafe	Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland
Wasserbad, Lab Line Waterbath	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifugen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<ul style="list-style-type: none"><li>• Heraeus Megafuge 16 Centrifuge</li><li>• Heraeus Fresco 17 Centrifuge</li></ul>	

## Material und Methoden

### 2.1.2 Werkzeuge und Hilfsmittel

Dako Pen	Dako, Hamburg, Deutschland
Deckgläser, Menzel-Gläser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<ul style="list-style-type: none"><li>• 24 mm x 24 mm</li><li>• 24 mm x 40 mm</li></ul>	
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"><li>• 0,5 ml</li><li>• 1,5 ml</li><li>• 2,0 ml</li></ul>	
Falcon Röhrchen	Becton Dickinson, New York, NY, USA
<ul style="list-style-type: none"><li>• 15 ml</li><li>• 50 ml</li></ul>	
Handschuhe Peha-Soft Nitrile	Hartmann, Heidenheim, Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Pipetten, Eppendorf Research Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"><li>• 10 µl</li><li>• 100 µl</li><li>• 1000 µl</li></ul>	
Pipettierspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"><li>• 10 µl</li><li>• 200 µl</li><li>• 1 ml</li><li>• 5 ml</li></ul>	
Super Frost Plus Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Tissue-Tek Cryomold 10 mm x 10 mm x 5mm	Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, NL
Zellkulturplatten	
<ul style="list-style-type: none"><li>• 96 Well-V-Boden</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland</li></ul>

## Material und Methoden

- 6-Well-Boden  
Zellschaber
- Becton Dickinson, New York, Ny, USA  
Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

## 2.2 Chemikalien

### 2.2.1 Zellkultur-Medien

Antibiotic-Antimycotic 100 x liquid	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
DMEM/F12	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
normales Eselserum (NDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
fetales Kälberserum (FKS)	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
GlutaMax TM 100 x liquid	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
KSR	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Matrigel, hESC-Qualified	Corning, New York, NY, USA
mTeSR1	Stemcell Technologies, Vancouver, CA, USA
NEAA	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PBS	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PBS - -	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PeperoGrow hESC Embryonic Stem Cell Media	PeperoTech, Hamburg, Deutschland

### 2.2.2 Zusätze und Chemikalien

Activin A	Cell Guidance Systems LLC, St. Louis, MO, USA
all-trans-Retinoic acid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Apotransferrin	Serologicals, Atlanta, GA, USA
B27 ohne Vitamin A	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

## Material und Methoden

Blebbistatin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chemically Defined Lipid Concentrate	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Dorsomorphin dihydrochloride	Tocris Bio-Techne, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
FGF-2	Cell Guidance Systems LLC, St. Louis, MO, USA
HSA	Biological Industries, Cromwell, CT, USA
Insulin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ITS	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
L(+)-Ascorbinsäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Progesteron	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ProLong gold antifade mountant mit DAPI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Putrescine Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Rock-inhibitor Y-27632	Ascent Scientific, Avonmouth, UK
Sucrose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TGFβ1	Cell Guidance Systems LLC, St. Louis, MO, USA
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura, Alphen aan den Rijn, NL
Triton X 100	Roth, Karlsruhe, Deutschland

### 2.2.3 Beschichtungen

Matrigel hESC qualified (bd)	BD Bioscience, Aachen, Deutschland
------------------------------	------------------------------------

## 2.2.4 Enzyme

TrypLE Express

Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

## 2.2.5 Antikörper

### 2.2.5.1 Primärantikörper

Tabelle 1: Primärantikörper

Antikörper	Isotyp	Quelle	Verdünnung
Cone-Arrestin	polyclonal goat IgG	Santa-Cruz, Santa-Cruz, CA, USA	1:50
Brn3b	polyclonal goat IgG	Santa-Cruz, Santa-Cruz, CA, USA	1:50
Calbindin	monoclonal mouse IgG	Swant, Marly Innovation Center, Schweiz	1:500
Chx10	polyclonal goat IgG	Santa-Cruz, Santa-Cruz, CA, USA	1:200
CRALBP	polyclonal mouse IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:250
CRB1	polyclonal rabbit IgG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	1:200
Glutamin-synthetase	monoclonal mouse IgG	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	1:1000
Lectin PNA	Arachis hypogaea (peanut), Alexa Fluor 568 Conjugate	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	1:1000
LM-Opsin	polyclonal rabbit IgG	Santa-Cruz, Santa-Cruz, CA, USA	1:200
Pax6	monoclonal mouse IgG	Santa-Cruz, Santa-Cruz, CA, USA	1:100

## Material und Methoden

Pde6 $\beta$	polyclonal rabbit IgG	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	1:400
Peripherin2	polyclonal mouse IgG	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	1:200
PKC $\alpha$	monoclonal mouse IgG	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA	1:100
Recoverin	polyclonal goat IgG	Santa-Cruz, Santa-Cruz, CA, USA	1:500
Recoverin	polyclonal rabbit IgG	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	1:1000
Rhodopsin	monoclonal mouse IgG	Santa-Cruz, Santa-Cruz, CA, USA	1:200
S-Opisin	polyclonal rabbit IgG	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland	1:200-1:300
ZO-1	monoclonal mouse IgG	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA	1:50

### 2.2.5.2 Sekundärantikörper

Tabelle 2: Sekundärantikörper

Antikörper	Typ	Quelle	Verdünnung
Alexa Fluor 488	Donkey anti mouse IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
Alexa Fluor 488	Donkey anti rabbit IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
Alexa Fluor 488	Donkey anti goat IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
Alexa Fluor 488	Donkey anti chicken IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
Alexa Fluor 568	Donkey anti mouse IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
Alexa Fluor 568	Donkey anti rabbit	Abcam, Cambridge,	1:1000

	IgG	UK	
Alexa Fluor 568	Donkey anti goat IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
Alexa Fluor 647	Donkey anti mouse IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
Alexa Fluor 647	Donkey anti rabbit IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:1000
Alexa Fluor 647	Donkey anti goat IgG	Abcam, Cambridge, UK	1:1000

## 2.3 Zellkultur

Die Zellkultivierung wurde unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank, die Inkubation bei 37 °C in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre bei 5 % CO<sub>2</sub> mit 5 % O<sub>2</sub> durchgeführt. Sämtliche Medien wurden unter Verwendung eines 37 °C-Wasserbades vor dem Gebrauch erwärmt.

### 2.3.1 Die hiPS-Zell-Kultur

Die verschiedenen hiPS-Zell-Linien wurden auf Matrigel-bestrichenen Platten mit FTDA-Medium bis zur Konfluenz (ca. 80 %) kultiviert. Kolonien mit klar sichtbaren differenzierten Zellen wurden vor dem Übergang mechanisch entfernt.

FTDA-Medium:

- DMEM/F12 + GlutaMax
- 1:1000 IST
- 0,1 % HSA (10%)
- 1:100 Chemically Defined Lipids Concentrate



- 25 µg/ml FGF-2
- 5 µg/ml TGFβ1
- 50 nM Dorsomorphin Dihydrochlorid
- 10 µg/ml Activin A
- 250 µM L(+)-Ascorbinsäure
- 1:100 Antibiotic-Antimycotic

### **2.3.2 Die Retinadifferenzierung**

#### **2.3.2.1 Die Embryoid Body Generierung**

Das hier verwendete Protokoll basiert auf den Protokollen von Zhong (2014) und Nakano (2012) und wurde an einigen Stellen verändert. Für das Ablösen der hiPS-Zell-Kolonien an Tag 0 (d0) wurden die jeweiligen hiPS-Zell-6-Wellen mit PBS - - gewaschen und durch eine TrypLE-Behandlung dissoziiert. Durch die Zugabe von DMEM/F12 wurde die Trypsin Reaktion beendet. Die Zellen wurden in 15 ml Falcons gesammelt und bei 1500 rpm, zwei Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in PeproGrow Medium unter Zugabe von 10 µM Y-27632 (ROCK-Inhibitor) und 10 µM Blebbistatin resuspendiert. Circa 30.000 Zellen pro 96er-Well wurden auf Suspensions-96-V-Bottom-Well Platten verteilt und diese danach bei 1600 rpm, vier Minuten zentrifugiert.

#### **2.3.2.2 Die neuronale Differenzierung**

An Tag eins (d1) wurde das PeproGrow Medium bestmöglich abgenommen und mit N2-Medium ersetzt. Die Zellaggregate wurden von Tag eins bis Tag sieben (d1-7) im N2-Medium kultiviert, wobei dieses insgesamt zwei Mal in diesem Zeitraum gewechselt wurde.

## Material und Methoden

### N2-Medium:

- DMEM/F12 + GlutaMax
- 1x Hormonmix
- 1 % NEAA
- 1% Antibiotikum-Antimykotikum

### Hormonmix (HM), 100ml:

- 20 µg/ml Insulin:
  - 100 mg Insulin wurden in 0,1 M HCl gelöst
  - es wurden 36 ml destilliertes H<sub>2</sub>O hinzugefügt und gemischt
- 7,72 µg/ml Putrescine Dihydrochlorid
  - 38,6 ml Putrescine Dihydrochlorid wurden in 40 ml destilliertem H<sub>2</sub>O gelöst und in die Insulin-Lösung hinzugegeben
- es wurden 40 µl Natrium-selenite-Stammlösung hinzugegeben
- es wurden 40 µl Progesteron-Stammlösung hinzugegeben
- es wurden 400 mg Apotransferrin hinzugegeben
- das Gemisch wurde mit destilliertem Wasser auf 200 ml aufgefüllt
- der Hormonmix wurde aliquottiert und bei -20 °C aufbewahrt

An Tag sieben (d7) wurden die Zellaggregate auf Matrigel (circa 5-15 pro 6er-Well) platziert und das N2-Medium täglich oder jeden zweiten Tag gewechselt. Von Tag 16 bis Tag 24 (d16-24) wurde das N2-Medium durch Zhong-II-Medium ersetzt und täglich gewechselt.

### Zhong-II-Medium:

- DMEM/F12 + Glutamax (3:1)
- 2 % B27 (ohne Vitamin A)
- 1 % NEAA
- 1 % Antibiotik-Antimykotik

Zwischen den Tagen 24 und 30 (d24-30) wurden Retina-ähnliche Strukturen mit einer Nadel oder Pipettenspitze mit Hilfe eines invertierten Zellkulturmikroskops gesammelt und im Zhong-II-Medium kultiviert. In dem Zeitraum von Tag 26 bis Tag 40 (d26-40) wurde das Medium zwei Mal pro Woche gewechselt. Für die Langzeit-Kultivierung der retinalen Zellen, wurde von Tag 40 bis Tag 70 (d40-70) das Zhong-II-Medium mit 10 % FKS und 100  $\mu\text{M}$  Taurin ergänzt. Zwischen Tag 70 und 100 (d70-100) wurde das Medium mit 1  $\mu\text{M}$  Retinsäure komplettiert. Ab Tag 100 (d100) wurde die Konzentration von Retinsäure auf 0,5  $\mu\text{M}$  gesenkt.

## **2.4 Kryokonservierung und Kryoschnitte**

### **2.4.1 Aufarbeitung des Gewebes für Kryoschnitte**

Die Augenbecher wurden nach der Entnahme zu den verschiedenen Zeitpunkten (d40, d60, d80, d100, d125, d150, d190) in 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Gewebe zwei Mal mit PBS - - gewaschen. Bei 4 °C und in 20 % Sucrose wurden die Zellaggregate mindestens über Nacht aufbewahrt.

Vor dem Schneiden wurden die Gewebe in Tissue-Tek Cryomold mit der Größe 10 mm x 10 mm x 5 mm mit Tissue-Tek O.C.T. Compound ohne Luftblasen eingebettet und in einem Metall-Behälter mit -80 °C kaltem Isopropanol langsam eingefroren. Anschließend wurden die Tissue-Tek Blöcke mit den enthaltenen Geweben für mindestens eine Stunde bei -80 °C eingefroren.

### **2.4.2 Kryoschnitte**

Vor dem Anfertigen der Kryoschnitte wurden die Tissue-Tek Blöcke mit den darin enthaltenen Geweben im Kryostat auf circa -20 °C erwärmt. Der Kryostat

wurde auf folgende Einstellungen gebracht: Objekt: -20 °C; Messer: -20 °C; Schnittdicke fein: 12 µm.

Es wurden 12 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Super Frost Plus Objektträger vorsichtig aufgezogen. Je zwei Proben von Kontrollgewebe und Patientengewebe, die zum gleichen Zeitpunkt entnommen worden sind, wurden dabei auf die gleichen Objektträger platziert. Die bestückten Objektträger wurden bei -80 °C bis zum Zeitpunkt der Immunzytochemiefärbung aufbewahrt.

## **2.5 Biochemische Methoden**

### **2.5.1 Die Immunzytochemie**

Die Immunzytochemie ist eine übliche Labortechnik um die Lokalisation eines spezifischen Proteins oder Antigens in einer Zelle mit einem speziellen Primärantikörper sichtbar zu machen. Die Kopplung dieses Primärantikörpers mit einem genau abgestimmten Sekundärantikörper, welcher mit einem fluoreszierenden Marker versetzt wurde, erlaubt die Darstellung des Proteins oder des Antigens unter einem Fluoreszenzmikroskop oder einem konfokalen Mikroskop.

Bei positiven Markierungen, ist es möglich festzustellen welche subzellulären Bereiche das spezielle Protein enthält oder welche dynamischen Prozesse (Exozytose, Endozytose, etc.) in der Zelle zum Zeitpunkt der Fixierung stattfanden. Hierbei ist es wichtig, dass die Antigene der Sekundärantikörper Immunglobuline gegen die konstanten Bereiche der jeweiligen Primärantikörper gerichtet sind. Die in unserer Studie verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 1 und 2 aufgelistet.

Zu Beginn der Färbung wurden die Super Frost Plus Objektträger mit den Augenbecher-Schnitten in gewünschter Form mit dem Dako Pen umrandet und anschließend für mindestens 15 Minuten getrocknet. Hierbei wurden die Proben

## Material und Methoden

so umrandet, dass äquivalente Kontroll- und Patientenproben der gleichen Antikörperlösung gefärbt werden konnten. Anschließend wurde auf die Felder für circa 30 Minuten H<sub>2</sub>O mit einer Pipette aufgetragen und bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dieser Schritt dient der Rehydrierung der Gewebe. Nach dem Abpipettieren des Wassers wurde die Blockierlösung aufgetragen.

Blockierlösung:

- PBS + +
- 0,2 % Triton X 100
- 10 % normales Eselserum

Die Objektträger wurden in der Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Das Blocken soll später die unspezifischen Bindungen der Antikörper an Proteine unterbinden, welche durch andere chemische Wechselwirkungen zustande kommen würden.

Als nächster Schritt wurde die Blockierlösung durch die Primärantikörperlösung ersetzt. In dieser wurden die Proben über Nacht in einer Färbekammer bei 4 °C inkubiert.

Primärantikörperlösung:

- PBS + +
- 0,2 % Triton X 100
- 10 % Donkey Serum/Eselserum
- jeweilige Antikörperkonzentration (siehe Tabelle 1)

Damit Reaktionen zwischen Antikörper und Antigen stattfinden können, müssen die Immunglobuline zunächst die Zellmembran überwinden. Die Verwendung von Triton X 100 in den Lösungen steigert die Permeabilität der Zellmembranen und ermöglicht so den Immunglobulinen die Bindung an intrazelluläre Epitope. Nach dem Entfernen der Primärantikörperlösung wurden die Felder drei Mal für

## Material und Methoden

drei Minuten bei Raumtemperatur mit PBS + + gewaschen und anschließend die Sekundärantikörperlösung für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetragen.

Sekundärantikörperlösung:

- PBS + +
- 0,1 % Triton X 100
- 5 % normales Eselserum
- jeweilige Antikörperkonzentration (siehe Tabelle 2)

Auch nach dem Entfernen der Sekundärantikörperlösung wurden die Felder drei Mal für drei Minuten bei Raumtemperatur mit PBS + + gewaschen. Nach dem Trocknen der Felder wurde ProLong DAPI (Zellkernfärbung) aufgetragen und mit Menzel-Deckgläser abgedeckt.

Die fertigen Färbungen wurden bis zur Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop bei 4 °C in einer Mappe aufbewahrt.

Mit dem in unserer Studie verwendete Mikroskop (Axioskop 2 mot plus) wurden vier verschiedene Fluoreszenz-Farbstoff-Kanäle (488, 568, 647, DAPI) mit unterschiedlichen Wellenlängen analysiert.

Die in der Arbeit verwendeten Z-Stapel wurden mit dem Apotome Zusatzmodul bei 63-facher Vergrößerung (mit Immersionsöl) aufgenommen. Alle Bilder wurden mit der Zeiss AxioVision Software (Version 4.9) aufgenommen und verarbeitet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Das Protokoll zur Differenzierung der hiPS-Zellen zu retinalen Organoiden

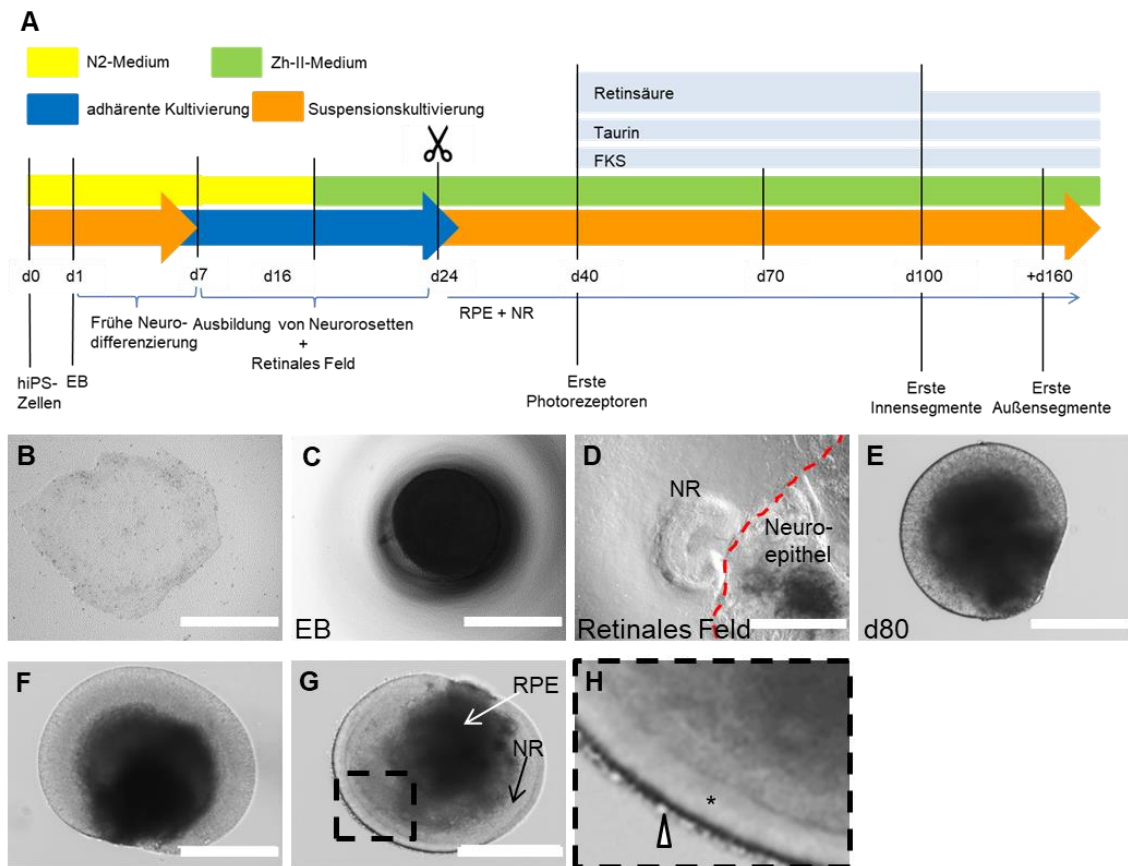
Zur Charakterisierung retinaler Organoide und der Rolle von CRB1 in deren Entwicklung wurden human induzierte pluripotente Stammzellen aus Haar-Keratinocyten durch die Reprogrammierungsfaktoren Oct4, Klf4, Sox2 und c-Myc generiert und anschließend charakterisiert (Linta et al. 2012). Auf der Grundlage des Protokolls von Zhong et al. (2014) wurden aus diesen Zellen Embryoid Bodies generiert, welche mittels eines N2-Hormoncocktails neural induziert wurden (**Abbildung 3A**) (Zhong et al. 2014). Nach dem Adhärenzieren der induzierten Embryoid Bodies konnten nach circa 14 Tagen retinale Felder identifiziert werden, welche außerhalb der zentral entstehenden Neurorosetten lokalisiert sind (**Abbildung 3D**). Das mechanische Ablösen dieser Felder mit anschließender Kultivierung in Suspension führte zu einer selbstgesteuerten Formation von dreidimensionalen Sphären deren äußere Schicht eine deutliche Streifung aufweist (**Abbildung 3E**). Im Folgenden konnten diese Zellen als eine entstehende Neurale Retina identifiziert werden (**Vergleich Abbildung 4**), welche vor allem retinale Progenitoren (CHX10-positiv) beinhalten (**Vergleich Abbildung 4**). Die längerfristige Kultivierung dieser Organoide wird ab dem Tag 40 (d40+) in Anwesenheit von fetalem Kälberserum, Taurin und Retinsäure (**Abbildung 3A**) durchgeführt, wobei die Konzentration der Retinsäure ab Tag 100 (d100+) um die Hälfte reduziert wird. Diese Ergänzung in der Langzeitkultivierung führt insbesondere zur Ausbildung von mehreren mikroskopisch sichtbaren Schichten (**Abbildung 3F, G**), welche bei genauerer Betrachtung in Korrelation zum Alter strukturierter und organisierter werden. Des Weiteren kommt es zur Entstehung von Photorezeptorsegment-artigen Strukturen, die aus der Organoidsphäre hinaus ragen (**Abbildung 3H**) und im Allgemeinen eine Länge von 5-30  $\mu\text{m}$  aufweisen (**Daten nicht gezeigt**). Retinales Pigmentepithel konnte ab dem Tag 40 (d40+) in allen Organoiden beobachtet werden. Dieses pigmentierte Epithel liegt zu jedem Zeitpunkt zentral

## Ergebnisse

im Organoid und zeigt hierdurch keinen direkten Zusammenhang mit Photorezeptorzellen oder den Photorezeptorsegment-artigen Strukturen (**Abbildung 3G**).



## Ergebnisse



**Abbildung 3: Das Protokoll zur Differenzierung der hiPS-Zellen zu retinalen Organoiden.**

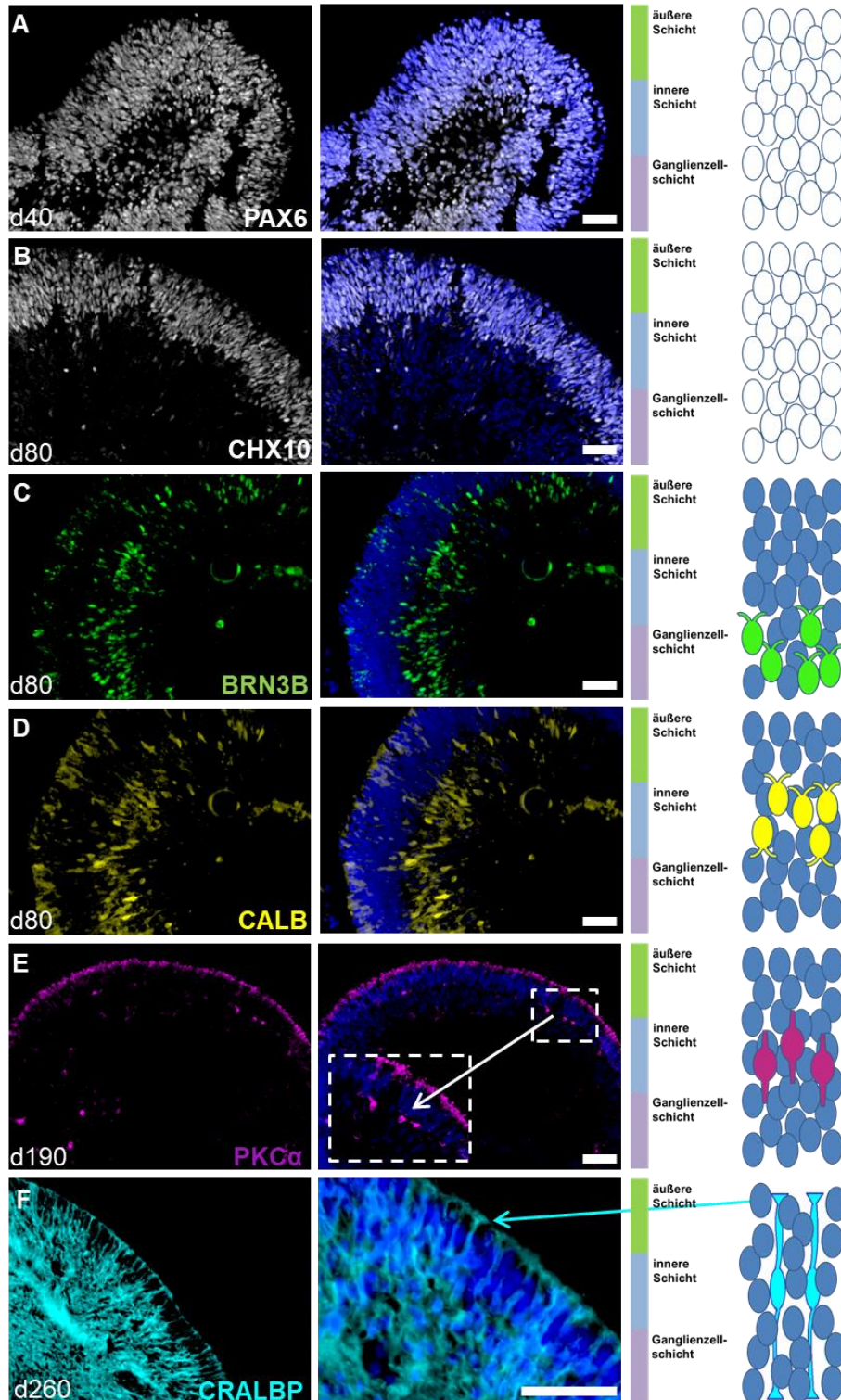
A: Schematische Darstellung des Protokolls mit Kultivierungsart, Medium und den entsprechenden Entwicklungszeitpunkten. B: hiPS-Zell-Kolonie. C: Embryoid Body in Suspensionskultur an Tag 1. D: Adhärenzte neurale Differenzierung mit spezialisiertem retinalem Feld und Neurorosette. E: Abgelöster, in Suspension kultivierter, retinaler Organoid an Tag 80 (d80) mit deutlich gestreifter äußeren Schicht entsprechend der reifenden Neuralen Retina. F: Retinaler Organoid an Tag 125 (d125) mit sich ausbildender Schichtung und wenig Segmenten. G/H: Retinaler Organoid mit deutlicher Photorezeptorschicht und nach außen gerichteter Innensegmentbesetzung (H) an Tag 190 (d190); RPE Bereiche befinden sich abgewandt der Segmente im inneren Bereich des Organoids. Längenmarkierungen in B-D entsprechen 400  $\mu\text{m}$ ; Längenmarkierung in E-G entsprechen 1000  $\mu\text{m}$ . H: \* zeigt die Ausbildung einer Photorezeptorschicht; Pfeilspitze: hier zeigen sich die sich entwickelnden Außensegmente. hiPS-Zellen = human induzierte pluripotente Stammzellen; RPE = retinales Pigmentepithel; NR = Neurale Retina; FKS = fetales Kälberserum; EB = Embryoid Body.

### 3.2 Die Zelltypen der mehrschichtigen Neuralen Retina

Die nach dem Protokoll von Zhong et al. (2014) gebildeten dreidimensionalen Sphären (**Vergleich Abbildung 3**) zeigen in der äußeren Schicht eine Streifung, welche durch die PAX6- und CHX10-positiven Zellen in **Abbildung 4A** und **Abbildung 4B** bereits am Tag 40 und Tag 80 (d40 und d80) als frühe Retina beziehungsweise als Neurale Retina identifiziert werden (Zhong et al. 2014). Morphologisch kann die Neurale Retina in mehrere primitive Schichten, wie in den Schemazeichnungen gezeigt, aufgeteilt werden: innere Schicht, äußere Schicht, Ganglienzellschicht (**Abbildung 4A-F**).

In diesen weiteren Schichten der Neuralen Retina lassen sich retinale Vorläuferzelltypen wie Ganglienzellen (**Abbildung 4C**), Amakrin- und Horizontalzellen (**Abbildung 4D**), Bipolarzellen (**Abbildung 4E**) und Müllerzellen (**Abbildung 4F**) nachweisen. Auch die Photorezeptorprogenitoren lassen sich innerhalb der Neuralen Retina darstellen (**Vergleich Abbildung 5**). Ganglienzellprogenitoren lassen sich ab Tag 40 (d40+) darstellen, werden aber, je älter der retinale Organoid ist, in der Anzahl weniger (**Daten nicht gezeigt**). Diese BRN3B-positiven Zellen ordnen sich ab Tag 80 (d80+) nur in der gleichnamigen innersten Schicht (Ganglienzellschicht) an (**Abbildung 4C**), während sich die Calbindin-positiven Zellen, sowohl in der Ganglienzellschicht als auch in der inneren Schicht anordnen. Sie sind ab Tag 80 (d80+) nachweisbar und stellen Vertreter der Amakrin- und Horizontalzellen dar (**Abbildung 4D**). Die Progenitoren der Bipolarzellen lassen sich an späten Zeitpunkten (d190) ausnahmslos in der inneren Schicht identifizieren (PKC $\alpha$ -positiv) (**Abbildung 4E**), wohingegen die Vorläuferzellen der Gliazellen mit ihren Fortsätzen durch alle drei Schichten ziehen (**Abbildung 4F**). An Tag 190 (d190) lassen sich keine eindeutig Glutaminsynthetase-positiven Zellkörper nachweisen (**Daten nicht gezeigt**), jedoch zeigen sie sich positiv für den Müller-Glia-Marker CRALBP (**Abbildung 4F**).

## Ergebnisse



**Abbildung 4: Die Zelltypen der mehrschichtigen Neuralen Retina:**

A: Darstellung der neuralen Differenzierung und der frühen Retina. B: Darstellung der neuralen Retina. C: Darstellung der Ganglienzellprogenitoren. D: Darstellung der Amakrin- und Horizontalzellprogenitoren; E: Darstellung der Bipolarzellprogenitoren; Vergrößerte Darstellung der PKC $\alpha$ -positiven Zellen. F: Darstellung der Müllerzellen. Längenmarkierungen in A-F entsprechen 50  $\mu\text{m}$ . CALB = Calbindin.

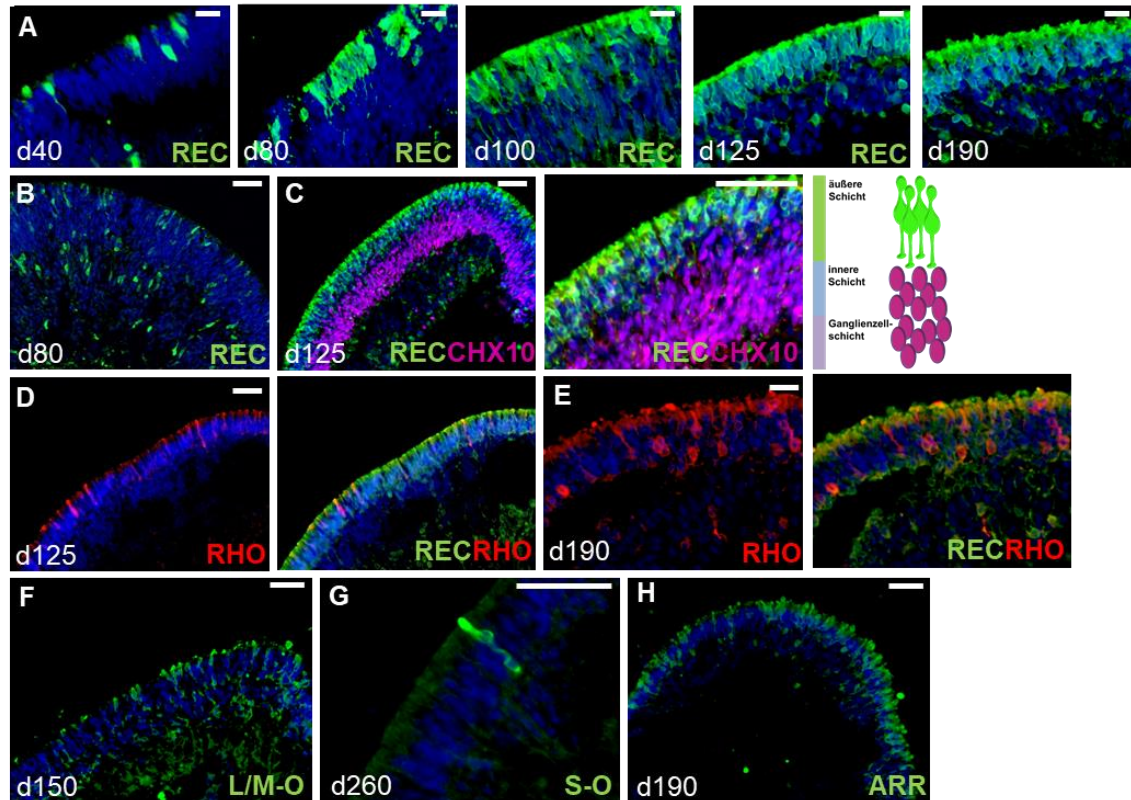
### 3.3 Die Photorezeptoren

#### 3.3.1 Clusterung innerhalb der Photorezeptorenentwicklung

Die generierten retinalen Organoide weisen neben den anderen retinalen Zellen (**Vergleich Abbildung 4**) in der äußeren Schicht Recoverin-positive Photorezeptoren auf. Zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten (d40, d80, d100, d125 und d190) zeigt sich korrelierend zum Alter der Organoide eine steigende Anzahl Recoverin-positiver Zellen (**Abbildung 5A**), welche sich vornehmlich in der äußeren Schicht, oberhalb der CHX10-positiven Zellen, anhäufen (**Abbildung 5C**). Die Photorezeptoren bilden letztlich zu den späteren Zeitpunkten (d125 und d190) eine durchgängige und dichte Schicht Photorezeptoren (**Abbildung 5A**). Zu den früheren Zeitpunkten, wie zum Beispiel an Tag 80 (d80) lassen sich nicht nur Photorezeptoren in der äußeren Schicht nachweisen, sondern es werden auch Recoverin-positive Zellen innerhalb der inneren Schicht und der Ganglienzellschicht beobachtet (**Abbildung 5B**). Diese Recoverin-positiven Zellen der unteren Schichten nehmen mit zunehmendem Alter der retinalen Organoide in ihrer Anzahl ab (**Daten nicht gezeigt**).

Die Zellen, welche für die Stäbchen-Marker Rhodopsin (**Abbildung 5D, E**) und die Zapfen-Marker L-/M-Opsin (**Abbildung 5F**), S-Opsin (**Abbildung 5G**) und Arrestin (**Abbildung 5H**) positiv sind, lassen sich ebenfalls fast ausschließlich in der äußeren Schicht identifizieren. An Tag 190 (d190) zeigt sich eine deutliche Vermehrung der Rhodopsin-positiven Zellen im Vergleich zum früheren Zeitpunkt am Tag 125 (d125), die allerdings nur ein Bruchteil der gesamten Recoverin-positiven Photorezeptorpopulation ausmacht (**Abbildung 5D, E**). In der Kombination mit Recoverin zeigt sich hier außerdem bei einigen Zellen eine Überlappung der beiden Marker, die demnach sowohl Rhodopsin-positiv als auch Recoverin-positiv sind (**Abbildung 5D, E**).

## Ergebnisse



**Abbildung 5: Clusterung innerhalb der Photorezeptorenentwicklung:**

A: Vermehrung und Clusterung der Photorezeptoren in der äußeren Schicht innerhalb der Entwicklungsreihe (d40, d80, d100, d125 und d190). B: Recoverin-positive Zellen innerhalb der inneren Schicht und der Ganglienzellschicht. C: Clusterung der Photorezeptoren oberhalb der CHX10-positiven Zellen. D: Darstellung von Rhodopsin-positiven Zellen am Tag 125 (d125) in der äußeren Schicht. E: Vermehrung von Rhodopsin-positiven Zellen am Tag 190 (d190) im Vergleich zum früheren Zeitpunkt in D. F: Darstellung von L-/M-Opsin-positiven Zellen in der äußeren Schicht. G: Darstellung einer S-Opsin-positiven Zelle in der äußeren Schicht. H: Arrestin-positive Zellen in der äußeren Schicht. Längenmarkierungen in A-H entsprechen 50  $\mu\text{m}$ . REC = Recoverin; RHO = Rhodopsin; L/M-O = L-/M-Opsin; S-O = S-Opsin; ARR = Arrestin.

### 3.3.2 Spezialisierungen innerhalb der Photorezeptorenentwicklung

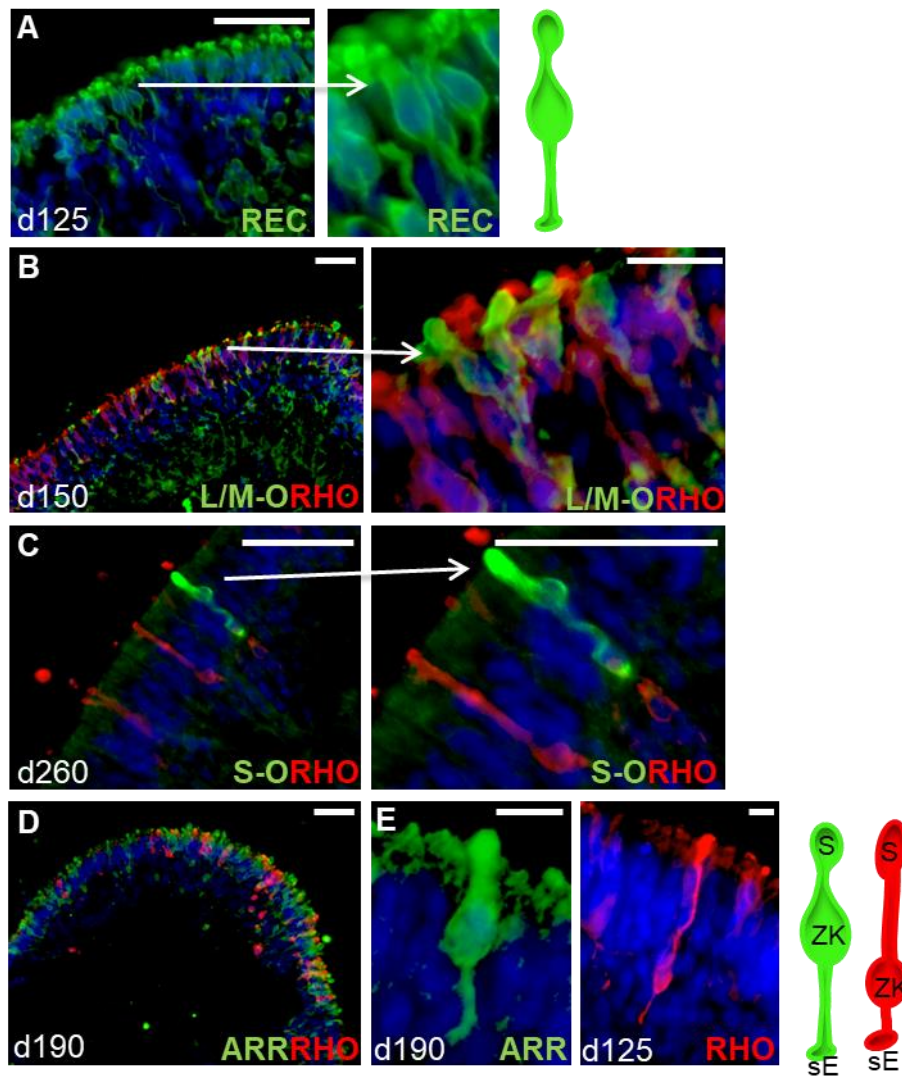
Die Recoverin-positiven Zellen zeigen bereits an Tag 125 (d125) einige Spezialisierungen in der Formgebung der einzelnen Zellen. So zeigen sich segmentähnliche Strukturen, Zellkörper und Fortsätze (**Abbildung 6A**). Auch bei den Rhodopsin-positiven Zellen lassen sich zum Zeitpunkt d125 und auch später einzelne Zellcharakteristika erkennen (**Abbildung 6B, C, D**). Bei den Arrestin-positiven Zellen der äußeren Schicht zeigen sich zu den späteren Zeitpunkten (d190) ebenfalls spezifische Zellformierungen (**Abbildung 6E**).

Der Vergleich zwischen den Arrestin-positiven und Rhodopsin-positiven Zellen zeigt, dass die Arrestin-positiven Segmente voluminöser (zapfenartig) als die dünneren stäbchenartigen Segmente der Rhodopsin-positiven Zellen erscheinen und die Zellkörper innerhalb der äußeren Schicht meist apikaler im Organoid liegen (**Abbildung 6E**).

Im Gegensatz zu den Rhodopsin- und Recoverin-positiven Zellen in **Abbildung 5 (Vergleich Abbildung 5D, E)** zeigen sich bei den Rhodopsin-Färbungen mit L-/M- oder S-Opin keine Überlappungen (**Abbildung 6B, C**). Auch bei den Arrestin-positiven Zellen der äußeren Schicht lassen sich keine Überlappungen zwischen der Arrestin-positiven und Rhodopsin-positiven Population feststellen (**Abbildung 6D**).



## Ergebnisse



**Abbildung 6: Spezialisierungen innerhalb der Photorezeptorenentwicklung.**

A: Darstellung der spezialisierten Zellform der Recoverin-positiven Zellen zum Zeitpunkt d125. B: Darstellung von spezialisierten L-/M-Opsin-positiven Zellen am Tag 150 (d150). C: Darstellung einer spezialisierten S-Opsin-positiven Zelle zum Zeitpunkt d260. D: Darstellung von Arrestin-positiven Zellen am Tag 190 (d190). E: Arrestin-positive und Rhodopsin-positiv Zellen mit zellspezifischen Charakteristika in der äußeren Schicht. Längenmarkierungen in A-D entsprechen 50  $\mu\text{m}$ ; Längenmarkierung in E entspricht 10  $\mu\text{m}$ . REC = Recoverin; RHO = Rhodopsin; L/M-O = L-/M-Opsin; S-O = S-Opsin; ARR = Arrestin; S = Segmente; ZK = Zellkörper; sE = synaptisches Endfüßchen.

### 3.3.3 Die Segmentausbildung der Photorezeptoren

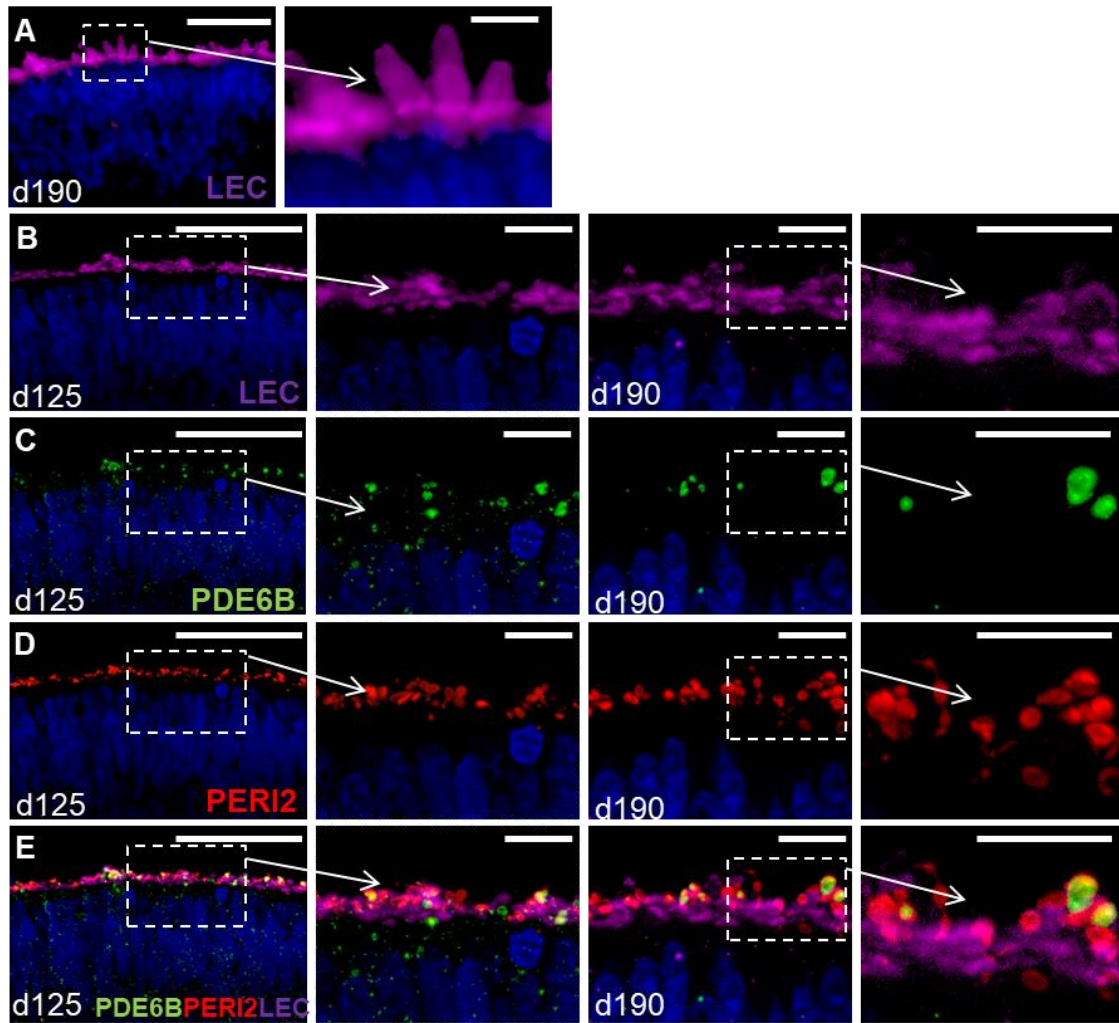
Zu der Entwicklung der Photorezeptoren gehört neben der Ausbildung einer spezialisierten Zellform (**Vergleich Abbildung 5**) auch die Ausbildung von Segmenten, genauer gesagt der Innen- und Außensegmente.

Bereits zum Zeitpunkt d125 zeigen sich segmentähnliche ovale Strukturen, welche durch den Marker Lectin angefärbt werden (**Abbildung 6B**). Lectin markiert sowohl die Innen- als auch die Außensegmente. Diese lassen sich streng oberhalb der Zellkerne und aus der Organoidsphäre herausragend identifizieren (**Abbildung 6A, B**). Am Tag 125 (d125) zeigen sich positive punktierte Signale des Segmentmarkers PDE6B im Randbereich des Organoids. Sie werden zum Zeitpunkt d190 noch deutlicher als an Tag 125 (d125) abgebildet (**Abbildung 6C**). PDE6B markiert ein Protein der Signalisierungskaskade welches in den Außensegmenten der Zapfen lokalisiert ist. Peripherin 2 identifiziert ein Protein in den Außensegmenten beider Photorezeptoren, der Stäbchen und der Zapfen. Auch hier lassen sich die positiven punktierten Signale sowohl an Tag 125 (d125) als auch an Tag 190 (d190) nachweisen und auch hier sind die Signale oberhalb der Zellkerne lokalisiert (**Abbildung 6D**).

In der Kombinationsfärbung zeigen sich doppelt-positiv punktierte Signale (PDE6B<sup>+</sup> und Peripherin 2<sup>+</sup>) und einfach-positive Signale (Peripherin 2<sup>+</sup>), welche sich größtenteils im oberen Anteil der Lectin-positiven Segmente befinden (**Abbildung 6E**).



## Ergebnisse



**Abbildung 7: Die Segmentausbildung der Photorezeptoren.**

A: Die Außen- und Innensegmente zum Zeitpunkt d190. B: Der Vergleich der Außen- und Innensegmente der Zeitpunkte d125 und d190. C: Die Außensegmentbildung der Zapfen zu den Zeitpunkten d125 und d190. D: Die Außensegmentbildung der Stäbchen und Zapfen zu den Zeitpunkten d125 und d190. E: Die Marker PDE6B, Peripherin und Lectin im Mischbild zu den Zeitpunkten d125 und d190. Längenmarkierungen in A: erstes Bild 50µm, zweites Bild 10µm. Längenmarkierungen in B-E: erstes Bild entspricht 50µm; zweites bis viertes Bild entsprechen 10µm. PDE6B = Phosphodiesterase 6b; PER12 = Peripherin 2; LEC = Lectin.

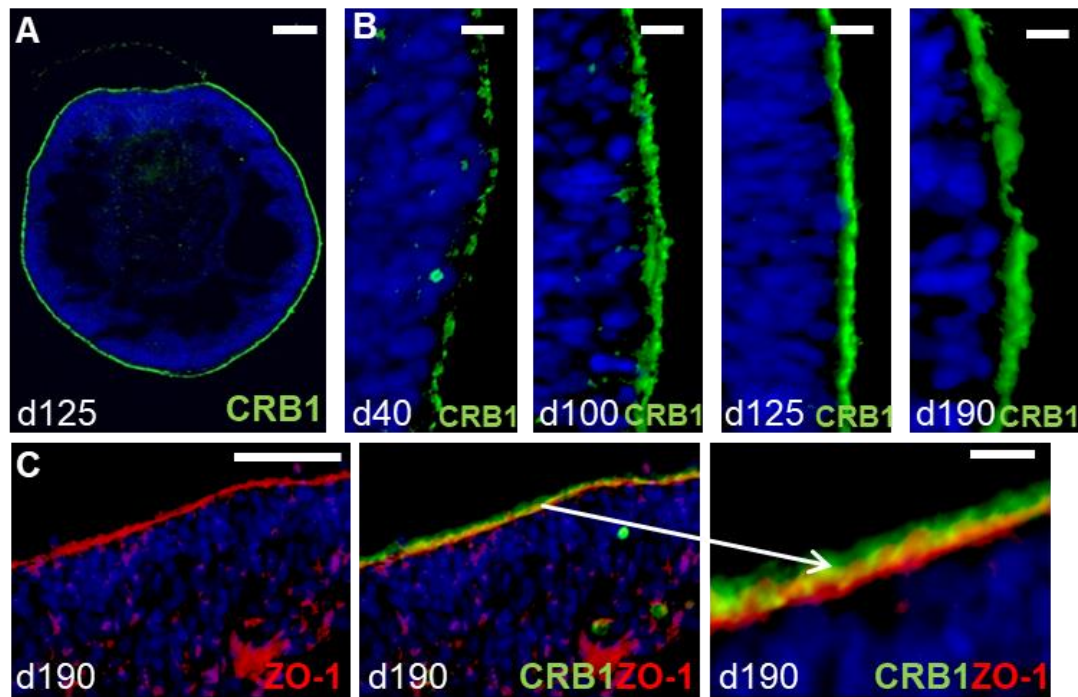
### 3.4 Das CRB1-Protein

#### 3.4.1 Das CRB1-Protein lokalisiert oberhalb der äGM

Die Expression und die Lokalisation des CRB1-Proteins in den aus hiPS-Zellen generierten retinalen Organoiden zeigen innerhalb der Entwicklungsreihe des Organoids eine Anreicherung im äußersten Rand des Organoids und enge Interaktionen zu den Photorezeptoren und Markern der äGM. Zu Beginn der Suspensionskultur an Tag 40 (d40) kann das CRB1-Protein bereits an der äußeren Organoidgrenzschicht lokalisiert werden (**Abbildung 8B**). Zeigt es sich zunächst unregelmäßig an einzelnen Stellen, so lässt sich jedoch zu den späteren Zeitpunkten (d125, d190) eine immer regelmäßiger werdende und ausgeprägte dünne Schicht identifizieren (**Abbildung 8B**), welche rund um das Organoid besteht (**Abbildung 8A**).

Beim Anfärben mit dem Marker ZO-1, welcher Tight-Junction-Proteine in der äußeren Grenzmembran anfärbt, zeigt sich ebenfalls eine dünne Schicht die vollständig um das Organoid zieht (**Abbildung 8C**). Bei detaillierter Betrachtung der beiden für die jeweiligen Marker spezifischen Schichten lässt sich die CRB1-positive Markierung streng und durchgängig oberhalb der ZO-1-Exprimierung identifizieren (**Abbildung 8C**).

## Ergebnisse



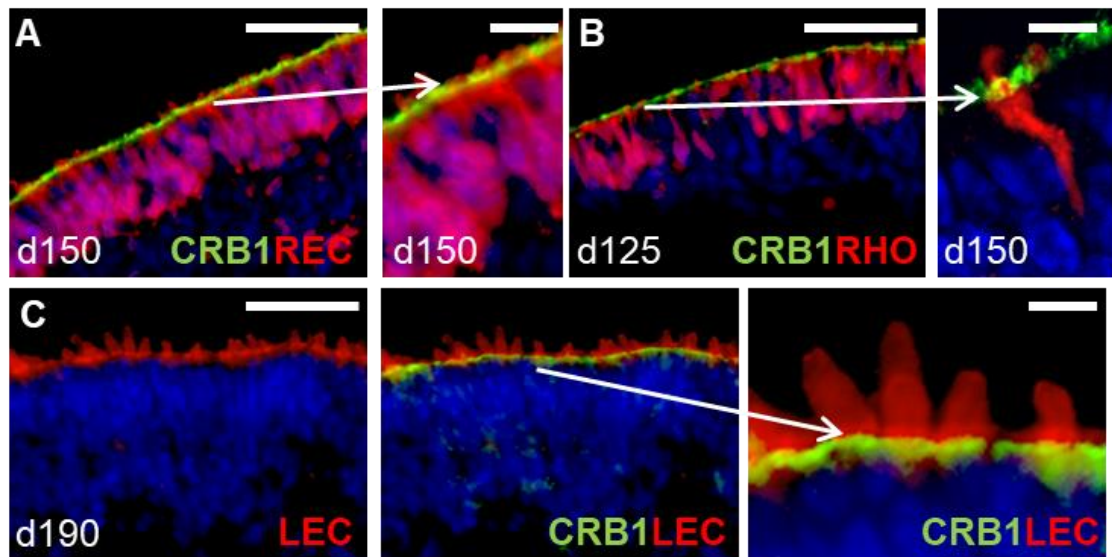
**Abbildung 8: Die CRB1-Exprimierung oberhalb der äGM.**

A: CRB1-Exprimierung rund um das retinale Organoid. B: Entwicklungsreihe von CRB1 mit stärker und dichter werdender CRB1-positiven Linie. C: CRB1-Exprimierung oberhalb der äGM. Längenmarkierung in A entspricht 100  $\mu\text{m}$ . Längenmarkierungen in B entsprechen 10  $\mu\text{m}$ . Längenmarkierungen in C entsprechen 50  $\mu\text{m}$  und in der größeren Vergrößerung 10  $\mu\text{m}$ . CRB1 = crumbs-like Protein 1; ZO-1 = Zonula occludens 1.

### 3.4.2 Das CRB1-Protein grenzt an die Photorezeptorsegmente

In Kombination mit den Photorezeptormarkern Recoverin (**Abbildung 9A**) und Rhodopsin (**Abbildung 9B**) zeigen sich ebenfalls die durchgängigen und dichten CRB1-positiven Schichten, welche sich im oberen Anteil der Photorezeptoren senkrecht zu diesen erstrecken. Sowohl bei den Recoverin-positiven als auch bei den Rhodopsin-positiven Zellen lassen sich segmentartige Strukturen, welche sich oberhalb der CRB1-positiven Schicht befinden, erkennen (**Abbildung 9A, B**). Der Photorezeptorsegmentmarker Lectin lässt ebenfalls Aussackungen in Form von Segmenten erkennen, die sich zumeist oberhalb der CRB1-positiven Linie befinden (**Abbildung 9C**). Im Apotome-Schnittbild zeigt sich, dass die CRB1-positiven Bereiche von den Photorezeptorsegmenten unterbrochen werden und sich beidseitig an den entstehenden Segmenten anlegen (**Abbildung 9B**).

## Ergebnisse



**Abbildung 9: Das CRB1-Protein grenzt an die Photorezeptorenssegmente.**

A: Lokalisation der CRB1-positiven Linie im oberen Anteil der Recoverin-positiven Photorezeptoren. B: Lokalisation der CRB1-positiven Linie im oberen Anteil der Rhodopsin-positiven Photorezeptoren. C: CRB1-Exprimierung in Bezug zu den Lectin-positiven Segmenten. Längenmarkierungen in A - C entsprechen 50 $\mu$ m und in der größeren Vergrößerung 10 $\mu$ m. CRB1 = crumbs-like Protein 1; REC = Recoverin; RHO = Rhodopsin; LEC = Lectin.

## 4 Diskussion

In unserer Studie wurden hiPS-Zellen unter definierten chemischen Bedingungen generiert und charakterisiert (Linta et al. 2012) und nach dem Protokoll von Zhong et al. (2014) zu retinalen Organoiden differenziert (Zhong et al. 2014). Wir konzentrieren uns hier auf entscheidende Punkte der *in vitro* Entwicklung von retinalen Organoiden mit besonderem Augenmerk auf die Photorezeptorenentwicklung mit Bildung von segmentähnlichen Formationen und der Exprimierung und Lokalisation von *CRB1*.

### 4.1 Stammzell-basierte Systeme und Generierung der humanen retinalen Organoide

Die Generierung von humanen retinalen Organoiden aus pluripotenten Stammzellen wird in den unterschiedlichen Protokollen nach verschiedenen Methoden vorgenommen. Während die einen eine reine dreidimensionale Suspensionskultur verwenden (Nakano et al. 2012; Mellough et al. 2015), nutzen andere, wie beispielsweise Zhong et al. (2014), Wahlin et al. (2017) und unsere Gruppe einen adhärennten, zweidimensionalen Zwischenschritt (Zhong et al. 2014; Wahlin et al. 2017). Die Suspensionskultivierung lässt über den Entwicklungsschritt der Augenbläschenbildung embryonale Augenbecher entstehen, welche denen der *in vivo* Entwicklung sehr ähnlich sind. Sie zeigen eine Neurale Retina und ein RPE, welches wie in der physiologischen Retina an die Neurale Retina angrenzt und zu den entstehenden Photorezeptoren in physikalischem Kontakt steht (Strauss; Kirsch 2010). Die retinalen Organoide lassen sich in diesem Stadium der *in vitro* Entwicklung nicht unbegrenzt lange kultivieren, sodass die Gruppe um Nakano lediglich die Kultivierung bis Tag 126 (d126) erreichte, die Gruppe um Mellough bis Tag 90 (d90) (Nakano et al. 2012; Mellough et al. 2015). Die retinalen Organoide im Stadium des Augenbläschens scheinen über längere Zeit stabil zu sein, sodass hier Wahlins Gruppe eine Kultivierung bis zum Tag 300 (d300) erreichte und Zhong bis zur 28. Woche

(W28) (Wahlin et al. 2017; Zhong et al. 2014). Auch in unserer Untersuchung gelingt die Generierung bis über den 260. Tag (d260+) hinaus, was eine Untersuchung der gereiften Photorezeptoren der Neuralen Retina ermöglicht. In den Protokollen mit adhärentem Zwischenschritt zeigt sich, dass hier nur der frühere Entwicklungszeitpunkt des Augenbläschens erreicht werden kann. Vermutlich ist es dem Adhärenzen geschuldet, dass bei diesen retinalen Organoiden das RPE nicht an physiologischer Stelle gebildet wird, sondern dieses, wie in unserer Untersuchung, im Zentrum des Organoids liegt. Somit wird hier kein physikalischer Kontakt zu den sich entwickelnden Photorezeptoren erreicht (Zhong et al. 2014; Wahlin et al. 2017).

### 4.2 Die Zellen der retinalen Organoide

Die *in vivo* Entwicklung der Retina beginnt mit der Bildung des Augenfelds, welches durch mehrere Faktoren, wie beispielsweise PAX6 gekennzeichnet wird (Zuber et al. 2003; Zuber 2010; Pevny et al. 1998; Zhang et al. 2010). Die weitere Spezialisierung dieser Zellen in Richtung Neuraler Retina kennzeichnet der Marker CHX10 (Adler und Canto-Soler 2007; Nguyen und Arnheiter 2000; Horsford et al. 2005). Wie in **Abbildung 4** gezeigt, sind in unseren Organoiden zu einem Zeitpunkt (d40) fast alle Zellen PAX6- und CHX10-positiv. Dies zeigt hier also eine hohe Übereinstimmung der *in vivo* Entwicklung mit unseren Organoiden und mit anderen Protokollen die ebenfalls einen hohen Anteil dieser PAX6- und CHX10-positiven Zellen aufweisen (Lamba et al. 2006; Nakano et al. 2012; Zhong et al. 2014). Die Fähigkeit dieser Zellen sich zu anderen Zellen der retinalen Linie zu entwickeln wurde durch andere Marker bestätigt. Wie in den Protokollen von Nakano et al. (2012) und Zhong et al. (2014) verzeichnen wir Zellen, die positiv für andere retinale Marker sind und welche in einer primitiven Schichtung, ähnlich der physiologischen Retina (Frings und Müller 2010; Kirsch 2010), angeordnet vorliegen (Nakano et al. 2012; Zhong et al. 2014). Es zeigen sich hier, vergleichbar mit der humanen

Retina, BRN3B-positive Ganglienzellen, welche sich in der Ganglienzellschicht anordnen. Diese Lokalisation entspricht ebenfalls der Lokalisation der Gruppe um Nakano (Nakano et al. 2012). Erste Ganglienzellen konnten ab dem Tag 40 dargestellt werden, was dem natürlichen Auftreten dieser Zelllinie in der *in vivo* Entwicklung ab Tag 24 nahekommt (Mu und Klein 2004; Cayouette et al. 2006). Zu den späteren Zeitpunkten (d100+) werden immer weniger Ganglienzellen detektiert. Dies steht im Einklang mit der Untersuchung von Wahlin et al. (2017), welche ebenfalls das Verschwinden der Ganglienzellen in den Organoiden beobachten (Wahlin et al. 2017). Wir vermuten, dass die fehlende Verbindung der Ganglienzellen zu höher gestellten Zentren ursächlich für das schleichende Verschwinden ist. Hierfür spricht, dass Zhong et al. (2014) und Ohlemacher et al. (2016) keine Degeneration der Ganglienzellen beschreiben, aber sich entwickelnde Synapsen und primitive Nervenfaserschichten beobachten können (Zhong et al. 2014; Ohlemacher et al. 2016). Eine weitere Möglichkeit könnte die Theorie der zentralen Degeneration, aufgrund mangelnder Versorgung der Zellen, sein. Gegen diese Theorie spricht allerdings das Ausbleiben einer hohen Anzahl an apoptotischen Zellen (**Daten nicht gezeigt**). Die Calbindin-positiven Zellen der inneren und der Ganglienzellschicht entsprechen den Interneuronen der Retina (Pasteels et al. 1990). Auch hier steht das zeitliche Auftreten dieser Zellen in Einklang mit der *in vivo* Entwicklung (Lamba et al. 2006). Bipolarzellen treten in der natürlichen Retina erst zu einem späten Zeitpunkt auf (Livesey und Cepko 2001). Wie in **Abbildung 4E** gezeigt, konnten bei uns, ebenso wie bei Zhong (2014), PKC $\alpha$ -positive Zellen in der inneren Schicht nachgewiesen werden (Zhong et al. 2014). Der Marker Glutaminsynthetase lässt, im Gegensatz zu CRALBP, keine eindeutig positiven Zellen identifizieren. Der Grund für das Ausbleiben einer positiven Glutaminsynthetase-Expression könnte sein, dass Glutaminsynthetase erst zu einem späteren Zeitpunkt in den Müllerzellen exprimiert wird.



### 4.3 Die Reifung der Photorezeptoren: Übersicht und Vergleich

Die Entwicklung der Photorezeptoren der Retina beginnt in der humanen fetalen Entwicklung um die zehnte Fetalwoche. Hier werden erstmalig in der Fovea centralis morphologische Photorezeptoren detektiert, welche dann in den weiteren Wochen in ihrer Anzahl kontinuierlich ansteigen (O'Brien et al. 2003; Hendrickson und Provis 2006). Erste Photorezeptoren lassen sich in unserer Untersuchung um den Tag 40 (d40±) durch die Färbung mit Recoverin, ein wichtiges calciumbindendes Protein welches in der Signaltransduktion eine Rolle spielt, identifizieren (Palczewski et al. 2000). Dies lässt sich sowohl mit der *in vivo* Entwicklung als auch mit den Studien von Nakano et al. (2012) und Zhong et al. (2014) in Einklang bringen (Nakano et al. 2012; Zhong et al. 2014). Die Verteilung der Recoverin-positiven Zellen beschränkt sich bis auf wenige Zellen auf die äußere Schicht. Die wenigen Ausnahmen zeigen sich zu den früheren Zeitpunkten im retinalen Organoid in den inneren Schichten (**Abbildung 5B**). Die Gruppe um Nakano und um Wahlin beobachten ebenfalls Photorezeptorzellen, welche innerhalb der retinalen Gebilde liegen. Je älter die retinalen Organoid sind, desto weniger Recoverin-positive Zelle lassen sich außerhalb der Äußeren Schicht aufweisen (Nakano et al. 2012; Wahlin et al. 2017). Das Auftreten von Photorezeptoren außerhalb der gewohnten Lokalisation kann in der humanen Entwicklung nicht beobachtet werden (O'Brien et al. 2003) und steht somit im Widerspruch zu unseren Beobachtungen. Nakano et al. (2012) stellen die Überlegung an, ob die Photorezeptoren der tieferen Schichten einen geringeren Reifegrad aufweisen, da sie hier keine segmentähnlichen Gebilde beobachten können. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob die Photorezeptoren während ihres Reifungsprozesses in apikaler Richtung wandern und somit das Verschwinden der Recoverin-positiven Zellen innerhalb des Organoids erklärt werden kann (Nakano et al. 2012).

Während der Marker Recoverin beide Photorezeptortypen darstellt (Palczewski et al. 2000), ist Rhodopsin, das Sehpigment der Stäbchen (Frings und Müller 2010), spezifisch für Stäbchen. Hierdurch lässt sich sowohl die geringere

Anzahl der Rhodopsin-positiven Zellen im Vergleich zu den Recoverin-positiven Zellen erklären, als auch die Überlappungen der beiden Marker in den Zellen, welche somit als Stäbchen identifiziert werden. Erste Rhodopsin-positive Stäbchen können bei uns ab dem Tag 100 (d100+) beobachtet werden und zeigen einen stetigen Anstieg in der Anzahl. Dies steht im Einklang mit den Untersuchungen von Wahlin et al. (2017), der neben dem Marker Rhodopsin die Stäbchen-spezifischen Marker NR2E und NRL verwendet (Wahlin et al. 2017). Rhodopsin befindet sich als Sehpigment der Stäbchen in den Lipiddoppelschichten der Disks in den Außensegmenten (Frings und Müller 2010). In den Untersuchungen zeigt sich jedoch, dass neben den Segmenten auch der Rest der Zelle positiv für den Marker ist. Diese Rhodopsin-Expression in der ganzen Zelle zeigt sich auch bei Zhong et al. (2014) und in der nativen Entwicklung (Zhong et al. 2014; Hendrickson et al. 2008). Dies lässt vermuten, dass das Sehpigment während der Entwicklung überall in der Zelle exprimiert wird und je weiter die Entwicklung fortschreitet sich dieses immer mehr in den AS zentralisiert. Hierfür spricht die zunehmende Expression von Rhodopsin in den Segmenten zu den späteren Zeitpunkten.

Da die Marker L-/M-Opisin, S-Opisin und Arrestin-3 zapfenspezifisch sind, zeigen sich in den Kombinationsfärbungen mit Rhodopsin keine Überlappungen. Die Expression der Opsine beginnt zu späteren Entwicklungszeitpunkten als die Rhodopsin- und die Recoverin-Expression. Die Reihenfolge des Auftretens der spezifischen Marker lässt sich auch bei Lamba et al. (2006), Nakano et al. (2012) und Zhong et al. (2014) beobachten (Lamba et al. 2006; Nakano et al. 2012; Zhong et al. 2014). Auch bei den Opsinen der Zapfen konzentriert sich die Expression immer mehr auf die Segmente.

Im Allgemeinen zeigen unsere Beobachtungen, dass die Zapfen in ihrer Struktur voluminöser als die Stäbchen sind. Des Weiteren zeigen sich ihre Zellkörper apikaler als die der Stäbchen. Dies entspricht teilweise der *in vivo* Situation, in welcher die Zapfen kürzer und untersetzter sind (Wahlin et al. 2017).

Erste Innensegmente lassen sich bei uns ab dem Tag 100 (d100) identifizieren. Nakano et al. (2012) zeigt innensegmentähnliche Gebilde, jedoch keine Außensegmente, was die humane Retinaentwicklung reflektiert (Nakano et al. 2012). Hier entstehen die Außensegmente als kleine Knospen nämlich erst um die 23. bis 25. Woche (Hendrickson und Drucker 1992; Narayanan und Wadhwa 1998; Hendrickson et al. 2008). Im Vergleich mit der humanen AS-Entwicklung zeigt sich, dass das erste Auftreten von AS in unserer Studie ab dem Tag 160 (d160+) sowohl mit der *in vivo* Entwicklung als auch mit den Studien von Wahlin et al. (2017), Zhong et al. (2014), Parfitt et al. (2016) und Lowe et al. (2016) übereinstimmend ist. In diesen Studien wurden äußere Grenzmembrane, Innensegmente mit mehreren Mitochondrien, Basalkörperchen und Verbindungscilien, welche eine photorezeptorspezifische Anordnung besitzen, bei Betrachtung mit dem Elektronenmikroskop beobachtet (Wahlin et al. 2017; Zhong et al. 2014; Parfitt et al. 2016; Lowe et al. 2016). In einigen Zellen können sogar intrazelluläre Membrandisks, ähnlich denen der Außensegmente, identifiziert werden (Wahlin et al. 2017). Die Gruppe um Zhong zeigt zusätzlich die Expression einiger Schlüsselproteine der Phototransduktion und bei einigen Zellen Lichtsensitivität (Zhong et al. 2014). Die Expression der B-Untereinheit der cGMP Phosphodiesterase (PDE6B) zeigt in unserer Untersuchung, dass auch hier Schlüsselproteine vorhanden sind, welche wie in der humanen Retina über die Zeit zunehmen (Hendrickson et al. 2008).

Die Reife der sich entwickelnden Photorezeptoren mit ihren Innen- und Außensegmenten überrascht dahingehend, als das in früheren Studien angenommen wurde, dass die Reifung, Differenzierung und das Überleben der Photorezeptoren an den Zellkontakt des RPEs und der Photorezeptoren gebunden ist (Caffe et al. 1989; Raymond und Jackson 1995; Sheedlo et al. 1998; Jablonski et al. 2000; Pinzón-Duarte et al. 2000; Bumsted et al. 2001; Nasonkin et al. 2013). Sowohl bei Zhong et al. (2014), Wahlin et al. (2017) als auch bei uns, stellt sich das RPE gebündelt im inneren des Organoids dar und zeigt keinen physikalischen Kontakt zu den Photorezeptoren (Zhong et al. 2014; Wahlin et al. 2017). So kann man vermuten, dass zumindest der Beginn der

Photorezeptorenreifung und der IS- und AS-Bildung *in vitro* nicht abhängig vom physikalischen Kontakt zum RPE ist. Dies steht im Widerspruch zu der Beobachtung, dass in der *in vivo* Entwicklung Photorezeptoren ohne Zellkontakt zum RPE nicht funktionsfähig sind und vermutlich zu Grunde gehen (Cook et al. 1995; Berglin et al. 1997).

#### **4.4 Die Expression und Lokalisation von CRB1: Übersicht und Vergleich**

Das humane Crb1-Protein, als Homolog des Crumbs-Protein in *Drosophila melanogaster*, zeigt eine artenspezifische Expression. Während Crumbs in *Drosophila melanogaster* vermutlich in allen Epithelien, welche vom Ektoderm abgeleitet sind, vorkommt (Tepass und Knust 1990; Tepass et al. 1990), zeigt es sich im Menschen im Gehirn und in der Retina (den Hollander et al. 1999; den Hollander et al. 2001). Die Expression in unseren aus den hiPS-Zellen generierten retinalen Organoiden konnte bereits zu den frühen Zeitpunkten gezeigt werden. Untersuchungen mit unterschiedlichen Tiermodellen zeigen, dass das *Crb1*-Protein in der Maus nur in den Müllerzellen exprimiert wird, wohingegen das *Crb2*-Protein sowohl in den Müllerzellen als auch in den Photorezeptoren zeigt (van Rossum et al. 2006). Im Mensch hingegen konnte die Gruppe um Pellissier et al. (2014) die Expression des *CRB1* in Photorezeptoren und die Expression des *CRB2* in den Müllerzellen nachweisen (Pellissier et al. 2014). Die *CRB1*-Expression am äußersten Rand unserer retinalen Organoiden lässt eine Lokalisation innerhalb der äußeren Grenzmembran in unseren retinalen Organoiden vermuten. Betrachtet man die *CRB1*-Expression in Zusammenhang mit den Photorezeptoren und insbesondere mit den Segmenten im Detail, so scheint es, als wäre *CRB1* nicht innerhalb der Photorezeptoren, sondern außerhalb dieser lokalisiert. Die *CRB1*-positive Schicht scheint sich beidseitig an die Segmente, welche über die *CRB1*-positive Schicht hinaus ragen, anzulagern. Um dies zu Beweisen müsste

allerdings andere Untersuchungen zum Beispiel in Form von Immuno-Elektronenmikroskop-Betrachtungen durchgeführt werden. In der Vergangenheit wurden allerdings schon durch andere Studien Zusammenhänge zwischen dem CRB1-Protein und der Photorezeptoren-entwicklung vermutet. Die Gruppe um Mehalow et al. (2003) vermuten beispielsweise durch ihre Untersuchungen, dass *CRB1* in der Entwicklung der Innen- und Außensegmente eine Rolle spielt (Mehalow et al. 2003). Im Jahr 2009 stellen Bulgakova und Knust außerdem die Vermutung an, dass *CRB1* in Bildung und Stabilität des primären Ciliums eine Rolle spielt, welches homolog zu den Verbindungscilien der Photorezeptoren ist (Bulgakova und Knust 2009).

Die äußere Grenzmembran, welche durch Ausbildung von Zonula adhaerens zwischen Müllerzellen und Photorezeptoren entsteht, weist apikal im humanen Vorbild die subapikale Region auf. In dieser Region scheint das CRB1-Protein in den humanen Photorezeptoren mit vielen anderen Proteinen lokalisiert zu sein (van de Pavert et al. 2004). Die Ausbildung einer äußeren Grenzmembran in unseren Organoiden wird durch die durchgängige ZO-1-Expression gezeigt. Dieses Protein lässt sich streng unterhalb der Crb1-positiven Schicht in unseren Organoiden zeigen, was die Lokalisation des Crb1-Proteins innerhalb einer sub-apikalen Region vermuten lässt. Dies entspricht hiermit dem humanen Vorbild (van de Pavert et al. 2004). Durch diese räumliche Nähe zur äußeren Grenzmembran und durch Untersuchungen in der Vergangenheit, wird vermutet, dass die Integrität der Adhaerens Junctions und somit die Manifestation der äGM maßgeblich auch in der humanen Entwicklung von Crb1 abhängig ist (Mehalow et al. 2003; Roh et al. 2003). Dies kann auch durch die Untersuchungen von Thepass et al. (1990), Klebes und Knust (2000) und Izaddoost et al. (2002) für das Tiermodell der *Drosophila melanogaster* angenommen werden (Tepass et al. 1990; Klebes und Knust 2000; Izaddoost et al. 2002).

Unsere Ergebnisse hinsichtlich der Rolle des Crb1-Proteins in der humanen retinalen Entwicklung sollten mit anderen Splice-Varianten des CRB1-Proteins verifiziert werden. Da der von uns verwendete Antikörper gegen einen Abschnitt in der Mitte des Proteins gerichtet ist, wird vermutet, dass dieser alle

Splice-Varianten erkennt. Die verschiedenen Splice-Varianten binden unterschiedliche Kompartimente des Proteins. Bisher werden in der Literatur nur das Transkript der vollen *CRB1*-Länge (Transkriptvariante 1) und die Transkriptvariante 4 (dem *CRB1* fehlen die Exons, welche den zytosolischen C-Terminus und die transmembranäre Domäne codieren) beschrieben (den Hollander et al. 1999; den Hollander et al. 2001). Des Weiteren gibt es eine Variante, welche von der Zelle in die Umgebung sezerniert wird. Diese Variante trägt keine transmembrane Region und keinen intrazellulären C-Terminus (Bujakowska et al. 2012). Es ist hierbei unklar, welchen Einfluss dies auf die umliegenden Zellen hat. In weiteren Studien könnten in Zukunft spezifischere Splice-Varianten des *CRB1*-Proteins untersucht werden um exaktere Erkenntnisse des humanen *CRB1*-Proteins innerhalb der Photorezeptorenentwicklung beobachten zu können.

### 4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Studien der letzten Jahre ergeben viele Fortschritte hinsichtlich der mit den *CRB1*-Mutationen in Verbindung gebrachten Krankheiten, wie Retinitis pigmentosa oder Lebersche Kongenitale Amaurose, jedoch fehlen immer noch wichtige Informationen für ein tiefgreifenderes Verständnis der Photorezeptorendegenerationen in diesen Krankheiten.

In unserer Studie können wir zeigen, dass humane Keratinozyten effizient in humane induzierte pluripotente Stammzellen reprogrammiert und anschließend in retinale Organoiden differenziert werden können, welche die Expression wichtiger Marker der Photorezeptorenentwicklung und auch das *Crb1*-Protein beinhaltet. Diese Art der *in vitro* Analyse stellt eine Möglichkeit dar, Fortschritte im Verständnis pathologischer Prozesse der Photorezeptorendegeneration in Krankheiten wie LCA oder RP zu verzeichnen. Demnach werden exakte Analysen der Photorezeptorenentwicklung und des *CRB1*-Gens mit patientenspezifischen Zellen in Zukunft unverzichtbar sein.

## 5 Zusammenfassung

Einige progressive degenerative Erkrankungen der Retina, welche mit einer Photorezeptorendegeneration einhergehen, wie Retinitis pigmentosa und Lebersche Kongenitale Amaurose, treten durch eine schwere visuelle Beeinträchtigung oder sogar Blindheit von Geburt oder Kindheit an in Erscheinung. Sie werden in bis zu 4 % aller RP-Fälle und in bis zu 15 % aller LCA-Fälle durch eine Mutation innerhalb des *CRB1*-Gens hervorgerufen. Protokolle, welche retinale Organoide aus hiPS-Zellen generieren, scheinen für die Untersuchung der Retinaentwicklung und auch für die Untersuchung solcher degenerativer Erkrankungen geeignet zu sein.

In unseren Untersuchungen verwenden wir ein Protokoll, basierend auf dem von Zhong et al. 2014, das uns erlaubt aus hiPS-Zellen Embryoid Bodies zu generieren und über eine neuronale Differenzierung retinale Organoide herzustellen. Durch einen Wechsel einer Suspensionskultivierung und einer adhärennten Kultivierung werden Augenbläschen hergestellt, welche zu verschiedenen Zeitpunkten durch Kryokonservierung, Kryoschnitte und eine anschließende Immunfärbung unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden können.

Bei der Betrachtung können alle wesentlichen Zelltypen der Neuralen Retina, die Ganglienzellen, die Amakrin- und Horizontalzellen, die Bipolarzellen, die Müllerzellen und die Photorezeptoren, in einer primitiven Schichtung beobachtet werden. Das retinale Pigmentepithel befindet sich zentral in den retinalen Organoiden und nicht an physiologischer Stelle, angrenzend an die Photorezeptoren. Durch die langzeitige Kultivierung der retinalen Organoide können reife Photorezeptoren mit segmentähnlichen Gebilden gezeigt werden. Innerhalb dieser Segmente lassen sich sogar funktionelle Schlüsselproteine wie beispielsweise *Pde6b* nachweisen. Das *Crb1*-Protein kann innerhalb des retinalen Organoids oberhalb der äußeren Grenzmembran lokalisiert werden und zeigt sich im engen Zusammenspiel mit entstehenden Photorezeptorsegmenten.

## Zusammenfassung

Es wird hier gezeigt, dass dieses Modell aus hiPS-Zellen retinale Organoide zu bilden eine gute Möglichkeit bietet, die Fortschritte der degenerativen Retinaerkrankungen weiter voran zu treiben und genauere Analysen der Photorezeptorenentwicklung und des *CRB1*-Gens innerhalb der Retinaentwicklung durchzuführen. Um ein tiefgreifenderes Verständnis dieser Krankheiten mit Photorezeptorendegeneration zu erlangen, werden weitere Untersuchungen in Zukunft unverzichtbar sein.



## 6 Literaturverzeichnis

- Aasen, T.; Raya, A.; Barrero, M. J.; Garreta, E.; Consiglio, A.; Gonzalez, F.; Vassena, R.; Bilic, J.; Pekarik, V.; Tiscornia, G.; Edel, M.; Boue, S. und Izpisua Belmonte, J. C. (2008): *Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes*. Nat Biotechnol, 26, 1276-84.
- Adler, R. und Canto-Soler, M. V. (2007): *Molecular mechanisms of optic vesicle development: complexities, ambiguities and controversies*. Dev Biol, 305, 1-13.
- Aleman, T. S.; Cideciyan, A. V.; Aguirre, G. K.; Huang, W. C.; Mullins, C. L.; Roman, A. J.; Sumaroka, A.; Olivares, M. B.; Tsai, F. F.; Schwartz, S. B.; Vandenberghe, L. H.; Limberis, M. P.; Stone, E. M.; Bell, P.; Wilson, J. M. und Jacobson, S. G. (2011): *Human CRB1-associated retinal degeneration: comparison with the rd8 Crb1-mutant mouse model*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 52, 6898-910.
- Alves, C. H.; Bossers, K.; Vos, R. M.; Essing, A. H.; Swagemakers, S.; Van Der Spek, P. J.; Verhaagen, J. und Wijnholds, J. (2013a): *Microarray and morphological analysis of early postnatal CRB2 mutant retinas on a pure C57BL/6J genetic background*. PLoS One, 8, e82532.
- Alves, C. H.; Pellissier, L. P. und Wijnholds, J. (2014): *The CRB1 and adherens junction complex proteins in retinal development and maintenance*. Prog Retin Eye Res, 40, 35-52.
- Alves, C. H.; Sanz, A. S.; Park, B.; Pellissier, L. P.; Tanimoto, N.; Beck, S. C.; Huber, G.; Murtaza, M.; Richard, F.; Sridevi Gurubaran, I.; Garcia Garrido, M.; Levelt, C. N.; Rashbass, P.; Le Bivic, A.; Seeliger, M. W. und Wijnholds, J. (2013b): *Loss of CRB2 in the mouse retina mimics human retinitis pigmentosa due to mutations in the CRB1 gene*. Hum Mol Genet, 22, 35-50.
- Ammann, F.; Klein, D. und Franceschetti, A. (1965): *Genetic and epidemiological investigations on pigmentary degeneration of the retina and allied disorders in Switzerland*. J Neurol Sci, 2, 183-96.
- Assemat, E.; Crost, E.; Ponsere, M.; Wijnholds, J.; Le Bivic, A. und Massey-Harroche, D. (2013): *The multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) expression regulates cellular levels of the PALS-1/PATJ polarity complex*. Exp Cell Res, 319, 2514-25.
- Berglin, L.; Algvere, P. V. und Seregard, S. (1997): *Photoreceptor decay over time and apoptosis in experimental retinal detachment*. Graefes Archive For Clinical And Experimental Ophthalmology, 235, 306-12.
- Berson, E. L.; Rosner, B.; Sandberg, M. A.; Hayes, K. C.; Nicholson, B. W.; Weigel-Difranco, C. und Willett, W. (1993): *A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa*. Arch Ophthalmol, 111, 761-72.
- Bock, C.; Kiskinis, E.; Verstappen, G.; Gu, H.; Boulting, G.; Smith, Z. D.; Ziller, M.; Croft, G. F.; Amoroso, M. W.; Oakley, D. H.; Gnirke, A.; Egan, K. und Meissner, A. (2011): *Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines*. Cell, 144, 439-52.
- Bongso, A. und Lee, E. H. (2005): *Stem cells: from bench to bedside*. World Scientific,
- Boughman, J. A.; Conneally, P. M. und Nance, W. E. (1980): *Population genetic studies of retinitis pigmentosa*. Am J Hum Genet, 32, 223-35.
- Bowmaker, J. K. und Dartnall, H. J. (1980): *Visual pigments of rods and cones in a human retina*. J Physiol, 298, 501-11.
- Bowmaker, J. K.; Dartnall, H. J. und Mollon, J. D. (1980): *Microspectrophotometric demonstration of four classes of photoreceptor in an old world primate, Macaca fascicularis*. J Physiol, 298, 131-43.
- Boycott, B. B. und Wässle, H. (1991): *Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina*. Eur J Neurosci, 3, 1069-88.
- Bujakowska, K.; Audo, I.; Mohand-Said, S.; Lancelot, M. E.; Antonio, A.; Germain, A.; Leveillard, T.; Letexier, M.; Saraiva, J. P.; Lonjou, C.; Carpentier, W.; Sahel, J. A.; Bhattacharya, S. S. und Zeitz, C. (2012): *CRB1 mutations in inherited retinal dystrophies*. Hum Mutat, 33, 306-15.

## Literaturverzeichnis

- Bulgakova, N. A.; Kempkens, O. und Knust, E. (2008): *Multiple domains of Stardust differentially mediate localisation of the Crumbs-Stardust complex during photoreceptor development in Drosophila*. J Cell Sci, 121, 2018-26.
- Bulgakova, N. A. und Knust, E. (2009): *The Crumbs complex: from epithelial-cell polarity to retinal degeneration*. J Cell Sci, 122, 2587-96.
- Bumsted, K.; Rizzolo, L. und Barnstable, C. (2001): *Defects in the MTF mi/mi Apical Surface are Associated with a Failure of Outer Segment Elongation*. Experimental eye research, 73, 383-92.
- Caffe, A.; Visser, H.; Jansen, H. und Sanyal, S. (1989): *Histotypic differentiation of neonatal mouse retina in organ culture*. Current eye research, 8, 1083-92.
- Can, A. (2008): *A Concise Review on the Classification and Nomenclature of Stem Cells*. Turk J Haematol, 25, 57-9.
- Cayouette, M.; Poggi, L. und Harris, W. A. (2006): *Lineage in the vertebrate retina*. Trends in neurosciences, 29, 563-70.
- Chacon-Camacho, O. F. und Zenteno, J. C. (2015): *Review and update on the molecular basis of Leber congenital amaurosis*. World J Clin Cases, 3, 112-24.
- Chen, C. L.; Gajewski, K. M.; Hamaratoglu, F.; Bossuyt, W.; Sansores-Garcia, L.; Tao, C. und Halder, G. (2010): *The apical-basal cell polarity determinant Crumbs regulates Hippo signaling in Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A, 107, 15810-5.
- Chin, M. H.; Mason, M. J.; Xie, W.; Volinia, S.; Singer, M.; Peterson, C.; Ambartsumyan, G.; Aimiwu, O.; Richter, L.; Zhang, J.; Khvorostov, I.; Ott, V.; Grunstein, M.; Lavon, N.; Benvenisty, N.; Croce, C. M.; Clark, A. T.; Baxter, T.; Pyle, A. D.; Teitell, M. A.; Pelegri, M.; Plath, K. und Lowry, W. E. (2009): *Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures*. Cell Stem Cell, 5, 111-23.
- Cook, B.; Lewis, G. P.; Fisher, S. K. und Adler, R. (1995): *Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment*. Investigative ophthalmology & visual science, 36, 990-96.
- Cremers, F. P.; Van Den Hurk, J. A. und Den Hollander, A. I. (2002): *Molecular genetics of Leber congenital amaurosis*. Hum Mol Genet, 11, 1169-76.
- Curcio, C. A.; Sloan, K. R., Jr.; Packer, O.; Hendrickson, A. E. und Kalina, R. E. (1987): *Distribution of cones in human and monkey retina: individual variability and radial asymmetry*. Science, 236, 579-82.
- Den Hollander, A. I.; Heckenlively, J. R.; Van Den Born, L. I.; De Kok, Y. J.; Van Der Velde-Visser, S. D.; Kellner, U.; Jurkles, B.; Van Schooneveld, M. J.; Blankenagel, A.; Rohrschneider, K.; Wissinger, B.; Cruysberg, J. R.; Deutman, A. F.; Brunner, H. G.; Apfelstedt-Sylla, E.; Hoyng, C. B. und Cremers, F. P. (2001): *Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene*. Am J Hum Genet, 69, 198-203.
- Den Hollander, A. I.; Roepman, R.; Koenekoop, R. K. und Cremers, F. P. (2008): *Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms*. Prog Retin Eye Res, 27, 391-419.
- Den Hollander, A. I.; Ten Brink, J. B.; De Kok, Y. J.; Van Soest, S.; Van Den Born, L. I.; Van Driel, M. A.; Van De Pol, D. J.; Payne, A. M.; Bhattacharya, S. S.; Kellner, U.; Hoyng, C. B.; Westerveld, A.; Brunner, H. G.; Bleeker-Wagemakers, E. M.; Deutman, A. F.; Heckenlively, J. R.; Cremers, F. P. und Bergen, A. A. (1999): *Mutations in a human homologue of Drosophila crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12)*. Nat Genet, 23, 217-21.
- Deng, J.; Shoemaker, R.; Xie, B.; Gore, A.; Leproust, E. M.; Antosiewicz-Bourget, J.; Egli, D.; Maherali, N.; Park, I. H.; Yu, J.; Daley, G. Q.; Eggan, K.; Hochedlinger, K.; Thomson, J.; Wang, W.; Gao, Y. und Zhang, K. (2009): *Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming*. Nat Biotechnol, 27, 353-60.
- Doi, A.; Park, I. H.; Wen, B.; Murakami, P.; Aryee, M. J.; Irizarry, R.; Herb, B.; Ladd-Acosta, C.; Rho, J.; Loewer, S.; Miller, J.; Schlaeger, T.; Daley, G. Q. und Feinberg, A. P. (2009): *Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes*

## Literaturverzeichnis

- human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts.* Nat Genet, 41, 1350-3.
- Dowling, J. E. (1987): *The Retina: An Approachable Part of the Brain.*
- Eiraku, M.; Adachi, T. und Sasai, Y. (2012): *Relaxation-expansion model for self-driven retinal morphogenesis: a hypothesis from the perspective of biosystems dynamics at the multicellular level.* Bioessays, 34, 17-25.
- Eiraku, M.; Takata, N.; Ishibashi, H.; Kawada, M.; Sakakura, E.; Okuda, S.; Sekiguchi, K.; Adachi, T. und Sasai, Y. (2011): *Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture.* Nature, 472, 51-6.
- Elkabetz, Y.; Panagiotakos, G.; Al Shamy, G.; Socci, N. D.; Tabar, V. und Studer, L. (2008): *Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage.* Genes Dev, 22, 152-65.
- Fei, Y. (2003): *Development of the cone photoreceptor mosaic in the mouse retina revealed by fluorescent cones in transgenic mice.* Mol Vis, 9, 31-42.
- Frings, S. und Müller, F. (2010): *Visuelles System - Auge und Sehen* 624-673. ALEXANDER, BOB und KONSTANTIN, BOB. Duale Reihe Physiologie Georg Thieme Verlag KG Stuttgart
- Gosens, I.; Den Hollander, A. I.; Cremers, F. P. und Roepman, R. (2008): *Composition and function of the Crumbs protein complex in the mammalian retina.* Exp Eye Res, 86, 713-26.
- Guenther, M. G.; Frampton, G. M.; Soldner, F.; Hockemeyer, D.; Mitalipova, M.; Jaenisch, R. und Young, R. A. (2010): *Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells.* Cell Stem Cell, 7, 249-57.
- Hamel, C. (2006): *Retinitis pigmentosa.* Orphanet J Rare Dis, 1, 40.
- Hanein, S.; Perrault, I.; Gerber, S.; Tanguy, G.; Hamel, C.; Dufier, J. L.; Rozet, J. M. und Kaplan, J. (2005): *[Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of genetic heterogeneity. A clinical definition update].* J Fr Ophtalmol, 28, 98-105.
- Heckenlively, J. R. (1982): *Preserved para-arteriole retinal pigment epithelium (PPRPE) in retinitis pigmentosa.* Br J Ophthalmol, 66, 26-30.
- Heckenlively, J. R. (1988): *Retinitis pigmentosa.* Lippincott Williams & Wilkins,
- Hendrickson, A.; Bumsted-O'Brien, K.; Natoli, R.; Ramamurthy, V.; Possin, D. und Provis, J. (2008): *Rod photoreceptor differentiation in fetal and infant human retina.* Experimental eye research, 87, 415-26.
- Hendrickson, A. und Drucker, D. (1992): *The development of parafoveal and mid-peripheral human retina.* Behavioural brain research, 49, 21-31.
- Hendrickson, A. E. und Provis, J. (2006): *Comparison of development of the primate fovea centralis with peripheral retina.* Retinal Development. Cambridge University Press,
- Hirami, Y.; Osakada, F.; Takahashi, K.; Okita, K.; Yamanaka, S.; Ikeda, H.; Yoshimura, N. und Takahashi, M. (2009): *Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells.* Neurosci Lett, 458, 126-31.
- Hojo, M.; Ohtsuka, T.; Hashimoto, N.; Gradwohl, G.; Guillemot, F. und Kageyama, R. (2000): *Glial cell fate specification modulated by the bHLH gene Hes5 in mouse retina.* Development, 127, 2515-22.
- Hoon, M.; Okawa, H.; Della Santina, L. und Wong, R. O. (2014): *Functional architecture of the retina: development and disease.* Prog Retin Eye Res, 42, 44-84.
- Horsford, D. J.; Nguyen, M.-T. T.; Sellar, G. C.; Kothary, R.; Arnheiter, H. und McInnes, R. R. (2005): *Chx10 repression of Mitf is required for the maintenance of mammalian neuroretinal identity.* Development, 132, 177-87.
- Izaddoost, S.; Nam, S. C.; Bhat, M. A.; Bellen, H. J. und Choi, K. W. (2002): *Drosophila Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres.* Nature, 416, 178-83.
- Jablonski, M. M.; Tombran-Tink, J.; Mrazek, D. A. und Iannaccone, A. (2000): *Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal.* Journal of Neuroscience, 20, 7149-57.
- Jacobson, S. G.; Cideciyan, A. V.; Aleman, T. S.; Pianta, M. J.; Sumaroka, A.; Schwartz, S. B.; Smilko, E. E.; Milam, A. H.; Sheffield, V. C. und Stone, E. M. (2003): *Crumbs homolog 1*

## Literaturverzeichnis

- (*CRB1*) mutations result in a thick human retina with abnormal lamination. *Hum Mol Genet*, 12, 1073-8.
- Jadhav, A. P.; Cho, S. H. und Cepko, C. L. (2006a): *Notch activity permits retinal cells to progress through multiple progenitor states and acquire a stem cell property*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 18998-9003.
- Jadhav, A. P.; Mason, H. A. und Cepko, C. L. (2006b): *Notch 1 inhibits photoreceptor production in the developing mammalian retina*. *Development*, 133, 913-23.
- Jay, M. (1982): *On the heredity of retinitis pigmentosa*. *Br J Ophthalmol*, 66, 405-16.
- Johnson, K.; Grawe, F.; Grzeschik, N. und Knust, E. (2002): *Drosophila crumbs is required to inhibit light-induced photoreceptor degeneration*. *Curr Biol*, 12, 1675-80.
- Kabir, F.; Ullah, I.; Ali, S.; Gottsch, A. D.; Naeem, M. A.; Assir, M. Z.; Khan, S. N.; Akram, J.; Riazuddin, S.; Ayyagari, R.; Hejtmancik, J. F. und Riazuddin, S. A. (2016): *Loss of function mutations in RP1 are responsible for retinitis pigmentosa in consanguineous familial cases*. *Mol Vis*, 22, 610-25.
- Kantardzhieva, A.; Gosens, I.; Alexeeva, S.; Punte, I. M.; Versteeg, I.; Krieger, E.; Neeffjes-Mol, C. A.; Den Hollander, A. I.; Letteboer, S. J.; Klooster, J.; Cremers, F. P.; Roepman, R. und Wijnholds, J. (2005): *MPP5 recruits MPP4 to the CRB1 complex in photoreceptors*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46, 2192-201.
- Kaplan, J.; Bonneau, D.; Frezal, J.; Munnich, A. und Dufier, J. L. (1990): *Clinical and genetic heterogeneity in retinitis pigmentosa*. *Hum Genet*, 85, 635-42.
- Khan, J. A.; Ide, C. H. und Strickland, M. P. (1988): *Coats'-type retinitis pigmentosa*. *Surv Ophthalmol*, 32, 317-32.
- Kim, D.; Kim, C. H.; Moon, J. I.; Chung, Y. G.; Chang, M. Y.; Han, B. S.; Ko, S.; Yang, E.; Cha, K. Y.; Lanza, R. und Kim, K. S. (2009): *Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins*. *Cell Stem Cell*, 4, 472-6.
- Kim, K.; Doi, A.; Wen, B.; Ng, K.; Zhao, R.; Cahan, P.; Kim, J.; Aryee, M. J.; Ji, H.; Ehrlich, L. I.; Yabuuchi, A.; Takeuchi, A.; Cunniff, K. C.; Hongguang, H.; Mckinney-Freeman, S.; Naveiras, O.; Yoon, T. J.; Irizarry, R. A.; Jung, N.; Seita, J.; Hanna, J.; Murakami, P.; Jaenisch, R.; Weissleder, R.; Orkin, S. H.; Weissman, I. L.; Feinberg, A. P. und Daley, G. Q. (2010): *Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells*. *Nature*, 467, 285-90.
- Kirsch, J. (2010): *Auge - Sehorgan*. 952-976. ALEXANDER, BOB und KONSTANTIN, BOB. Duale Reihe Anatomie Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart
- Klebes, A. und Knust, E. (2000): *A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in Drosophila*. *Curr Biol*, 10, 76-85.
- Kolb, H.: *Morphology and Circuitry of Ganglion Cells* [Online]. <http://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/morphology-and-circuitry-of-ganglion-cells/> [17.08.2017].
- Kolb, H.: *Simple Anatomy of the Retina* [Online]. <http://webvision.med.utah.edu/book/part-i-foundations/simple-anatomy-of-the-retina/> [17.08.2017].
- Kolb, H.: *Glial cells of the Retina* [Online]. <http://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/glial-cells-of-the-retina/> [17.08.2017].
- Kolb, H.: *Roles of Amacrine Cells* [Online]. <http://webvision.med.utah.edu/book/part-iii-retinal-circuits/roles-of-amacrine-cells/> [17.08.2017].
- Kuh, G. F.; Stockmann, M.; Meyer-Ohlendorf, M.; Linta, L.; Proepper, C.; Ludolph, A. C.; Bockmann, J.; Boeckers, T. M. und Liebau, S. (2012): *Tubulin-binding cofactor B is a direct interaction partner of the dynactin subunit p150(Glued)*. *Cell Tissue Res*, 350, 13-26.
- Lad, E. M.; Cheshier, S. H. und Kalani, M. Y. (2009): *Wnt-signaling in retinal development and disease*. *Stem Cells Dev*, 18, 7-16.
- Lamba, D. A.; Karl, M. O.; Ware, C. B. und Reh, T. A. (2006): *Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103, 12769-74.
- Leber, T. (1869): *Ueber Retinitis pigmentosa und angeborene Amaurose*. *Graefe's Archive For Clinical And Experimental Ophthalmology*, 15, 1-25.
- Lemmers, C.; Medina, E.; Delgrossi, M. H.; Michel, D.; Arsanto, J. P. und Le Bivic, A. (2002): *hINAD1/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells*. *J Biol Chem*, 277, 25408-15.

## Literaturverzeichnis

- Lintz, L.; Stockmann, M.; Kleinhans, K. N.; Bockers, A.; Storch, A.; Zaehres, H.; Lin, Q.; Barbi, G.; Bockers, T. M.; Kleger, A. und Liebau, S. (2012): *Rat embryonic fibroblasts improve reprogramming of human keratinocytes into induced pluripotent stem cells*. *Stem Cells Dev*, 21, 965-76.
- Lister, R.; Pelizzola, M.; Dowen, R. H.; Hawkins, R. D.; Hon, G.; Tonti-Filippini, J.; Nery, J. R.; Lee, L.; Ye, Z.; Ngo, Q. M.; Edsall, L.; Antosiewicz-Bourget, J.; Stewart, R.; Ruotti, V.; Millar, A. H.; Thomson, J. A.; Ren, B. und Ecker, J. R. (2009): *Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences*. *Nature*, 462, 315-22.
- Lister, R.; Pelizzola, M.; Kida, Y. S.; Hawkins, R. D.; Nery, J. R.; Hon, G.; Antosiewicz-Bourget, J.; O'malley, R.; Castanon, R.; Klugman, S.; Downes, M.; Yu, R.; Stewart, R.; Ren, B.; Thomson, J. A.; Evans, R. M. und Ecker, J. R. (2011): *Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells*. *Nature*, 471, 68-73.
- Livesey, F. und Cepko, C. (2001): *Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina*. *Nature reviews. Neuroscience*, 2, 109.
- Lo, H. S.; Wang, Z.; Hu, Y.; Yang, H. H.; Gere, S.; Buetow, K. H. und Lee, M. P. (2003): *Allelic variation in gene expression is common in the human genome*. *Genome Res*, 13, 1855-62.
- Lotery, A. J.; Jacobson, S. G.; Fishman, G. A.; Weleber, R. G.; Fulton, A. B.; Namperumalsamy, P.; Heon, E.; Levin, A. V.; Grover, S.; Rosenow, J. R.; Kopp, K. K.; Sheffield, V. C. und Stone, E. M. (2001): *Mutations in the CRB1 gene cause Leber congenital amaurosis*. *Arch Ophthalmol*, 119, 415-20.
- Lowe, A.; Harris, R.; Bhansali, P.; Cvekl, A. und Liu, W. (2016): *Intercellular adhesion-dependent cell survival and ROCK-regulated actomyosin-driven forces mediate self-formation of a retinal organoid*. *Stem cell reports*, 6, 743-56.
- Luo, Y. R. (2000): *Why is the human visual system sensitive only to light of wavelengths from approximately 760 to 380 nm? An answer from thermochemistry and chemical kinetics*. *Biophys Chem*, 83, 179-84.
- Maherali, N.; Ahfeldt, T.; Rigamonti, A.; Utikal, J.; Cowan, C. und Hochedlinger, K. (2008): *A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells*. *Cell Stem Cell*, 3, 340-5.
- Makarova, O.; Roh, M. H.; Liu, C. J.; Laurinec, S. und Margolis, B. (2003): *Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1)*. *Gene*, 302, 21-9.
- Malicki, J. (2004): *Cell fate decisions and patterning in the vertebrate retina: the importance of timing, asymmetry, polarity and waves*. *Curr Opin Neurobiol*, 14, 15-21.
- Mallon, B. S.; Chenoweth, J. G.; Johnson, K. R.; Hamilton, R. S.; Tesar, P. J.; Yavatkar, A. S.; Tyson, L. J.; Park, K.; Chen, K. G.; Fann, Y. C. und McKay, R. D. (2013): *StemCellDB: the human pluripotent stem cell database at the National Institutes of Health*. *Stem Cell Res*, 10, 57-66.
- Mallon, B. S.; Hamilton, R. S.; Kozhich, O. A.; Johnson, K. R.; Fann, Y. C.; Rao, M. S. und Robey, P. G. (2014): *Comparison of the molecular profiles of human embryonic and induced pluripotent stem cells of isogenic origin*. *Stem Cell Res*, 12, 376-86.
- Martin-Belmonte, F. und Perez-Moreno, M. (2012): *Epithelial cell polarity, stem cells and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 12, 23-38.
- Masland, R. H. (2001): *The fundamental plan of the retina*. *Nat Neurosci*, 4, 877-86.
- Massey-Harroche, D.; Delgrossi, M. H.; Lane-Guermonprez, L.; Arsanto, J. P.; Borg, J. P.; Billaud, M. und Le Bivic, A. (2007): *Evidence for a molecular link between the tuberous sclerosis complex and the Crumbs complex*. *Hum Mol Genet*, 16, 529-36.
- Mehalow, A. K.; Kameya, S.; Smith, R. S.; Hawes, N. L.; Denegre, J. M.; Young, J. A.; Bechtold, L.; Haider, N. B.; Tepass, U.; Heckenlively, J. R.; Chang, B.; Naggert, J. K. und Nishina, P. M. (2003): *CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina*. *Hum Mol Genet*, 12, 2179-89.
- Mellough, C. B.; Collin, J.; Khazim, M.; White, K.; Sernagor, E.; Steel, D. H. und Lako, M. (2015): *IGF-1 signaling plays an important role in the formation of three-dimensional laminated neural retina and other ocular structures from human embryonic stem cells*. *Stem Cells*, 33, 2416-30.

## Literaturverzeichnis

- Michel, D.; Arsanto, J. P.; Massey-Harroche, D.; Beclin, C.; Wijnholds, J. und Le Bivic, A. (2005): *PATJ connects and stabilizes apical and lateral components of tight junctions in human intestinal cells*. J Cell Sci, 118, 4049-57.
- Mu, X. und Klein, W. H. A gene regulatory hierarchy for retinal ganglion cell specification and differentiation. Seminars in cell & developmental biology, 2004. Elsevier, 115-23.
- Nakano, T.; Ando, S.; Takata, N.; Kawada, M.; Muguruma, K.; Sekiguchi, K.; Saito, K.; Yonemura, S.; Eiraku, M. und Sasai, Y. (2012): *Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs*. Cell Stem Cell, 10, 771-85.
- Narayanan, K. und Wadhwa, S. (1998): *Photoreceptor morphogenesis in the human retina: a scanning electron microscopic study*. The Anatomical Record, 252, 133-39.
- Nasonkin, I. O.; Merbs, S. L.; Lazo, K.; Oliver, V. F.; Brooks, M.; Patel, K.; Enke, R. A.; Nellissery, J.; Jamrich, M. und Le, Y. Z. (2013): *Conditional knockdown of DNA methyltransferase 1 reveals a key role of retinal pigment epithelium integrity in photoreceptor outer segment morphogenesis*. Development, 140, 1330-41.
- Nguyen, M. und Arnheiter, H. (2000): *Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF*. Development, 127, 3581-91.
- Nobelprize.Org: *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012* [Online].  
[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2012/yamanaka-facts.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/yamanaka-facts.html)  
[18.08.2017].
- O'Brien, K.; Schulte, D. und Hendrickson, A. E. (2003): *Expression of photoreceptor-associated molecules during human fetal eye development*. Mol Vis, 9, 401-09.
- Ohlemacher, S. K.; Sridhar, A.; Xiao, Y.; Hochstetler, A. E.; Sarfarazi, M.; Cummins, T. R. und Meyer, J. S. (2016): *Stepwise differentiation of retinal ganglion cells from human pluripotent stem cells enables analysis of glaucomatous neurodegeneration*. Stem Cells, 34, 1553-62.
- Palczewski, K.; Polans, A. S.; Baehr, W. und Ames, J. B. (2000): *Ca(2+)-binding proteins in the retina: structure, function, and the etiology of human visual diseases*. Bioessays, 22, 337-50.
- Parfitt, D. A.; Lane, A.; Ramsden, C. M.; Carr, A.-J. F.; Munro, P. M.; Jovanovic, K.; Schwarz, N.; Kanuga, N.; Muthiah, M. N. und Hull, S. (2016): *Identification and correction of mechanisms underlying inherited blindness in human iPSC-derived optic cups*. Cell Stem Cell, 18, 769-81.
- Pasteels, B.; Rogers, J.; Blachier, F. und Pochet, R. (1990): *Calbindin and calretinin localization in retina from different species*. Visual neuroscience, 5, 1-16.
- Patel, M. und Yang, S. (2010): *Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells*. Stem Cell Rev, 6, 367-80.
- Pearring, J. N.; Salinas, R. Y.; Baker, S. A. und Arshavsky, V. Y. (2013): *Protein sorting, targeting and trafficking in photoreceptor cells*. Prog Retin Eye Res, 36, 24-51.
- Pellikka, M.; Tanentzapf, G.; Pinto, M.; Smith, C.; Mcglade, C. J.; Ready, D. F. und Tepass, U. (2002): *Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis*. Nature, 416, 143-9.
- Pellissier, L. P.; Alves, C. H.; Quinn, P. M.; Vos, R. M.; Tanimoto, N.; Lundvig, D. M.; Dudok, J. J.; Hooibrink, B.; Richard, F.; Beck, S. C.; Huber, G.; Sothilingam, V.; Garcia Garrido, M.; Le Bivic, A.; Seeliger, M. W. und Wijnholds, J. (2013): *Targeted ablation of CRB1 and CRB2 in retinal progenitor cells mimics Leber congenital amaurosis*. PLoS Genet, 9, e1003976.
- Pellissier, L. P.; Lundvig, D. M.; Tanimoto, N.; Klooster, J.; Vos, R. M.; Richard, F.; Sothilingam, V.; Garcia Garrido, M.; Le Bivic, A.; Seeliger, M. W. und Wijnholds, J. (2014): *CRB2 acts as a modifying factor of CRB1-related retinal dystrophies in mice*. Hum Mol Genet, 23, 3759-71.
- Perrault, I.; Rozet, J. M.; Gerber, S.; Ghazi, I.; Leowski, C.; Ducroq, D.; Souied, E.; Dufier, J. L.; Munnich, A. und Kaplan, J. (1999): *Leber congenital amaurosis*. Mol Genet Metab, 68, 200-8.
- Pevny, L. H.; Sockanathan, S.; Placzek, M. und Lovell-Badge, R. (1998): *A role for SOX1 in neural determination*. Development, 125, 1967-78.

## Literaturverzeichnis

- Pinzón-Duarte, G.; Kohler, K.; Arango-González, B. und Guenther, E. (2000): *Cell differentiation, synaptogenesis, and influence of the retinal pigment epithelium in a rat neonatal organotypic retina culture*. Vision research, 40, 3455-65.
- Puech, B.; Kostrubiec, B.; Hache, J. C. und Francois, P. (1991): *[Epidemiology and prevalence of hereditary retinal dystrophies in the Northern France]*. J Fr Ophtalmol, 14, 153-64.
- Querubin, A.; Lee, H. R.; Provis, J. M. und O'Brien, K. M. (2009): *Photoreceptor and ganglion cell topographies correlate with information convergence and high acuity regions in the adult pigeon (Columba livia) retina*. J Comp Neurol, 517, 711-22.
- Raymond, S. M. und Jackson, I. J. (1995): *The retinal pigmented epithelium is required for development and maintenance of the mouse neural retina*. Current Biology, 5, 1286-95.
- Richard, M.; Roepman, R.; Aartsen, W. M.; Van Rossum, A. G.; Den Hollander, A. I.; Knust, E.; Wijnholds, J. und Cremers, F. P. (2006): *Towards understanding CRUMBS function in retinal dystrophies*. Hum Mol Genet, 15 Spec No 2, R235-43.
- Rieke, F. (2000): *Mechanisms of single-photon detection in rod photoreceptors*. Methods Enzymol, 316, 186-202.
- Riesenber, A. N.; Liu, Z.; Kopan, R. und Brown, N. L. (2009): *Rbpj cell autonomous regulation of retinal ganglion cell and cone photoreceptor fates in the mouse retina*. J Neurosci, 29, 12865-77.
- Robinson, B. S.; Huang, J.; Hong, Y. und Moberg, K. H. (2010): *Crumbs regulates Salvador/Warts/Hippo signaling in Drosophila via the FERM-domain protein Expanded*. Curr Biol, 20, 582-90.
- Rocha, S. F.; Lopes, S. S.; Gossler, A. und Henrique, D. (2009): *Dll1 and Dll4 function sequentially in the retina and pV2 domain of the spinal cord to regulate neurogenesis and create cell diversity*. Dev Biol, 328, 54-65.
- Rodriguez-Boulan, E. und Nelson, W. J. (1989): *Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype*. Science, 245, 718-25.
- Roh, M. H.; Fan, S.; Liu, C. J. und Margolis, B. (2003): *The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells*. J Cell Sci, 116, 2895-906.
- Sampath, A. P. und Rieke, F. (2004): *Selective transmission of single photon responses by saturation at the rod-to-rod bipolar synapse*. Neuron, 41, 431-43.
- Schappert-Kimmijser, J.; Henkes, H. E. und Van Den Bosch, J. (1959): *Amaurosis congenita (Leber)*. AMA Arch Ophthalmol, 61, 211-8.
- Sharma, R.; Bhargava, D.; Rastogi, P.; Yadav, M.; Chandavarkar, V.; Siddhartha, M.; Caroli, P. und Bansal, P. (2014): *Stem Cells: An Update*. Journal of Indian Academy of Forensic Medicine, 36, 276-80.
- Sheedlo, H. J.; Nelson, T. H.; Lin, N.; Rogers, T. A.; Roque, R. S. und Turner, J. E. (1998): *RPE secreted proteins and antibody influence photoreceptor cell survival and maturation*. Developmental brain research, 107, 57-69.
- Sohocki, M. M.; Sullivan, L. S.; Mintz-Hittner, H. A.; Birch, D.; Heckenlively, J. R.; Freund, C. L.; McInnes, R. R. und Daiger, S. P. (1998): *A range of clinical phenotypes associated with mutations in CRX, a photoreceptor transcription-factor gene*. Am J Hum Genet, 63, 1307-15.
- Staerk, J.; Dawlaty, M. M.; Gao, Q.; Maetzel, D.; Hanna, J.; Sommer, C. A.; Mostoslavsky, G. und Jaenisch, R. (2010): *Reprogramming of human peripheral blood cells to induced pluripotent stem cells*. Cell Stem Cell, 7, 20-4.
- Stone, E. M. (2007): *Leber congenital amaurosis - a model for efficient genetic testing of heterogeneous disorders: LXIV Edward Jackson Memorial Lecture*. Am J Ophthalmol, 144, 791-811.
- Strauss, O.: *The retinal pigment epithelium* [Online]. <http://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/the-retinal-pigment-epithelium/> [17.08.2017].
- Sung, C. H. und Chuang, J. Z. (2010): *The cell biology of vision*. J Cell Biol, 190, 953-63.
- Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K. und Yamanaka, S. (2007): *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors*. Cell, 131, 861-72.
- Takahashi, K. und Yamanaka, S. (2006): *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 126, 663-76.
- Takatsuka, K.; Hatakeyama, J.; Bessho, Y. und Kageyama, R. (2004): *Roles of the bHLH gene Hes1 in retinal morphogenesis*. Brain Res, 1004, 148-55.

## Literaturverzeichnis

- Tepass, U. (1996): *Crumbs, a component of the apical membrane, is required for zonula adherens formation in primary epithelia of Drosophila*. Dev Biol, 177, 217-25.
- Tepass, U. und Knust, E. (1990): *Phenotypic and developmental analysis of mutations at the crumbs locus, a gene required for the development of epithelia in Drosophila melanogaster*. Roux Arch Dev Biol, 199, 189-206.
- Tepass, U.; Theres, C. und Knust, E. (1990): *crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of Drosophila epithelial cells and required for organization of epithelia*. Cell, 61, 787-99.
- Thomson, J. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S. und Jones, J. M. (1998): *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 282, 1145-7.
- Thomson, J. A. und Odorico, J. S. (2000): *Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines*. Trends Biotechnol, 18, 53-7.
- Tucker, B. A.; Mullins, R. F.; Streb, L. M.; Anfinson, K.; Eyestone, M. E.; Kaalberg, E.; Riker, M. J.; Drack, A. V.; Braun, T. A. und Stone, E. M. (2013): *Patient-specific iPSC-derived photoreceptor precursor cells as a means to investigate retinitis pigmentosa*. Elife, 2, e00824.
- Van De Pavert, S. A.; Kantardzhieva, A.; Malysheva, A.; Meuleman, J.; Versteeg, I.; Levelt, C.; Klooster, J.; Geiger, S.; Seeliger, M. W.; Rashbass, P.; Le Bivic, A. und Wijnholds, J. (2004): *Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure*. J Cell Sci, 117, 4169-77.
- Van De Pavert, S. A.; Sanz, A. S.; Aartsen, W. M.; Vos, R. M.; Versteeg, I.; Beck, S. C.; Klooster, J.; Seeliger, M. W. und Wijnholds, J. (2007): *Crb1 is a determinant of retinal apical Muller glia cell features*. Glia, 55, 1486-97.
- Van Den Born, L. I.; Van Soest, S.; Van Schooneveld, M. J.; Riemsdag, F. C.; De Jong, P. T. und Bleeker-Wagemakers, E. M. (1994): *Autosomal recessive retinitis pigmentosa with preserved para-arteriolar retinal pigment epithelium*. Am J Ophthalmol, 118, 430-9.
- Van Den Hurk, J. A.; Rashbass, P.; Roepman, R.; Davis, J.; Voesenek, K. E.; Arends, M. L.; Zonneveld, M. N.; Van Roekel, M. H.; Cameron, K.; Rohrschneider, K.; Heckenlively, J. R.; Koenekoop, R. K.; Hoyng, C. B.; Cremers, F. P. und Den Hollander, A. I. (2005): *Characterization of the Crumbs homolog 2 (CRB2) gene and analysis of its role in retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis*. Mol Vis, 11, 263-73.
- Van Rossum, A. G.; Aartsen, W. M.; Meuleman, J.; Klooster, J.; Malysheva, A.; Versteeg, I.; Arsanto, J. P.; Le Bivic, A. und Wijnholds, J. (2006): *Pals1/Mpp5 is required for correct localization of Crb1 at the subapical region in polarized Muller glia cells*. Hum Mol Genet, 15, 2659-72.
- Wahlin, K. J.; Maruotti, J. A.; Sripathi, S. R.; Ball, J.; Angueyra, J. M.; Kim, C.; Grebe, R.; Li, W.; Jones, B. W. und Zack, D. J. (2017): *Photoreceptor Outer Segment-like Structures in Long-Term 3D Retinas from Human Pluripotent Stem Cells*. Scientific reports, 7.
- Wilson, P. G. und Stice, S. S. (2006): *Development and differentiation of neural rosettes derived from human embryonic stem cells*. Stem Cell Rev, 2, 67-77.
- Wolfrum, U. und Schmitt, A. (2000): *Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells*. Cell Motil Cytoskeleton, 46, 95-107.
- Yamada, E. (1969): *Some structural features of the fovea centralis in the human retina*. Arch Ophthalmol, 82, 151-9.
- Yamanaka, S. (2008): *Pluripotency and nuclear reprogramming*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 363, 2079-87.
- Yan, H.; Yuan, W.; Velculescu, V. E.; Vogelstein, B. und Kinzler, K. W. (2002): *Allelic variation in human gene expression*. Science, 297, 1143.
- Yaron, O.; Farhy, C.; Marquardt, T.; Applebury, M. und Ashery-Padan, R. (2006): *Notch1 functions to suppress cone-photoreceptor fate specification in the developing mouse retina*. Development, 133, 1367-78.
- Zhang, X.; Huang, C. T.; Chen, J.; Pankratz, M. T.; Xi, J.; Li, J.; Yang, Y.; Lavaute, T. M.; Li, X. J.; Ayala, M.; Bondarenko, G. I.; Du, Z. W.; Jin, Y.; Golos, T. G. und Zhang, S. C. (2010): *Pax6 is a human neuroectoderm cell fate determinant*. Cell Stem Cell, 7, 90-100.
- Zheng, M. H.; Shi, M.; Pei, Z.; Gao, F.; Han, H. und Ding, Y. Q. (2009): *The transcription factor RBP-J is essential for retinal cell differentiation and lamination*. Mol Brain, 2, 38.



## Literaturverzeichnis

- Zhong, X.; Gutierrez, C.; Xue, T.; Hampton, C.; Vergara, M. N.; Cao, L. H.; Peters, A.; Park, T. S.; Zambidis, E. T.; Meyer, J. S.; Gamm, D. M.; Yau, K. W. und Canto-Soler, M. V. (2014): *Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs*. Nat Commun, 5, 4047.
- Zhou, H.; Wu, S.; Joo, J. Y.; Zhu, S.; Han, D. W.; Lin, T.; Trauger, S.; Bien, G.; Yao, S.; Zhu, Y.; Siuzdak, G.; Scholer, H. R.; Duan, L. und Ding, S. (2009): *Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins*. Cell Stem Cell, 4, 381-4.
- Zuber, M. E. (2010): *Eye field specification in Xenopus laevis*. Curr Top Dev Biol, 93, 29-60.
- Zuber, M. E.; Gestri, G.; Viczian, A. S.; Barsacchi, G. und Harris, W. A. (2003): *Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors*. Development, 130, 5155-67.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde im Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie unter Betreuung von Prof. Dr. Stefan Liebau durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Stefan Liebau und Kevin Achberger.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Kevin Achberger mit Unterstützung durch Kevin Achberger durchgeführt. Die Zellkultivierung wurde von Kevin Achberger durchgeführt.

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

---

Tübingen, den 14.11.2017

## Danksagungen

Zu aller erst möchte ich Stefan Liebau danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat im Institut für Neuroanatomie und Entwicklungsbiologie diese Promotion durchzuführen. Danke für deine offene Tür bei Fragen jeglicher Art und deine sehr angenehme Art und Weise mich bei meiner Promotion zu unterstützen.

Besonders danken möchte ich Kevin Achberger, der mich über die ganze Zeit in sämtlichen Phasen der Promotion sehr geduldig und freundlich unterstützt und begleitet hat. Du warst mir nicht nur eine sehr große Hilfe in diesem Projekt, sondern hast mich zusammen mit den anderen sehr herzlich in der Gruppe aufgenommen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Jasmin Haderspeck, Moritz Klingenstein, Stefanie Raab, Leonhard Linta, Clara Misbah, Maira Bertolossi und Sabine Conrad für jegliche Unterstützung während meiner Zeit in der Anatomie und für die herzliche Aufnahme und freundlichen Worte in eurer Arbeitsgruppe.

Ein ganz besonderer Dank geht an alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Instituts für die stets freundliche und gute Zusammenarbeit.

Großen Dank geht an meine lieben Eltern, Günther und Edeltraud, die mich nicht nur während meiner Promotion, sondern schon mein ganzes Leben und insbesondere während meines Studiums in meinem Vorhaben immer wieder ermutigt und bestärkt haben. Ohne euch wäre dies alles sicherlich nicht möglich gewesen.

Vielen lieben Dank auch an meine Schwester, meinen Schwager, den drei Kleinen und an meinen Bruder. Ihr habt mich immer wieder ermutigt, aufgemuntert und unterstützt.

Ich danke allen meinen Freunden und insbesondere meinem Freund Michael, der mir mit Ausdauer, Ruhe und Geduld stets zur Seite stand und mich immer wieder ermutigt und neu motiviert hat.