

OR-100

Towards exploring the role of RPGR isoforms in rods and cones in human retinal organoids

Vlasta Hadalin¹, Teresa Rogler², Marija Volk³, Ana Fakin¹, Friedhelm Serwane²

¹Očesna klinika, Univerzitetni klinični center (UKC) Ljubljana, Slovenia

²Ulm University, Germany

³Klinični inštitut za genomsko medicino, Univerzitetni klinični center (UKC) Ljubljana, Slovenia

PURPOSE: The Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR) protein plays a crucial role in the formation of connecting cilia and outer segments in photoreceptor cells (PRs). Although pathogenic variants in RPGR are known to impact either rod or cone PRs, the underlying mechanism behind this distinction remains unclear (1). Research involving patient-derived fibroblasts has indicated that the ratio of retina-specific RPGR isoforms influences the length of the connecting cilia. However, it remains uncertain whether these findings apply to rods and cones due to the difficulty in obtaining living human retinal tissue.

METHODS: To investigate the relationship between RPGR isoform ratios and connecting cilia length in rods and cones, we are establishing human retinal organoids (hROs) as an RPGR disease model. For further analysis we created 5 subgroups of organoids: 1) wild-type group (10 organoids), 2) wild-type group with added scramble RNA (10 organoids), 3) group with RPGR ORF15 isoform downregulation (10 organoids), 4) group with RPGR skip14/15 isoform downregulation (10 organoids) and 5) group with all RPGR isoforms' downregulation (10 organoids). We manipulate RPGR isoform expression using short hairpin RNA (shRNA) specific to each of the three RPGR isoforms. Adeno-associated viral vectors (AAVs) are employed for shRNA delivery, transduction efficiency is evaluated using confocal microscopy and deep learning-based segmentation tools (2). For photoreceptor's morphology analysis, we utilize live or immunofluorescence high-resolution microscopy (5 organoids from each condition). For RNA isoform ratio evaluation we perform single-cell RNA sequencing (5 organoids from each condition).

CONCLUSIONS: We anticipate discovering variations in the isoform ratio between rods and cones, and documenting their impact on photoreceptors' morphology. Our in vitro model may help guiding the development of therapies targeting the modulation of RNA isoform expression ratios, offering a promising avenue for retinal precision medicine.

1 Hadalin et al. Int J Mol Sci 2023.02.14, doi: 10.3390/ijms24043840

2 Rogler et al., bioRxiv 2024.03.06.583795.

Raziskovanje vloge RPGR izoform v paličnicah in čepnicah humanih mrežničnih organoidov

Vlasta Hadalin¹, Teresa Rogler², Marija Volk³, Ana Fakin¹, Friedhelm Serwane²

¹Očesna klinika, Univerzitetni klinični center (UKC) Ljubljana, Slovenia

²Ulm University, Germany

³Klinični inštitut za genomsko medicino, Univerzitetni klinični center (UKC) Ljubljana, Slovenia

NAMEN: Retinitis Pigmentosa GTPazni regulator (RPGR) je beljakovina, ki igra ključno vlogo v izgradnji povezovalnih cilij in zunanjih segmentov fotoreceptorskih celic. Znano je, da patogene različice v RPGR lahko prizadenejo bodisi paličnice ali čepnice, vendar mehanizem za tem ni poznan (1). Raziskave na bolnikovih fibroblastih so pokazale, da razmerje mrežnično specifičnih RPGR izoform vpliva na dolžino povezovalnih cilij. Zaradi težavnosti in tveganja pridobitve vitalnega mrežničnega tkiva bolnikov, zaenkrat ni jasno ali lahko razmerje RPGR izoform vpliva na dolžino povezovalnih cilij paličnic ali čepnic.

METODE: Za raziskovanje povezave med razmerjem RPGR izoform ter dolžino povezovalnih cilij v paličnicah in čepnicah, smo vzgojili humane mrežnične organoide kot model z RPGR povezanimi fenotipi. Za nadaljnjo analizo smo ustvarili 5 podskupin mrežničnih organoidov: 1) wild-type skupina (10 organoidov), 2) wild-type skupina z dodano scramble RNA (10 organoidov), 3) skupina z zmanjšanim izražanjem RPGR ORF15 izoforme (10 organoidov), 4) skupina z zmanjšanim izražanjem RPGR skip14/15 izoforme ter 5) skupina z zmanjšanim izražanjem vseh RPGR izoform (10 organoidov). Izražanje RPGR izoform v humanem mrežničnem organoidu smo regulirali s kratko lasnično RNA (shRNA), specifično za vsako od treh RPGR izoform. Za transport shRNA v fotoreceptorje, smo uporabili adenovirusne vektorje (AAV) ter ocenjevali uspešnost transdukcije s konfokalno mikroskopijo in segmentacijskimi orodji (2). Za analizo morfologije

fotoreceptorjev smo uporabili in vivo ali imunofluorescenčno visokoresolucijsko mikroskopijo (5 organoidov iz vsake podskupine). Razmerje RNA izoform smo ocenili z uporabo RNA sekvenciranja posameznih celic (5 organoidov iz vsake skupine).

ZAKLJUČKI: Z našo raziskavo se nadejamo najti razlike v razmerju RPGR izoform med paličnicami in čepnicami ter ugotoviti njihov vpliv na morfologijo fotoreceptorjev. Naš in vitro model bi v prihodnosti lahko pomagal usmerjati razvoj potencialnih tarčnih terapij reguliranja izražanja razmerja RNA izoform, kot obetajočega zdravljenja na področju genetskih bolezni mrežnice.

1 Hadalin et al. Int J Mol Sci 2023.02.14, doi: 10.3390/ijms24043840

2 Rogler et al., bioRxiv 2024.03.06.583795.