

Entwicklung einer therapeutischen Strategie basierend auf  
CRISPR/Cas Genome Editing im Schweinemodell für Morbus  
Stargardt

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Bucher, Michael  
aus Regensburg

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Gutachterin: Prof. Dr. Dagmar Nolte

Tag der Disputation: 14.06.2024

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Morbus Stargardt.....	1
1.2	Retinale Gentherapie .....	2
1.3	Genome Editing.....	3
1.4	Endonukleasen und CRISPR/Cas9.....	4
1.5	DNA-Reparaturmechanismen .....	6
1.5.1	NHEJ .....	7
1.5.2	MMEJ.....	7
1.5.3	HDR .....	8
1.6	Therapeutische Ansätze zur Behandlung von STGD1.....	8
1.6.1	Medikamentöse Therapieansätze .....	9
1.6.2	Stammzelltherapie bei Morbus Stargardt.....	9
1.6.3	Genome Editing bei Morbus Stargardt.....	9
1.7	Quantifizierung aktiver gRNA/Cas9-Komplexe .....	11
1.7.1	BRET-Assay.....	11
1.8	Zielsetzung .....	13
2	Material und Methoden .....	14
2.1	Material .....	14
2.1.1	Geräte .....	14
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	15
2.1.3	Chemikalien und Antibiotika .....	16
2.1.4	Enzyme.....	17
2.1.5	DNA-Größenstandards.....	18
2.1.6	Vektoren/Plasmide .....	18
2.1.7	Kit-Systeme .....	20
2.1.8	Organismen .....	20
2.1.9	Oligonukleotide und Primer .....	21
2.1.10	Kulturmedien.....	25
2.1.10.1	Bakterienmedien.....	25
2.1.10.2	Medien für eukaryotische Zellen.....	25
2.1.11	Puffer und Lösungen .....	26
2.1.12	Software .....	27
2.2	Methoden.....	27

2.2.1	Arbeiten mit DNA.....	27
2.2.1.1	Hybridisierung von Oligonukleotiden.....	27
2.2.1.2	Restriktionsverdau.....	27
2.2.1.3	Ligation von DNA-Molekülen.....	28
2.2.1.4	Nachverdau von ligierten Plasmiden.....	28
2.2.1.5	Klonierungen mit pCRTM-Blunt II-TOPO®.....	29
2.2.1.6	Sequenzierung von Plasmidklonen.....	29
2.2.1.7	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	30
2.2.1.8	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	30
2.2.1.9	Synthese von DNA-Templates.....	30
2.2.1.10	Agarosegelelektrophorese.....	30
2.2.1.11	DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	31
2.2.2	Arbeiten mit Zellen.....	31
2.2.2.1	Arbeiten mit Bakterien.....	31
2.2.2.1.1	Herstellung elektrokompenter <i>E.coli</i> .....	31
2.2.2.1.2	Transformation elektrokompenter <i>E.coli</i> .....	31
2.2.2.1.3	Kultivieren und Selektieren von Bakterien in LB-Kulturen.....	32
2.2.2.1.4	Herstellung von Glycerolstocks.....	32
2.2.2.1.5	Isolation von Plasmid DNA.....	33
2.2.2.1.5.1	Mini-Preparation mit Puffern.....	33
2.2.2.1.5.2	Mini-Preparation mit Plasmid Kit.....	33
2.2.2.1.5.3	Maxi-Preparation von Plasmid-DNA.....	33
2.2.2.2	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	33
2.2.2.2.1	Kultivierung von HEK293-T-Zellen.....	33
2.2.2.2.2	Transfektion eukaryotischer Zellen.....	34
2.2.2.2.3	Fluoreszenz Mikroskopie.....	35
2.2.3	Arbeiten mit Proteinen.....	35
2.2.3.1	Proteinisolation aus eukaryotischen Zellen.....	35
2.2.3.2	BRET-Assay/MMEJ-Assay.....	35
2.2.4	Statistische Auswertung.....	36
3	Ergebnisse.....	37
3.1	Klonierungen der gRNA/Cas9-Plasmide.....	37
3.2	Klonierungen der Target-Plasmide.....	39
3.3	Überprüfung der Endonukleaseaktivität.....	40

3.4	Synthese des Wildtyp-Templates .....	45
3.5	Synthese des porzinen ABCA4 MMEJ Target DNA Templates .....	47
3.6	Klonierung des porzinen ABCA4 MMEJ Target DNA Templates in den pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 Vektor .....	47
3.7	Durchführung des MMEJ-Assays in HEK293-T-Zellen .....	48
4	Diskussion .....	52
4.1	Herstellung und Test verschiedener gRNA/Cas9-Plasmide für das porzine <i>ABCA4</i> Gen.....	52
4.2	Konstruktion und Herstellung des WT-Templates.....	55
4.3	DNA-Editierung im MMEJ-Template .....	55
4.4	Ausblick .....	58
5	Zusammenfassung .....	59
6	Summary .....	60
7	Abkürzungsverzeichnis .....	61
8	Abbildungsverzeichnis .....	62
9	Tabellenverzeichnis.....	63
10	Literaturverzeichnis.....	64
11	Anhang .....	73
11.1	Basenabfolge des Wildtyp-Templates.....	73
11.2	Basenabfolge des MMEJ-Templates.....	73
12	Selbstständigkeitserklärung.....	75
13	Danksagung .....	76

# 1 Einleitung

## 1.1 Morbus Stargardt

Morbus Stargardt ist mit einer Prävalenz von 1:8000 – 10000 eine der häufigsten erblichen Ursachen für Sehbehinderung bei Kindern und Erwachsenen. In Deutschland leben ca. 10000 Betroffene. (Röck et al., 2013) Die Krankheit beginnt meist im Kindesalter mit fortschreitenden zentralen Gesichtsfeldausfällen und zunehmender makulärer Dysfunktion auf beiden Augen. (Tanna et al., 2017) Die Folge sind Schwierigkeiten bei Aktivitäten des täglichen Lebens wie Lesen, Autofahren und Erkennen von Personen. (Miedziak et al., 2000) Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es zudem häufig zu Photophobie sowie zu verändertem Farbsehen. (Wittkowski & Krause, 2010) Die häufigste Form von Morbus Stargardt ist STGD1. (Piotter et al., 2021) Ursächlich hierfür sind Mutationen im *ABCA4* Gen, die autosomal rezessiv vererbt werden. (Tanna et al., 2017) Dieses Gen umfasst ca. 128 000 bp mit einer codierenden Gesamtlänge von ~7 kbp verteilt auf 50 Exons und liegt auf Chromosom 1. (Wimmer et al., 2023)

Das Genprodukt des *ABCA4* Gens, das ABCA4 Protein, ist in den Außensegmenten der Photorezeptorzellen lokalisiert und spielt eine wichtige Rolle im retinalen Phototransduktionsprozess. (Piotter et al., 2021) Dieser besteht aus enzymkatalysierten Reaktionen, in denen All-trans-Retinal, welches in den Photorezeptorzellen durch einfallendes Licht aus 11-cis-Retinal isomerisiert wird, wieder in 11-cis-Retinal rückumgewandelt wird. Das anfallende All-trans-Retinal bildet zunächst einen Komplex mit Phosphatidylethanolamin, der zu N-Retinylidene-Phosphatidylethanolamin (N-ret-PE) führt. (Tanna et al., 2017) Dieses N-ret-PE wird beim Gesunden vom ABCA4 Protein vom Lumen zur zytosomatischen Seite der Diskusmembran in den Photorezeptorzellen wegtransportiert. (Molday et al., 2022; Piotter et al., 2021) Ist dieser Transportprozess gestört, kommt es zur Akkumulation von N-ret-PE und damit im weiteren Verlauf durch Umwandlungsprozesse zur Ansammlung des toxischen Bisretinoids N-Retinylidene-N-Retinylolethanolamin (A2E) in den Diskusmembranen. (Piotter et al., 2021) Neue Diskusmembranen, welche die Photorezeptoren ständig produzieren, schieben die alten immer weiter nach distal, wo diese vom angrenzenden retinalen Pigmentepithel (RPE) phagozytiert werden. A2E sowie weitere Bisretinoide, zusammen Lipofuszin genannt, reichern sich daraufhin im RPE an und führen dort im Verlauf zu einer Zellschädigung. Das RPE ist wichtig für die Funktion der Photorezeptoren, weshalb es auch in diesen zunehmend zu einer

Funktionseinschränkung und damit zu der oben beschriebenen Symptomatik kommt. (Cremers et al., 2020; Piotter et al., 2021; Tanna et al., 2017)

Analysen konnten bislang über 1500 krankheitsverursachende Sequenzvarianten innerhalb des *ABCA4* Gens nachweisen. (Siles et al., 2023; Zernant et al., 2014) Diese Vielzahl an Mutationen, die auch phänotypisch zu einer weiten Bandbreite an Krankheitsverläufen führen, macht es häufig schwierig, der Krankheit eine eindeutige Ursache zuzuordnen und die Diagnose richtig zu stellen. (Tanna et al., 2017) Eine der bekannten pathogenen Mutationen im *ABCA4* Gen ist in Exon 43 zwischen den Positionen 5918 und 5919 lokalisiert (c.5918\_5919insA). Es handelt sich dabei um eine Frameshiftmutation, die durch eine Adenin-Insertion (gtg<gtAg) verursacht wird. (Kjellström, 2014; Wimmer et al., 2023) Diese Mutation soll in der vorliegenden Arbeit beispielhaft therapiert werden.

Das *ABCA4* Gen ist unter den verschiedenen Spezies sehr gut konserviert. Das porcine *ABCA4* Gen (XP\_020945843.1) weist eine 86,19%ige Übereinstimmung zum humanen Pendant (NP\_000341.2) auf und eignet sich daher sehr gut als Modell. (Wimmer et al., 2023)

## 1.2 Retinale Gentherapie

Unter dem Begriff Gentherapie versteht man Techniken, die darauf abzielen, mit genetischen Modifikationen von Zellen einen therapeutischen Effekt zu erwirken. (Kaji & Leiden, 2001) Das Auge bietet für die Anwendung von Gentherapie ein wertvolles Modellsystem. Zum einen ist es therapeutisch, bspw. durch intraokulare Injektionen, gut zugänglich, zum anderen kann der Therapieerfolg, u.a. durch Fundusbildgebung und elektrophysiologische Untersuchungen, einfach und direkt phänotypisch beurteilt werden. (Bainbridge et al., 2006) Außerdem besitzt das Auge mit der Blut-Retina-Schranke eine Barriere, welche den Kontakt der ins Auge applizierten Substanzen mit anderen Organen vorbeugt und so systemische Nebenwirkungen verringert. (Dhurandhar et al., 2021) Augenerkrankungen können bereits heute gentherapeutisch behandelt werden. So ist das Medikament Voretigen Neparvovec (Luxturna®) als subretinale Injektion seit Dezember 2017 in den USA, bzw. seit November 2018 in Europa zur Behandlung der Leber'schen Kongenitalen Amaurose zugelassen. (Keeler & Flotte, 2019)

Technisch wird in der Gentherapie unterschieden zwischen u.a. „Gene Silencing“, „Gene Replacement“, und „Genome Editing“. (Burnett & Rossi, 2012; Tessitore et al., 2006; D. Wang & Gao, 2014)

Gene Silencing kann bei dominant vererbten Mutationen, wie bspw. bei Formen der Retinitis pigmentosa, zum Einsatz kommen. Durch Hemmung der Translation des mutierten dominanten Proteins auf RNA-Ebene wird dieses nicht produziert und kann seine schädigende Dysfunktion nicht ausüben. (Burnett & Rossi, 2012; Tessitore et al., 2006) Da STGD1 rezessiv vererbt wird, erscheint der Einsatz von Gene Silencing hier nicht sinnvoll.

Ein Ansatz, rezessiv vererbte Mutationen zu behandeln, ist Gene Replacement. Hiermit können Erkrankungen, welche auf das Fehlen eines einzigen funktionstüchtigen Gens zurückgeführt werden können, behandelt werden, indem man mittels Vektoren, meist Adeno-assoziierten Viren (AAV), die korrekte kodierende DNA-Sequenz des Gens in die Zellen transfiziert. (D. Wang & Gao, 2014) Dieses Verfahren kommt u.a. bei Voretigen Neparvovec (siehe oben) zur Anwendung. (Russell et al., 2017) Eine Limitation, diesen Ansatz bei Mutationen im *ABCA4* Gen therapeutisch zu verfolgen, ist die geringe Transportkapazität der AAVs, welche lediglich DNA-Fragmente von ~4,7 kbp Länge transfizieren können. (Berns & Giraud, 1996) Die komplette kodierende Sequenz des humanen *ABCA4* Gens ist mit >7,7 kbp (XM\_021090184) hierfür schlicht zu groß. (Han et al., 2014; Stingl et al., 2022) Theoretisch gibt es neben AAVs noch weitere Vektoren mit teils wesentlich höherer Transportkapazität, die man zum retinalen Gentransfer benutzen könnte. Diese bringen jedoch wieder andere Herausforderungen mit sich, um Gene suffizient in die Retina zu transferieren und werden derzeit erforscht. (Albert et al., 2018; Stingl et al., 2022; Wimmer, 2018; Yanik et al., 2017)

### 1.3 Genome Editing

Ein weiterer Ansatz, Krankheiten auf DNA-Ebene zu therapieren, ist die Genome Editing (GE) Technologie, welche in dieser Arbeit angewendet wird. Erzeugt man mit einer Endonuklease an einer spezifischen Stelle im Genom einen DNA-Doppelstrangbruch (DSB), wird dieser anschließend vom zelleigenen Reparatursystem erkannt und behoben (siehe 1.5). NHEJ (siehe 1.5.1) kommt dabei hauptsächlich beim Ausschalten von Genen zum Einsatz, während MMEJ und HDR (siehe 1.5.2 und 1.5.3) unter Nutzung einer DNA-Vorlage grundsätzlich in der Lage sind, verloren gegangene DNA-Abschnitte wieder herzustellen bzw. durch neue Sequenzen zu ersetzen. Sofern diese DNA-Vorlage der wild-typischen Sequenz des betroffenen Genabschnitts entspricht, kann so eine Mutation im Genom selbst vollständig behoben werden. (Lee et al., 2016; Wimmer, 2018; Yanik et

al., 2017) Da man hierfür im Gegensatz zum Gene Replacement nicht das komplette Gen, sondern lediglich einen viel kleineren wildtypischen Abschnitt davon sowie die Endonuklease in die Zelle einbringen muss, wird die Transportkapazität der AAVs u.U. weniger ausgereizt. Denkbar ist auch, die verschiedenen Konstrukte, die beim Genome Editing benötigt werden in einer Dual-Vector-Strategie separat zu transfizieren. (van Haasteren et al., 2020) Auch nicht virale Vektor-Strategien, wie Nanopartikel oder Supercharged Proteins befinden sich in Entwicklung. (Yanik et al., 2017)

## 1.4 Endonukleasen und CRISPR/Cas9

Wie bereits beschrieben, bedarf es bei der Genome Editing-Technologie Endonukleasen, welche spezifisch an einer zuvor definierten Stelle im Genom einen DSB erzeugen können. Hierfür stehen heutzutage mehrere bekannte Systeme zur Verfügung, wie zum Beispiel Meganukleasen, Zinkfingernukleasen, TALENs und das in dieser Arbeit verwendete CRISPR/Cas9-System. CRISPR steht für “clustered regularly interspaced short palindromic repeats” und Cas9 für “CRISPR-assoziiertes Protein 9”. (Jiang, 2017; Yanik et al., 2017) Das Cas-Protein wird von einem RNA-Molekül zu seinem Zielort (sog. Targetstelle) geleitet und ist somit im Vergleich zu den oben genannten Endonukleasen, welche teils Proteinmotive zur DNA-Sequenzerkennung verwenden, einfacher zu implementieren. (Chandrasegaran & Carroll, 2016; Mahfouz et al., 2014; Yanik et al., 2017) Mit dieser Technologie lässt sich praktisch an jeder genomischen Sequenz, welche vorher durch eine sog. guideRNA (gRNA) spezifiziert wurde, ein DNA-DSB erzeugen. (Jiang, 2017)

Das CRISPR/Cas System kommt natürlicherweise vor als Bestandteil des adaptiven Immunsystems vieler Bakterien und Archaeen. (Jiang, 2017) Sobald eine genetische Struktur, bspw. ein Virus, in das Bakterium eindringt, werden aus dieser kleine ca. 20 bp lange Sequenzen herausgeschnitten und an spezifischen dafür vorgesehenen Stellen im Wirtsgenom, den sog. CRISPR-Arrays, eingebaut. (Jiang, 2017; Yanik et al., 2017) Somit werden Teile der DNA des Eindringlings im Wirtsgenom abgespeichert. Der CRISPR-Array kann anschließend transkribiert werden, wodurch durch weitere enzymatische Spaltungsschritte die sog. CRISPR-RNA (crRNA) entsteht. (Jiang, 2017) Die crRNA, welche dann an ihrem 5'-Ende ein kurzes Segment, welches komplementär zur DNA des Eindringlings ist, enthält, wird anschließend mithilfe der bakteriellen trans-activating-crRNA (tracrRNA) in die Cas-Endonuklease integriert. (Jiang, 2017; Yanik et al., 2017) Sollte

der Eindringling das Bakterium erneut infizieren, kann die crRNA dessen zu ihr komplementäre DNA durch Basenpaarung erkennen und binden, woraufhin die Cas-Endonuklease dort einen DSB erzeugt und so das Genom des Eindringlings zerstört. (Jiang, 2017) Voraussetzung hierfür ist darüber hinaus, dass sich am 3'-Ende der Targetstelle eine spezifische 3-5 bp lange Basenabfolge, die sog. PAM-Sequenz (Protospacer Adjacent Motif), befindet. (Yanik et al., 2017) Diese wird nicht in die CRISPR-arrays des Wirtsgenoms mit eingebaut, sodass die Cas-Endonuklease spezifisch nur an der DNA des Eindringlings schneidet und einem autoimmunen Spalten im eigenen Genom vorgebeugt wird. (Horvath & Barrangou, 2010)

Die spezifischen PAM-Sequenzen unterscheiden sich bei den verschiedenen CRISPR-Systemen der verschiedenen Bakterien. Das in dieser Arbeit verwendete CRISPR/Cas9-System des Bakteriums *streptococcus pyogenes* (SpCas9) erfordert als PAM-Sequenz 5'-NGG-3'. (Ran et al., 2013)

Bisher sind über die verschiedenen Bakterien und Archaeen hinweg 3 verschiedene Typen (I-III) des CRISPR-Systems, welche alle ähnlich arbeiten, bekannt. (Ran et al., 2013) Cas9 gehört zum CRISPR-System II. (Doudna & Charpentier, 2014)

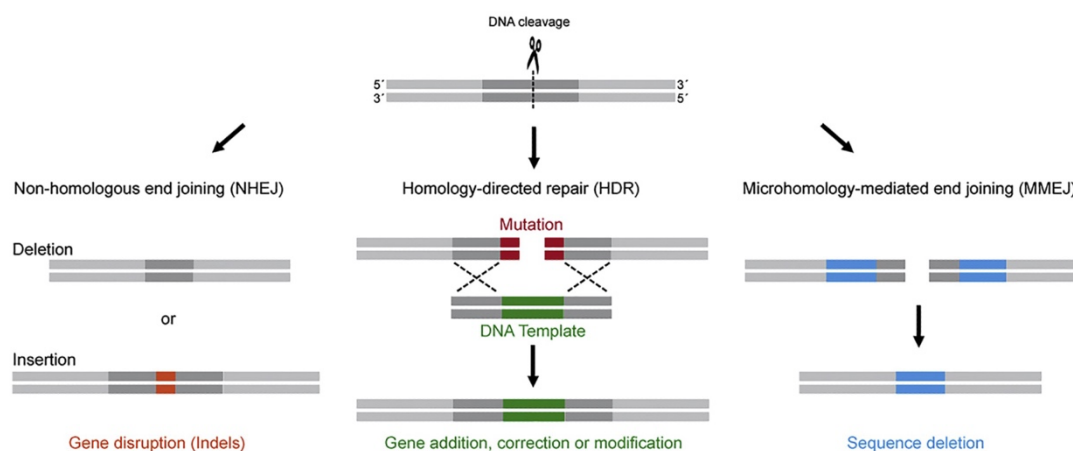
Mittlerweile ist es gelungen, die relevanten Abschnitte von crRNA und tracrRNA zu einer einzigen, gRNA genannten RNA zusammenzufassen. Somit muss zur Erzeugung eines DSB mit der Cas9 Endonuklease an einer spezifischen Stelle lediglich die gRNA auf die gewünschte Targetstelle angepasst werden. (Jinek et al., 2012)

Eine Herausforderung bei der Anwendung von CRISPR/Cas *in vivo* ist die sog. Off-Target-Aktivität, also das ungewollte Erzeugen von Doppelstrangbrüchen an Stellen im Genom, die eine gewisse Homologie zur On-Target-Stelle aufweisen. (Jiang, 2017) Sofern der DSB an dieser Stelle anschließend nicht korrekt repariert wird, können dadurch schwere, unkontrollierbare Schäden entstehen, weshalb die Off-Target-Aktivität des jeweiligen gRNA/Cas9 Konstruktes im eingesetzten Genom kontrolliert und minimiert werden muss. (Manghwar et al., 2020) Hierzu gibt es die Möglichkeit, das Genom *in vitro* vollständig zu sequenzieren und anschließend mithilfe von Computerprogrammen *in silico* die Wahrscheinlichkeit zu bestimmen, dass das eingesetzte gRNA/Cas9 Konstrukt dort an ungewünschter Stelle einen DSB erzeugen wird. (Liu et al., 2020; Ran et al., 2013; Slaymaker et al., 2016) Diese Computerberechnungen basieren auf zuvor empirisch erhobenen Daten. (Konstantakos et al., 2022) Untersuchungen haben gezeigt, dass die Bindung von einem gRNA/Cas9 Komplex an eine Off-Target Stelle entscheidend davon abhängt, in welcher Entfernung von der PAM-Sequenz sich eine potenzielle Off-Target

Stelle von der On-Target Stelle unterscheidet. (Jiang, 2017) Auch die Länge der gewählten gRNA kann die Off-Target-Aktivität beeinflussen. (Ren et al., 2014) Dennoch sind die Methoden zur Vorhersage von Off-Target-Aktivität bis heute nicht genau genug und müssen noch weiter erforscht werden. (Jiang, 2017)

## 1.5 DNA-Reparaturmechanismen

Jeden Tag treten im menschlichen Körper pro Zelle ca. 10 DNA-Doppelstrangbrüche auf. Dies geschieht meist im Zuge der Zellteilung, aber auch durch ionisierende Strahlung, oxidative Schädigung oder inadäquate Aktivität von Endonukleasen. (Chang et al., 2017) Um diese Doppelstrangbrüche schnellstmöglich zu reparieren und somit die Funktionalität der DNA weiterhin zu gewährleisten, nutzen Zellen, sofern bekannt, hauptsächlich zwei Verfahren. (Lieber, 2010) Zum einen gibt es den Homology directed repair Mechanismus (HDR), welcher als nahezu fehlerfrei gilt. Zum anderen den Non-homologous end joining Mechanismus (NHEJ), welcher fehleranfälliger ist und seinerseits noch einmal in klassisches (C-NHEJ, in dieser Arbeit NHEJ genannt) und alternatives NHEJ (A-NHEJ, in dieser Arbeit MMEJ genannt) unterteilt werden kann. NHEJ kommt während des gesamten Zellteilungszyklus vor, während HDR und MMEJ meist nur während bestimmten Phasen auftreten (S- und G2-Phase bei HDR, S-Phase bei MMEJ). Die Entscheidungskriterien, nach welchen sich eine Zelle des einen oder anderen der ihr zur Verfügung stehenden Reparaturmechanismen bedient, sind bisher weitestgehend nicht bekannt. (Lieber, 2010; Yanik et al., 2017) Einen schematischen Überblick über die drei Reparaturwege, welche man sich beim Genome Editing (siehe 1.3) zu Nutze macht, gibt Abbildung 1.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der DNA-Reparaturmechanismen NHEJ, HDR und MMEJ**  
(Yanik et al., 2017), Creative Commons Lizenz (CC BY NC ND)

### 1.5.1 NHEJ

NHEJ ist der von menschlichen Zellen am häufigsten benutzte Mechanismus zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Hierbei werden mithilfe von Nukleasen, Polymerasen und Ligasen die entstandenen Doppelstrangbrüche direkt wieder miteinander verknüpft. Dabei kann es zu Insertionen, Deletionen und Substitutionen von Basenabschnitten kommen, weshalb NHEJ als sehr fehleranfällig gilt. (Lieber, 2008, 2010) Die NHEJ-Reparatur beginnt damit, dass sog. DNA-Damage-Sensing-Proteine Doppelstrangbrüche erkennen und diese markieren. An diese Proteine bindet dann ein weiterer Proteinkomplex, welcher gleichzeitig die offenen DNA-Enden stabilisiert. In einer dadurch hervorgerufenen Kaskade von sich immer weiter rekrutierenden und aktivierenden Proteinkomplexen werden die offenen DNA-Enden weiter prozessiert. Anschließend werden von den Polymerasen  $\lambda$  und  $\mu$  weitere Nukleotide eingefügt. Schließlich werden die beiden DNA-Doppelstrangenden durch die ATP-abhängige Ligase LIG4 verknüpft. (Yanik et al., 2017) Da hierbei also zur Reparatur des DSB keine Vorlage benutzt, spricht kein Template eingebaut wird, ist NHEJ für das in dieser Arbeit geplante Genome Editing unbrauchbar. Der NHEJ-Weg wird in der Gentherapie häufig verwendet, um Gen-Knock-outs zu erreichen. (Yu & Wu, 2018)

### 1.5.2 MMEJ

MMEJ wurde ursprünglich auch als alternatives NHEJ bezeichnet, da man dachte, dass es nur zum Einsatz kommt, wenn die Reparatur über andere Mechanismen wie dem NHEJ gescheitert ist. Mit der Zeit hat man allerdings festgestellt, dass dieser Reparaturweg überraschend robust ist und in bestimmten Situationen durchaus regelhaft auftritt. (McVey & Lee, 2008) Der MMEJ-Reparaturweg nutzt, falls vorhanden, ein DNA-Template als Vorlage. Sofern sich in der Nähe der Enden des DSBs DNA-Sequenzen befinden, welche homolog zu Sequenzabschnitten auf dem Template sind, kann dieses an den homologen Stellen so mit den Enden des DSBs verknüpft werden, dass es diesen am Ende überbrückt (siehe Abbildung 1). Somit erscheint mithilfe von MMEJ eine präzise Gentherapie möglich. Die spezifischen Merkmale, welche die homologen Sequenzen auf dem Template enthalten müssen, sind Gegenstand von Forschungsbemühungen. Soweit bekannt sollten sie an beiden Seiten ca. 5 bis 25 bp lang sein und zu 100% mit den homologen Sequenzen auf den Enden des DSBs übereinstimmen. (McVey & Lee, 2008; Yanik et al., 2017) Auch

beim MMEJ kann es zu Deletionen von Basen kommen. (Deng et al., 2014; McVey & Lee, 2008; Yanik et al., 2017)

### 1.5.3 HDR

Ein weiterer Template-abhängiger DNA-Reparaturprozess von DNA-Doppelstrangbrüchen ist HDR. (Smirnikhina et al., 2018) Hier kommt als Vorlage natürlicherweise das Schwesterchromatid zum Einsatz, ein exogen zugeführtes homologes DNA-Template kann jedoch ebenfalls verwendet werden. (Heyer et al., 2010; Yanik et al., 2017) Nachdem die Zelle den DSB erkannt hat, wird eine komplexe Proteinkaskade in Gang gesetzt, welche einerseits in der Zelle nach einem DNA-Template mit homologen Sequenzen sucht und andererseits die beiden Enden des DSBs auf beiden Seiten bis zu den homologen Bereichen prozessiert, wobei Überhänge entstehen. Diese Überhänge werden anschließend an die homologen Sequenzen des DNA-Templates gebunden, woraufhin die DNA-Enden mit dem Template als Vorlage durch eine Ligase wieder verbunden werden, sodass die DNA-Sequenz des Templates letzten Endes den DSB überbrückt (siehe Abbildung 1). (Kakaroukas & Jeggo, 2014; Smirnikhina et al., 2018; Yanik et al., 2017) Die homologen Sequenzen des Templates sollten für HDR mindestens 500 bis 3000 bp betragen und sind somit wesentlich länger als beim MMEJ. (Xiao et al., 2018) HDR kann also neben MMEJ ebenfalls zum gezielten Korrigieren von Mutationen im Genom genutzt werden, welchen der beiden Wege die Zelle nutzt, kann u.a. über die Länge der homologen Sequenzen auf dem Template gesteuert werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Effizienz von HDR umso höher ist, je länger die homologen Arme des Templates sind. (Li et al., 2014)

## 1.6 Therapeutische Ansätze zur Behandlung von STGD1

Bisher gibt es keine kausale Therapie des STGD1. (Stingl et al., 2022) Zur Verlangsamung des Fortschreitens der Erkrankung wird Betroffenen aktuell empfohlen, übermäßige Zufuhr von Vitamin A sowie Exposition gegenüber UVA/UVB-Strahlung so gut wie möglich zu vermeiden und allgemein einen gesunden Lebensstil zu führen. Zur Unterstützung im Alltag stehen optische und elektronische Sehhilfen zur Verfügung. (Baldermann et al., 2022; Kellner et al., 2012; Kuan et al., 2021; Sofi et al., 2016; Tanna et al., 2017) Aktuell befinden sich diverse Therapieansätze, die sowohl Stammzelltherapie, medikamentöse Therapie als auch Gentherapie umfassen, in Entwicklung.

### 1.6.1 Medikamentöse Therapieansätze

Ein möglicher Ansatz medikamentös zu therapieren ist der Einsatz von sog. Visual Cycle Modulatoren (VCMs), also Wirkstoffen, die auf eine positive Beeinflussung des visuellen Zyklus derart abzielen, dass das Akkumulieren von Lipofuszin verringert wird (siehe 1.1). Beispiele hierfür sind Emixustat, welches durch Hemmung von RPE65 die Bildung von 11-cis-Retinol und damit letztlich die Ansammlung des toxischen A2E verlangsamen soll oder „VM200“, ein primäres Amin, welches mit all-trans-Retinal zu einer ungiftigen Schiff-Base reagiert, was ebenfalls wiederum die Bildung von A2E vermindert. VM200 wurde bisher in präklinischen Studien, Emixustat bereits an Probanden getestet. Ein weiterer VCM, ALK-001, ein modifiziertes Vitamin A, konnte in präklinischen Studien zunächst eine verringerte Ansammlung von Lipofuszin zeigen. In einer zweijährigen, multizentrischen, doppelblinden, randomisierten, placebokontrollierten Studie aus dem Jahr 2022 zur klinischen Prüfung von ALK-001 konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine therapeutische Intervention das Fortschreiten von STGD1 auf klinisch und statistisch bedeutsame Weise verlangsamen kann (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02402660). (Scholl et al., 2022)

### 1.6.2 Stammzelltherapie bei Morbus Stargardt

Ein weiterer Therapieansatz ist die Regeneration des RPEs, dessen Schädigung beim Morbus Stargardt ursächlich für den Sehverlust ist (siehe 1.1). RPE-Zellen können, indem man Stammzellen gezielt ausdifferenzieren lässt, hergestellt und anschließend bei PatientInnen mit schwerer fortgeschrittener Erkrankung subretinal implantiert werden. Klinische Studien hierzu lieferten bereits vielversprechende Ergebnisse. (Cremers et al., 2020; Yang et al., 2022)

### 1.6.3 Genome Editing bei Morbus Stargardt

Um die eigentliche Ursache von STGD1, das Fehlen einer korrekten Gensequenz für das ABCA4 Protein, zu behandeln, kann Gentherapie zum Einsatz kommen. Für ein vollständiges Gene Replacement des *ABCA4* Gens ist die Kapazität von AAVs, welche bereits bei anderen okulären Genen erfolgreich eingesetzt wurden, zu klein. (Han et al., 2014)

Subretinale Injektionen, die anstelle von AAVs z.B. Lentivirale Vektoren, welche eine höhere Transportkapazität besitzen, benutzen, befinden sich in Entwicklung. (Albert et al., 2018; Stingl et al., 2022)

Der in dieser Arbeit verfolgte Therapieansatz ist die CRISPR/Cas basierte Genome Editing Technologie (siehe 1.3), welche grundsätzlich das Potential bietet, Mutationen unabhängig von der Größe des Gens oder der Position im Genom zu korrigieren. (Cremers et al., 2020) Dabei wird zwischen *ex vivo*- und *in vivo* Genome Editing unterschieden. Beim *ex vivo* GE werden, bspw. durch die Entnahme einer Hautbiopsie, von STGD1-PatientInnen stammende Stammzellen generiert, diese dann mittels Genome Editing *ex vivo* therapiert, anschließend wieder in RPE-Zellen oder Photorezeptoren rückdifferenziert und daraufhin in die Retina der PatientInnen implantiert. Vorteile hiervon sind, dass die editierten Zellen zwischenzeitlich wieder in Zellteilung gehen und so viel einfacher behandelt, gescreent und nach Erfolg selektiert werden können. (Yanik et al., 2017) Demgegenüber steht der *in vivo* Approach, bei welchem die Mutation direkt in den Zellen *in situ* therapiert werden soll. (Yanik et al., 2017)

In der vergangenen Dekade konnten Forschungsgruppen einige vielversprechende Ergebnisse im Einsatz von Genome Editing in der Retina erzielen. (Yanik et al., 2017) So konnte z.B. in einer 2017 publizierten Studie gezeigt werden, dass mithilfe eines entsprechend designten gRNA/Cas9-Komplexes hocheffizient eine Mutation im CEP290-Gen, die zu Leberscher Kongenitaler Amaurose führt, entfernt werden konnte, woraufhin das wildtypische Genprodukt exprimiert wurde. (Ruan et al., 2017; Yu & Wu, 2018) In einer im Jahre 2022 erschienenen Publikation konnte gezeigt werden, dass mittels Base Editing, einer Sonderform des Genome Editing, bei der einzelne Basen ohne Erzeugung eines vorhergehenden DSBs ausgetauscht werden können, Zapfenzellen im Mausmodell mit Leberscher Kongenitaler Amaurose Typ 2 signifikant vom Absterben geschützt werden können. (Choi et al., 2022; Yanik et al., 2017) Im laufenden Jahr (2023) wurde eine Studie veröffentlicht, in der es gelungen ist, mittels CRISPR/Cas Genome Editing zwei bestimmte Mutationen im *ABCA4* Gen in Stammzellen, die von STGD1-PatientInnen stammten, zu therapieren. Dabei konnte zusätzlich keine off-target-Aktivität festgestellt werden. (Siles et al., 2023)

## 1.7 Quantifizierung aktiver gRNA/Cas9-Komplexe

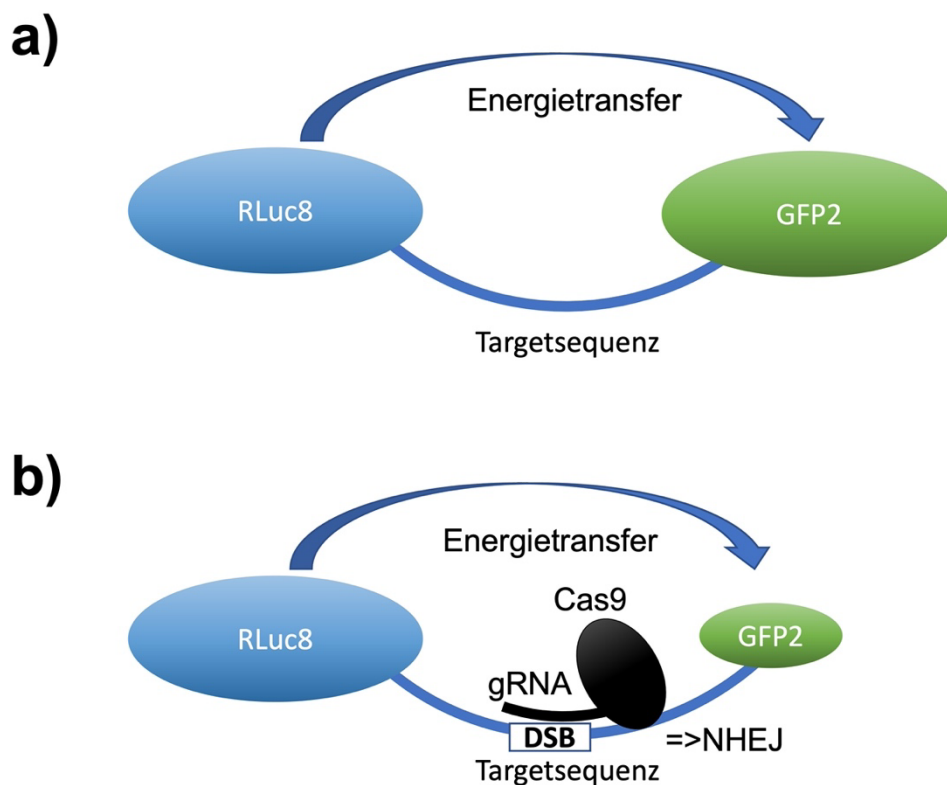
Die Effizienz von programmierbaren Endonukleasen hängt weitgehend von der jeweiligen Targetstelle ab und kann somit abhängig von dieser stark variieren. (Brinkman & van Steensel, 2019) Um zu überprüfen, ob ein gRNA/Cas9-Komplex an seiner Targetstelle zuverlässig einen DSB erzeugen kann, gibt es verschiedene Methoden, die sich jeweils in ihrer Sensitivität und in ihren Vor- und Nachteilen unterscheiden. (Wimmer et al., 2021) Vergleichsweise kostengünstige und leicht anwendbare Methoden sind bspw. TIDE und TIDER, welche DNA-Sequenzveränderungen mittels PCR- und Sanger-Sequenzierungsverfahren detektieren. (Brinkman & van Steensel, 2019) Sehr verbreitet ist auch der T7-Endonuklease-I-Assay, welcher in der Lage ist, Heteroduplices, welche sich bilden können, wenn sich ein durch einen CRISPR/Cas9 induzierten DSB mutiertes DNA-Fragment an das wildtypische Fragment anlagert, zu erkennen. (Sentmanat et al., 2018) Möchte man genau wissen, wie sich die Basenabfolge durch den erzeugten DSB verändert hat, kann man Next Generation Sequencing (NGS) verwenden. (Bell et al., 2014) Alternativ gibt es auch fluoreszenzbasierte Reportersysteme, wie den in dieser Arbeit verwendeten BRET-Assay. Mit diesen kann Veränderung von DNA-Sequenzen nicht nur *in vitro*, sondern potenziell auch *in vivo* beurteilt werden. (Wimmer et al., 2021)

### 1.7.1 BRET-Assay

Beim BRET (Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer) überträgt eine Luciferase (hier: Renilla reniformis Luciferase 8 (RLuc8)) strahlungsfrei Energie auf einen Fluoreszenzfarbstoff (hier GFP2). Die Luciferase, ein Energiedonor, welcher nicht von außen angeregt werden muss, da er das Substrat Coelenterazin spaltet und dadurch Energie emittiert, regt so den Fluoreszenzfarbstoff an. Sowohl die Luciferase als auch das GFP2 emittieren Licht in definierten Wellenlängenbereichen, was am Plattenlesegerät mit geeigneten Transmissionsfiltern detektiert werden kann. Aus den Peaks beider Farbstoffe kann dann das Verhältnis errechnet werden, was die sog. BRET-Ratio ergibt. (Bacart et al., 2008; Weller, 2019; Wimmer, 2018)

Diesen Sensor kann man nutzen, um Sequenzveränderungen nach DNA-Reparaturaktivität nachzuweisen. Somit lassen sich zum Beispiel direkte Rückschlüsse auf die Aktivität von gRNAs an der Targetstelle ziehen. Die Aktivität der gRNAs kann wie folgt gemessen werden: Die Targetsequenz wird in einem spezifischen Vektor genau zwischen die Gene von Luciferase und GFP2 kloniert (siehe Abbildung 2a)). Sobald ein effektiver

gRNA/Cas-Komplex an der Targetsequenz einen DSB erzeugt, wird dieser überwiegend durch NHEJ repariert, wobei häufig Basen eingefügt oder deletiert werden. Dabei entsteht eine Verschiebung im Leseraster, wodurch das GFP2 in der Zelle weniger stark exprimiert wird (siehe Abbildung 2b)) und somit weniger Licht emittiert, was wiederum am Plattenlesegerät erfasst werden kann. Durch die geringere Expression des GFP bei gleichbleibender Expression der Luciferase verringert sich die BRET-Ratio, was genau quantifiziert werden kann. (Weller, 2019; Wimmer, 2018)



**Abbildung 2: Messung der Schneideaktivität der einzelnen gRNAs**

a): ohne DSB, b): mit DSB, induziert durch einen gRNA/Cas9-Komplex. Durch die Verschiebung des Leserasters hinter dem DSB nach dessen Reparatur durch NHEJ wird GFP2 weniger stark exprimiert.

## 1.8 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, die ersten Schritte einer möglichen Therapie von STGD1 aufgrund von Mutationen im Exon 43 durch MMEJ basiertes Genome Editing zu entwickeln. Dazu sollen zunächst 10 gRNA/Cas9-Komplexe mittels BRET-Assays auf ihre Schneideaktivität an Target-Sequenzen, welche in Intron 42 und Intron 43 des porzinen *ABCA4* Gens liegen, getestet werden. Dazu müssen zuvor sowohl die gRNA/Cas9-Plasmide, auf denen sich der gRNA/Cas9-Komplex befindet als auch Plasmide, die die Target-Sequenz enthalten, entworfen und hergestellt werden.

Parallel dazu soll ein DNA-Template (sog. „Wildtyp-Template“), welches aneinandergereiht aus den wildtypischen Sequenzen der Exons 42, 43 und 44 des porzinen *ABCA4* Gens besteht, entworfen und hergestellt werden.

Anschließend soll mithilfe eines MMEJ-Assays, welcher auf dem Prinzip des BRET-Assays beruht, ermittelt werden, ob das Wildtyp-Template mithilfe der gRNA/Cas9-Plasmide, die sich zuvor als schneideeffizient erwiesen haben, in ein weiteres Template, welches die Target-Sequenzen der gRNAs und homologe DNA-Sequenzen zum Wildtyp-Template enthält, eingebaut werden kann. Auch dieses Template (sog. „MMEJ-Template“) soll zuvor entworfen und hergestellt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 1 alphabetisch aufgelistet.

**Tabelle 1: Verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav DX-65	Systec (Wettenberg)
BioPhotometer	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Destillationsanlage Arium 611 DI	Sartorium (Göttingen)
Eismaschine	Scotsman (Berlin)
Elektroporationsküvette	Eppendorf (Köln), BioRad (München)
Fluoreszenz-Mikroskop Biozero	Keyence (Neu-Isenburg)
Gasbrenner Fireboy	Integra Biosciences (Zizers (CH))
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr (Biberach an der Riß)
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Gelkammer für Agarosegele Compact XS/S und M	Biometra (Göttingen)
Heizblock	Biometra (Göttingen)
Inkubatoren	Binder (Tuttlingen)
Kühlschrank (+4°C)	VWR International (Darmstadt), Bosch (Gerlingen), Liebherr (Biberach an der Riß)
Laminar Flow Sterilbank	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Mikroskop	VWR International (Darmstadt)
Mikrowelle	Siemens (München)
Multimode Platerreader Infinite M1000Pro	Tecan (Gröding, Österreich)
Multiporator für elektrische Transformationen	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)

PCR Thermocycler T- Professional/ T- Personal	Biometra (Göttingen)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg), Brand (Wertheim)
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Power-Supply für Elektrophorese PS305T	Whatman-Biometra (Göttingen)
Schüttler	Sartorius AG (Göttingen)
Spülmaschine	Miele Professional (Gütersloh)
35 Stickstofftonne (-196°C) Locator Plus 6	Thermolyne (Pfullingen)
Thermoblock	Biometra (Göttingen)
Trockenschrank	Binder (Tuttlingen)
UV-Transilluminator	Biometra (Göttingen)
Vortexer	VWR International (Darmstadt)
Waage	Ohaus (Zürich (CH))
Wasserbad	Julabo (Seelbach)
Zentrifugen 1-15PK & 4K15	Sigma (München)
Zentrifuge Micro200	Hettich Lab Technology (Tuttlingen)

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Biozym Scientific (Hessisches Oldendorf), Brand (Wertheim), Braun (Melsungen), Corning (Kaiserslautern), Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhäuser), LVL Technologies (Crailsheim), Nerbe plus (Winsen/Luhe), Nunc/Thermo Fisher Scientific (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht) und TPP AG (Trasadingen; Schweiz)

### 2.1.3 Chemikalien und Antibiotika

Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2 alphabetisch aufgelistet.

**Tabelle 2: Verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Accutase	eBioscience (Frankfurt a. M.)
Agar	Life Technologies/ Thermo Fisher (Darmstadt)
Agarose	Genaxxon Bioscience (Ulm)
Borsäure	Roth (Karlsruhe)
Coelenterazin 400a	Nanolight Inc. (Pinetop, AZ, USA)
D-Glucose	Roth (Karlsruhe)
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe)
DNA Stain Clear G	Serva (Heidelberg)
dNTPs	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
DMEM	Anprotec (Bruckberg)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
FKS (Fetales Kälberserum)	PAN-Biotech (Aidenbach)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt	BD Biosciences (Heidelberg) Roth (Karlsruhe)
HEPES	Roth (Karlsruhe)
Iso-Propanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Luria Broth Base	Invitrogen (Karlsruhe)
L-Glutamin	Anprotec (Bruckberg)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat	Fermentas (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)

PEI	Polysciences (Hirschberg an der Bergstraße)
Stickstoff (flüssig)	Linde (München)
Tris-NH <sub>3</sub>	Roth (Karlsruhe)
Trypton	BD Biosciences (Heidelberg)

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind unter Angabe der Arbeitskonzentration in Tabelle 3 alphabetisch aufgelistet.

**Tabelle 3: Verwendete Antibiotika**

Antibiotikum	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 µg/ml	Sigma-Aldrich (Darmstadt)
Kanamycin	50 µg/ml	Sigma-Aldrich (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin	100 IU/ml; 0,1 mg/ml	Anprotec (Bruckberg)
Tetracyclin	10 µg/ml	Sigma-Aldrich (Darmstadt, Deutschland)

#### 2.1.4 Enzyme

Die verwendeten Restriktionsenzyme sind in Tabelle 4 alphabetisch aufgelistet. ↓ und ↑ kennzeichnen die jeweiligen Schnittstellen.

**Tabelle 4: Verwendete Restriktionsenzyme**

Enzym	Erkennungssequenz	Hersteller
<i>AvrII</i>	5'...C↓CTAGG...3' 3'...GGATC↑C...5'	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
<i>BbsI</i>	5'...GAAGACNN↓...3' 3'...CTTCTGNNNNNN↑...5'	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
<i>BsiWI</i>	5'...C↓GTACG...3' 3'...GCATG↑C...5'	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
<i>EcoRI</i>	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTTAA↑G...5'	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)

Weitere verwendete Enzyme sind in Tabelle 5 alphabetisch aufgelistet.

Tabelle 5: Andere verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
Platinum® Pfx DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)

### 2.1.5 DNA-Größenstandards

Die verwendeten DNA-Größenstandards sind in Tabelle 6 alphabetisch aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete DNA-Größenstandards

Größenstandard	Hersteller
GeneRuler 1 kb DNA ladder	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)

### 2.1.6 Vektoren/Plasmide

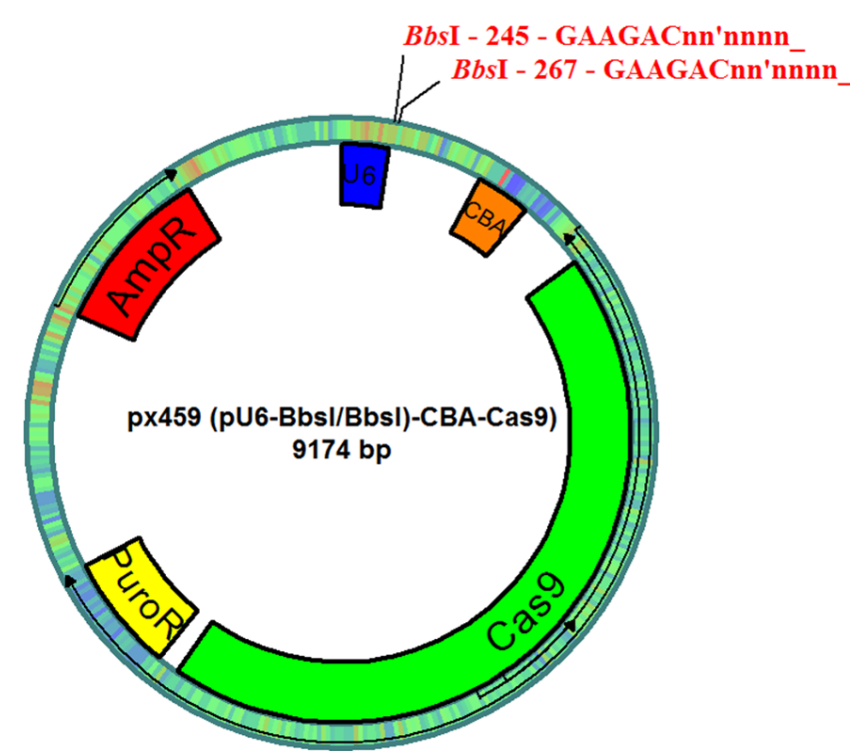
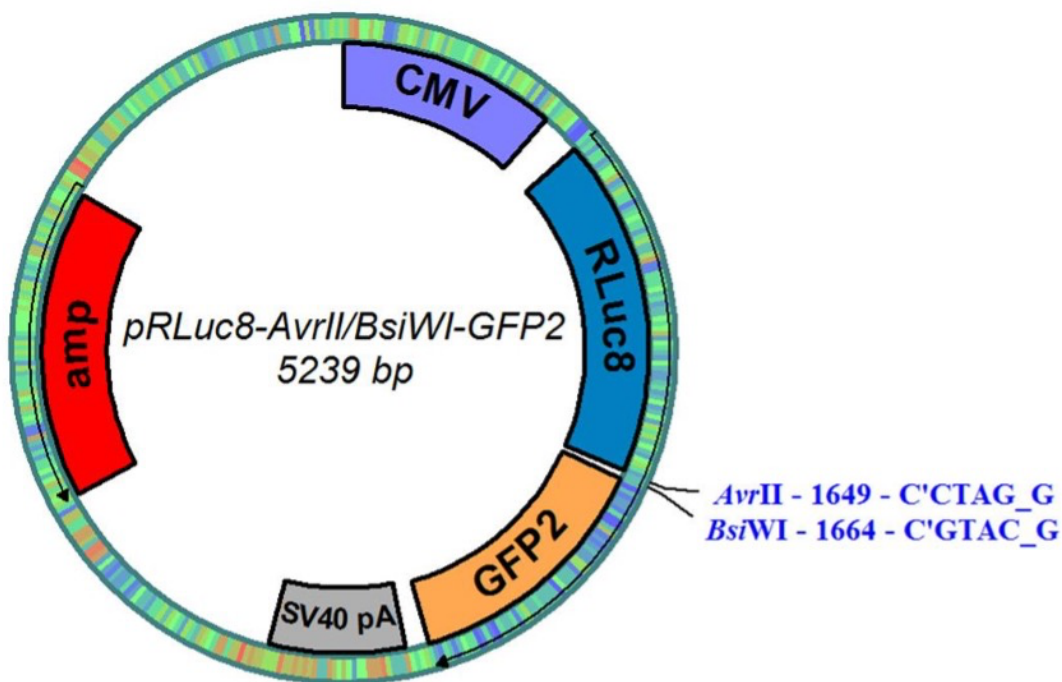


Abbildung 3: Vektorkarte des px459 (pU6-BbsI/BbsI)-CBA-Cas9) mit den beiden Schnittstellen des verwendeten Restriktionsenzym *BbsI*. (<https://www.addgene.org/48139/>)

(Ran et al., 2013) (pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid # 48139 ; <http://n2t.net/addgene:48139> ; RRID:Addgene\_48139)), Bild: Dr. Tobias Wimmer

### px459 (pU6-BbsI/BbsI)-CBA-Cas9)

In Abbildung 3 ist der Vektor px459 dargestellt, in welchen die Guide-Oligonukleotide (siehe 2.1.9) hineinkloniert wurden. Zu sehen sind u.a. die Schnittstellen für das verwendete Restriktionsenzym *BbsI* sowie die codierende Sequenz für die Cas9-Endonuklease, welche unter Kontrolle des CBA-Promotors steht. Die Expression der guideRNAs (gRNAs) steht unter der Kontrolle des U6-Promotors. Der Vektor enthält zudem eine Ampicillin-Resistenz.



**Abbildung 4: Vektorkarte des pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 mit den beiden Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme *AvrII* und *BsiWI*.**

(Wimmer et al., 2021), Bild: Dr. Tobias Wimmer

### pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2

In Abbildung 4 ist der Vektor pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 dargestellt, in welchen die Target-Sequenzen (siehe 2.1.9) hineinkloniert wurden. Zu sehen sind u.a. die Schnittstellen für die verwendeten Restriktionsenzyme *AvrII* und *BsiWI* sowie die codierenden Sequenzen für die Luciferase (RLuc8) und das GFP2, deren Transkription unter Kontrolle des CMV-Promotors steht. Der Vektor enthält zudem eine Ampicillin-Resistenz.

### pCRTM-Blunt II-TOPO®

Der Vektor pCR-Blunt II-TOPO wurde ebenfalls für Klonierungsarbeiten benutzt. Auf diesem befinden sich u.a. Schnittstellen für das verwendete Restriktionsenzym *EcoRI* und eine Kanamycin-Resistenz. Der Vektor wurde von Thermo Fisher (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

## 2.1.7 Kit-Systeme

Die in dieser Arbeit verwendeten Kit-Systeme sind in Tabelle 7 alphabetisch aufgelistet.

**Tabelle 7: Verwendete Kit-Systeme**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
PCR Clean-Up and Gel Extraction	Macherey-Nagel (Düren, Deutschland)
GeneArt Gene Synthesis Kit	Thermo Fisher (Darmstadt, Deutschland)
DNA Clean and Concentrator-25 Kit	Zymo Research (Freiburg, Deutschland)

## 2.1.8 Organismen

### Bakterienstämme

In Tabelle 8 sind die bei Klonierungen verwendeten *E.coli* Stämme aufgeführt.

**Tabelle 8: Bei Klonierungen verwendete *E.coli* Stämme**

<b>Stamm</b>	<b>Marker</b>
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]
Stellar	F <sup>-</sup> , endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ (lacZYA - argF) U169, Δ (mrr - hsdRMS - mcrBC), ΔmcrA, λ <sup>-</sup>

Beide Stämme wurden zunächst elektrokompotent gemacht (siehe 2.2.2.1.1).

## Eukaryotische Zellen

Nachfolgend ist die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie aufgeführt. Sie wurde von ATCC (American Type Culture Collection), bzw. deren Distributor (LGC Standards) bezogen.

Zelllinie:

HEK293-T (ATCC: CRL-3216)

Humane embryonale Nierenzelle

### 2.1.9 Oligonukleotide und Primer

Sämtliche Oligonukleotide wurden, sofern nicht anders angegeben, extern von der Firma Metabion (Planegg/Steinkirchen) synthetisiert.

Oligonukleotide für die Klonierungen von Target- bzw. gRNA/Cas9-Sequenzen sind in Tabelle 9 bzw. Tabelle 10 aufgelistet. Sie wurden danach benannt, ob sie als Target- oder guideRNA-Sequenz verwendet wurden (T oder G). Vorwärtsstrang (f) und der zugehörige, in Teilen komplementäre Rückwärtsstrang (r) sind immer jeweils untereinander dargestellt.

**Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide für Target-Sequenzen**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
T1 f	CTAGGGTGATGAGCTTCTGTCCGTCTGG
T1 r	GTACCCAGACGGACAGAAGCTCATCACC
T2 f	CTAGGTGACCTCTCTCGAGCTGTCGTGG
T2 r	GTACCCACGACAGCTCGAGAGAGGTCAC
T3 f	CTAGGTGAGCTTCTGTCCGTCTGGGTGG
T3 r	GTACCCACCCAGACGGACAGAAGCTCAC
T4 f	CTAGGACTTTGCACTCTTTTTGTCGTGG
T4 r	GTACCCACGACAAAAAGAGTGCAAAGTC
T5 f	CTAGGCCCGCGTGTGTGCGACGCACGGG
T5 r	GTACCCCGTGCGTCGCACACACGCGGGC
T6 f	CTAGGCCTCAGGGCAGCGTTCACGTGGG
T6 r	GTACCCACGTGAACGCTGCCCTGAGGC
T7 f	CTAGGTTTCGCTGGGCGGTCCACCCTCGG

T7 r	GTACCCGAGGGTGGACCGCCCAGCGAAC
T8 f	CTAGGTCTCCCCTTCGGTTTCCACCAGG
T8 r	GTACCCTGGTGGAAACCGAAGGGGAGAC
T9 f	CTAGGACCTCAGGGCAGCGTTCACGTGG
T9 r	GTACCCACGTGAACGCTGCCCTGAGGTC
T10 f	CTAGGGGATCGGGGGGTTCCTTCGTGG
T10 r	GTACCCACGAAGGGAACCCCCGATCCC

**Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide für guideRNA-Sequenzen**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
G1 f	CACCGTGATGAGCTTCTGTCCGTC
G1 r	AAACGACGGACAGAAGCTCATCAC
G2 f	CACCTCACCTCTCTCGAGCTGTCTG
G2 r	AAACCGACAGCTCGAGAGAGGTCA
G3 f	CACCTGAGCTTCTGTCCGTCTGGG
G3 r	AAACCCCAGACGGACAGAAGCTCA
G4 f	CACCACTTTGCACTCTTTTTGTCTG
G4 r	AAACCGACAAAAGAGTGCAAAGT
G5 f	CACCCCCGCGTGTGTGCGACGCAC
G5 r	AAACGTGCGTTCGCACACACGCGGG
G6 f	CACCCCTCAGGGCAGCGTTCACGT
G6 r	AAACACGTGAACGCTGCCCTGAGG
G7 f	CACCTTCGCTGGGCGGTCCACCCT
G7 r	AAACAGGGTGGACCGCCCAGCGAA
G8 f	CACCTCTCCCCTTCGGTTTCCACC
G8 r	AAACGGTGGAAACCGAAGGGGAGA
G9 f	CACCACCTCAGGGCAGCGTTCACG
G9 r	AAACCGTGAACGCTGCCCAGTGGT
G10 f	CACCGGATCGGGGGGTTCCTTCG
G10 r	AAACGCAAGGGAACCCCCGATCC

Oligonukleotide, welche als Sequenzierprimer für die Sanger-Sequenzierungen verwendet wurden, sind in Tabelle 11 aufgelistet.

**Tabelle 11: Verwendete Sequenzierprimer**

Sequenzierprimer	Sequenz (5'-3')
#3056	GACTATCATATGCTTACCGT
#4041	AGCCCGACGTCGTCCAGATTG
M13rev (Thermo Fisher)	CAGGAAACAGCTATGAC

Oligonukleotide, welche für die Herstellung des WT-Templates, bzw. für die zur Herstellung notwendige PCR verwendet wurden, sind in Tabelle 12 aufgelistet.

**Tabelle 12: Oligonukleotide zur Herstellung des synthetischen WT-Templates**

Primer	Sequenz (5'-3')
MBHDR1	ATCTACCCAGGCGCGTCCAGCCCGGCGGTG- GACAGGCTGTGCGTGGGAGTCCGGCCCCG
MBHDR2	CAGCTCCGTTCACTCCCAG- GAGGCCAAAGCACTCTCCGGGCCGGACTCCCACG
MBHDR3	TCCTGGGAGTGAACGGAGCTGGCAAACGACCACGTTCA- AGATGC
MBHDR4	TCTCCTGAGGTCACTGTGGTGTCCCCAGTGAGCATCTT- GAACGTGGTCGTTTTGC
MBHDR5	GACACCACAGTGACCTCAGGAGATGCCACCG- TAGCAGGCAAGA
MBHDR6	GATGGACGTCAGCAATATTGGTTAAAATACTCTT- GCCTGCTACGGTGGCA
MBHDR7	GTATTTTAACCAATATTGCTGACGTCCATCAAAGCAT- GGGCTACTGTCCGC
MBHDR8	TCTCGCCCTGTAAGCAGGTCGTCGATGGCATCA- AACTGCGGACAGTAGCCCATGCTTT
MBHDR9	CGACCTGCTTACAGGGCGAGAACATCTCCACCTTTA- CGCACGGCTTCGGGG

MBHDR10	CCTCTTGATTTCTCGGCTGGCACACCCCGAAGCCGTGCG-TAAAG
MBPCR1 (für PCR)	ATCTACCCAGGCGCGTCCAG
MBPCR2 (für PCR)	CCTCTTGATTTCTCGGCTGGC

Oligonukleotide, welche für die Herstellung des porzinen ABCA4 MMEJ Target DNA Templates (MMEJ-Template), bzw. für die zur Herstellung notwendige PCR verwendet wurden, sind in Tabelle 13 aufgelistet.

**Tabelle 13: Oligonukleotide zur Herstellung des MMEJ-Templates**

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
MBMMEJ1	AATCCTAGGATCTAC- CCAGTCCAGGCTGGCACGGGTCTCTCAG
MBMMEJ2	CTCCTCTCCACCCAGACGGACAGAAGCTCATCA- CTGGAGACACCTGAGAGACCCGTGCCA
MBMMEJ3	CGTCTGGGTGGAGAGGAGAT- GCACAAGAGAAAGACAGAAGCTTGTC- GCCCGTGCGTCGC
MBMMEJ4	ACCGCGTGTAACCACCCCTCA- GGTCCGGCAGCTCCCCGCGTGTGTGCGACGCACG GGCT
MBMMEJ5	GGGTGGTTACACGCGGTGGGATTTACCAT- GAGACCTCAGGGCAGCGTTCACGTGGGACAT
MBMMEJ6	ATAGTTCCTTTCTAGCCTGGTTTGACCTT- CTGGGCATCGGACATGTCCCACGTGAACGCT
MBMMEJ7	AAACCAGGCTAGAAAGGAAGTATGGCTTTCG- GACACAGGATCGGGGGTTCCCTTCGTGG
MBMMEJ8	ATTCGTACGCCTCTTGATTTTCAATCAGTCA- GAGCCACGAAGGGAACCC
MBPRIMER1 (für PCR)	CAGTCCACCTTCTCTGGCTCTTGC
MBPRIMER2 (für PCR)	AGACTCCTGAGTGGGCACCAC

## 2.1.10 Kulturmedien

### 2.1.10.1 Bakterienmedien

#### LB-Medium

Luria Broth Base	25 g
	ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O

#### LB-Agar:

Luria Broth Base	12,5 g
Agar	7,5 g
Ampicillin	500 µg
	ad 500 ml ddH <sub>2</sub> O

#### SOC-Medium

Trypton	2%
Hefeextrakt	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucose	20 mM

### 2.1.10.2 Medien für eukaryotische Zellen

#### DMEM +++

#### DMEM---

Pen/Strep	1% (v/v)
FKS	10% (v/v)
L-Glutamin	4 mM

## 2.1.11 Puffer und Lösungen

### 10x Phosphatpuffer (PBS)

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4 g
ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O, pH 7,4 mit HCl	

### PEI-Mix:

PEI	0,1 g/L
NaCl	150 mM

### 10x TBE Puffer

Tris-NH <sub>3</sub>	121,0 g
Borsäure	51,5 g
EDTA	3,5 g
ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O	

Weitere in dieser Arbeit verwendete Puffer sind in Tabelle 14 alphabetisch aufgelistet.

**Tabelle 14: Verwendete Puffer**

<b>Puffer</b>	<b>Hersteller</b>
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
10x CutSmart-Puffer	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)
Platinum Pfx Amplification Puffer (5x)	Thermo Fisher Scientific (Darmstadt)
S1-Resuspensions-Puffer	Macherey-Nagel (Düren)
S2-Lysis-Puffer	Macherey-Nagel (Düren)
S3-Neutralisierungs-Puffer	Macherey-Nagel (Düren)
T4 DNA Ligase Reaction Buffer	New England Biolabs (Frankfurt a. M.)

## 2.1.12 Software

Die verwendete Software ist in Tabelle 15 aufgelistet.

**Tabelle 15: Verwendete Software**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
BioDocAnalyse	Biometra, Göttingen (Deutschland)
Chromas Lite	Technelysium, Brisbane (Australien)
CRISPR gRNA Design tool	ATUM, Newark (USA)
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, Boston (USA)
Mendeley	Elsevier, Amsterdam (Niederlande)
Microsoft Office 365	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
SigmaPlot	Systat, Erkrath (Deutschland)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Arbeiten mit DNA

#### 2.2.1.1 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zur Hybridisierung wurden zwei komplementäre DNA-Oligonukleotide (Vorwärts- und Rückwärtsstrang, siehe 2.1.9) zusammenpipettiert und der Ansatz mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt.

#### **Ansatz (20 µl)**

Oligonukleotid Vorwärtsstrang	8 µl
Oligonukleotid Rückwärtsstrang	8 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Der Ansatz wurde zunächst für 10 min bei 90°C im Heizblock und anschließend für 30 min bei RT inkubiert, bevor er bis zur späteren Verwendung bei -20°C eingefroren wurde.

#### 2.2.1.2 Restriktionsverdau

Die Plasmide pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 und px459 (pU6-BbsI/BbsI)-CBA-Cas9) wurden vor der Ligation mit spezifisch schneidenden Restriktionsendonukleasen (siehe 2.1.4) aufgeschnitten, wodurch spezifische Überhänge entstanden. Sämtliche Restriktionsenzyme wurden mit den erforderlichen Puffern nach Herstellerangaben verwendet.

**Ansatz (20 µl)**

Plasmid	x µl
Restriktionsenzym	1,0 µl (pro Restriktionsenzym)
10x Puffer	2,0 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Der Ansatz wurde über Nacht im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Restriktionsenzyme für 20 min bei 65 °C im Heizblock inaktiviert.

**2.2.1.3 Ligation von DNA-Molekülen**

Für die Ligationen der verdauten Vektoren pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 und px459 (pU6-BbsI/BbsI)-CBA-Cas9) mit den hybridisierten Oligonukleotiden, bzw. dem MMEJ-Template (DNA-Inserts) wurde die T4 DNA Ligase (siehe 2.1.4) verwendet. Die Ansätze wurden nach Herstellerangaben gemischt. Das Verhältnis von der Anzahl an Inserts zu der Anzahl an Vektoren betrug ca. 6-8:1.

**Ansatz (20 µl)**

Vektor	2 µl
DNA-Insert	5 µl
10x T4 DNA Ligase Puffer	2 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Anschließend wurden die Ligationsansätze über Nacht bei 4°C inkubiert.

**2.2.1.4 Nachverdau von ligierten Plasmiden**

Um Re-Liganden herauszufiltern, wurden die Plasmide teils nachverdaut. Bei bestimmten Plasmidvektoren wird beim Ligationvorgang die Basenabfolge an der Schnittstelle so verändert, dass das Restriktionsenzym bei ligierten Plasmiden nicht mehr schneiden wird. Vektoren, bei welchen die Ligation nicht funktioniert hat, werden vom Restriktionsenzym wieder aufgeschnitten und somit linearisiert. Bakterien vervielfältigen später nur Plasmide, welche zirkulär sind. So wird die Wahrscheinlichkeit, dass nur Plasmide mit der gewünschten Sequenz weitergezogen werden, erhöht. In dieser Arbeit wurde für den

Nachverdau des pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 -Vektors das Restriktionsenzym *BsiWI* verwendet.

So wurde zu jedem Ligationsansatz 1 µl des Restriktionsenzym gegeben und dieser für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, bevor die Enzyme bei 65°C inaktiviert wurden. Bei Bedarf konnte der Ansatz bei -20°C eingefroren werden.

#### 2.2.1.5 Klonierungen mit pCRTM-Blunt II-TOPO®

Der pCRTM-Blunt II-TOPO®-Vektor wurde bei Klonierungsarbeiten stets nach Herstellerangaben mit der mitgelieferten Salzlösung verwendet.

##### **Ansatz (20 µl)**

PCR-Produkt	4 µl
Salzlösung	1 µl
pCRTM-Blunt II-TOPO®	1 µl

Anschließend wurden die Ligationsansätze gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden sie bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

#### 2.2.1.6 Sequenzierung von Plasmidklonen

Sequenzierungen von Plasmidklonen wurden extern von Microsynth (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Für den Sequenzieransatz, der verschickt wurde, wurden die jeweils erforderlichen Primer (siehe 2.1.9) verwendet. Für Sequenzierungen des pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2-Vektors kam der Primer #4041, für Sequenzierungen des px459 (pU6-BbsI/BbsI)-CBA-Cas9)-Vektors der Primer #3056 und für Sequenzierungen des pCRTM-Blunt II-TOPO®-Vektors der Primer M13rev (Thermo Fisher) zum Einsatz.

##### **Sequenzieransatz (15 µl)**

Plasmid DNA	6-12 µl (max. 1200 ng)
Sequenzierprimer (10 µM)	3,0 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 15 µl

#### 2.2.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben erfolgte am Photometer nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Hierzu wurden die Proben so mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt, dass die gemessenen Absorptionswerte innerhalb des linearen Bereichs von 0,1-1,0 lagen.

#### 2.2.1.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um spezifische DNA-Fragmente exponentiell zu amplifizieren, wurde eine PCR eingesetzt. Die PCR besteht aus sich immer wiederholenden Zyklen von 3 Schritten. Zuerst werden bei hoher Temperatur die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Einzelsträngen der doppelsträngigen DNA aufgebrochen (Denaturierung). Anschließend erfolgt das Anlagern von PCR-Primern an die einzelsträngige DNA bei der vom jeweiligen Primer abhängigen Schmelztemperatur (Annealing). Danach erfolgt ausgehend von den Primern in 3'-Richtung die Zweitstrangsynthese durch eine DNA-Polymerase (Elongation).

#### 2.2.1.9 Synthese von DNA-Templates

Die Synthese längerer DNA-Templates erfolgte mithilfe des GeneArt Gene Synthesis Kits. Bei diesem werden mehrere kürzere einzelsträngige Oligonukleotide (siehe 2.1.9), deren Enden jeweils zum Anfang des nächsten Oligonukleotids komplementär sind, mittels PCRs zu einem langen doppelsträngigen Template verbunden und vervielfältigt. Anschließend sieht das Kit vor, mithilfe des Enzyms CorrectASE eventuell entstandene Fehler zu beheben. Dieser Schritt wurde in dieser Arbeit weggelassen.

Um aus der DNA-Basenabfolge, die das fertige Template haben sollte, die optimalen Oligonukleotide zu designen, wurde das im Protokoll empfohlene kostenlose Online Tool DNABworks (<https://hpcwebapps.cit.nih.gov/dnaworks/>), welches vom NIH (National Institutes of Health) zur Verfügung gestellt wird, verwendet.

#### 2.2.1.10 Agarosegelelektrophorese

Sollten DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden, wurde eine Agarosegelelektrophorese im elektrischen Feld durchgeführt. Zur Herstellung der Agarosegele wurden Agarose-Pulver und 1x TBE Puffer so vermischt, dass je nach Bedarf entweder 1 oder 2%ige Agarosegele, welche zusätzlich mit 4-6 µl DNA Stain Clear G versetzt wurden, gegossen werden konnten. Anschließend wurden die DNA Proben mit 6x Loading Dye versetzt, auf das Gel aufgetragen und für 60 min bei 100 V in 1x TBE Puffer

aufgetrennt. Zusätzlich lief immer ein DNA-Größenstandard mit, der je nach zu erwartender Fragmentgröße gewählt wurde.

#### 2.2.1.11 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um DNA aus Agarosegelen zu extrahieren und aufzureinigen wurde das PCR Clean-Up and Gel Extraction Kit (siehe 2.1.7) nach Herstellerangaben verwendet. Zur Aufreinigung für Transfektionszwecke wurde zusätzlich das DNA Clean and Concentrator-25 Kit nach Herstellerangaben verwendet.

### 2.2.2 Arbeiten mit Zellen

#### 2.2.2.1 Arbeiten mit Bakterien

##### 2.2.2.1.1 Herstellung elektrokompenter *E.coli*

Um *E.coli* elektrokompent zu machen wurden zunächst 5 ml LB Medium mit Tetracyclin (Konzentration: 10 µg/ml) und 5 µl eines Glycerolstocks beimpft und im Schüttler bei 37°C und 180 rpm für 16-18 h inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in 200 ml an Tetracyclin-haltigem LB-Medium gegeben und diese Kultur so lange bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, bis eine optische Dichte (OD<sub>600nm</sub>) von 0,6 bis 0,8 erreicht wurde. Diese Kultur wurde anschließend in 50 ml Falcons aliquotiert, für 30 min auf Eis gekühlt und bei 4 °C, 5000 x g für 10 min abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 50 ml HEPES Puffer (1 mM) resuspendiert und anschließend erneut abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde zunächst mit 25 ml HEPES Puffer und anschließend mit 10 ml und dann nochmal mit 5 ml 10%iger Glycerinlösung wiederholt. Zuletzt wurde das Pellet in 0,5 ml 10 %iger Glycerinlösung resuspendiert, in 50 µl Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur späteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Während des gesamten Prozesses wurden sämtliche verwendeten Materialien stets auf Eis gehalten.

##### 2.2.2.1.2 Transformation elektrokompenter *E.coli*

Zur Transformation elektrokompenter *E.coli* wurden zunächst 2 µl der zu transformierenden DNA auf 50 µl *E.coli*, welche zuvor auf Eis aufgetaut wurden, gegeben. Nachdem der Inhalt des Tubes durch leichtes Antippen durchmischt wurde, wurde dieser ohne luftblasenfrei in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und im Elektroporator 5 ms lang bei 2000 V elektroporiert. Unmittelbar danach wurde der Inhalt mit 1 ml SOC

Medium aus der Küvette aufgenommen, in ein neues Tube pipettiert und für 1 h bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz aufkonzentriert, indem er für 5 min bei 11000 x g und 4 °C abzentrifugiert wurde, 800 µl vom Überstand abgenommen und verworfen wurden und das Pellet wieder resuspendiert wurde. Mit diesem Ansatz wurden vorgewärmte LB-Agarplatten, welche das zur Selektion nötige Antibiotikum enthielten, beimpft und für 16-18 h bei 37 °C inkubiert.

#### 2.2.2.1.3 Kultivieren und Selektieren von Bakterien in LB-Kulturen

Bakterien, die auf einer LB-Agarplatte gewachsen sind, wurden mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in 5ml an unter sterilen Bedingungen autoklaviertem LB-Medium gegeben. Von Bakterienkulturen aus Glycerolstocks wurden ca. 5 µl verwendet, um 5 ml autoklaviertes LB-Medium anzuimpfen. Das zusätzlich hinzugegebene jeweilige Selektionsantibiotikum wurde zuvor aus der Stocklösung mit autoklaviertem LB-Medium auf die erforderliche Arbeitskonzentration verdünnt. Die so angesetzten Kulturen wurden im Schüttler bei 37°C und 180 rpm für 16-18 h über Nacht inkubiert und anschließend, sofern sie nicht unmittelbar weiterverwendet wurden, bei 4 °C gelagert.

Sofern größere Mengen an Bakterien nötig waren, bspw. um mehr Plasmid-DNA isolieren zu können (siehe 2.2.2.1.5.3), wurden entweder 100 µl aus der Übernachtskultur (s.o.) oder 100 µl Bakterienkultur aus dem Glycerolstock zusammen mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum in 100 ml LB-Medium gegeben. Dieser Ansatz wurde dann für weitere 16-18 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

Zur Selektion verwendete LB-Agarplatten wurden vor dem Gießen ebenfalls mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum versetzt.

#### 2.2.2.1.4 Herstellung von Glycerolstocks

Zur Lagerung von Bakterienkulturen wurden Glycerolstocks hergestellt. Dazu wurden 100 µl an sterilem Glycerol zu 200 µl Bakterienkultur gegeben, der Ansatz gevortext und anschließend bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.2.1.5 Isolation von Plasmid DNA

#### 2.2.2.1.5.1 Mini-Preparation mit Puffern

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurden 4 ml LB-Bakterienkultur zunächst bei 5000 x g für 5 min abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl S1-Puffer (siehe 2.1.11) resuspendiert. Anschließend wurden 100 µl an S2-Puffer (siehe 2.1.11) hinzugegeben und die Tubes invertiert. Danach wurden 100 µl an S3-Puffer (siehe 2.1.11) hinzu pipettiert und die Tubes nochmals invertiert, bevor die Zelltrümmer bei 10000 x g für 10 min abzentrifugiert wurden. Der die DNA enthaltende Überstand wurde zusammen mit 700 µl an -20 °C kaltem absolutem Ethanol (100%) präzipitiert und in ein neues Tube pipettiert. Der Ansatz wurde anschließend für mindestens 30 min bei 11000 x g, 4 °C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde nach Verwerfen des Überstandes in 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen und wiederum für 5 min bei 11000 x g abzentrifugiert. Nach einem kurzen Luft-trocknungsschritt wurde das aufgereinigte DNA-Pellet in 27 µl ddH<sub>2</sub>O aufgelöst.

#### 2.2.2.1.5.2 Mini-Preparation mit Plasmid Kit

Alternativ zur Methode mit Puffern (siehe 2.2.2.1.5.2) wurde zur hochreinen Isolation von Plasmid-DNA geringerer Menge teils auch das NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit (siehe 2.1.7) nach Herstellerangaben verwendet. Lediglich die am Ende vorgesehene Elution wurde nicht wie vorgesehen in TE-Puffer, sondern in 27 µl ddH<sub>2</sub>O durchgeführt.

#### 2.2.2.1.5.3 Maxi-Preparation von Plasmid-DNA

Für die Isolation von Plasmid-DNA in größerer Menge wurde das Plasmid Maxi Kit (siehe 2.1.7) nach Herstellerangaben verwendet. Auch hier erfolgte das Eluieren des Pellets am Ende nicht in TE-Puffer sondern in entsprechend 300 µl ddH<sub>2</sub>O.

### 2.2.2.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

Sämtliche Arbeiten mit eukaryotischen Zellen fanden unter der Sterilbank (siehe 2.1.1) statt.

#### 2.2.2.2.1 Kultivierung von HEK293-T-Zellen

Die adhärente Zelllinie HEK293-T wurde im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und mindestens 95 % Luftfeuchtigkeit in einer 10 cm Zellkulturschale kultiviert. Als Medium

wurde DMEM+++ (siehe 2.1.10.2) verwendet. Zum Passagieren, bei 80 % Confluenz, wurde das Medium abgenommen und die adhärennten Zellen anschließend mit 1ml Accutase gelöst. Nach 5 min im Inkubator wurden 9 ml an frischem Medium hinzugegeben. Die gesamte Zellsuspension wurde in eine Pipette aufgenommen und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren durchmischt. Davon wurde dann 1 ml in eine neue Zellkulturschale gegeben und diese mit neuem Kulturmedium zur weiteren Inkubation auf 10 ml aufgefüllt. Sobald die 26. Passage erreicht war, wurden die Zellen nicht weiterverwendet.

#### 2.2.2.2.2 Transfektion eukaryotischer Zellen

##### Transfektion in 6-Well-Platten

Am Vortag der Transfektion wurden 6-Well-Platten vorbereitet, indem in jedes Well 1 ml Zellsuspension und 1 ml Kulturmedium (DMEM+++ ) gegeben wurde. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium wieder abgenommen und 1,5 ml frisches Medium hinzugegeben. Zur Transfektion wurden zunächst 2,5 µg der zu transfizierenden DNA in 100 µl NaCl (150 mM) pipettiert. Anschließend wurden 200 µl PEI (0,1 mg/ml) hinzugegeben. Zwischen den einzelnen Pipettierschritten wurden die Tubes stets gevortext. Nach Inkubation bei RT für 10 min wurden die Ansätze tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert und die Zellkultur daraufhin im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 5 h wurde das Medium gewechselt und die Kultur weiter im Brutschrank inkubiert.

##### Transfektion in 24-Well-Platten

Am Vortag der Transfektion wurden 24-Well-Platten vorbereitet, indem in jedes Well 500 µl Zellsuspension und 500 µl Kulturmedium gegeben wurde. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium wieder abgenommen und durch 1,0 ml frisches Medium ersetzt. Zur Transfektion wurden zunächst 500 ng der zu transfizierenden DNA in 30 µl NaCl (150 mM) pipettiert. Anschließend wurden 40 µl PEI (0,1mg/ml) hinzugegeben. Zwischen den einzelnen Pipettierschritten wurden die Tubes stets gevortext. Nach Inkubation bei RT für 10 min wurden die Ansätze tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert und die Zellkultur daraufhin im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 5 h wurde das Medium gewechselt und die Kultur weiter im Brutschrank inkubiert.

#### 2.2.2.2.3 Fluoreszenz Mikroskopie

Zur Verifizierung der Expression des GFPs wurden transfizierte Zellen mindestens 24 h nach der Transfektion und vor der Isolation von Gesamtproteinextrakten unter dem Fluoreszenzmikroskop unter 20 facher optischer (10 facher digitaler) Vergrößerung begutachtet.

### 2.2.3 Arbeiten mit Proteinen

#### 2.2.3.1 Proteinisolation aus eukaryotischen Zellen

Die Isolation von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen fand frühestens 24 h nach erfolgter Transfektion statt. Zuerst wurde das Kulturmedium abgenommen, woraufhin die Zellen mit 1 ml sterilem PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt, in 150 µl PBS (6-Well-Platten), bzw. 100 µl PBS (24-Well-Platten) suspendiert und in ein 1,5 ml Tube pipettiert. Nachdem die Zellen zweimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren, wieder aufgetaut und gevortext wurden, wurden die Zelltrümmer bei maximaler Drehzahl und 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand, welcher das Gesamtproteinextrakt enthielt, wurde in ein frisches Tube übertragen und, sofern nicht unmittelbar weitergearbeitet wurde, bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.3.2 BRET-Assay/MMEJ-Assay

Zur Durchführung des BRET Assays, bzw. des MMEJ-Assays, wurde zunächst das Substrat für die Luciferase-Reaktion vorbereitet. Dazu wurde Coelenterazin 400a 1:100 in 1x PBS verdünnt (Endkonzentration 10 µg/ml). Von dieser Lösung wurden pro Well der 96-Well Lumineszenz Platte (siehe unten) 100 µl benötigt. Zusätzlich bedurfte das Gerät nochmal 1,5 ml um sich zu primen. Da das Substrat lichtempfindlich ist, wurde es lichtgeschützt für 20 min bei RT inkubiert. Zur Messung wurden je 5 µl an Gesamtproteinextrakt (aus 2.2.3.1) in die einzelnen Wells einer weißen 96-Well Lumineszenz Platte gegeben. Jede Probe wurde dabei 4x pipettiert.

Die Lichtemission wurde mit dem Tecan Infinite Multimode Platereader mit zwei verschiedenen Transmissionsfiltern bestimmt. Der Filter „Blue“ hat eine Transmission von < 450 nm und ist somit geeignet, die Emission der Luciferase zu erfassen. Der Filter „Green“ hat eine Transmission von 500-550 nm und kann somit die Emission des GFP2 detektieren. Aus dem Verhältnis der beiden Emissionswerte eines Wells kann mit Gleichung (1) die BRET-Ratio errechnet werden.

$$BRET - Ratio = \frac{Biosensor\ Em(Green)}{Biosensor\ Em(Blue)} \quad (1)$$

#### 2.2.4 Statistische Auswertung

Sofern nicht anders angegeben, wurden die einzelnen Experimente unabhängig voneinander in 3 biologischen Proben mit jeweils vierfacher Bestimmung durchgeführt. Zur statistischen Auswertung wurden von den erhobenen Daten Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Um zu prüfen, ob sich die Ergebnisse von 2 Proben signifikant voneinander unterscheiden, wurden, sofern die Grundgesamtheit normalverteilt war, Zweistichproben t-Test angewendet. Sofern die Grundgesamtheit nicht normalverteilt war, wurden Mann-Whitney-Tests angewendet. Zuvor wurden die Grundgesamtheiten mittels Shapiro-Wilk-Tests und Kolmogorow-Smirnow-Tests auf Normalverteilung geprüft. Um Ergebnisse von mehreren Proben untereinander zu vergleichen, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen SigmaPlot und GraphPad (siehe: 2.1.12). P-Werte ab <0,05 wurden als statistisch signifikant (gekennzeichnet mit \*), P-Werte ab <0,01 als hoch signifikant (gekennzeichnet mit \*\*) und P-Werte ab <0,001 als höchst signifikant (gekennzeichnet mit \*\*\*) erachtet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierungen der gRNA/Cas9-Plasmide

In dieser Arbeit sollten insgesamt 10 verschiedene gRNA/Cas9-Plasmide, welche die codierenden Sequenzen sowohl für die verschiedenen gRNAs (G1-10) als auch für die Cas9-Endonuklease und weiterer regulatorischer Sequenzen enthalten, hergestellt werden. 5 gRNA/Cas9-Plasmide davon (G1 – G5) sollen in Intron 42, weitere 5 (G6 – G10) in Intron 43 des porzinen *ABCA4* Gens einen DSB erzeugen können (siehe Abbildung 5). Dazu mussten zunächst in beiden Intronen jeweils 5 potenzielle Schnittstellen, sog. Targetsequenzen, gefunden werden. Hierfür wurde das „CRISPR gRNA Design tool“ (siehe 2.1.12) verwendet. Die ermittelten Targetsequenzen in Intron 42 sind Tabelle 16, die in Intron 43 Tabelle 17 zu entnehmen.

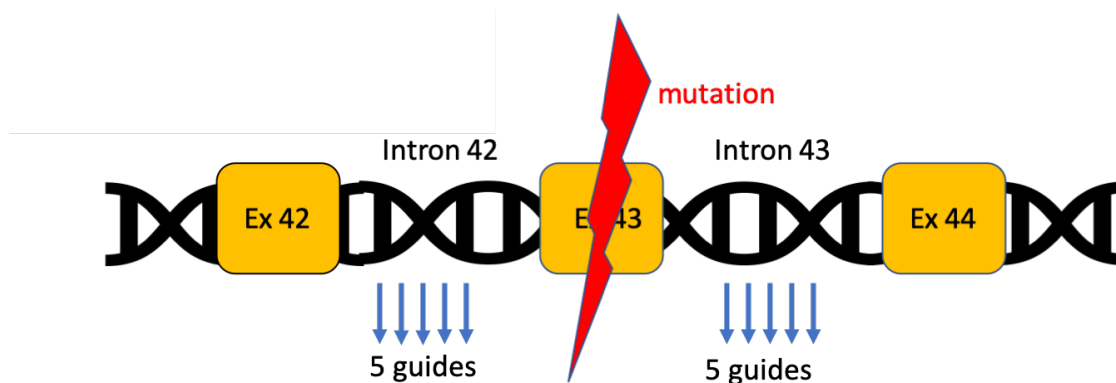


Abbildung 5: Schematische Darstellung des mutierten Exon 3 des porzinen *ABCA4* Gens.

Links und rechts davon sind die Introns 42 und 43 zu sehen. In diesen befinden sich die verwendeten Target-Sequenzen, aus welchen sich auch die gRNA-Sequenzen ableiten.

Tabelle 16: Mit dem „CRISPR gRNA Design tool“ ermittelte Oligonukleotide für Targetsequenzen in Intron 42 des porzinen *ABCA4* Gens

Target	Sequenz (5'-3')
T1	GTGATGAGCTTCTGTCCGTCTGG
T2	TGACCTCTCTCGAGCTGTCGTGG
T3	TGAGCTTCTGTCCGTCTGGGTGG
T4	ACTTTGCACTCTTTTGTTCGTGG
T5	CCCGCGTGTGTGCGACGCACGGG

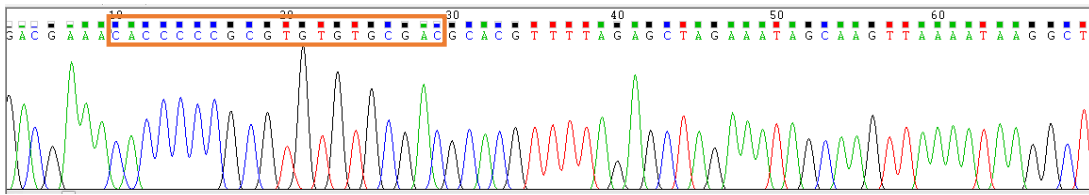
**Tabelle 17: Mit dem „CRISPR gRNA Design tool“ ermittelte Oligonukleotide für Targetsequenzen in Intron 43 des porcinen *ABCA4* Gens**

Target	Sequenz (5'-3')
T6	CCTCAGGGCAGCGTTCACGTGGG
T7	TTCGCTGGGCGGTCCACCCTCGG
T8	TCTCCCCTTCGGTTTCCACCAGG
T9	ACCTCAGGGCAGCGTTCACGTGG
T10	GGATCGGGGGGTTCCTTCGTGG

Um die einzelnen Sequenzen mit den verwendeten Restriktionsenzymen in den px459 Vektor klonieren zu können, mussten an diese – sowohl an den Vorwärtsstrang als auch an den komplementären Rückwärtsstrang - spezifische Überhänge angefügt werden. Zudem wurde jeweils die PAM-Sequenz (siehe 1.4) entfernt. Die so entstandenen Oligonukleotide sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Zur Herstellung der gRNA/Cas9-Plasmide wurden jeweils der Vorwärts- und der zugehörige Rückwärtsstrang der in Tabelle 10 aufgelisteten Oligonukleotide zusammen hybridisiert und anschließend in den Vektor px459 (siehe Abbildung 3) ligiert. Hiernach wurde das ligierte Plasmid in *E. coli*s transformiert und auf Ampicillin-Selektivagarplatten ausplattiert. Die untransformierten *E.coli*s enthielten keine Ampicillinresistenz, das Plasmid jedoch schon, weshalb nur erfolgreich transformierte Bakterien auf der Platte wachsen konnten. Anschließend wurden einzelne auf der Platte gewachsene Bakterienklone mittels Übernachtskultur in ampicillinhaltigem Medium vervielfältigt. Die Plasmid-DNA wurde daraufhin mit einer Mini-Preparation (siehe 2.2.2.1.5) isoliert und anschließend zum Sequenzieren geschickt. Sofern in der Auswertung die gewünschte DNA-Sequenz zu sehen war, wurde dieser Klon in größerer Menge kultiviert und mit einer Maxi-Preparation aufgereinigt sowie ein Teil der Bakterienkultur in einem Glycerolstock eingefroren. Die Klonierungsarbeiten wurden so oft wiederholt, bis alle 10 gRNA/Cas9-Plasmide erfolgreich hergestellt waren.

Als Beispiel für die Auswertung einer erfolgreichen Klonierung eines gRNA/Cas9-Plasmids ist Abbildung 6 aufgeführt.

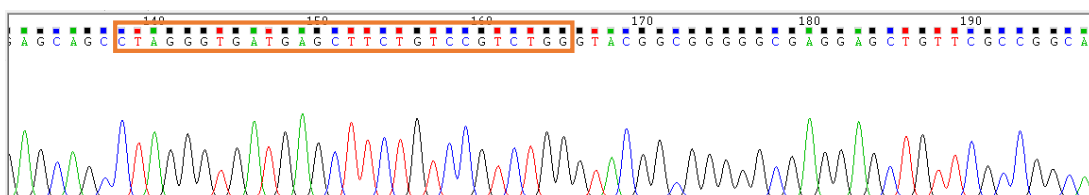


**Abbildung 6: Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Sequenzierung des Klons von gRNA/Cas9-Plasmid 5**  
Zu sehen ist die Sequenz von gRNA 5 (gelbe Umrahmung) an der gewünschten Stelle im Vektor px459.

### 3.2 Klonierungen der Target-Plasmide

Für den BRET-Assay war zudem für jedes der 10 gRNA/Cas9-Plasmide die Klonierung eines zugehörigen Target-Plasmids, an welchem die Genprodukte des gRNA/Cas9-Plasmids schneiden können, notwendig. Dies geschah nach dem gleichen Prinzip wie die Klonierungen der gRNA/Cas9-Plasmide. Um die einzelnen Targetsequenzen aus Tabelle 16 und Tabelle 17 mit den verwendeten Restriktionsenzymen in den pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 Vektor klonieren zu können, mussten auch hier sowohl an den Vorwärts- als auch an den Rückwärtsstrang spezifische Überhänge angefügt werden. Die PAM-Sequenzen wurden diesmal belassen. Die so entstandenen Oligonukleotide sind in Tabelle 9 aufgelistet. Von diesen wurden wieder Vorwärts- und zugehöriger Rückwärtsstrang zusammen hybridisiert und anschließend in den Vektor pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 (siehe Abbildung 4) ligiert. Danach wurde das ligierte Plasmid, anders als beim gRNA/Cas9-Plasmid, nachverdaut. (siehe 2.2.1.4). Ab hier erfolgten die weiteren Schritte wieder genau wie beim gRNA/Cas9-Plasmid (siehe 3.1). Sofern in der Auswertung der Sequenzierung die gewünschte DNA-Sequenz zu sehen war, wurde auch hier der richtige Klon in größerer Menge kultiviert und mit einer Maxi-Preparation aufgereinigt sowie ein Teil der Kultur in einem Glycerolstock eingefroren. Die Klonierungsarbeiten wurden so oft wiederholt, bis alle 10 Target-Plasmide erfolgreich hergestellt waren.

Als Beispiel für die Auswertung einer erfolgreichen Klonierung eines Target-Plasmids ist Abbildung 7 aufgeführt.



**Abbildung 7: Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Sequenzierung des Klons von Target-Plasmid 1.**  
Zu sehen ist die Sequenz von Target 1 (gelbe Umrahmung) an der gewünschten Stelle im Vektor pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2.

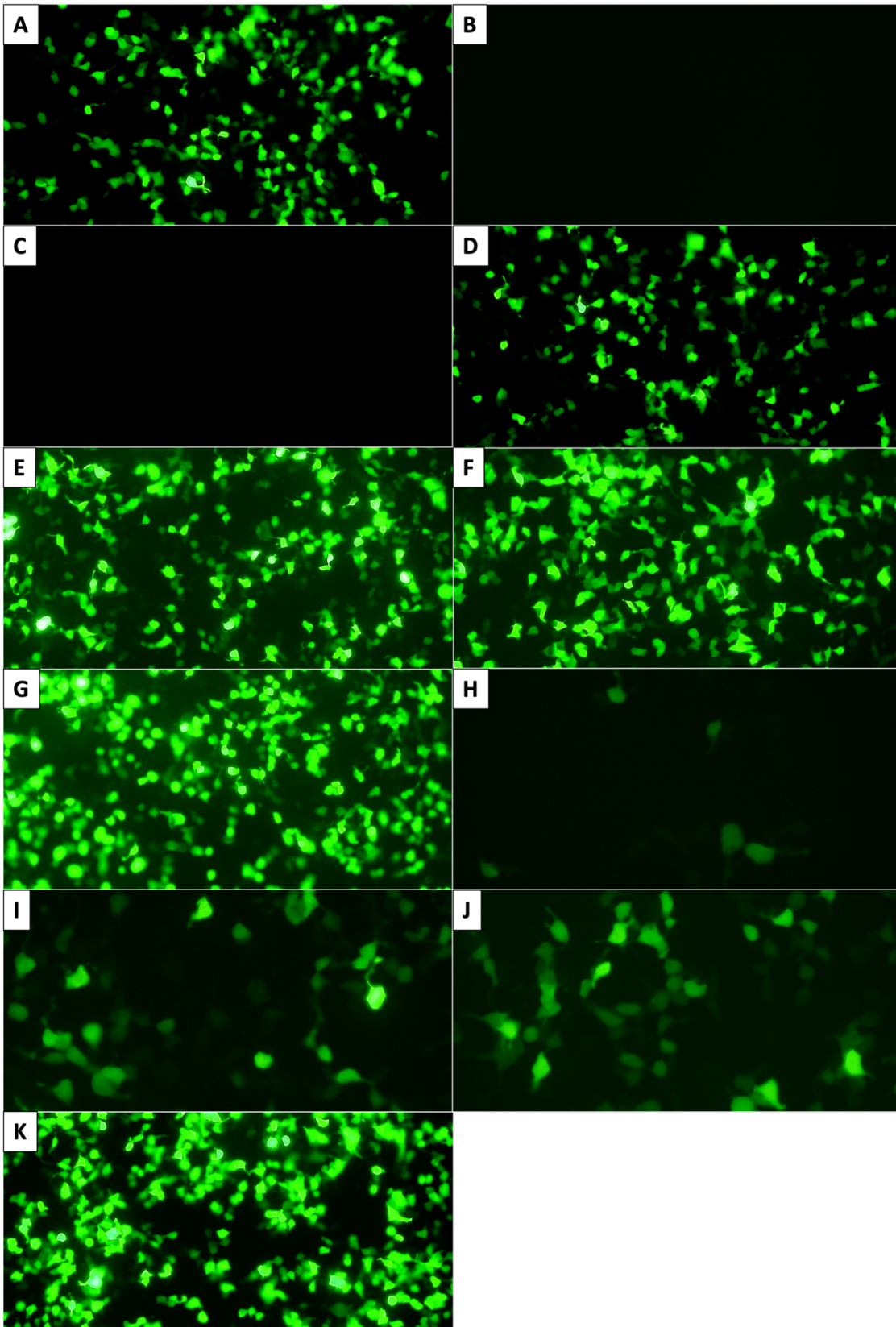
### 3.3 Überprüfung der Endonukleaseaktivität

Mithilfe eines BRET-Assays kann die Schneideaktivität von gRNAs ermittelt werden (siehe 1.7.1). Dies diente als Vorselektion, sodass nur mit signifikant effizienten gRNA/Cas9-Plasmiden weitergearbeitet werden sollte. Hierfür wurden die aufgereinigten Target- und gRNA/Cas9-Plasmide in HEK293-T-Zellen transfiziert. Bei erfolgreicher Transfektion stellt die Zelle die auf den Plasmiden codierten Genprodukte her, deren Aktivität anschließend am Fluoreszenzmikroskop und am Plattenlesegerät nachgewiesen werden kann (siehe 1.7.1).

Die Transfektionen für den BRET-Assay wurden im 6-Well Format durchgeführt. Für jedes der 10 zu testenden gRNA/Cas9-Plasmide wurden sowohl das zugehörige Target-Plasmid allein transfiziert als auch Target- und gRNA/Cas9-Plasmid zusammen cotransfiziert (zusammengehörende Guide- und Target-Plasmide wurden jeweils gleich nummeriert). Jede dieser (Co-)transfektionen wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die Transfektion des Target-Plasmids allein diente dabei als Positivkontrolle, die Cotransfektion von Guide- und Target wurde zur Analyse der Schneideaktivität verwendet. Zusätzlich wurden an jedem Tag, an dem transfiziert wurde, die Luciferase (pRLuc8, Negativkontrolle) und ein GFP jeweils allein transfiziert. Jeder Transfektionsansatz, abgesehen vom GFP, wurde 4x am Plattenlesegerät überprüft. Insgesamt entstanden somit für jede Positivkontrolle sowie für jede zugehörige Cotransfektion 12 Messwerte, für die Negativkontrolle 8 Messwerte.

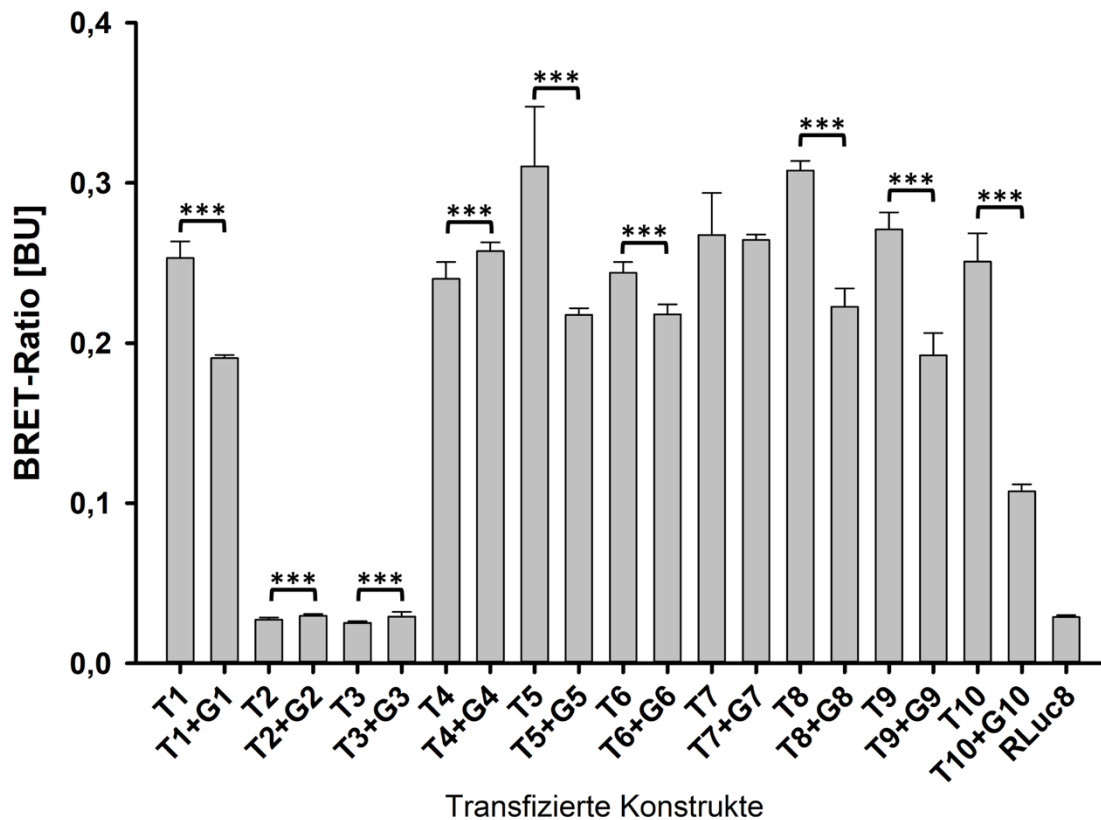
Von diesen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Die Positivkontrollen wurden mit den zugehörigen Cotransfektionen mittels t-Tests, bzw. Mann-Whitney-Tests, verglichen. Je niedriger die ermittelte BRET-Ratio bei der Cotransfektion von Target und Guide im Vergleich zur zugehörigen Positivkontrolle war, umso stärker ist die Schneideaktivität des gRNA/Cas9-Plasmids (siehe 1.7.1).

Jede Positivkontrolle sowie die mit dem GFP transfizierten Zellen wurden zudem am Fluoreszenzmikroskop auf Expression des GFPs überprüft (siehe Abbildung 8).



**Abbildung 8: Unterm Fluoreszenzmikroskop mit grünem Filter aufgenommene Bilder der adhärenen HEK293-T-Zellen, welche mit den einzelnen Target-Plasmiden (Positivkontrollen) bzw. dem GFP transfiziert wurden.** Die Aufnahme der Bilder erfolgte 24 h nach der Transfektion. A: Target 1, B: Target 2, C: Target 3, D: Target 4, E: Target 5, F: Target 6, G: Target 7, H: Target 8, I: Target 9, J: Target 10, K: GFP.

## BRET-Assay



**Abbildung 9: Graphische Darstellung der Ergebnisse des BRET-Assays.**

Auf der x-Achse sind die einzelnen Ansätze zu sehen. Zusammengehörige Kombinationen sind nebeneinander dargestellt. Die einzelnen Positivkontrollen (nur Target-Plasmide allein) sind jeweils links neben den zugehörigen Cotransfektionen (mit Guide- und Target-Plasmid) dargestellt. Ganz rechts ist die Luciferase (Negativkontrolle) zu sehen. Auf der y-Achse sind Mittelwerte und Standardabweichungen der BRET-Ratios dargestellt. Mit \*\*\* markierte Ergebnisse unterschieden sich jeweils höchst signifikant ( $p < 0,001$ ).

In Abbildung 9 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der errechneten BRET-Ratios der einzelnen transfizierten Konstrukte zu sehen. Diese sind zusätzlich numerisch in Tabelle 18 dargestellt. Die Targets 1 bis 5 stammen aus dem Intron 42, die Targets 6-10 aus dem Intron 43 des porzinen *ABCA4* Gens (siehe 3.1). Bei G1, G2, G3, G4, G5, G6, G8, G9 und G10 unterschieden sich die Mittelwerte von Positivkontrolle und zugehöriger Cotransfektion höchst signifikant.

**Tabelle 18: Numerische Darstellung der Ergebnisse des BRET-Assays**

<b>Transfizierte Konstrukte</b>	<b>Mittelwert der BRET-Ratio</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>P-Wert (zweiseitig) *</b>
T1	0,2531	0,0105	
T1+G1	0,1908	0,0018	<0,0001
T2	0,0272	0,0014	
T2+G2	0,0296	0,0012	<0,0001
T3	0,0252	0,0010	
T3+G3	0,0292	0,0029	<0,0001
T4	0,2401	0,0106	
T4+G4	0,2575	0,0055	<0,0001
T5	0,3105	0,0372	
T5+G5	0,2176	0,0042	<0,0001
T6	0,2439	0,0069	
T6+G6	0,2181	0,0061	<0,0001
T7	0,2675	0,0263	
T7+G7	0,2645	0,0034	0,1179
T8	0,3078	0,0061	
T8+G8	0,2227	0,0115	<0,0001
T9	0,2710	0,0107	
T9+G9	0,1924	0,0139	<0,0001
T10	0,2509	0,0178	
T10+G10	0,1073	0,0044	<0,0001
RLuc8	0,0289	0,0011	

\* verglichen mit der jeweiligen Positivkontrolle

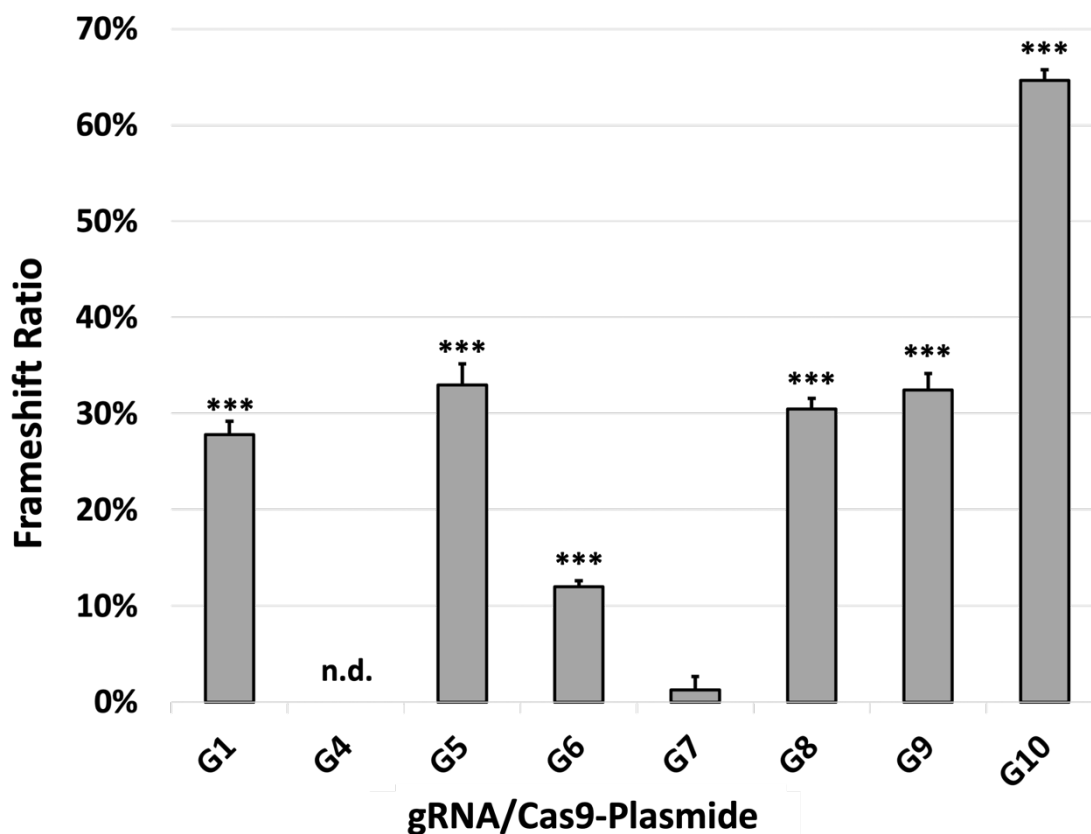
Aus diesen Daten lässt sich mit Gleichung (2) die Frameshift-Ratio (FR) für jedes gRNA/Cas9-Plasmid berechnen. Die FR ist dabei ein Maß für die Endonukleaseaktivität. Je höher die FR, desto höher ist die Endonukleaseaktivität des jeweiligen gRNA/Cas9-Plasmids.

Dazu wird jeweils die Differenz aus dem Mittelwert der BRET-Ratios vom Target und dem Mittelwert der BRET-Ratios der zugehörigen Cotransfektion von Target und Guide

durch die Differenz aus dem Mittelwert der BRET-Ratios des Targets und dem Mittelwert der BRET-Ratios der Luciferase dividiert und der Quotient mit 100% multipliziert.

$$\text{Frameshift Ratio} = \frac{\text{BRET Ratio (T)} - \text{BRET Ratio (T+G)} \times 100\%}{\text{BRET Ratio (T)} - \text{BRET Ratio (RLuc8)}} \quad (2)$$

Die FRs der einzelnen gRNA/Cas9-Plasmide sind, mit Ausnahme von G2 und G3, in Abbildung 10 und Tabelle 19 dargestellt. Die Targetsequenzen von G2 und G3 enthalten Stopcodons, weshalb die Bestimmung der FR hier nicht vergleichbar und weiterführend ist (siehe 4.1). In der Abbildung ist gut zu erkennen, dass für Intron 42 G1 und G5 sowie für Intron 43 G9 und G10 die beiden jeweils endonukleaseaktivsten Konstrukte waren. Mit diesen 4 Konstrukten wurde im Folgenden weitergearbeitet. Daneben haben sich G6 und G8 ebenfalls als endonukleaseaktiv erwiesen. Nicht überzeugt haben G4 und G7.



**Abbildung 10: Graphische Darstellung der Frameshift-Ratios der verschiedenen gRNA/Cas9-Plasmide**

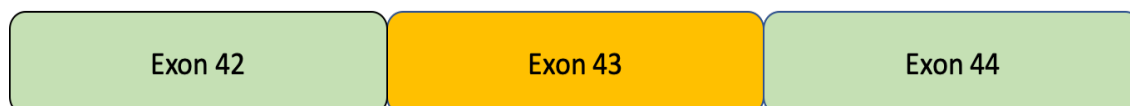
Auf der x-Achse sind die einzelnen gRNA/Cas9-Plasmide zu sehen. Auf der y-Achse sind deren Frameshift-Ratios dargestellt. Mit \*\*\* markierte Ergebnisse waren höchst signifikant ( $p < 0,001$ ), jeweils verglichen mit der zugehörigen Kontrolle.

**Tabelle 19: Numerische Darstellung der Frameshift-Ratios der verschiedenen gRNA/Cas9-Plasmide**

<b>gRNA/Cas9-Plasmid</b>	<b>Frameshift-Ratio</b>	<b>Standardabweichung</b>
G1	27,80%	1,42%
G4	n.d.	/
G5	32,98%	2,21%
G6	11,98%	0,65%
G7	1,27%	1,40%
G8	30,49%	1,10%
G9	32,45%	1,74%
G10	64,56%	1,10%

### 3.4 Synthese des Wildtyp-Templates

Das Wildtyp-Template (WT-Template) enthält die fusionierten wildtypischen Sequenzen der Exons 42, 43 und 44 des porzinen *ABCA4* Gens ohne die natürlicherweise dazwischenliegenden intronischen Sequenzen (siehe Abbildung 11). Es besitzt somit ausreichend homologe Sequenzen zum porzinen Genom, um dort nach einem durch die in 3.3 getesteten gRNA/Cas9-Komplexe erzeugten DSB von den Reparaturmechanismen MMEJ oder HDR eingebaut zu werden. Die genaue Basenabfolge des Wildtyp Templates findet sich im Anhang (siehe 11.1).

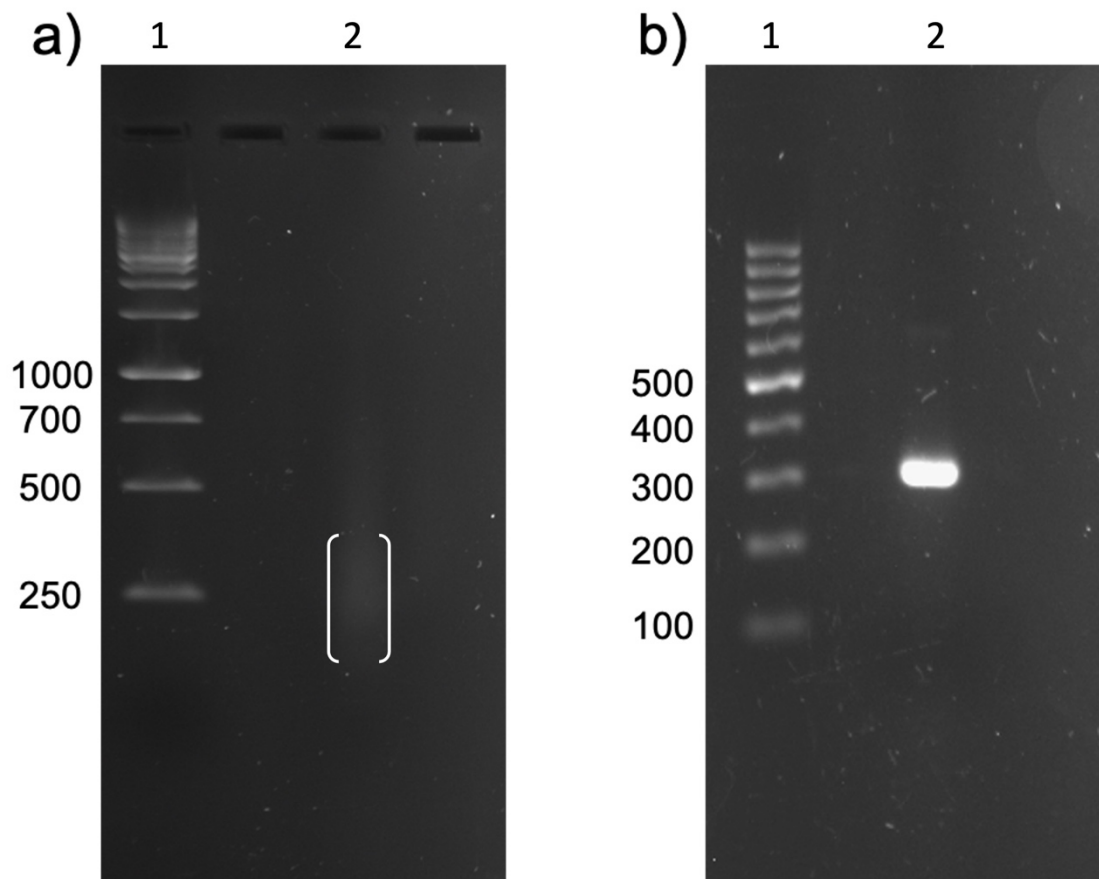


**Abbildung 11: Schematische Darstellung des Wildtyp Templates.**

Dieses besteht aus den aneinandergereihten Sequenzen von Exon 42, 43 und 44 des porzinen *ABCA4* Gens.

Die Synthese des Templates (siehe 2.2.1.9) nach dem GeneArt Kit bestand im Wesentlichen aus 2 PCR-Schritten. Zuerst wurden 10 zuvor designte, sich an den Enden überlagernde Oligonukleotide (MBHDR1 - MBHDR10, siehe 2.1.9) in einer Assemblierungs-PCR zu einem längeren doppelsträngigen Template zusammengefügt. Das zugehörige Agarosegel zeigte eine sehr weite Bande in der Größenordnung von ca. 200 bis 400 bp (siehe Abbildung 12a)). In einer darauffolgenden Amplifizierungs-PCR wurde das Template dann vervielfältigt. Dabei wurden spezifische Primer (MBPCR 1 & 2, siehe 2.1.9) verwendet, welche dafür sorgten, dass nur diejenigen der im ersten PCR-Schritt

entstandenen DNA-Fragmente amplifiziert wurden, welche der Sequenz des gewünschten WT-Templates entsprachen. Im zugehörigen Agarosegel war anschließend eine Bande im Bereich von etwas mehr als 300 bp zu sehen (siehe Abbildung 12b)), was der Größe des WT-Templates entsprach. Da die im Kit vorgeschlagene Methode zur Konzentrationsmessung nicht zur Verfügung stand, wurde sie am Photometer durchgeführt.



**Abbildung 12: Agarosegelelektrophoresen zur Synthese des Wildtyp Templates.**

a): Agarosegel zur Assemblierungs PCR. Lane 1 zeigt die DNA-Größenreferenz (GeneRuler 1kb). Lane 2 zeigt eine sehr weite Bande in der Größenordnung von ca. 200 bis 400 bp. b): Agarosegel zur Amplifizierungs PCR. Lane 1 zeigt die DNA-Größenreferenz (GeneRuler 100 bp). Lane 2 zeigt eine klare Bande von etwas mehr als 300 bp.

Um das Template aus der Amplifizierungs-PCR zu vervielfältigen und zu selektieren, wurde es in den TOPO-Vektor pCR-BluntII kloniert. Das so entstandene Plasmid wurde dann in elektrokompetente *E.colis* transformiert. Nach Übernachtskultur und Plasmid-Aufreinigung zeigte die Sequenzierung das korrekte Template.

Anschließend wurde das WT-Template wieder aus dem TOPO-Vektor herausgeschnitten. Hierzu wurde das aufgereinigte Plasmid mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut und anschließend mit einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Bande, welche der Größe des WT-Templates entsprach, wurde ausgeschnitten und anschließend transfektionsbereit aufgereinigt (siehe 2.2.1.11).

### 3.5 Synthese des porzinen ABCA4 MMEJ Target DNA Templates

Um zu überprüfen, ob der Einbau des WT-Templates in ein längeres geeignetes DNA-Fragment mithilfe der getesteten gRNA/Cas9-Plasmide grundsätzlich möglich ist, wurde ein spezielles porzines ABCA4 MMEJ Target DNA Template (im Folgenden „MMEJ-Template“ genannt) hergestellt. Die Basenabfolge und der genaue Aufbau des MMEJ-Templates sind im Anhang aufgeführt (siehe 11.2), den schematischen Aufbau zeigt Abbildung 13a). Das MMEJ-Template wurde, genau wie das zuvor synthetisierte WT-Template, mit dem GeneArt Gene Synthesis Kit hergestellt (siehe 2.2.1.9 & 3.4). Die zugehörigen Agarosegelelektrophoresen zeigten die gewünschten Ergebnisse. Auch hier erfolgte die Konzentrationsbestimmung am Photometer.

Um das DNA-Produkt aus der Amplifizierungs PCR zu vervielfältigen und zu selektieren, wurde es, genau wie zuvor das WT-Template, in den TOPO-Vektor pCR-BluntII kloniert und das so entstandene Plasmid anschließend in elektrokompetente *E.colis* transformiert. Nach Übernachtskultur und Plasmid-Aufreinigung zeigte die Sequenzierung die gewünschten Ergebnisse, das korrekte MMEJ-Template wurde hergestellt.

### 3.6 Klonierung des porzinen ABCA4 MMEJ Target DNA Templates in den pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 Vektor

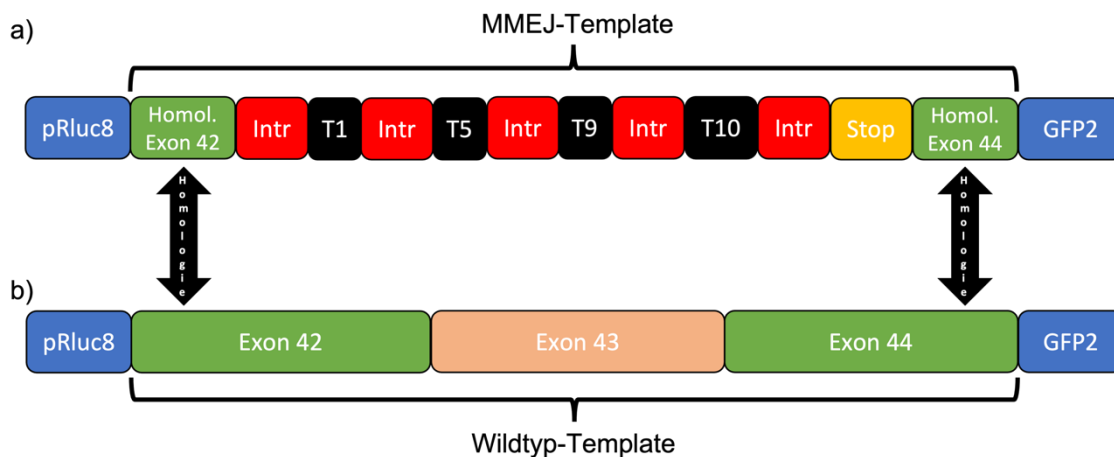
Für die Durchführung des MMEJ-Assays war es nötig, das MMEJ-Template aus dem TOPO-Vektor herauszuschneiden und in den pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 Vektor (siehe Abbildung 4) zu klonieren. Hierfür wurde das aufgereinigte TOPO-Plasmid mit den Restriktionsenzymen *AvrII* und *BsiWI*, deren Schnittstellen sich an den Enden des MMEJ-Templates befinden, verdaut. Der dabei entstandene Ansatz wurde mithilfe einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die Bande im Bereich von 300 bp, welche der Größe des MMEJ-Templates entsprach, wurde ausgeschnitten und anschließend in den ebenfalls

mit *AvrII* und *BsiWI* verdauten pRLuc8-*AvrII*/*BsiWI*-GFP2 Vektor ligiert. Dieser Ansatz wurde dann in elektrokompente *E.colis* transformiert und die Bakterien auf Ampicillinplatten ausgestrichen. Da der pRLuc8-Vektor im Gegensatz zum TOPO-Vektor über eine Ampicillinresistenz verfügt, können nur die mit diesem erfolgreich transformierten *E.colis* auf den Platten wachsen. Nach Übernachtskultur und Plasmid-Aufreinigung zeigte die Sequenzierung die gewünschte Basenabfolge, das MMEJ-Template wurde erfolgreich in den pRLuc8-*AvrII*/*BsiWI*-GFP2 Vektor kloniert. Dieser Vektor wird im Folgenden als MMEJ-Template-Vektor bezeichnet.

### 3.7 Durchführung des MMEJ-Assays in HEK293-T-Zellen

Der MMEJ-Assay basiert auf dem gleichen Prinzip wie der BRET-Assay (siehe 1.7.1). Er soll eine Aussage darüber liefern, ob das WT-Template mithilfe der gRNA/Cas9-Plasmide in das sich im pRLuc8-*AvrII*/*BsiWI*-GFP2 Vektor befindende MMEJ-Template, welches homologe Bereiche zum WT-Template enthält, eingebaut werden kann. Das MMEJ-Template wurde in Schritt 3.6 in den pRLuc8-*AvrII*/*BsiWI*-GFP2 Vektor zwischen die codierenden Sequenzen von Luciferase und GFP2 kloniert (siehe Abbildung 13a)). Da es in jedem Frame ein Stopcodon enthält, sollte bei alleiniger Transfektion des MMEJ-Template-Plasmides in HEK293-T-Zellen kein GFP2 exprimiert werden und somit auch keine GFP2-Emission am Plattenlesegerät messbar sein (zur Funktionsweise zu Luciferase/BRET-Assay siehe 1.7.1). Das MMEJ-Template enthält außerdem die Targetsequenzen der 4 gRNA/Cas9-Plasmide, welche sich zuvor im BRET-Assay als am schneideeffizientesten erwiesen (siehe 3.3). Außen wird das MMEJ-Template an einen Ende von einer 10 bp langen Sequenz aus Exon 42 und am anderen Ende von einer 10 bp langen Sequenz aus Exon 44 flankiert und ist an diesen Stellen somit homolog zum WT-Template (siehe Abbildung 13). Dementsprechend könnte man bei Cotransfektion des MMEJ-Template-Vektors mit einem gRNA/Cas9-Plasmid und dem WT-Template in HEK293-T-Zellen erwarten, dass das Genprodukt des gRNA/Cas9-Plasmids, der gRNA/Cas9-Komplex, einen DSB an der entsprechenden Target-Stelle im MMEJ-Template-Vektor erzeugt und das WT-Template an den homologen Bereichen des MMEJ-Template-Vektors mittels MMEJ (siehe 1.5) eingebaut wird (siehe Abbildung 13b)). Da in diesem Falle die Stopcodons entfernt würden, würde GFP2 exprimiert und am Plattenlesegerät messbar.

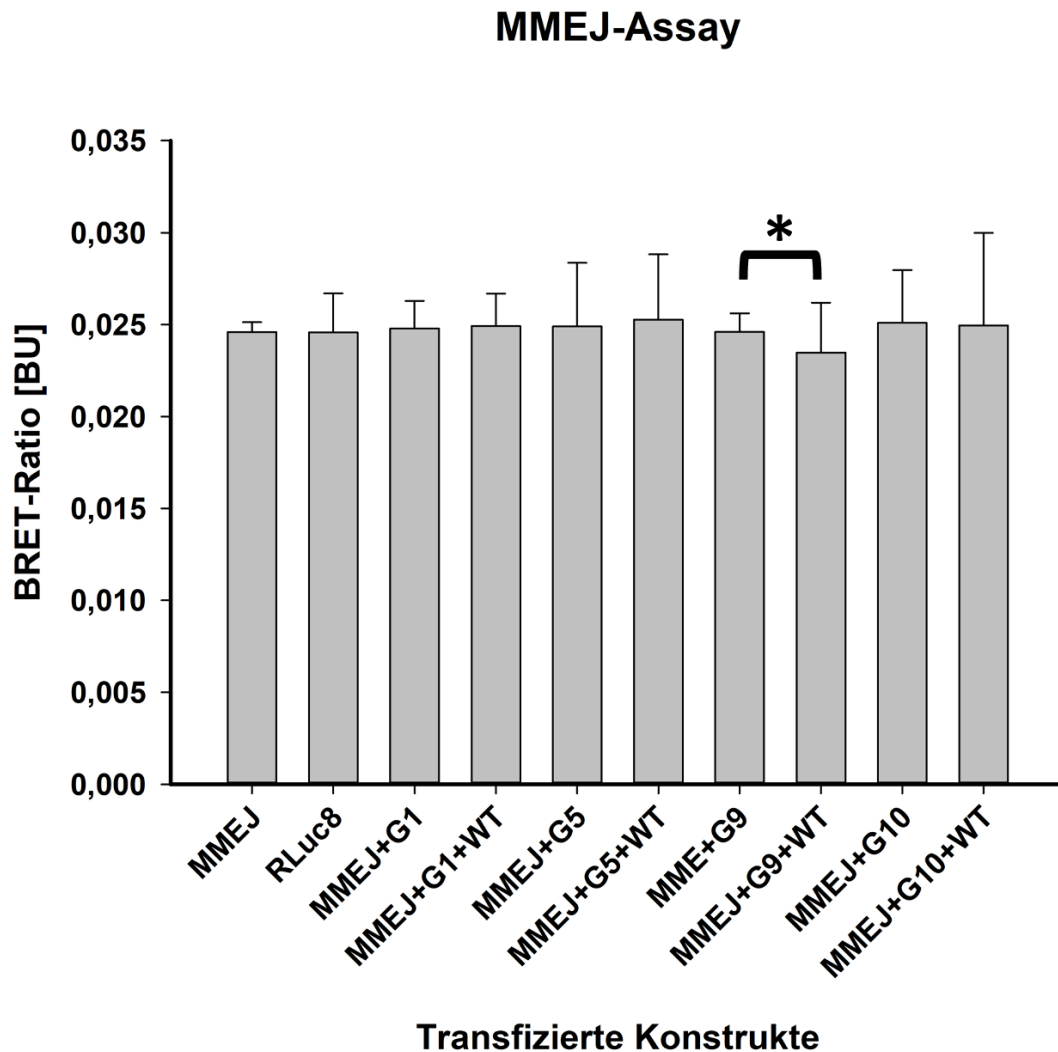
Um sicherzustellen, dass die Stopcodonsequenz durch den Einbau des Wildtyp Templates entfernt und nicht durch Schneideaktivität des gRNA/Cas9-Komplexes zerstört wurde, wurde als Positivkontrolle zu jedem Experiment jeweils nur das gRNA/Cas9-Plasmid zusammen mit dem MMEJ-Template-Vektor cotransfiziert, ohne das WT-Template.



**Abbildung 13: Schematische Darstellung des MMEJ-Assays**

a): Das sich im pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 Vektor zwischen Luciferase und GFP2 befindende MMEJ-Template. Das MMEJ-Template enthält die Target-Sequenzen der effektivsten gRNA/Cas9-Komplexe T1, T5, T9 und T10. Dazwischen befinden sich intronische Sequenzen aus dem porzinen *ABCA4* Gen. An den Enden des Templates befinden sich jeweils 10 bp lange Sequenzen von Exon 42, bzw. Exon 44 des porzinen *ABCA4* Gens. Zudem ist eine Stop-Sequenz eingebaut, in welcher sich in jedem der 3 Frames ein Stopcodon befindet. b): Darstellung des WT-Templates nach Einbau in den pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 Vektor. Da das WT-Template außen ebenfalls die Exons 42 und 44 enthält, kann es nach einem DSB im MMEJ-Template (siehe Abbildung 13a)) von den DNA-Reparaturmechanismen der Zelle als homologe Sequenz erkannt und eingebaut werden.

Die Transfektionen für den MMEJ-Assay wurden im 24-Well Format in HEK293-T-Zellen durchgeführt. Jedes der 4 gRNA/Cas9-Plasmide (G1, G5, G9 und G10) wurde jeweils zusammen mit dem MMEJ-Template-Vektor und dem Wildtyp Template cotransfiziert. Cotransfektionen jeweils der 4 gRNA/Cas9-Plasmide mit dem MMEJ-Vektor allein ohne das WT-Template dienen als Positivkontrolle. Transfektionen von jeweils Luciferase (pRLuc8) und MMEJ-Template-Vektor allein dienen als Negativkontrollen. Jede (Co)transfektion wurde insgesamt dreimal durchgeführt und jeder Transfektionsansatz 4x am Plattenlesegerät überprüft, sodass für alle Konstrukte 12 Messwerte entstanden. Von diesen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.



**Abbildung 14: Graphische Darstellung der Ergebnisse des MMEJ-Assays.**

Auf der x-Achse sind die einzelnen Ansätze zu sehen. Dargestellt sind die Transfektionen von Luciferase und MMEJ-Template-Vektor allein sowie die jeweils 4 Cotransfektionen von MMEJ-Template-Vektor + gRNA/Cas9-Plasmid und MMEJ-Template + gRNA/Cas9-Plasmid + WT-Template. Auf der y-Achse sind Mittelwerte und Standardabweichungen der BRET-Ratios dargestellt. Mit \* markierte Ergebnisse unterschieden sich jeweils signifikant ( $p < 0,05$ ).

In Abbildung 14 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der errechneten BRET-Ratios der einzelnen transfizierten Konstrukte zu sehen. Diese sind zusätzlich numerisch in Tabelle 20 dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurden einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVAs) sowie t-Tests durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sich fast kein Mittelwert im MMEJ-Assay signifikant von einem anderen unterschied. Lediglich bei G9 gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen Cotransfektion mit WT-Template und Positivkontrolle.

**Tabelle 20: Numerische Darstellung der Ergebnisse des MMEJ-Assays nach Transfektion der HEK293-T-Zellen mit gRNA/Cas9-Plasmiden, WT-Template, MMEJ-Template und der Luciferase.**

<b>Transfizierte Konstrukte</b>	<b>Mittelwert der BRET-Ratio</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>P-Wert (zweiseitig) *</b>
RLuc8	0,024573	0,002125	
MMEJ	0,024591	0,000531	
MMEJ+G1	0,024780	0,001507	
MMEJ+G1+WT	0,024921	0,001754	0,7311
MMEJ+G5	0,024895	0,003458	
MMEJ+G5+WT	0,025263	0,003554	0,7166
MMEJ+G9	0,024606	0,001003	
MMEJ+G9+WT	0,023480	0,002716	0,0335
MMEJ+G10	0,025097	0,002864	
MMEJ+G10+WT	0,024954	0,005035	0,8788

\* verglichen mit der jeweiligen Positivkontrolle

## 4 Diskussion

STGD1 ist eine Erkrankung, die autosomal-rezessiv vererbt wird. Ursächlich dafür sind verschiedene Mutationen im *ABCA4* Gen, wie die in dieser Arbeit anvisierte, auf Exon 43 zwischen den Positionen 5918 und 5919 lokalisierte Frameshiftmutation c.5918\_5919insA (siehe 1.1). Um diese Mutationen ursächlich zu beheben, erscheint die Anwendung der CRISPR/Cas Genome Editing Technologie als sinnvoll. In dieser Arbeit wurde die porcine *ABCA4* Sequenz des *Sus Scrofa* verwendet, welche eine hohe Übereinstimmung mit der humanen Genvariante aufweist. (Wimmer et al., 2023)

### 4.1 Herstellung und Test verschiedener gRNA/Cas9-Plasmide für das porcine *ABCA4* Gen

Für das geplante Genome Editing im porcinen *ABCA4* Gen mussten zunächst in der Nähe der Mutation Stellen im Gen ermittelt werden, an welchen mit der Cas9-Endonuklease zuverlässig und mit hoher Effizienz Doppelstrangbrüche erzeugt werden können. Diese sog. Targetstellen im Genom müssen dazu bestimmte Voraussetzungen erfüllen. (Yanik et al., 2017) Hierfür wurde das online verfügbare gRNA Design tools von ATUM verwendet. Dieses Tool basiert auf einem Algorithmus, der sowohl eine möglichst hohe Schneideeffizienz als auch eine möglichst geringe Off-Target-Aktivität des an der Targetsequenz schneidenden gRNA/Cas9-Komplex erwirken möchte. (*CRISPR GRNA Design Tool* | ATUM - ATUM, n.d.) Die Kontrolle der Off-Target-Aktivität ist enorm wichtig bei der Anwendung von CRISPR/Cas *in vivo*, da dadurch schwerwiegende Schäden für den gesamten Organismus entstehen können. Das Entwerfen von optimalen gRNAs mit hoher On-Target-Aktivität und nahezu keiner Off-Target-Aktivität durch Ermittlung von entsprechenden Targetstellen ist daher von entscheidender Bedeutung. (Manghwar et al., 2020)

Für die Weiterentwicklung der CRISPR/Cas Genome Editing Strategie ist es essenziell, die Effektivität der eingesetzten gRNA/Cas9-Komplexe an den entsprechenden Targetstellen bestimmen zu können. Um dies zu erreichen, gibt es verschiedene etablierte Verfahren. (Brinkman & van Steensel, 2019; Sentmanat et al., 2018) In dieser Arbeit kam der BRET-Assay zum Einsatz. Dieser hat im Vergleich zu anderen Verfahren (siehe 1.7) mehrere Vorteile. U.a. kann er durch seinen ratiometrischen Charakter die meisten transfektions- und konzentrationsbedingten Variationen eliminieren. (Wimmer et al., 2021)

Dadurch ist es auch möglich, einzelne Targetstellen, und damit die Effizienz der verschiedenen in dieser Arbeit verwendeten gRNA/Cas9-Komplexe, untereinander zuverlässig zu vergleichen. (Wimmer et al., 2021) Außerdem liefert der BRET-Assay vergleichsweise schnell, häufig bereits innerhalb von 24 h, Ergebnisse. (Wimmer et al., 2021) Andere gemeinhin verwendete Methoden sind dabei weniger zuverlässig. Analysen haben gezeigt, dass die gRNA/Cas9-Aktivität mit dem T7-Endonuklease-I-Assay (siehe 1.7) aufgrund von mehreren bekannten Störfaktoren häufig falsch eingeschätzt wird und das Ergebnis dabei möglicherweise auch selbst abhängig von der Aktivität des jeweils getesteten Komplexes ist. (Sentmanat et al., 2018) Sofern man auch die Art der erzeugten Mutationen, also ob es sich bei den Indels um Insertionen oder Deletionen handelt, quantifizieren möchte, könnte man auf sequenzierungsbasierte Verfahren wie TIDE oder TIDER zurückgreifen. (Brinkman & van Steensel, 2019) Dies wurde allerdings für diese Arbeit als nicht notwendig erachtet.

Das Genprodukt eines gRNA/Cas9-Plasmids gilt dann als schneideaktiv, wenn die errechnete BRET-Ratio der Cotransfektion signifikant niedriger ist als die der zugehörigen Positivkontrolle (siehe 1.7.1). (Wimmer et al., 2021) Für jedes gRNA/Cas9-Plasmid kann aus den Ergebnissen des BRET-Assays die jeweilige Frameshift-Ratio als Maß der Schneideaktivität berechnet werden (siehe Abbildung 10). Bei 6 der 10 getesteten gRNA/Cas9-Plasmide (G1, G5, G6, G8, G9 und G10) zeigt sich eine höchst signifikante Schneideaktivität. G2 und G3 sind als Sonderfälle zu betrachten. Bei diesen fällt auf, dass einerseits die Emissionen der Positivkontrollen lediglich ungefähr denen der Luciferase entsprechen und andererseits die BRET-Ratios der zugehörigen Cotransfektionen signifikant höher sind. Dies ist dadurch zu erklären, dass die zugehörigen Targetsequenzen T2 und T3 jeweils ein Stopcodon enthalten. Somit wird das GFP2 bei alleiniger Transfektion der Target-Plasmide nicht exprimiert und am Plattenlesegerät ist nur die Emission der Luciferase zu messen. Schneidet allerdings ein geeigneter gRNA/Cas9-Komplex an dieser Stelle, der DSB wird repariert und das Stopcodon geht dabei verloren, ist eine Expression des GFP2 messbar, die BRET-Ratio steigt. (Weller, 2019; Wimmer et al., 2021) Da die BRET-Ratios der Cotransfektionen bei G2 und G3 sich von den zugehörigen Positivkontrollen höchst signifikant unterscheiden, kann man bei diesen beiden Konstrukten ebenfalls von einer Schneideaktivität an den zugehörigen Target-Sequenzen T2 und T3 ausgehen.

Ein weiterer Sonderfall ist G4. Hier fällt auf, dass der Mittelwert der BRET-Ratios der Cotransfektionen im Vergleich zu den Positivkontrollen höchst signifikant gestiegen ist,

obwohl sich im Target-Plasmid (T4) kein Stopcodon befindet und bei alleiniger Transfektion der Positivkontrolle GFP exprimiert wird (siehe Abbildung 8). Dies könnte damit zu erklären sein, dass die Energieübertragung beim BRET-Assay u.a. von den Winkeln zwischen den Dipolmomenten des Energiedonors und -akzeptors zueinander abhängig ist. (Wimmer, 2018) Es ist also denkbar, dass G4 eine Schneideaktivität besitzt und die anschließende Reparatur der Targetstelle zu einer leichten Konformationsänderung von Luciferase und GFP zueinander führt, was die Energieübertragung derart begünstigt, dass mehr GFP-Expression am Plattenlesegerät detektiert werden kann. Als Nachweis einer Schneideaktivität wird dies jedoch nicht gewertet.

Zusammenfassend konnte im BRET-Assay bei lediglich 2 von 10 der getesteten gRNA/Cas9-Plasmiden, nämlich G4 und G7, keine Schneideaktivität festgestellt werden. Für die unterschiedliche Aktivität der einzelnen gRNA/Cas9-Plasmide werden verschiedene Faktoren diskutiert und erforscht. Einen Einfluss darauf könnte die PAM-Sequenz der Targetstelle haben. Diese ist beim SpCas9 5'-NGG-3', die N-Position ist also variabel, wobei Studien gezeigt haben, dass an dieser Stelle ein Cytosin günstiger ist als ein Thymin. (Doench et al., 2014; Konstantakos et al., 2022) In dieser Arbeit wurde zwar an Targetstellen, welche ein Thymin an der beschriebenen Stelle besitzen (u.a. T1, T9 & T10), tendenziell besser geschnitten als an denen mit Cytosin (T7), jedoch sind die Targetstellen ansonsten nicht vergleichbar, weshalb hierüber aus den Daten dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden kann. Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass ein sog. Poly-N-Motiv innerhalb der gRNA, ein Abschnitt identischer aufeinanderfolgender Basen, die Schneideaktivität erheblich verringert. (Konstantakos et al., 2022; Wong et al., 2015) Die gRNA des gRNA/Cas9-Plasmid Nr. 4 (G4) bspw., welches keine im BRET-Assay nachgewiesene Schneideaktivität besitzt (siehe 3.3), enthält 5 Mal hintereinander ein Adenin. Auch die Affinität der gRNA zum Cas9-Enzym spielt eine Rolle bei der Schneideeffizienz. Entsprechende Versuche zum sog. Cas9-Loading haben gezeigt, dass hierfür besonders das 3'-Ende der gRNA von besonderer Bedeutung ist. Purine scheinen an den letzten 4 Basenstellen günstiger für die Schneideeffizienz als Pyrimidine. (T. Wang et al., 2014)

Analog zu den Messergebnissen im BRET-Assay zeigten sich unterm Fluoreszenzmikroskop (siehe Abbildung 8) in fast allen Ansätzen grün leuchtende Zellen, entsprechend der GFP2-Expression. Lediglich in den Bildern von T2 und T3 ist, wie erwartet, keine GFP2-Expression zu sehen, da sich in beiden ein Stopcodon vor der codierenden Sequenz des GFP2 befindet.

Im Folgenden wurde mit den beiden jeweils schneideeffektivsten gRNA/Cas9-Plasmiden aus jedem Intron weitergearbeitet. Diese sind G1 und G5 für Intron 42, bzw. G9 und G10 für Intron 43.

## 4.2 Konstruktion und Herstellung des WT-Templates

Mithilfe der ermittelten gRNA/Cas9-Plasmide war es nun möglich, *in vitro* an den gewünschten Stellen im porzinen *ABCA4* Gen Doppelstrangbrüche zu erzeugen. Dort soll anschließend vom zelleigenen Reparatursystem ein Template, welches die wildtypischen exonischen Sequenzen dieses Bereiches des Gens enthält, eingebaut werden, sodass in der Zelle das funktionstüchtige Genprodukt exprimiert werden kann. (Yanik et al., 2017) Dieses Template wurde so entworfen, dass es fusioniert die Exons 42 bis 44 des porzinen *ABCA4* Gens enthält, ohne die natürlicherweise dazwischenliegenden intronischen Bereiche (siehe Abbildung 11). Auf diese wurde einerseits verzichtet, da das Template dadurch kürzer und einfacher herzustellen ist, andererseits bietet sich so die Möglichkeit, einen etwaigen Einbau dieses Templates an der gewünschten Stelle im Genom mittels PCR mit spezifischen Primern und anschließender Agarosegelelektrophorese nachzuweisen, da sich die Länge des Templates durch die fehlenden intronischen Bereiche von der Länge der ursprünglichen Sequenz an dieser Stelle unterscheidet. Die flankierenden Exons 42 und 44 sollen den zelleigenen Doppelstrangreparaturmechanismen als homologe Sequenzen dienen. Diese sind groß genug, dass das Template theoretisch sowohl durch MMEJ als auch durch HDR eingebaut werden kann (siehe 1.5). Da die im Protokoll des Kits, welches zur Herstellung des Templates verwendet wurde, vorgesehene Fehlerkorrektur in Vorarbeiten im Labor nicht funktionierte, wurde dieser Schritt bei sämtlichen in dieser Arbeit hergestellten Templates weggelassen. (Weller, 2019) Das WT-Template konnte dennoch erfolgreich transfektionsbereit hergestellt werden.

## 4.3 DNA-Editierung im MMEJ-Template

Im nächsten Schritt wurde versucht, mithilfe der hergestellten gRNA/Cas9-Plasmide das WT-Template in einen geeigneten DNA-Abschnitt einzubauen. Dies soll, im Hinblick auf die Translation in die spätere klinische Anwendung, bestenfalls mithilfe eines DNA-Doppelstrangreparaturmechanismus geschehen, der auch in Photorezeptoren auftritt. Hierfür wurde MMEJ ausgewählt. Untersuchungen haben gezeigt, dass HDR Zellzyklusabhängig auftritt und somit in postmitotischen Zellen wie Photorezeptoren kaum

vorkommt. (Pasquini et al., 2020) MMEJ ist dabei in postmitotischen Zellen stets höher ausgeprägt als HDR, auch wenn das für das in dieser Arbeit geplante Genome Editing unbrauchbare NHEJ der häufigste Weg ist. (Pasquini et al., 2020) MMEJ ist zwar weniger präzise als HDR, kann jedoch grundsätzlich ebenfalls für gezieltes Genome Editing benutzt werden. (Yanik et al., 2017)

Als Zielsequenz, in welche das WT-Template eingebaut werden sollte, wurde eigens ein Template, das sog. MMEJ-Template, entworfen. Das MMEJ-Template wird an beiden Seiten von Sequenzen flankiert, welche Homologien zum WT-Template aufweisen. Diese Homologien sind jeweils 10 bp lang, stimmen zu 100% mit den entsprechenden Vorlagen im WT-Template überein und bieten somit ideale Voraussetzungen für eine Reparatur des DSBs mit MMEJ. (McVey & Lee, 2008; Yanik et al., 2017)

Der Einbau wurde mit einem auf dem BRET-Assay beruhendem Versuch, dem sog. MMEJ-Assay, getestet. (Yanik et al., 2017) Die spezielle Version des Assays für das porcine *ABCA4* Exon 43 wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Dazu wurde das MMEJ-Template in den pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 Vektor an die gleiche Stelle kloniert wie zuvor im BRET-Assay die Target-Sequenzen, sprich zwischen die Luciferase und das GFP2 (siehe Abbildung 13a)). Das so entstandene Plasmid wird im Folgenden als „MMEJ-Template-Vektor“ bezeichnet.

Da sich im MMEJ-Template-Vektor vor dem GFP2 die Stopsequenz befindet, würde man bei alleiniger Transfektion von diesem erwarten, dass das GFP2 nicht exprimiert wird und nur die Expression der Luciferase zu messen ist. Dies konnte im Versuch bestätigt werden, der Mittelwert der BRET-Ratios der Transfektionen des MMEJ-Template unterscheidet sich nicht signifikant von dem der Luciferase ( $P = 0,9616$ ). Sofern das WT-Template am gewünschten Ort in den MMEJ-Template-Vektor eingebaut würde, würde die Stopsequenz herausfallen und das GFP2 würde exprimiert (siehe Abbildung 13b)). Somit wäre zu erwarten, dass in den Cotransfektionsansätzen von gRNA/Cas9-Plasmid, WT-Template und MMEJ-Template-Vektor eine höhere BRET-Ratio zu messen ist als in den zugehörigen Positivkontrollen, in denen das WT-Template nicht eingebaut worden sein kann, da es nicht mit transfiziert wurde. Dies war in den Ergebnissen nicht festzustellen, bei keinem der 4 Cotransfektionsansätze war die BRET-Ratio gegenüber der Positivkontrolle signifikant höher, somit wurde das WT-Template von keinem der Konstrukte an der gewünschten Stelle eingebaut. Bei G9 gab es zwar einen signifikanten Unterschied zwischen Cotransfektion (mit WT-Template) und Positivkontrolle, die BRET-Ratio hat jedoch abgenommen, bei einem Einbau des Templates an der gewünschten

Stelle hätte sie zunehmen müssen (siehe oben). Evtl. ist der signifikante Unterschied damit zu erklären, dass das WT-Template an einer anderen Stelle im MMEJ-Template eingebaut wurde, was zur Verminderung der Expression der Luciferase geführt hat. Dies könnte man ggf. mithilfe einer Sequenzierung nachweisen.

Dass das WT-Template nicht an der gewünschten Stelle im MMEJ-Template eingebaut wurde, könnte damit zu erklären sein, dass die Exonukleaseaktivität von MMEJ nicht weit genug reicht, um die DNA vom DSB aus in beide Richtungen bis zu den homologen Sequenzen zu prozessieren. In der Literatur gibt es kaum Untersuchungen, die zeigen, wie viele Basenpaare die Exonukleaseaktivität von MMEJ und NHEJ speziell in HEK293-T-Zellen umfasst. Neuere Untersuchungen legen nahe, dass die DNA-Enden beim NHEJ, abhängig von dem genauen Schaden, den die Endonuklease erzeugt hat, häufig kaum prozessiert und die Enden direkt wieder ligiert werden, wobei oft sogar gar keine Insertionen oder Deletionen entstehen. (Stinson et al., 2020) Dies würde den Einbau des Templates durch MMEJ verhindern, da dazu die Enden bis zu den homologen Bereichen prozessiert werden müssten. Interessant wäre daher nicht nur zu wissen, wie schneideaktiv die in dieser Arbeit verwendeten gRNA/Cas9-Komplexe sind, was im BRET-Assay getestet wurde (siehe 3.3), sondern welche genaue Sequenzveränderung durch den DSB und die anschließende Reparatur an den Targetstellen hervorgerufen wird. Mit Verfahren wie TIDE/TIDER oder NGS könnte dies zusätzlich überprüft werden. (Bell et al., 2014; Brinkman & van Steensel, 2019)

Lösungsstrategien, um einen Einbau des Templates zu erreichen, könnten sein, entweder mehrere der 4 Guides zusammen zu transfizieren, sodass an mehreren Stellen gleichzeitig Doppelstrangbrüche erzeugt werden oder anstatt einem langen MMEJ-Template mehrere kürzere zu designen, welche nicht alle 4 Targetsequenzen gleichzeitig enthalten, sondern jeweils lediglich eine. In beiden Fällen dürfte die die Exonukleaseaktivität der DSB-Reparaturmechanismen kürzer ausfallen, um die homologen Bereiche zu erreichen.

Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse des MMEJ-Assays, dass sich keine BRET-Ratio der Positivkontrollen (Transfektion von MMEJ-Template-Vektor und gRNA/Cas9-Plasmid) signifikant von der BRET-Ratio des MMEJ-Target-Templates unterscheidet. Damit wurde sichergestellt, dass das alleinige Erzeugen eines DSBs ohne Einbau des MMEJ-Templates noch nicht zu einem Herausfallen der Stopsequenz führt. Dies stützt noch einmal die oben aufgestellte These, dass die Exonukleaseaktivität der hier auftretenden DNA-Doppelstrangreparaturmechanismen nur wenige Basenpaare umfasst.

## 4.4 Ausblick

Der nächste nun folgende Schritt wird sein, das MMEJ-Template mit den in 4.3 vorgeschlagenen Anregungen so zu optimieren, dass ein Einbau des WT-Template mit dem MMEJ-Assay nachgewiesen werden kann. Sobald dies gelingt, kann versucht werden, mittels der in dieser Arbeit hergestellten und geprüften gRNA/Cas9-Komplexe das WT-Template *in vitro* in das Genom porziner Zellen (z.B. PK15-Zellen) einzubauen und dies anschließend auf DNA-Ebene mittels PCR (siehe 4.2) oder Sequenzierung und auf Proteinebene mittels Western-Blots nachzuweisen. Ab hier muss stets die Off-Target-Aktivität der Cas-Endonuklease kontrolliert und minimiert werden (siehe 1.4).

Anschließend soll diese Strategie so verbessert werden, dass sie auch in porzinen Photorezeptoren gelingt. Eine Herausforderung dabei wird sein, die Aktivität von HDR und MMEJ in Photorezeptoren hochzuregulieren und so für das GE effizienter zu machen. (Pasquini et al., 2020; Stieger et al., 2022; Yanik et al., 2017)

Von der Arbeitsgruppe wurde während der Anfertigung dieser Dissertation ein Schweinemodell mit einer auf Exon 43 lokalisierten Mutation (siehe 1.1) generiert. (*DFG - GE-PRIS - Therapeutische Genomeditierung Als Behandlungsform Für Morbus Stargardt - Herstellung Und Phänotypisierung Eines Schweinemodells Und Entwicklung Eines Behandlungsansatzes*, n.d.) Sollten die Vorarbeiten hierzu gelingen, kann versucht werden, diese Mutation mit den in dieser Arbeit hergestellten Konstrukten *in vivo* zu therapieren. Schließlich gilt es all das vom Schweinemodell auf den Menschen zu übertragen. Das porcine *ABCA4* Gen weist zwar eine sehr hohe, jedoch keine 100%ige Übereinstimmung zum humanen Pendant auf (siehe 1.1).

Bis STGD1 beim Menschen mit der CRISPR/Cas Genome Editing Strategie zuverlässig, sicher und nebenwirkungsarm therapiert werden kann, ist somit noch viel Forschungsanstrengung notwendig.

## 5 Zusammenfassung

STGD1 ist eine der häufigsten genetisch bedingten Ursachen für Sehbehinderung. Verursacht durch autosomal rezessiv vererbte Mutationen im *ABCA4* Gen kommt es zur Akkumulation von toxischen Produkten im retinalen Pigmentepithel und damit letztlich zu einer zunehmenden Einschränkung der Sehkraft beider Augen. Bisher gibt es keine klinisch zugelassene kausale Therapie. Eine der für STGD1 verantwortlichen humanpathogenen Mutationen liegt im Exon 43 des *ABCA4* Gens. Mithilfe von Genome Editing ist es theoretisch möglich, diese ursächlich zu therapieren. Dabei wird zunächst mit einer Endonuklease, in dieser Arbeit CRISPR/Cas9, ein Doppelstrangbruch in der Nähe der Mutation erzeugt. Die Cas9 Endonuklease braucht dazu eine effektive guideRNA, welche sie spezifisch zu der gewünschten Stelle (sog. Targetstelle) im Genom führt. Der erzeugte Doppelstrangbruch soll dann von den zelleigenen Reparaturmechanismen unter Nutzung eines DNA-Templates, welches das entsprechende wildtypische DNA-Fragment des Gens enthält, so repariert werden, dass am Ende die wildtypische Sequenz des Gens im Genom vorliegt und das funktionstüchtige Genprodukt von der Zelle hergestellt werden kann. In dieser Arbeit wurde am Schweinemodell (*Sus Scrofa*) gearbeitet, d.h. es wurden die porzinen Sequenzen des *ABCA4* Gens verwendet. Es konnten zunächst 10 verschiedene Plasmide, sog. gRNA/Cas9-Plasmide, welche die codierenden Sequenzen sowohl für gRNAs als auch für die Cas9-Enzyme enthalten, generiert werden. Die zugehörigen Targetsequenzen der gRNAs lagen dabei in den intronischen Bereichen um das Exon 43 des porzinen *ABCA4* Gens. Anschließend wurden die gRNA/Cas9-Plasmide mit einem sog. BRET-Assay auf ihre Schneideaktivität *in vitro* überprüft. Dabei zeigte sich, dass 6 der 10 Plasmide eine signifikante Schneideaktivität besitzen, mit 4 davon wurde weitergearbeitet. Parallel dazu wurde ein Template entworfen und hergestellt, welches aneinandergereiht die wildtypischen Sequenzen der Exons 42, 43 und 44 des porzinen *ABCA4* Gens enthält. Zudem wurde ein zweites Template (MMEJ-Template) entworfen und in das BRET-Reporter-System integriert werden. Anschließend wurde versucht, mithilfe der gRNAs und dem Cas9 Enzym die DNA-Sequenz des WT-Templates in das MMEJ-Template einzubauen und dies anschließend mit einem sog. MMEJ-Assay zu überprüfen. Es zeigte sich, dass kein Einbau des WT-Templates stattgefunden hatte. Gründe und Lösungsstrategien hierfür wurden diskutiert.

## 6 Summary

STGD1 is one of the most common genetic causes of visual impairment. Caused by autosomal recessive mutations in the *ABCA4* gene, toxic products accumulate in the retinal pigment epithelium and ultimately lead to an increasing restriction of vision in both eyes. So far, there is no clinically approved causal therapy. One of the human pathogenic mutations responsible for STGD1 is located in exon 43 of the *ABCA4* gene. With the help of Genome Editing, it is theoretically possible to treat these mutations causally. Therefore, an endonuclease, in this work CRISPR/Cas9, is used to generate a double-strand break near the mutation in the gene. To do this, the Cas9 endonuclease needs an effective guideRNA, which guides it specifically to the desired site (so-called target site) in the genome. The generated double-strand break is then to be repaired by the cell's own repair mechanisms using a DNA template containing the corresponding wildtype DNA fragment of the gene, in such a way that in the end the wild-typical sequence of the gene is present in the genome and the functional gene product can be produced by the cell. In this work, the porcine sequences of the *ABCA4* gene were used. Initially, 10 different plasmids, so-called gRNA/Cas9-plasmids, which contain the coding sequences for both gRNAs and Cas9 enzymes, could be generated. The corresponding target sequences of the gRNAs were located in the intronic regions around exon 43 of the porcine *ABCA4* gene. Subsequently, the gRNA/Cas9-plasmids were tested for their cleavage activity *in vitro* using a so-called BRET-Assay. The results showed that 6 of the 10 plasmids have significant cutting activity, 4 of them were used for further work. At the same time, a template was designed and produced, which contains the wildtype sequences of the exons 42, 43 and 44 of the porcine *ABCA4* gene. In addition, a second template (MMEJ-template) was designed and integrated into the BRET reporter system. Subsequently, an attempt was made to incorporate the DNA sequence of the wildtype-template into the MMEJ-template with the help of the gRNAs and the Cas9 enzyme and then to check this with a so-called MMEJ-assay. It turned out that no installation of the wild-type template had taken place. Reasons and solution strategies for this were discussed.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
3'	Position der OH-Gruppe
5'	Position des Phosphatrestes
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
bp	Basenpaare
BRET	Biolumineszenz Resonanz Energietransfer
Cas	CRISPR associated (protein)
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Et al.	und andere
FKS	Fetales Kälberserum
FR	Frameshift-Ratio
g	Gramm
GE	Genome Editing
gRNA	guideRNA
h	Stunde(n)
HEK	Human Embryonic Kidney (Cells)
HDR	Homology-directed repair
k	Kilo
kB	Kilobasen
L	Liter
LB	Luria Broth
M	molar (mol/L)
m	Milli
min	Minute(n)
ml	Milliliter

μ	Mikro
MMEJ	Microhomology-mediated end joining
MMEJ-Template	ABCA4 MMEJ Target DNA Template
NGS	Next Generation Sequencing
NHEJ	Non-homologous end joining
Nr.	Nummer
nt	Nukleotide
n.d.	nicht detektierbar
PAM	Protospacer adjacent motif
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PBS	phosphate buffered saline
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SpCas9	Cas9-Endonuklease des <i>streptococcus pyogenes</i>
STGD1	Stargardt Disease 1
VCM	Visual Cycle Modulator
v/v	volume/volume
WT-Template	Wildtyp-Template
w/v	weight/volume

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der DNA-Reparaturmechanismen NHEJ, HDR und MMEJ.....	6
Abbildung 2: Messung der Schneideaktivität der einzelnen gRNAs.....	12
Abbildung 3: Vektorkarte des px459 (pU6-BbsI/BbsI)-CBA-Cas9) mit den beiden Schnittstellen des verwendeten Restriktionsenzym BbsI. ( <a href="https://www.addgene.org/48139/">https://www.addgene.org/48139/</a> ).....	18
Abbildung 4: Vektorkarte des pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 mit den beiden Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme AvrII und BsiWI. ....	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung des mutierten Exon 43 des porzinen ABCA4 Gens.....	37

Abbildung 6: Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Sequenzierung des Klons von gRNA/Cas9-Plasmid 5 .....	39
Abbildung 7: Ausschnitt aus dem Chromatogramm der Sequenzierung des Klons von Target-Plasmid 1. ....	39
Abbildung 8: Unterm Fluoreszenzmikroskop mit grünem Filter aufgenommene Bilder der adhärenen HEK293-T-Zellen, welche mit den einzelnen Target-Plasmiden (Positivkontrollen) bzw. dem GFP transfiziert wurden. ....	41
Abbildung 9: Graphische Darstellung der Ergebnisse des BRET-Assays. ....	42
Abbildung 10: Graphische Darstellung der Frameshift-Ratios der verschiedenen gRNA/Cas9-Plasmide .....	44
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Wildtyp Templates. ....	45
Abbildung 12: Agarosegelelektrophoresen zur Synthese des Wildtyp Templates. ....	46
Abbildung 13: Schematische Darstellung des MMEJ-Assays .....	49
Abbildung 14: Graphische Darstellung der Ergebnisse des MMEJ-Assays. ....	50

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte .....	14
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien .....	16
Tabelle 3: Verwendete Antibiotika .....	17
Tabelle 4: Verwendete Restriktionsenzyme .....	17
Tabelle 5: Andere verwendete Enzyme .....	18
Tabelle 6: Verwendete DNA-Größenstandards .....	18
Tabelle 7: Verwendete Kit-Systeme .....	20
Tabelle 8: Bei Klonierungen verwendete E.coli Stämme .....	20
Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide für Target-Sequenzen .....	21
Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide für guideRNA-Sequenzen .....	22
Tabelle 11: Verwendete Sequenzierprimer .....	23
Tabelle 12: Oligonukleotide zur Herstellung des synthetischen WT-Templates .....	23
Tabelle 13: Oligonukleotide zur Herstellung des MMEJ-Templates .....	24
Tabelle 14: Verwendete Puffer .....	26
Tabelle 15: Verwendete Software .....	27
Tabelle 16: Mit dem „CRISPR gRNA Design tool“ ermittelte Oligonukleotide für Targetsequenzen in Intron 42 des porzinen ABCA4 Gens .....	37

Tabelle 17: Mit dem „CRISPR gRNA Design tool“ ermittelte Oligonukleotide für Targetsequenzen in Intron 43 des porzinen ABCA4 Gens .....	38
Tabelle 18: Numerische Darstellung der Ergebnisse des BRET-Assays .....	43
Tabelle 19: Numerische Darstellung der Frameshift-Ratios der verschiedenen gRNA/Cas9-Plasmide .....	45
Tabelle 20: Numerische Darstellung der Ergebnisse des MMEJ-Assays nach Transfektion der HEK293-T-Zellen mit gRNA/Cas9-Plasmiden, WT-Template, MMEJ-Template und der Luciferase .....	51
Tabelle 21: Basenabfolge des WT-Templates .....	73
Tabelle 22: Basenabfolge des MMEJ-Templates .....	74

## 10 Literaturverzeichnis

- Albert, S., Garanto, A., Sangermano, R., Khan, M., Bax, N. M., Hoyng, C. B., Zernant, J., Lee, W., Allikmets, R., Collin, R. W. J., & Cremers, F. P. M. (2018). Identification and Rescue of Splice Defects Caused by Two Neighboring Deep-Intronic ABCA4 Mutations Underlying Stargardt Disease. *The American Journal of Human Genetics*, *102*(4), 517–527. <https://doi.org/10.1016/J.AJHG.2018.02.008>
- Bacart, J., Corbel, C., Jockers, R., Bach, S., & Couturier, C. (2008). The BRET technology and its application to screening assays. *Biotechnology Journal*, *3*(3), 311–324. <https://doi.org/10.1002/BIOT.200700222>
- Bainbridge, J. W. B., Tan, M. H., & Ali, R. R. (2006). Gene therapy progress and prospects: the eye. *Gene Therapy* *2006 13:16*, *13*(16), 1191–1197. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302812>
- Baldermann, C., Berking, C., Ulrich, C., Breitbart, E., Bunde, H., Volkmer, B., Janßen, W., Baldermann, C., Weiskopf, D., Grimm, F., Keller, B., Kakkassery, V., von Kiedrowski, R., Stavermann, T., Schlette, S., Kessel, T. M., Berneburg, M., Höger, P., Fartasch, M., ... Schäfermeyer, D. (2022). UV-Schutz-Bündnis in Deutschland – Zweck und Ziele. *Der Ophthalmologe*, *119*(3), 223. <https://doi.org/10.1007/S00347-021-01543-W>
- Bell, C. C., Magor, G. W., Gillinder, K. R., & Perkins, A. C. (2014). A high-throughput screening strategy for detecting CRISPR-Cas9 induced mutations using next-generation sequencing. *BMC Genomics*, *15*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-1002/FIGURES/3>

- Berns, K. I., & Giraud, C. (1996). Biology of adeno-associated virus. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 218, 1–23. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-80207-2\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-80207-2_1)
- Brinkman, E. K., & van Steensel, B. (2019). Rapid Quantitative Evaluation of CRISPR Genome Editing by TIDE and TIDER. *Methods in Molecular Biology*, 1961, 29–44. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9170-9\\_3/FIGURES/3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9170-9_3/FIGURES/3)
- Burnett, J. C., & Rossi, J. J. (2012). RNA-Based Therapeutics: Current Progress and Future Prospects. *Chemistry & Biology*, 19(1), 60–71. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMBIOL.2011.12.008>
- Chandrasegaran, S., & Carroll, D. (2016). Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. *Journal of Molecular Biology*, 428(5), 963–989. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2015.10.014>
- Chang, H. H. Y., Pannunzio, N. R., Adachi, N., & Lieber, M. R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2017 18:8, 18(8), 495–506. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.48>
- Choi, E. H., Suh, S., Foik, A. T., Leinonen, H., Newby, G. A., Gao, X. D., Banskota, S., Hoang, T., Du, S. W., Dong, Z., Raguram, A., Kohli, S., Blackshaw, S., Lyon, D. C., Liu, D. R., & Palczewski, K. (2022). In vivo base editing rescues cone photoreceptors in a mouse model of early-onset inherited retinal degeneration. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29490-3>
- Cremers, F. P. M., Lee, W., Collin, R. W. J., & Allikmets, R. (2020). Clinical spectrum, genetic complexity and therapeutic approaches for retinal disease caused by ABCA4 mutations. *Progress in Retinal and Eye Research*, 79, 100861. <https://doi.org/10.1016/J.PRETEYERES.2020.100861>
- CRISPR gRNA Design Tool | ATUM - ATUM. (n.d.). Retrieved March 18, 2023, from <https://www.atum.bio/catalog/vectors/grna-design>
- Deng, S. K., Gibb, B., De Almeida, M. J., Greene, E. C., & Symington, L. S. (2014). RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks. *Nature Structural & Molecular Biology* 2014 21:4, 21(4), 405–412. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2786>
- DFG - GEPRIS - Therapeutische Genomeditierung als Behandlungsform für Morbus Stargardt - Herstellung und Phänotypisierung eines Schweinmodells und

- Entwicklung eines Behandlungsansatzes.* (n.d.). Retrieved November 30, 2022, from <https://gepris.dfg.de/gepris/projekt/412915769?context=projekt&task=showDetail&id=412915769&>
- Dhurandhar, D., Sahoo, N. K., Mariappan, I., & Narayanan, R. (2021). Gene therapy in retinal diseases: A review. *Indian Journal of Ophthalmology*, *69*(9), 2257. [https://doi.org/10.4103/IJO.IJO\\_3117\\_20](https://doi.org/10.4103/IJO.IJO_3117_20)
- Doench, J. G., Hartenian, E., Graham, D. B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B. L., Xavier, R. J., & Root, D. E. (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nature Biotechnology* *2014 32:12*, *32*(12), 1262–1267. <https://doi.org/10.1038/nbt.3026>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213). [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1258096/ASSET/2313E70A-5C58-4755-A0E6-2E64EE240A09/ASSETS/GRAPHIC/346\\_1258096\\_F6.JPEG](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1258096/ASSET/2313E70A-5C58-4755-A0E6-2E64EE240A09/ASSETS/GRAPHIC/346_1258096_F6.JPEG)
- Han, Z., Conley, S. M., & Naash, M. I. (2014). Gene therapy for stargardt disease associated with ABCA4 gene. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *801*, 719–724. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3209-8\\_90/COVER](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3209-8_90/COVER)
- Heyer, W. D., Ehmsen, K. T., & Liu, J. (2010). Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annual Review of Genetics*, *44*, 113. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENET-051710-150955>
- Horvath, P., & Barrangou, R. (2010). CRISPR/Cas, the immune system of Bacteria and Archaea. *Science*, *327*(5962), 167–170. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1179555/SUPPL\\_FILE/167\\_THUMB.JPG](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1179555/SUPPL_FILE/167_THUMB.JPG)
- Jiang, F. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Article in Annual Review of Biophysics*. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, *337*(6096), 816–821. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1225829/SUPPL\\_FILE/JINEK.SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1225829/SUPPL_FILE/JINEK.SM.PDF)
- Kaji, E. H., & Leiden, J. M. (2001). Gene and Stem Cell Therapies. *JAMA*, *285*(5), 545–550. <https://doi.org/10.1001/JAMA.285.5.545>
- Kakarougkas, A., & Jeggo, P. A. (2014). DNA DSB repair pathway choice: An orchestrated handover mechanism. *British Journal of Radiology*, *87*(1035).

<https://doi.org/10.1259/BJR.20130685/ASSET/IM-AGES/LARGE/BJR.20130685.G004.JPEG>

- Keeler, A. M., & Flotte, T. R. (2019). Recombinant Adeno-Associated Virus Gene Therapy in Light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where Are We, and How Did We Get Here? *Annual Review of Virology*, 6(1), 601. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-092818-015530>
- Kellner, U., Renner, A. B., Herbst, S. M., Kellner, S., Weinitz, S., Weber, B. H. F., Jonescu-Cuypers, C., Kellner, B. U., Meltendorf, C., Schlote, T., & Steffen, H. (2012). Hereditäre Netzhautdystrophien Augenheilkunde up2date Augenheilkunde up2date. *Klin Monatsbl Augenheilkd*, 229, 171–196. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1280461>
- Kjellström, U. (2014). Association between genotype and phenotype in families with mutations in the ABCA4 gene. *Molecular Vision*, 20, 89. [/pmc/articles/PMC3892680/](https://doi.org/10.1167/10.1055/s-0031-1280461)
- Konstantakos, V., Nentidis, A., Krithara, A., & Paliouras, G. (2022). CRISPR–Cas9 gRNA efficiency prediction: an overview of predictive tools and the role of deep learning. *Nucleic Acids Research*, 50(7), 3616–3637. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC192>
- Kuan, V., Warwick, A., Hingorani, A., Tufail, A., Cipriani, V., Burgess, S., Sofat, R., (IAMDGC), I. A. G. C., Fritsche, L. G., Igl, W., Bailey, J. N. C., Grassmann, F., Sengupta, S., Bragg-Gresham, J. L., Burdon, K. P., Hebbbring, S. J., Wen, C., Gorski, M., Kim, I. K., ... Heid, I. M. (2021). Association of Smoking, Alcohol Consumption, Blood Pressure, Body Mass Index, and Glycemic Risk Factors With Age-Related Macular Degeneration: A Mendelian Randomization Study. *JAMA Ophthalmology*, 139(12), 1299–1306. <https://doi.org/10.1001/JAMAOPHTHALMOL.2021.4601>
- Lee, J., Chung, J. H., Kim, H. M., Kim, D. W., & Kim, H. (2016). Designed nucleases for targeted genome editing. *Plant Biotechnology Journal*, 14(2), 448–462. <https://doi.org/10.1111/PBI.12465>
- Li, K., Wang, G., Andersen, T., Zhou, P., & Pu, W. T. (2014). Optimization of Genome Engineering Approaches with the CRISPR/Cas9 System. *PLOS ONE*, 9(8), e105779. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0105779>

- Lieber, M. R. (2008). The mechanism of human nonhomologous DNA End joining. *Journal of Biological Chemistry*, 283(1), 1–5. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700039200>
- Lieber, M. R. (2010). The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End Joining Pathway. *Annual Review of Biochemistry*, 79, 181. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BIOCHEM.052308.093131>
- Liu, G., Zhang, Y., & Zhang, T. (2020). Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 35–44. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2019.11.006>
- Mahfouz, M. M., Piatek, A., & Stewart, C. N. (2014). Genome engineering via TALENs and CRISPR/Cas9 systems: challenges and perspectives. *Plant Biotechnology Journal*, 12(8), 1006–1014. <https://doi.org/10.1111/PBI.12256>
- Manghwar, H., Li, B., Ding, X., Hussain, A., Lindsey, K., Zhang, X., Jin, S., Manghwar, H., Li, B., Ding, X., Hussain, A., Zhang, X., Jin, S., & Lindsey, K. (2020). CRISPR/Cas Systems in Genome Editing: Methodologies and Tools for sgRNA Design, Off-Target Evaluation, and Strategies to Mitigate Off-Target Effects. *Advanced Science*, 7(6), 1902312. <https://doi.org/10.1002/ADVS.201902312>
- McVey, M., & Lee, S. E. (2008). MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends in Genetics*, 24(11), 529–538. <https://doi.org/10.1016/J.TIG.2008.08.007>
- Miedziak, A. I., Perski, T., Andrews, P. P., & Donoso, L. A. (2000). Stargardt's macular dystrophy--a patient's perspective. *Optometry (St. Louis, Mo.)*, 71(3), 165–176. <https://europepmc.org/article/med/10970260>
- Molday, R. S., Garces, F. A., Scortecci, J. F., & Molday, L. L. (2022). Structure and function of ABCA4 and its role in the visual cycle and Stargardt macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 89. <https://doi.org/10.1016/J.PRET-EYERES.2021.101036>
- Pasquini, G., Cora, V., Swiersy, A., Achberger, K., Antkowiak, L., Müller, B., Wimmer, T., Fraschka, S. A. K., Casadei, N., Ueffing, M., Liebau, S., Stieger, K., & Busskamp, V. (2020). Using Transcriptomic Analysis to Assess Double-Strand Break Repair Activity: Towards Precise in Vivo Genome Editing. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 1380, 21(4), 1380. <https://doi.org/10.3390/IJMS21041380>

- Piotter, E., McClements, M. E., & Maclaren, R. E. (2021). Therapy Approaches for Stargardt Disease. *Biomolecules* 2021, Vol. 11, Page 1179, 11(8), 1179. <https://doi.org/10.3390/BIOM11081179>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* 2013 8:11, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Ren, X., Yang, Z., Xu, J., Sun, J., Mao, D., Hu, Y., Yang, S. J., Qiao, H. H., Wang, X., Hu, Q., Deng, P., Liu, L. P., Ji, J. Y., Li, J. B., & Ni, J. Q. (2014). Enhanced Specificity and Efficiency of the CRISPR/Cas9 System with Optimized sgRNA Parameters in Drosophila. *Cell Reports*, 9(3), 1151–1162. <https://doi.org/10.1016/J.CEL-REP.2014.09.044>
- Röck, T., Schatz, A., Naycheva, L., Gosheva, M., Pach, J., Wilhelm, B., Peters, T., Bartz-Schmidt, K. U., Zrenner, E., Willmann, G., & Gekeler, F. (2013). Effects of transcorneal electrical stimulation in patients with Stargardt’s disease. *Ophthalmologie*, 110(1), 68–74. <https://doi.org/10.1007/S00347-012-2749-Y/FIGURES/1>
- Ruan, G. X., Barry, E., Yu, D., Lukason, M., Cheng, S. H., & Scaria, A. (2017). CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing as a Therapeutic Approach for Leber Congenital Amaurosis 10. *Molecular Therapy*, 25(2), 331–341. <https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2016.12.006>
- Russell, S., Bennett, J., Wellman, J. A., Chung, D. C., Yu, Z. F., Tillman, A., Wittes, J., Pappas, J., Elci, O., McCague, S., Cross, D., Marshall, K. A., Walshire, J., Kehoe, T. L., Reichert, H., Davis, M., Raffini, L., George, L. A., Hudson, F. P., ... Maguire, A. M. (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, 390(10097), 849–860. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31868-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31868-8)
- Scholl, H. P., DeBartolomeo, G., Washington, I., & Saad, L. (2022). ALK-001 (C20-D3-Vitamin A) slows the growth of atrophic lesions in ABCA4-related Stargardt Disease: Results of a Phase 2 placebo-controlled clinical trial (TEASE study). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 63(7), 38–38.
- Sentmanat, M. F., Peters, S. T., Florian, C. P., Connelly, J. P., & Pruett-Miller, S. M. (2018). A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19441-8>

- Siles, L., Ruiz-Nogales, S., Navinés-Ferrer, A., Méndez-Vendrell, P., & Pomares, E. (2023). *Efficient correction of ABCA4 variants by CRISPR-Cas9 in hiPSCs derived from Stargardt disease patients*. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.02.032>
- Slymaker, I. M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D. A., Yan, W. X., & Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, *351*(6268), 84–88. [https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD5227/SUPPL\\_FILE/SLAYMAKER-SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD5227/SUPPL_FILE/SLAYMAKER-SM.PDF)
- Smirnikhina, S. A., Anuchina, A. A., & Lavrov, A. V. (2018). Ways of improving precise knock-in by genome-editing technologies. *Human Genetics* *2018 138:1*, *138*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/S00439-018-1953-5>
- Sofi, F., Sodi, A., Franco, F., Murro, V., Biagini, D., Miele, A., Abbruzzese, G., Mucciolo, D. P., Virgili, G., Menchini, U., Casini, A., & Rizzo, S. (2016). Dietary profile of patients with Stargardt’s disease and Retinitis Pigmentosa: Is there a role for a nutritional approach? *Retina. BMC Ophthalmology*, *16*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/S12886-016-0187-3/FIGURES/3>
- Stieger, K., Knapp, M., Götzmann, D., Janise-Libawski, A., Gill, B., Fühler, B., Wimmer, T., & Müller, B. (2022). Increasing the amount of template favors HDR mediated DSB repair in photoreceptors in vivo following AAV mediated gene transfer. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *63*(7), 1116–1116.
- Stingl, K., Hoyng, C., Kempf, M., Kohl, S., Jung, R., Righetti, G., Kühlewein, L., Pohl, L., Kortüm, F., Kelbsch, C., Wilhelm, B., Peters, T., Stingl, K., Wheeler-Schilling, T., Diether, S., Klein, W., Mirow, R., Smerud, K., Jungmann, O., ... Möller, P. (2022). Evaluation of Local Rod and Cone Function in Stargardt Disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *63*(3), 6–6. <https://doi.org/10.1167/IOVS.63.3.6>
- Stinson, B. M., Moreno, A. T., Walter, J. C., & Loparo, J. J. (2020). A Mechanism to Minimize Errors during Non-homologous End Joining. *Molecular Cell*, *77*(5), 1080-1091.e8. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2019.11.018>
- Tanna, P., Strauss, R. W., Fujinami, K., & Michaelides, M. (2017). Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *British Journal of Ophthalmology*, *101*(1), 25–30. <https://doi.org/10.1136/BJOPHTHALMOL-2016-308823>
- Tessitore, A., Parisi, F., Denti, M. A., Allocca, M., Di Vicino, U., Domenici, L., Bozzoni, I., & Auricchio, A. (2006). Preferential silencing of a common dominant

- rhodopsin mutation does not inhibit retinal degeneration in a transgenic model. *Molecular Therapy*, 14(5), 692–699.  
<https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2006.07.008>
- van Haasteren, J., Li, J., Scheideler, O. J., Murthy, N., & Schaffer, D. V. (2020). The delivery challenge: fulfilling the promise of therapeutic genome editing. *Nature Biotechnology* 2020 38:7, 38(7), 845–855. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0565-5>
- Wang, D., & Gao, G. (2014). STATE-OF-THE-ART HUMAN GENE THERAPY: PART II. GENE THERAPY STRATEGIES AND APPLICATIONS. *Discovery Medicine*, 18(98), 151. /pmc/articles/PMC4440458/
- Wang, T., Wei, J. J., Sabatini, D. M., & Lander, E. S. (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 343(6166), 80–84.  
[https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1246981/SUPPL\\_FILE/WANG.SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1246981/SUPPL_FILE/WANG.SM.PDF)
- Weller, M. (2019). “CRISPR/Cas9 mediated repair of the murine *Cln3*  $\Delta$ Ex7-8 gene in vitro.”
- Wimmer, T. (2018). *Entwicklung eines Systems zur Kontrolle des „Vascular Endothelial Growth Factor“ Spiegels im Auge.*
- Wimmer, T., Bonthu, D., Moeschl, V., Kleekamp, P., Thiel, C., Lytvynchuk, L., Ellinwood, M., & Stieger, K. (2021). A Bioluminescence Resonance Energy Transfer–Based Reporter System: Characterization and Applications. <https://Home.Liebertpub.Com/Crispr>, 4(6), 884–895.  
<https://doi.org/10.1089/CRISPR.2021.0023>
- Wimmer, T., Sawinski, H., Urban, A. M., Motlik, J., & Stieger, K. (2023). Rapid and Reliable Quantification of Prime Editing Targeting Within the Porcine ABCA4 Gene Using a Bioluminescence Resonance Energy Transfer-Based Sensor. <https://Home.Liebertpub.Com/Nat>. <https://doi.org/10.1089/NAT.2022.0037>
- Wittkowski, B., & Krause, L. (2010). Morbus Stargardt. *Klinische Monatsblätter Für Augenheilkunde*, 227(S 02), V13. <https://doi.org/10.1055/S-0030-1267567>
- Wong, N., Liu, W., & Wang, X. (2015). WU-CRISPR: Characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system. *Genome Biology*, 16(1), 1–8.  
<https://doi.org/10.1186/S13059-015-0784-0/FIGURES/4>
- Xiao, Q., Min, T., Ma, S., Hu, L., Chen, H., & Lu, D. (2018). Intracellular generation of single-strand template increases the knock-in efficiency by combining

- CRISPR/Cas9 with AAV. *Molecular Genetics and Genomics*, 293(4), 1051–1060.  
<https://doi.org/10.1007/S00438-018-1437-2/FIGURES/5>
- Yang, Y. P., Hsiao, Y. J., Chang, K. J., Foustine, S., Ko, Y. L., Tsai, Y. C., Tai, H. Y., Ko, Y. C., Chiou, S. H., Lin, T. C., Chen, S. J., Chien, Y., & Hwang, D. K. (2022). Pluripotent Stem Cells in Clinical Cell Transplantation: Focusing on Induced Pluripotent Stem Cell-Derived RPE Cell Therapy in Age-Related Macular Degeneration. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 13794, 23(22), 13794. <https://doi.org/10.3390/IJMS232213794>
- Yanik, M., Müller, B., Song, F., Gall, J., Wagner, F., Wende, W., Lorenz, B., & Stieger, K. (2017). In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies. *Progress in Retinal and Eye Research*, 56, 1–18.  
<https://doi.org/10.1016/J.PRETEYERES.2016.09.001>
- Yu, W., & Wu, Z. (2018). In Vivo applications of CRISPR-based genome editing in the retina. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(MAY), 53.  
<https://doi.org/10.3389/FCELL.2018.00053/BIBTEX>
- Zernant, J., Xie, Y. A. ngela, Ayuso, C., Riveiro-Alvarez, R., Lopez-Martinez, M. A., Simonelli, F., Testa, F., Gorin, M. B., Strom, S. P., Bertelsen, M., Rosenberg, T., Boone, P. M., Yuan, B., Ayyagari, R., Nagy, P. L., Tsang, S. H., Gouras, P., Colli-son, F. T., Lupski, J. R., ... Allikmets, R. (2014). Analysis of the ABCA4 genomic locus in Stargardt disease. *Human Molecular Genetics*, 23(25), 6797–6806.  
<https://doi.org/10.1093/HMG/DDU396>

# 11 Anhang

## 11.1 Basenabfolge des Wildtyp-Templates

In Tabelle 21 ist die genaue Basenabfolge des Wildtyp-Templates (WT-Template) dargestellt.

**Tabelle 21: Basenabfolge des WT-Templates**

<b>Basenabfolge (5'-3')</b>
ATCTACCCAGGCGCGTCCAGCCC GGCGGTGGACAGGCTGTGCGTGG
GAGTCCGGCCCCGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAACGGAGC
TGGCAAACGACCACGTTCAAGATGCTCACTGGGGACACCACAGTG
ACCTCAGGAGATGCCACCGTAGCAGGCAAGAGTATTTAACCAATA
TTGCTGACGTCCATCAAAGCATGGGCTACTGTCCGCAGTTTGATGCC
ATCGACGACCTGCTTACAGGGCGAGAACATCTCCACCTTTACGCACG
GCTTCGGGGTGTGCCAGCCGAGGAAATCAAGAGG

## 11.2 Basenabfolge des MMEJ-Templates

In Tabelle 22 ist die genaue Basenabfolge und der genaue Aufbau des MMEJ-Templates dargestellt. Ganz außen befinden sich auf beiden Seiten Schnittstellen für das Restriktionsenzym *EcoRI* (1), innen davon die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *AvrII* (2) und *BsiWI* (3). Weiter innen davon befinden sich die jeweils 10 bp langen homologen Sequenzen zum WT-Template (4). In der Mitte des Templates befinden sich die 4 Targetsequenzen der im BRET-Assay ausgewählten gRNA/Cas9-Plasmide, sprich T1, T5, T9 und T10 (6), dazwischen wurden intronische Sequenzen aus dem porzinen *ABCA4* Gen gesetzt (5). Zudem befindet sich eine Stopsequenz (7) im Template. Diese enthält dreimal das Stopcodon TGA mit jeweils einer Base dazwischen, sodass sich in jedem Frame des Templates ein Stopcodon befindet.

**Tabelle 22: Basenabfolge des MMEJ-Templates**

<b>Basenabfolge (5'-3')</b>
AAT (1)
CCTAGG (2)
ATCTACCCAG (4)
TCCAGGCTGGCACGGGTCTCTCAGGTGTCTCCA (5)
GTGATGAGCTTCTGTCCGTCTGG (6)
GTGGAGAGGAGATGCACAAGAGAAAGACAGAAGCTTGTCAG (5)
CCCGTGCGTCGCACACACGCGGG (6)
GAGCTGCCGGACCTGAGGGGGTGGTTACACGCGGTGGGATTTACCATGAG (5)
ACCTCAGGGCAGCGTTCACGTGG (6)
GACATGTCCGATGCCCAGAAGGTCAAACCAGGCTAGAAAGGAACTATGGCTTT- CGGACACA (5)
GGATCGGGGGGTTCCTTCGTGG (6)
CTC (5)
TGA C TGA T TGA A (7)
AATCAAGAGG (4)
CGTACG (3)
AAT (1)

## 12 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

---

Ort,

---

Datum Unterschrift

## 13 Danksagung

Das allererste Dankwort möchte ich an meine beiden Betreuer Prof. Dr. Dr. Knut Stieger und Dr. Tobias Wimmer richten für die Überlassung des Themas, die über Jahre hinweg stets hervorragende Betreuung, das immer offene Ohr und die persönliche Unterstützung in allen diese Arbeit betreffenden Belangen und darüber hinaus.

Damit einher geht der Dank an die gesamte AG Experimentelle Ophthalmologie für Hilfestellungen bei Fragen und Lösungsvorschläge bei Problemen, für das kollegiale Miteinander und die einfach schöne Zeit im Labor.

Außerdem möchte ich meinen Freunden und allen Menschen, die ich in Gießen lieb gewonnen habe, danken für das schöne und unvergessliche Miteinander.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken für die bedingungslose und ununterbrochene Unterstützung.

Diese Arbeit wurde durch das Stipendium JLU TRAINEE der Justus-Liebig-Universität Gießen gefördert.