Identifikation und Untersuchung von guideRNA/Cas9-Konstrukten für CRISPR/Cas9 vermittelte Doppelstrangbrüche im *USH2A*-Gen

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

vorgelegt von Viktoria Bettina Sophie Jacobi
aus Köln

Gießen 2026

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: 08.09.2026

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Das menschliche Auge 1

1.1.1 Der Aufbau des menschlichen Auges 1

1.1.2 Der Aufbau der Retina 2

1.2 Erbliche Netzhauterkrankungen 2

1.2.1 Erbliche Netzhauterkrankungen 2

1.2.2 Usher-Syndrom 3

1.2.3 *USH2A*-Gen 4

1.2.4 Therapiemöglichkeiten der *USH2A*-Retinopathie 4

1.3 Genome Editing 6

1.3.1 CRISPR/Cas9 6

1.3.2 DNA-Reparaturmechanismen von Doppelstrangbrüchen 7

1.3.3 Messmethoden 9

1.3.3.1 T7-Endonuklease-I-Assay 9

1.3.3.2 BRET-Assay 10

1.3.3.3 TIDE-Analyse 11

1.4 Zielsetzung 12

2 Material und Methoden 13

2.1 **Material** 13

2.1.1 Geräteliste 13

2.1.2 Verbrauchsmaterialien 14

2.1.3 Chemikalien 15

2.1.4 Enzyme 17

2.1.5 Kulturmedien und Puffer 17

2.1.6 Kitsysteme 18

2.1.7 Software 18

2.1.8 Oligonukleotide und Plasmide 19

2.1.9 Eukaryotische Zellen und Bakterienstämme 24

2.2 **Methoden** 25

2.2.1 Zellkultur 25
2.2.1.1 Kultur eukaryotischer Zellen 25
2.2.1.2 Einfrieren eukaryotischer Zellen 26
2.2.2 Zellkultur Prokaryoten 26
2.2.2.1 Herstellung elektrokompetenter XL1 *E.coli* Zellen 26
2.2.3 Enzymatischer Restriktionsverdau 27
2.2.4 Agarosegelelektrophorese 27
2.2.5 Klonierung 28
2.2.5.1 Hybridisierung 28
2.2.5.2 Ligation 28
2.2.5.3 Nachverdau 29
2.2.5.4 Elektroporation und Ausplattieren 30
2.2.5.5 Beimpfen von Flüssigkulturen 30
2.2.5.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA 30
2.2.5.7 Glycerolstock 31
2.2.6 Isolation von (Plasmid-)DNA 31
2.2.6.1 Mini-Preparation mit Puffern 31
2.2.6.2 Mini-Preparation mit Kit 31
2.2.6.3 Maxi-Preparation mit Kit 32
2.2.6.4 Extraktion genomischer DNA 33
2.2.6.5 Bestimmung der DNA-Konzentration 34
2.2.7 Transfektion und Selektion von ipSCs 34
2.2.7.1 Transfektion 34
2.2.7.2 Selektion 35
2.2.8 TIDE-Analyse 35
2.2.9 T7-Endonuklease-I-Assay 38
2.2.10 BRET-Analyse 39
2.2.10.1 Vorbereitung der 6-Well-Platten 39
2.2.10.2 Transfektion der HEK-Zellen 39
2.2.10.3 BRET-Assay 40
2.2.11 Statistische Auswertung 42

3 Ergebnisse 43

3.1 Design und Kontrolle der guideRNA-und target-Sequenzen 43

3.1.1 Design und Herstellung der guideRNA- und target-Sequenzen 43
3.1.2 Vorbereitung der Plasmide 43
3.1.3 Verifizierung der Klonierung durch Sanger-Sequenzierung 44

3.2 Vorbereitung der ipSC 45
3.2.1 Etablierung eines Transfektionsprotokolls 45
3.2.2 Vervielfältigung mittels PCR 46
3.2.3 Verifizierung durch Sangersequenzierung....47
3.3 Mismatch-Kontrolle mittels T7-Endonuklease-I-Assay 47
3.4 BRET-Assay zur Quantifizierung der Frameshift-Aktivität 49
3.5 Schnittkontrolle via TIDE-Analyse....52
4 Diskussion 57
5 Zusammenfassung 64
6 Summary....65
7 Abkürzungsverzeichnis....66
8 Abbildungsverzeichnis....68
9 Tabellenverzeichnis 69
10 Literaturverzeichnis 70
11 Ehrenwörtliche Erklärung 83
12 Publikationsverzeichnis 84
13 Danksagung....85

1 Einleitung

1.1 Das menschliche Auge

1.1.1 Der Aufbau des menschlichen Auges

Das menschliche Auge ist ein Organ, das sich zusammensetzt aus Bulbus oculi, Nervus opticus, Lid- und Tränenapparat, sowie den geraden und schrägen Augenmuskeln.
Der Bulbus oculi ist aufgebaut aus drei Schichten: der Tunica fibrosa bulbi, welche die durchsichtige, nicht vaskularisierte Cornea und die Sklera, welche dem Schutz und der Formgebung dient, umfasst. Die zweite Schicht, die Tunica vasculosa bulbi, auch als Uvea bezeichnet, besteht aus der Iris, welche den Lichteinfall reguliert; der Choroidea – die Aderhaut –, die für die Blutversorgung der Retina verantwortlich ist, und dem Ciliarkörper. Der Ciliarkörper dient mit seinen Zonulafasern der Aufhängung der Linse und ist somit wesentlich an der Akkomodation beteiligt. Darüber hinaus produziert er auch das Kammerwasser, welches den Augeninnendruck aufrechterhält und Linse und Cornea per Diffusion mit Nährstoffen versorgt. Wie der Name vermuten lässt, befindet sich das Kammerwasser in der vorderen und hinteren Augenkammer, wobei die vordere von der Hinterfläche der Cornea bis zur Iris reicht und die hintere zwischen Iris und Glaskörper liegt.
Die innerste Schicht des Bulbus oculi wird als Tunica interna bulbi bezeichnet und umfasst die Retina, welche im Punkt 1.1.2 näher erläutert wird.
Die Verbindung zwischen Bulbus und den Augenlidern wird hergestellt durch die Konjunctiva, welche sowohl die Innenflächen der Lider als auch den vorderen Bereich der Sklera überzieht. Sie stellt eine Verschiebeschicht dar, dient der Benetzung des Bulbus und zusätzlich der Immunabwehr.
Beim Aufbau des Auges wird zwischen einem lichtbrechenden und einem lichtwahrnehmenden Teil unterschieden. Der lichtbrechende Bereich wird aus Cornea, Linse, Glaskörper und Kammerwasser zusammengesetzt. Die Lichtwahrnehmung erfolgt über die Retina.
Damit ein Lichtreiz den visuellen Kortex im Okzipitalhirn erreicht, muss er vier Neuronen der Sehbahn passieren. Die ersten drei Neuronen (Photorezeptoren, Bipolarzellen, Ganglienzellen) befinden sich in der Retina. Ihre Axone verbinden sich zum Nervus opticus, welcher die Informationen über das Chiasma opticum und dem Tractus opticus zum vierten Neuron, dem Corpus geniculatum laterale im Thalamus leitet. Von hier aus

gelangt der optische Reiz dann schließlich zum visuellen Kortex, der Area striata (Grehn, 2019).

1.1.2 Der Aufbau der Retina

Die Retina stellt die innerste Schicht des Auges dar und wird unterteilt in einen lichtunempfindlichen Teil, den Pars caeca retinae, welcher aus Pigmentepithel besteht und die Rückfläche von Ciliarkörper und Iris überzieht, sowie in den Pars optica retinae. Dieser Teil ist der lichtempfindliche Teil der Retina und enthält die ersten drei Neuronen der Sehbahn.
Die Retina besteht aus zehn Schichten, wobei, ausgehend von der Choroidea von außen nach innen, die erste Schicht das Pigmentepithel darstellt. Dahinter folgen dann weitere Schichten, welche unter anderem die Zapfen und Stäbchen (1. Neuron), die Bipolarzellen (2. Neuron) und die Ganglienzellen (3. Neuron) enthalten.
Die Zapfen und Stäbchen bilden die zwei verschiedenen Rezeptorzelltypen in der Retina. Die Zahl der Zapfen beträgt etwa sechs Millionen, die der Stäbchen etwa 120 Millionen.
Die Zapfen sind zuständig für das photopische Sehen und befinden sich vor allem zentral in der Fovea, dem Punkt des schärfsten Sehens. Daneben dienen die Stäbchen dem skotopischen Sehen, also vor allem dem Sehen bei Nacht, sie erkennen Helligkeitsunterschiede, jedoch keine Farben. Die Stäbchen liegen hauptsächlich in der Peripherie der Netzhaut, im parafovealen Bereich. In der Fovea centralis sind sie überhaupt nicht zu finden (Schmidt et al., 2017).

1.2 Erbliche Netzhauterkrankungen

1.2.1 Erbliche Netzhauterkrankungen

Erbliche Netzhauterkrankungen (Inherited Retinal Diseases (IRD)) bilden eine Gruppe von Krankheiten, die zu einer Degeneration der Photorezeptorzellen und des retinalen Pigmentepithels führen können. Sie stellen die Hauptursache für Sehverlust in der erwerbsfähigen Bevölkerung dar und betreffen weltweit circa 5,5 Millionen Menschen (Ben-Yosef, 2022; Karali et al., 2022). Bis heute wurden Mutationen in 346 Genen als Auslöser identifiziert (RetNet, o. J.). Zu den erblichen Netzhauterkrankungen gehören beispielsweise der Morbus Best, der Morbus Stargart, die Lebersche kongenitale Amaurose und die Retinitis pigmentosa, welche die häufigste Form der IRDs darstellt.

Die Erkrankungen lassen sich in syndromale und nicht-syndromale Formen unterteilen, wobei letztere ausschließlich das Auge betreffen, während syndromale IRDs neben ophthalmologischen Symptomen auch andere Organsysteme einbeziehen. Die häufigste Form der syndromalen IRDs stelllt das Usher-Syndrom dar (Ben-Yosef, 2022).
Die große Heterogenität, die Vielzahl an Mutationsursprüngen und die unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbilder der erblichen Netzhauterkrankungen erschweren eine präzise Diagnose und stellen eine erhebliche Herausforderung für die Entwicklung effektiver therapeutischer Ansätze dar.

1.2.2 Usher-Syndrom

Das Usher-Syndrom ist eine autosomal-rezessive Erkrankung, die zu Taubheit und Blindheit führen kann. Sie ist gekennzeichnet durch eine Kombination aus Innenohrschwerhörigkeit und Retinitis pigmentosa. In manchen Fällen wird zusätzlich eine vestibuläre Dysfunktion beobachtet.
Je nach Ausprägung der Symptome lassen sich drei verschiedene Subtypen unterscheiden. USH Typ 1 ist dabei die schwerwiegendeste Form mit prälingualer sensorineuraler Schwerhörigkeit, früh beginnender Retinitis pigmentosa und vestibulären Einschränkungen. USH Typ 2 stellt die häufigste Form des Usher-Syndroms dar mit mäßiger bis schwerwiegender Innenohrschwerhörigkeit und einer in der zweiten Lebensdekade beginnenden Retinitis pigmentosa. Das Vestibularorgan ist in diesem Fall nicht betroffen (Millán et al., 2011).
Der seltenste Subtyp ist USH Typ 3, einhergehend mit postlingualer progressiver Innenohrschwerhörigkeit und variabler Manifestation einer Retinitis pigmentosa und vestibulärer Dysfunktion. Erkrankungsformen, welche in keine der oben genannten Subtypen eingeteilt werden können, werden den atypischen USH zugeordnet (Toualbi et al., 2020).
In Deutschland sind laut der Pro-Retina-Stiftung am 27.06.2024 ungefähr 8.000 Patienten von dem Usher-Syndrom betroffen. Weltweit schwankt die Prävalenz zwischen 3 bis 6,2 pro 100.000 (Fuster-García et al., 2021).
Bisher konnten Mutationen in 10 verschiedenen Genen als Ursache für die Erkrankung entdeckt werden, wobei das *USH2A*-Gen die häufigste Lokalisation für Mutationen darstellt und zur Entwicklung eines Usher-Syndroms Typ 2 führt (Bonnet et al., 2016).

1.2.3 *USH2A*-Gen

Das *USH2A*-Gen liegt auf dem Chromosom 1q41, umfasst 72 Exons und ca. 800 kb, mit einer cDNA-Sequenz von 15,6 kb (GenBank: NM_206933.4). Es codiert für mehrere Isoformen des Proteins Usherin. Unter anderem codiert es durch alternatives Splicen für die lange Isoform b des Usherins (van Wijk et al., 2004). Diese Isoform wird vor allem in der Retina exprimiert und ist zusammen mit weiteren Proteinen wie Whirlin und ADGRV1 (adhesion G protein-coupled receptor V1) Bestandteil eines periziliären Membrankomplexes, der das Zilium umhüllt, welches das innere und äußere Segment eines Photorezeptors verbindet. Es wird angenommen, dass Usherin hier durch extrazelluläre Protein-Protein-Interaktionen für das Zilium eine stabilisierende Funktion übernimmt (Dona et al., 2018).
In postnatalen cochleären Haarzellen konnte Usherin ebenfalls nachgewiesen werden. Dort befindet es sich an den sogenannten „ankle links“, welche dünne Fasern darstellen, die Stereozilien an ihren Basalregionen verbinden und für die korrekte Entwicklung und Organisation der Haarzellen zuständig sind (Dona et al., 2018; Toualbi et al., 2020).
Mit einem Anteil von über 50 % an Usher-Syndrom- und an 8 % der nicht-syndromalen Retinitis pigmentosa-Fällen, stellt *USH2A* das Gen mit den häufigsten krankheitsverursachenden Mutationen dar (Fuster-García et al., 2017).
Biallele Mutationen im *USH2A*-Gen führen zu defekten Usherin-Proteinen und somit zur Entwicklung eines Usher-Syndroms Typ 2. Monoallele Mutationen führen hingegen zu einer nicht-syndromalen Retinitis pigmentosa.
Die Retinitis pigmentosa ist charakterisiert durch eine progrediente Degeneration der Photorezeptorzellen und des retinalen Pigmentepithels. Hierbei gehen zuerst die Stäbchen zugrunde, wodurch es zu ersten Symptomen wie Nachtblindheit und Tunnelblick kommt. Im Verlauf dystrophieren auch die Zapfen, was zu schweren visuellen Einschränkungen führt. Mit einer Prävalenz von 1:4.000 ist die Retinitis pigmentosa die häufigste Ursache von Blindheit in der berufstätigen Bevölkerung (W. Liu et al., 2022; Verbakel, 2018).

1.2.4 Therapiemöglichkeiten der *USH2A*-Retinopathie

Bisher gibt es keine kausale Therapie für die retinalen Defekte des Usher-Syndroms. Für die sich momentan in der Forschung befindenden therapeutischen Strategien, werden zwei Ansätze unterschieden. Zum einen die Strategien, die sich auf das *USH2A*-Gen und dessen Mutationen konzentrieren, zum anderen solche, die *USH2A*-unabhän-

gig darauf abzielen, den Untergang der Photorezeptoren durch Manipulation von beispielsweise Apoptose-Wegen oder oxidativem Stress zu verhindern (Toualbi et al., 2020).

Jüngste Erfolge in der gentherapeutischen Forschung erzielte die Verwendung von adenoassoziierten viralen Vektoren (AAV), mit deren Hilfe sich genetisches Material in Zellen schleusen lässt, um so pathologische oder fehlende Gene zu ersetzen. Erfolgreich angewendet wurden AAVs zum Beispiel in der Behandlung von Patienten mit Leberschen kongenitalen Amaurose und RPE65-Mutationen (Russell et al., 2017). Jedoch besitzen die AAVs mit maximal 4,7 kb eine limitierte Transportkapazität, sodass der Transfer von cDNA-Sequenzen größerer Gene, wie der des *USH2A*-Gens (15,6 kb), bisher nicht möglich ist (Z. Wu et al., 2010).

Derzeitige Forschung beinhaltet Herangehensweisen mit Dual- oder Triple-Vektoren, wodurch die Transportkapazität bereits auf 14 kb erhöht werden konnte, jedoch agieren jene Vektoren bisher nur mit einer Effizienz von 40 % und sind darüber hinaus noch immer nicht in der Lage das gesamte *USH2A*-Gen zu transportieren (Maddalena et al., 2018). Das gleiche Problem besteht bei der Verwendung von Lentiviren, welche ebenfalls in der Gentherapie anderer Erkrankungen angewendet werden. Auch sie haben eine limitierte Transportkapazität von 9 kb und bergen außerdem aufgrund ihres Integrase-Mechanismus das Risiko onkogener Effekte (C. S. Lee et al., 2017).

Eine weitere sich in der Erprobung befindende Strategie ist das Exon Skipping. Hierbei werden Antisense-Oligonukleotide (AON) eingesetzt, die zu einem Überspringen eines mutationstragenden Exons beziehungsweise zu einer Wiederherstellung des korrekten Leserasters führen. Dadurch soll die Expression eines (teilweise) funktionierenden Proteins wieder ermöglicht werden (Collin et al., 2012; Slijkerman et al., 2016). Durch das Skipping ensteht ein kürzeres Usherin-Protein, welches darüber hinaus einfacher in die Zelle eingeschleust werden könnte. So haben beispielsweise Dulla et al. Exon 13 Skipping im *USH2A*-Gen im Zebrafisch- und Mausmodell durchgeführt und Hinweise auf eine verbesserte retinale Funktion feststellen können (Dulla et al., 2021).

Stammzellen stellen eine weitere Option dar, die Funktion der Photorezeptorzellen aufrechtzuerhalten. Sie können sich zu retinalem Gewebe differenzieren und ins Auge transplantiert werden (Assawachananont et al., 2014; Shirai et al., 2016). Dieser Ansatz wird zum Beispiel auch untersucht im Hinblick auf die Therapie der altersbedingten Makuladegeneration (Mandai et al., 2017). Obwohl einige Behandlungen (zum Teil) keine kanzerogenen Prozesse beobachten konnten (Mandai et al., 2017; Watari et al., 2023), stellt das Neoplasiepotential der Stammzellen weiterhin ein nicht zu vernachlässigendes Risiko für eine Behandlung dar (Nishimura et al., 2012; Major, McClements and MacLaren, 2022).

Ein neueres Instrument zur Genom-Editierung ist CRISPR/Cas9, eine Genschere, die Doppelstrangbrüche im Genom induzieren kann. Die Idee hierbei ist, dass Mutationen gezielt angesteuert werden, um diese mit einer Template-DNA zu ersetzten, welche durch zelleigene DNA-Reparaturmechansimen nach Herbeiführen eines Doppelstrangbruchs eingebaut wird (Ma et al., 2014). Der Vorteil der Genom-Editierung besteht darin, die krankheitsverursachende Mutation direkt im Genom zu beheben, ohne dass es überhaupt zu einer Entstehung fehlerhafter Proteine kommen kann.

1.3 Genome Editing

1.3.1 CRISPR/Cas9

Clustered **r**egularly **i**nterspaced **s**hort **p**alindromic **r**epeats – **C**RISPR-**as**sociated protein **9**, kurz CRISPR/Cas9, ist ein Werkzeug zur Genom-Editierung. Ursprünglich wurde es entdeckt in Bakterien und Archeae als ein Abwehrmechanismus gegen virale Infektionen. Hier werden nach einer erstmaligen Infektion mit einem Virus sogenannte Spacer-Sequenzen gebildet, die als Gedächtnis fungieren. Bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Virus, wird dieses dadurch erkannt und die eingedrungende DNA durch einen CRISPR-Komplex gespalten und somit unschädlich gemacht (Jinek et al., 2012; Happi Mbakam et al., 2022).

Durch das Induzieren von Doppelstrangbrüchen aktiviert CRISPR/Cas9 zelleigene DNA-Reparaturmechanismen, wie Non-homologous end joining (NHEJ), das zu Insertionen und Deletionen (Indels) im Genom führt (siehe 1.3.2). Wird zusätzlich zu CRISPR/Cas9 eine zum Zielort homologe Template-DNA in die Zelle miteingebracht, so wird diese durch den HDR (Homology directed repair)-Mechanismus eingebaut (Ma et al., 2014). Hierdurch besteht die Möglichkeit einer Ausschaltung beziehungsweise Korrektur von pathologisch mutierten Genen. CRISPR/Cas9, abgeleitet vom bakteriellen Immunsystem, setzt sich aus drei Komponenten zusammen. Hierzu gehören die CRISPR-RNA (crRNA), die trans-activating crRNA (tracrRNA) und das Cas9-Protein. Die trans-activating crRNA aktiviert zusammen mit einer RNAse III die crRNA, anschließend bilden tracrRNA und crRNA einen Komplex, den sogenannten „crRNA-tracrRNA-duplex“. Dieses Duplex kann auch durch eine künstliche „guide-RNA“ (gRNA) ersetzt werden und als Einzelstrang-gRNA transkribiert werden (sgRNA). Diese fungiert als Stabilisator und leitet die Endonuklease Cas9 dann zu jener Stelle, an der sie schneiden soll. Die crRNA beziehungsweise die gRNA trägt eine zum Zielort komplementäre Basensequenz, sodass sich der Doppelstrang an entprechender Stelle entspiralisiert und sich RNA und

DNA aneinanderbinden können. Damit Cas9 jedoch sicher den Zielort findet, wird daneben eine proto-spacer adjacent motif (PAM)-Sequenz benötigt. Diese PAM-Sequenz liegt neben der Erkennungssequenz im Genom und besteht aus zwei Guaninbasen und einer beliebig weiteren Base (NGG) (Ma et al., 2014; Max-Planck-Gesellschaft, o. J.).

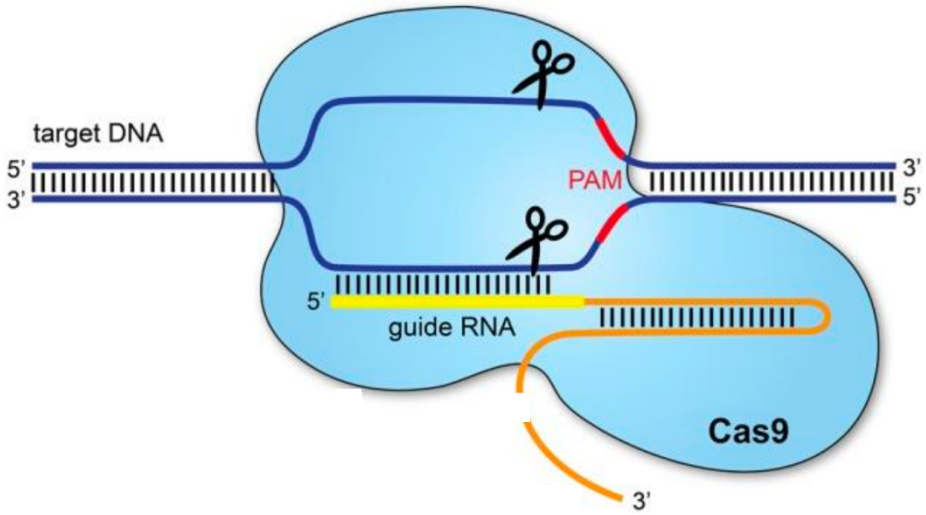


Abbildung 1: Genomeditierung durch CRISPR/Cas9

Dargestellt ist die exemplarische Editierung des Genoms durch den CRISPR/Cas9-Komplex. Die guideRNA hat bereits ihre komplementäre Zielsequenz in der doppelsträngigen Ziel-DNA (target DNA) erkannt und sich nach deren Entspiralisierung angelagert. In unmittelbarer Nähe zur Zielsequenz liegt die in rot abgebildete PAM-Sequenz in der Ziel-DNA, die ebenso als Leitstruktur für Cas9 fungiert. Es ist ein stabiler Komplex entstanden, der Cas9 erlaubt, an der gewünschten Stelle einen Doppelstrangbruch in der target DNA zu induzieren, hier veranschaulicht durch die beiden Scheren (Abbildung nach Redman et al. 2016, mit Nutzungserlaubnis durch Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) license).

1.3.2 DNA-Reparaturmechanismen von Doppelstrangbrüchen

Durch eigene DNA-Reparaturmechanismen ist es einer Zelle möglich, unterschiedlich verursachte Schäden in der DNA zu beseitigen. So sind gerade DNA-Doppelstrangbrüche folgenreiche Defekte der Integrität der genomischen DNA, die es zu korrigieren bedarf. Für die Reparatur von solchen Doppelstrangbrüchen sind Non-homologous end joining (NHEJ) und Homology directed repair (HDR) als Hauptmechanismen verantwortlich.

NHEJ ist eine schnelle Reparaturmöglichkeit für Doppelstrangbrüche (DSB) und in allen Phasen des Zellzyklus aktiv. Dabei werden die Enden des Bruchs direkt miteinander verknüpft, was jedoch vereinzelt zu Insertionen und Deletionen führt. Aus diesem Grund gilt NHEJ als ein fehleranfälliger Mechanismus (Yanik et al., 2017). Im Gegensatz dazu

erfolgt eine Reparatur durch HDR nur dann, wenn ein geeignetes DNA-Template vorhanden ist. HDR tritt bevorzugt in der S- und G2-Phase des Zellzyklus auf, da in dieser Zeit die Schwesterchromatiden als Vorlage dienen können (Jachimowicz et al., 2019; Xue & Greene, 2021; Yanik et al., 2017). Somit bietet HDR eine präzisere Reparatur des Bruchs im Vergleich zu NHEJ.

Kommt es durch endogene (Reaktive Sauerstoffspezies, Depurinierung, Desaminierung, Replikationsfehler) oder exogene Prozesse (UV-Strahlung, ionisierende Strahlung, Alkylierung) zu einem Doppelstrangbruch in der DNA, wird dieser durch Serin/Threonin-Kinasen erkannt. Diese lösen eine Kaskade an Proteinmodifikationen aus, die in der Rekrutierung der Proteine 53BP1 und BRCA1 enden (Chatterjee & Walker, 2017).

53BP1 vermittelt den NHEJ-Mechanismus (Lei et al., 2022; Scully et al., 2019). Hierbei erkennen die Proteine Ku70/Ku80 den Doppelstrangbruch, binden dort und fungieren als Gerüst für weitere Proteine (Yanik et al., 2017). An diesem Gerüst können verschiedene Nukleasen nun die Bruchenden für die Reparatur vorbereiten. Hierzu werden Nukleotide entfernt, erneut angeknüft und blockierende Phosphatgruppen entfernt (Chatterjee & Walker, 2017; Xue & Greene, 2021). Schließlich verschließt der DNA Ligase Komlex IV die Bruchenden miteinander (Xue & Greene, 2021).

Der HDR-Mechanismus verläuft über BRCA1 (*breast cancer gene 1*). Durch die Interaktion des MRN-Komplexes (bestehend aus MRE11 (MRE11 double strand break repair nuclease), Rad50 (Rad50 double strand break repair protein) und NBN (Nibrin)) mit EXO1 (Exonuklease 1) und DNA2 (DNA replication helicase/nuclease 2) werden aus den Bruchenden einsträngige 3´-Überhänge gebildet (Chatterjee & Walker, 2017; Xue & Greene, 2021; Yanik et al., 2017). Die DNA-Rekombinase RAD51 sucht im Genom nach einer den 3´-Überhängen homologen Sequenz, die als Matrize dienen kann (Xue & Greene, 2021; Yanik et al., 2017). Ist diese homloge Sequenz gefunden, formt sich an dieser Stelle ein sogenannter Displacement-Loop (D-Loop) und es kommt zu einer Invasion des Template-Strangs durch den 3`-Überhang (Chatterjee & Walker, 2017). Nach DNA-Synthese durch die Polymerasen δ, κ und ν löst sich der Strang wieder von seiner Matrize (Chatterjee & Walker, 2017). Abschließend verknüpft die DNA-Ligase I die beiden verlängerten Bruchenden miteinander (Yanik et al., 2017).

Die Entscheidung, welcher Reparaturmechanismus zum Einsatz kommt, ist ein komplexer Prozess und wird derzeit intensiv erforscht. Zu den bislang identifizierten Faktoren, die diesen Auswahlmechanismus beeinflussen könnten, zählen die Zellzyklusphase, vor allem auch, ob es sich um mitotische oder post-mitotische Zellen handelt, der Zeitpunkt der Brucherkennung, das Vorhandensein eines Template-DNA-Strangs, Chromatinmodifikationen sowie die Prozesse der DNA-Endbearbeitung (End-Resection)

(Chatterjee & Walker, 2017; Frigerio et al., 2023; Scully et al., 2019; Xue & Greene, 2021; Yanik et al., 2017).

1.3.3 Messmethoden

1.3.3.1 T7-Endonuklease-I-Assay

Das T7-Endonuklease-I-Assay ist eines der ältesten Verfahren zur Bestimmung von Mutationsnachweisen über DNA-Mismatches. Zur Anwendung kommt hier eine Endonuklease, die ursprünglich aus Bakteriophagen der Familie T7 gewonnen wurde. T7 Bakteriophagen sind Viren, die hauptsächlich *E.coli*-Bakterien infizieren (Chan et al., 2005). Die Nutzung einer solchen T7-Endonuklease erlaubt beispielsweise die Bestimmung der Effektivität des Genome-Editing durch CRISPR/Cas9. Die durch CRISPR/Cas9 induzierten Doppelstrangbrüche werden durch zelleigene DNA-Reparaturmechanismen wieder zusammengefügt, wobei Insertionen und Deletionen auftreten können (siehe 1.3.2). Diese Indels können zu Basenfehlpaarungen, sogenannten „Mismatches“, in der DNA führen, wodurch sich Heteroduplexe formen. Die T7-Endonuklease erkennt solche Heteroduplexe und schneidet diese (Vouillot et al., 2015).
Mittels Gelelektrophorese können dann, bei erfolgreichem Verdau, drei Banden unterschieden werden: das Wildtyp-PCR-Produkt und zwei kleinere Banden als Produkt der gespaltenen Mismatches. Die Kontrolle hingegen zeigt nur das Wildtyp-PCR-Produkt (Sentmanat et al., 2018).

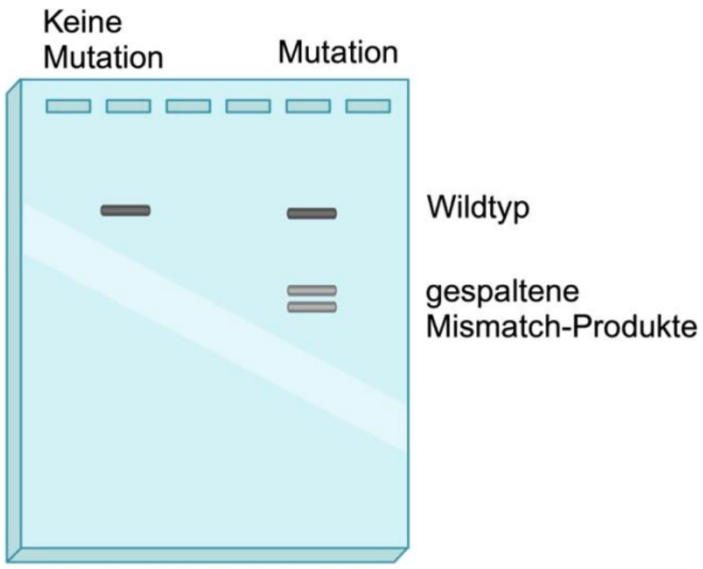


Abbildung 2: Gelbild eines T7E1-Verdaus
(erstellt mit BioRender.com)

1.3.3.2 BRET-Assay

Die BRET-Analyse (**B**ioluminescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer) erlaubt die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe des Energietransfers zwischen einem lichtemittierendem (Luciferase) und einem lichtempfindlichen Molekül (**g**rün**f**luoreszierendes **P**rotein (GFP)). Der BRET-Reporter stellt die Weiterentwicklung von FRET (**F**örster **r**esonance **e**nergy **t**ransfer mechanism) dar. FRET basiert auf einer Interaktion zweier Fluorophore miteinander. Nachteil hier ist, dass auch das Donormolekül von extern angeregt werden muss, damit es Licht emittiert. Die beim BRET-Assay zum Einsatz kommende Luciferase hat den Vorteil, dass ihre Anregung bereits durch Umsetzung eines passenden Substrats erfolgt (Stumpf et al., 2020; Wimmer, 2018; Y. Wu & Jiang, 2022). Diese Anregung der Luciferase und die daraus resultierende Lichtemission führt anschließend zur Anregung des Akzeptormoleküls, des GFP. Das GFP emittiert daraufhin selbst Licht einer höheren Wellenlänge, welches mit Hilfe von speziellen Transmissionsfiltern gemessen werden kann (Borroto-Escuela et al., 2013; Wimmer, 2018). Die Rate des Energietransfers ist hierbei abhängig von der Überlappung des Donoremmissions- und des Akzeptorabsorptionsspektrums, von der Ausrichtung der Dipol-Momente des Donors relativ zum Akzeptor und von der Distanz zwischen Donor und Akzeptor (Wimmer et al., 2017).

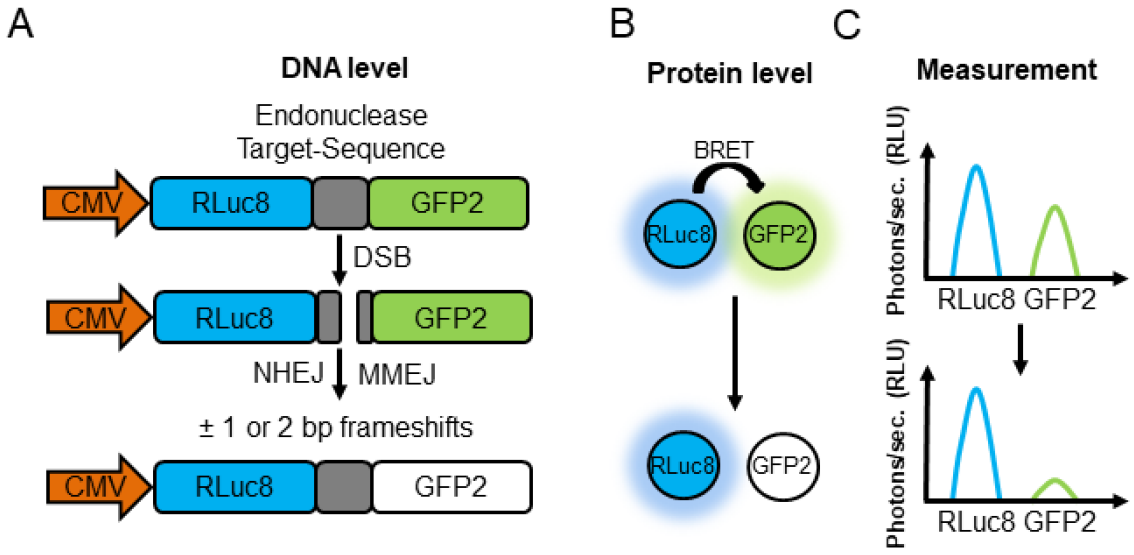


Abbildung 3: Funktionsprinzip des BRET-Reporters

(**A**) Luciferase und GFP auf DNA-Ebene: wird eine sich zwischen Luciferase und GFP befindende Zielsequenz durch eine Endonuklease geschnitten, so entsteht ein Doppelstrangburch, der mit Hilfe von DNA-Reparatursystemen wie NHEJ geschlossen wird. Durch Fehler während der Reparatur können Insertionen und Deletionen im Gen und somit Frameshifts entstehen. (**B**) Auf Proteinebene regt die Lichtemission der Luciferase das GFP an, welches daraufhin selbst Licht emittiert. Nach Auftreten eines Frameshifts wird diese Interaktion gestört und es kommt zu einer verringerten Anregung des GFP, welche im Vergleich zu vorher als verminderte Lichtemission

gemessen werden kann (**C**) (Abbildung nach Wimmer et al. 2021, mit Nutzungserlaubnis durch Mary Ann Liebert, Inc. license, Lizenzummer 5966950975735).

Für das BRET-Assay können verschiedene Luciferasen verwendet werden, wie beispielsweise die Renilla-Luciferase (RLuc), die Gaussia-Luciferase (GLuc), die Oplophorus-Luciferase (OLuc) oder die Nano-Luciferase (Nano-Luc). Die Renilla-Luciferase bezeichnet man auch als „Coelenterazine-consuming luciferase“, da sie das Substrat Coelenterazine (CLZ) umsetzt, indem sie es in Anwesenheit von Sauerstoff und Calcium zu Coelenteramid und CO_2 oxidativ decarobxyliert und dabei Lichtphotonen einer bestimmten Wellenlänge, abhängig von der umgesetzten Substratvariante emittiert (Wimmer, 2018). Unter anderem setzt sich die RLuc in den BRET-Analysen weitestgehend aufgrund ihrer fehlenden ATP-Abhängigkeit, verbesserten Sensitivität der Lumineszenzmessungen und der fehlenden Zelltoxizität ihres Substrats CLZ durch (Wimmer, 2018). In dieser Arbeit wird der BRET-Reporter zur Quantifizierung der Frameshift-Aktivität der untersuchten guideRNA/Cas9 Komplexe angewandt. Hierzu dient eine Renilla-Luciferase (RLuc8) mit ihrem Substrat Coelenterazine 400a und als Akzeptormolekül ein grün-fluoresizierende Protein (GFP2). Die guideRNA leitet die Endonuklease Cas9 zur Target-Sequenz auf der DNA, welche dort einen Doppelstrangbruch setzt. Dieser Doppelstrangbruch wird durch zelleigene Reparaturmechanismen wie beispielsweise NHEJ repariert. Diese Reparatur ist jedoch sehr fehleranfällig und so kommt es zu Insertionen und Deletionen im Genom (siehe 1.3.1). Diese „Indels“ führen zu einem Frameshift, sodass es zu Ablesungsfehlern bei der Transkription kommt und die Protein-Protein-Interaktion zwischen der Luciferase als Energiedonor und dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) als Energieakzeptor gestört wird. GFP wird dadurch vermindert exprimiert und emittiert somit weniger Licht. Folglich spricht eine hohe Differenz der Fluoreszenzemission zwischen den Kontrollen und den Proben für eine hohe Aktivität der gRNA/Cas9-Komplexe. Berechnet wird diese Aktivität als Quotient aus gemessener Emission des GPF und Emission der Luciferase (I_{em}GFP/I_{em}Luc) (Wimmer et al., 2021). Bei hoher Akitvität der gRNA/Cas9-Komplexe schneidet Cas9 und führt so zu einer verminderten Expression von GFP und die BRET-Ratio sinkt.

1.3.3.3 TIDE-Analyse

Das Akronym TIDE steht für “**T**racking of **I**ndels by **DE**composition”. Insertionen und Deletionen entstehen häufig nach Reparaturen von DNA-Doppelstrangbrüchen. Die TIDE-Analyse erlaubt es, diese Indels mit Hilfe von Sanger Sequenzierungen zu identifizieren und quantifizieren (Brinkman & Van Steensel, 2019).

Eine solche Untersuchung ist essenziell für die Beurteilung der Effizienz von beispielsweise gRNA/Cas9-Komplexen im Rahmen einer Genom-Editierung durch CRISPR/Cas9, da diese je nach adressierter Gensequenz und Transfektionseffizienz der verwendeten Zellen variiert (Brinkman et al., 2014; Brinkman & Van Steensel, 2019). Für diese Analyse benötigt man zwei Sangersequenzierungen aus parallel erfolgten PCR-Ansätzen. Zum einen jene der zu untersuchenden Probe, also die DNA einer mit Cas9 und guideRNA transfizierten Zelle, und die DNA der dazugehörigen Negativkontrolle. Außerdem muss die Sequenz der zu untersuchenden guideRNA im Programm eingegeben werden. Die beiden Sequenzierungen werden anschließend mit Hilfe des TIDE web tools (https://tide.nki.nl) analysiert (Brinkman et al., 2014).
Um die Position des erwarteten Cas9-Schnittpunkts zu identifizieren, sucht die Software nach der sgRNA/Cas9 Ziel (Target-)Sequenz im Genom der beiden Proben. Danach wird der Bereich der Negativkontrolle ab dem angenommenen Schnittpunkt mit dem der Probensequenz verglichen, um mögliche Unterschiede zwischen den beiden Sequenzchromatogrammen festzustellen. Die Software bestimmt über die auftretenden Sequenzabweichungen die totale Indel-Effizienz (overall efficiency), berechnet für jedes Indel den Signifikanzwert p und gibt das Bestimmtheitsmaß R^2 an (Brinkman et al., 2014; Brinkman & Van Steensel, 2019). Zur Reliabilität des Testes wird eine „goodness of fit“ von R^2 >0,9 empohlen (Brinkman et al., 2014).

1.4 Zielsetzung

Noch immer gibt es keine Möglichkeit der Therapie für die retinale Patholgie des Usher-Syndroms. Neue Ansätze zur Behandlung sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Derzeitige Limitationen jedoch stellen eine Notwendigkeit der Optimierung vorhandener Strategien und Entwicklung alternativer Methoden dar.
Ziel dieser Arbeit ist es daher, den Behandlungsansatz der Genom-Editierung durch CRISPR/Cas9 zu verfolgen. Hierfür wurden spezielle gRNA/Cas9 Komplexe identifiziert und untersucht, welche CRISPR/Cas9 vermittelte Doppelstrangbrüche im *USH2A*-Gen hervorrufen sollten. Dafür mussten zur Zielsequenz passende guideRNAs identifiziert und angesetzt werden. Anschließend wurden diese guideRNA/Cas9-Plasmid-Konstrukte in HEK293-T-Zellen und humane induced pluripotent stem cells (ipSCs) transfiziert und ihre Effizienz mittels verschiedener Methoden gemessen. Mit Hilfe effizienter guideRNA/Cas9-Komplexe und den resultierenden Doppelstrangbrüchen wäre es möglich, gezielt komplementäre Template-DNA in ein fehlerhaftes *USH2A*-Gen einzusetzen, um so Mutationen zu korrigieren und einer Degeneration von Photorezeptoren mit darauffolgenden visuellen Einschränkungen zu verhindern.

2 Material und Methoden

2.1 **Material**

2.1.1 Geräteliste

Tabelle 1: Geräteliste

Gerätename	**Typ**	**Hersteller**
Autoklav	DX-65	Systec, Linden
Dest. H_2O-Anlage	Arium 611 DI	Sartorius, Göttingen
Dunkelhaube	BioDocAnalyze BDR 5	Biometra, Göttingen
Eismaschine	UFP0244A	Manitowoc, Milwaukee (USA)
Elektrophorese Power Supply	PS 305 T	Biometra, Göttingen
Fluoreszenz Mikroskop	BioZero BZ 8100 E	Keyence, Neu-Isenburg
Gefrierschrank -20°C	GN2856-20	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80°C	Heraeus HFU 586 Top	Thermo Scientific, Darmstadt
Gelkammer	Compact Xs/S und M	Biometra, Göttingen
Heizblock	Thermoblock TB2	Biometra, Göttingen
Inkubator (eukaryotisch)	C 150	Binder, Tuttlingen
Inkubator (prokaryotisch)	BD115	Binder, Tuttlingen
Kühlschrank 4 °C	Premium TP 1760	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank 4 °C	KT 3L 17A	Bosch, Gerlingen
Magnetrührer	RCT classic	IKA, Staufungen
Mikroskop	IT 400	VWR International, Darmstadt
Multimode Platereader	Infinite M1000Pro	Tecan, Gröding (AUT)
Multipipette	Handy Step	Brand, Wertheim
Multiporator für Transformationen	Multiporator 4308	Eppendorf, Hamburg
PCR Thermocycler	T.Professional/T-Personal	Biometra, Göttingen
pH-Meter	Expert Pro	Mettler Toledo, Gießen
Photometer	Biophotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	1/10/20/200/1000/5000 µl	Brand, Wertheim

Pipetten	Reference 10/20/100 µl	Eppendorf, Hamburg
Power-Supply für Elektrophoresen	Whatman-Biometra PS305T	Biometra, Göttingen
Schüttler	Centromat H/MOII	Sartorius, Göttingen
Schüttler	Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Spülmaschine	G 7883 CD	Miele Professional, Gütersloh
Sterilbank	MSC-Advantage	Thermo Scientific, Darmstadt
Stickstofftonne -196 °C	Thermolyne Locator Plus 6	Thermo Scientific, Darmstadt
Trockenschrank	FED115	Binder, Tuttlingen
Vortexer	444-1372	VWR International, Darmstadt
Vortexer	444-0202	VWR International, Darmstadt
Vortexer	uniTexer 1	Lab Logistic Group, Meckenheim
Waage	Item PA 2102	Ohaus, Zürich (CH)
Wasserbad	TW12	Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Mini Star	VWR International, Darmstadt
Zentrifuge	4K15	Sigma, Osterode
Zentrifuge	1-15PK	Sigma, Osterode

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	**Typ**	**Hersteller**
Eppendorf Reagiergefäß	0,2 ml	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Eppendorf Reagiergefäß	1,5 / 2 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
Falcon Reagiergefäß	15 / 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Filteraufsatz	„rapid“-Filtermax	TPP AG, Trasadingen (CH)
Filterspitzen	200 / 500 µl	Biozym Scientific, Hess. Oldenforf

Glaspipetten	5 / 10 / 20 ml	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karls-ruhe
Handschuhe	Vasco nitril white	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	0,5 ml Safe MX500	LVL Technologies, Crailsheim
Mikrotiterplatte	Costar 96 Well white	Corning GmbH, Kaiserslautern
Multipipettenspitzen	PD Tips 1,25 / 5 ml	Brand, Wertheim
Parafilm	PM996	Bemis Europe, Braine L'Alleud (BE)
Pipettenspitzen	10 µl	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen	10 / 5000 µl	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	200 / 1000 µl	Sarstedt, Nünbrecht
Pipettenspitzen steril	10 / 200 / 1000 µl	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Zellkultur Platten	Cellstar 6 /96 Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkultur Platten	Cellstar 100*20mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkultur Platten	Petridish 100*15 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	CellScraper 16 cm	Sarstedt, Nürnbrecht

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Chemikalien

Name	**Hersteller**
Accutase	Anprotec, Bruckberg
Agarose LE	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Coelenterazine 400a	Nanolight Inc., Pinetop (USA)
ddH_2O	eigene Herstellung
D-Glucose	Roth, Karlsruhe
dH_2O	eigene Herstellung
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrophosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
DMEM	Anprotec, Bruckberg
dNTPs (10 mM)	New England BioLabs, Frankfurt a.M.

DNA-Größenstandard	Thermo Scientific, Darmstadt
DPBS (+ Mg, + Ca)	Thermo Scientific, Darmstadt
DPBS (- Mg, - Ca)	Thermo Scientific, Darmstadt
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol 100%	Roth, Karlsruhe
Ethanol 70%	Roth, Karlsruhe (verdünnt)
Fötales Kälber Serum (FKS)	Anprotec, Bruckberg
GelRed DNA-Farbstoff	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrophosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Lipofectamine Stem reagent	Invitrogen by Thermo Scientific, Darmstadt
L-Glutamin	Anprotec, Bruckberg
Luria-Broth Base (LB)	Thermo Scientific, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
PEI-Mix	Polysciences Europe GmbH, Hirschberg
Penicillin/Streptomycin	Anprotec, Bruckberg
Puromycin	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Select Agar	Thermo Scientific, Darmstadt
Tetracyclin	Sigma-Aldrich, Darmstadt
Tryple-LE Express	Thermo Scientific, Darmstadt
Tris 1M	Roth, Karlsruhe

2.1.4 Enzyme

Tabelle 4: Enzyme

Name	Schnittstelle/Funktion	Hersteller
AvrII (Restriktionsenzym)	5'- C↓CTAGG -3' 3'- GGATC↑C -5'	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
BbsI (Restriktionsenzym)	5'- GAAGACNN↓ -3' 3'- CTTCTGNNNNNN↑ -5	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
BsiWI (Restriktionsenzym)	5'- C↓GTACG -3' 3'- GCATG↑C -5'	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
T4 DNA-Ligase	Katalyse einer Phosphodiesterbindung aus einem 5'-Phosphat- und einem 3'- Hydroxylterminus	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
T7-Endonuclease I	erkennt und schneidet DNA-Mismatches, hinterlässt ein 3'-OH- und ein 5'-Phoshatende	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
Phusion-HF DNA-Polymerase	5'->3'-Polymeraseaktivität, 3'->5'-Exonukleaseaktivität, Blunt-end-Produkte	New England BioLabs, Frankfurt a.M.

2.1.5 Kulturmedien und Puffer

- Zellkulturmedium
  - DMEM +++: 87% DMEM, 10% FKS, 2% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin
  - mTeSR**:** 80% mTesR, 20% Supplements

- Einfriermedium: 90% FKS, 10% DMSO

- Bakterienkulturmedien
  - LB-Medium: 25 g Luria-Broth Base ad 1000 ml ddH_2O
  - LB-Agar: 12,5 g Luria-Broth Base, 7,5g Luria-Broth Agar, ad 500 ml ddH_2O
  - SOC-Medium: 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 0,25M KCl, 5 ml 2M $MgCl_2$, 20 ml 1M Glucose, ad 1000 ml dH_2O, pH 7,0

- Puffer
  - 10x CutSmart Puffer (von New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.)
  - 6x DNA-Loading Dye (von New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.)
  - Hepes-Puffer: 1mM aus HEPES in dH_2O
  - 10x Ligase Puffer (von New England Biolabs GmbH, Frankfurt a. M.)
  - 10x PBS: 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na_2HPO_4, 2,4 g KH_2PO, ad 1000 ml dH_2O, pH 7,4
  - 1x PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4, 0,24 g KH_2PO, ad 1000 ml dH_2O, pH 7,4
  - 5X Phusion HF-Puffer (New England BioLabs, Frankfurt a.M)
  - S1-/S2-/ S3- Puffer: Resuspensionspuffer mit RNase A/ Lysepuffer mit SDS / Neutralisationspuffer (von Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren)
  - 10x TBE Puffer: 242,2 g 1M Tris, 102,7g 0,28 M Borsäure, 7,44 g 10 mM EDTA, ad 2 l dH_2O

2.1.6 Kitsysteme

Tabelle 5: Kitsysteme

Name	**Hersteller**
NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit (6 Isolation of high-copy plasmid DNA from ***E.coli***)	Machery-Nagel, Düren
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Machery-Nagel, Düren
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Pure Link Genomic DNA Mini Kit	Invitrogen by ThermoScientific, Darmstadt

2.1.7 Software

Tabelle 6: Software

Name	**Hersteller**
BioDocAnalyze 2.67.3.0	Biometra, Göttingen
Chromas light v.2.1	Technelysium Pty Ltd, South Brisbane (AUS)
guideRNA designer for CRISPR	http://www.rgenome.net/cas-designer/
Finch TV	Perkin Elmer, Rodgau

i-control	Tecan Trading AG, Männedorf (CHE)
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Microsoft PowerPoint für Office 356	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Microsoft Word für Office 356	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
NCBI USH2A usherin	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7399
SigmaPlot	Systat Software GmbH, Erkrath
Snap Gene	Insightful Science, San Diego (USA)
TIDE web tool version 3.3.0	http://shinyapps.datacurators.nl/tide/
Tm Calculator	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Zotero Version 6.0.37	Roy Rosenzweig Center for History and New Media der George Mason University, Fairfax County (USA)

2.1.8 Oligonukleotide und Plasmide

Tabelle 7: Oligonukleotide

PAM-Sequenz rot, Enzymüberhang grün, Gx = guideRNA, Tx = adressierte target-Sequenz, f = forward, r = reverse (von metabion)

Name	**Sequenz (5' → 3')**
G1f	CACC GCC ATC ATG GGC CAC AAC AG
G1r	AAAC CTG TTG TGG CCC ATG ATG GC
T1f	CTAGG GCC ATC ATG GGC CAC AAC AG TGG
T1r	GTAC CCA CTG TTG TGG CCC ATG ATG GC C
G2f	CACC GAG AGT GGT GGC ACA CAA CG
G2r	AAAC CGT TGT GTG CCA CCA CTC TC
T2f	CTAGG GAG AGT GGT GGC ACA CAA CG AGG
T2r	GTAC CCT CGT TGT GTG CCA CCA CTC TC C
G3f	CACC GCT GTT AAA TGT AGG ATC GT
G3r	AAAC ACG ATC CTA CAT TTA ACA GC
T3f	CTAGG GCT GTT AAA TGT AGG ATC GT CGG
T3r	GTAC CCG ACG ATC CTA CAT TTA ACA GC C
G4f	CACC GAC CCC AGT GCC TTA AGA AC
G4r	AAAC GTT CTT AAG GCA CTG GGG TC

T4f	CTAGG GAC CCC AGT GCC TTA AGA AC AGG
T4r	GTAC CCT GTT CTT AAG GCA CTG GGG TC C
G-Seq-Primer	GAC TAT CAT ATG CTT ACC GT
T-Seq-Primer	AGC CCG ACG TCG TCC AGA TTG

Tabelle 8: PCR-Primer

Name	**Sequenz (5' → 3')**
PrG1for	GTC AGG AGA CAG TCA TTC CCT TCA CTG A
PrG1rev	CAA GAC AAA GTT TCT ACC CTG CTT ATC AAA
PrG2for	TGA GAG CAG TTT CCT GCA AAT GGA AAT T
PrG2rev	ACC CTA TCC CCA CAA GAA AAT CCT TCT T
PrG3for	GAA TTT ATG GAT GAA GGA GAC ACC CTG AGG
PrG3rev	CCG TGA CTA CAT TGC AAC TTT TCA CAA GT
PrG4for	AGG TCA CAC ATA CAC TTG TGA AAT TCA AGT
PrG4rev	CTC TTG ATT CTG CTG TGT TGG AGC AGT A

Tabelle 9: Plasmide

Plasmid	**Quelle**
BRET Reporter	Wimmer et al.,2021
pcDNA3.1(+)-RLuc8	Loening et al., 2006
peGFP-N1	NovoPro Biosience Inc., Shanghai (China)
pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0	Addgene #62988 (Ran et al., 2013)

pcDNA3.1(+)-RLuc8

Das pcDNA3.1(+)-RLuc8-Plasmid (Addgene #87121) wird hier als RLuc8-Expressionsvektor bezeichnet. Es exprimiert eine Renilla-Luciferase (RLuc8), welche in dieser Arbeit als Negativkontrolle im Rahmen des BRET-Assays dient. Über einen CMV-Promoter wird ihre Expression reguliert.

(RLuc8 wurde entwickelt von Andreas Loening (Loening, 2006) und zum abgebildeten Vektor pcDNA-RLuc8 durch Tobias Wimmer weiterentwickelt (Wimmer et al., 2021).

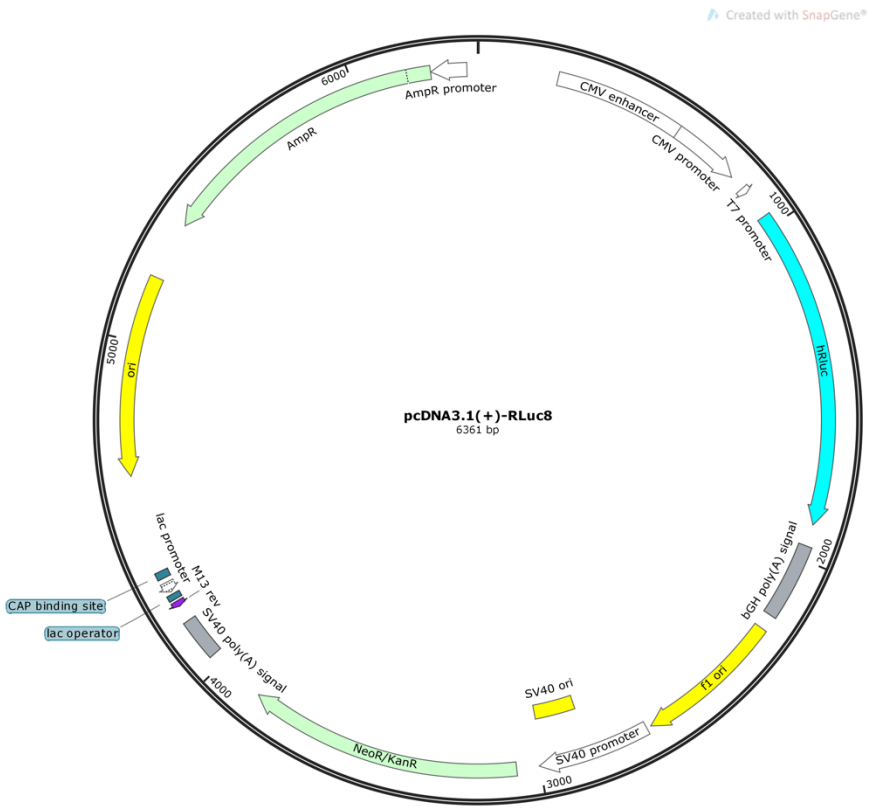


Abbildung 4: Vektorkarte RLuc8 Expressionsvektor
(erstellt mit SnapGene)

pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0

Das pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0-Plasmid (Addgene #62988) wird hier als px459-Plasmid bezeichnet. Es besitzt ein Ampicillin- und ein Puromycin-Resistenzgen. Die enthaltende Cas9-Sequenz ermöglicht die Expression der Endonuklease Cas9 zur Genom-Editierung. Die Regulation der Expression erfolgt über einen U6 Promoter. In dieses Plasmid wurden die in der vorliegenden Arbeit untersuchten gRNA-Sequenzen integriert. Nach der Integration wurden die Plasmide als gRNA/Cas9-Plasmide betitelt (pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 war ein Geschenk von Feng Zhang (Addgene plasmid #62988, (Ran et al., 2013)).



Abbildung 5: Vektorkarte px459-Plasmid

(erstellt mit SnapGene)

BRET-Reporter

Das BRET-Reporter-Plasmid wird hier als NHEJ-Reporter-Plasmid bezeichnet. Es besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen und exprimiert eine Renilla-Luciferase und ein GFP2. Die Expression wird über einen CMV-Promotor reguliert. Das Plasmid wird in dieser Arbeit zur Integration der designten Target-Sequenzen und im Rahmen des BRET-Assays zur Quantifizierung der Frameshift-Aktivität der gRNA/Cas9-Komplexe verwendet.

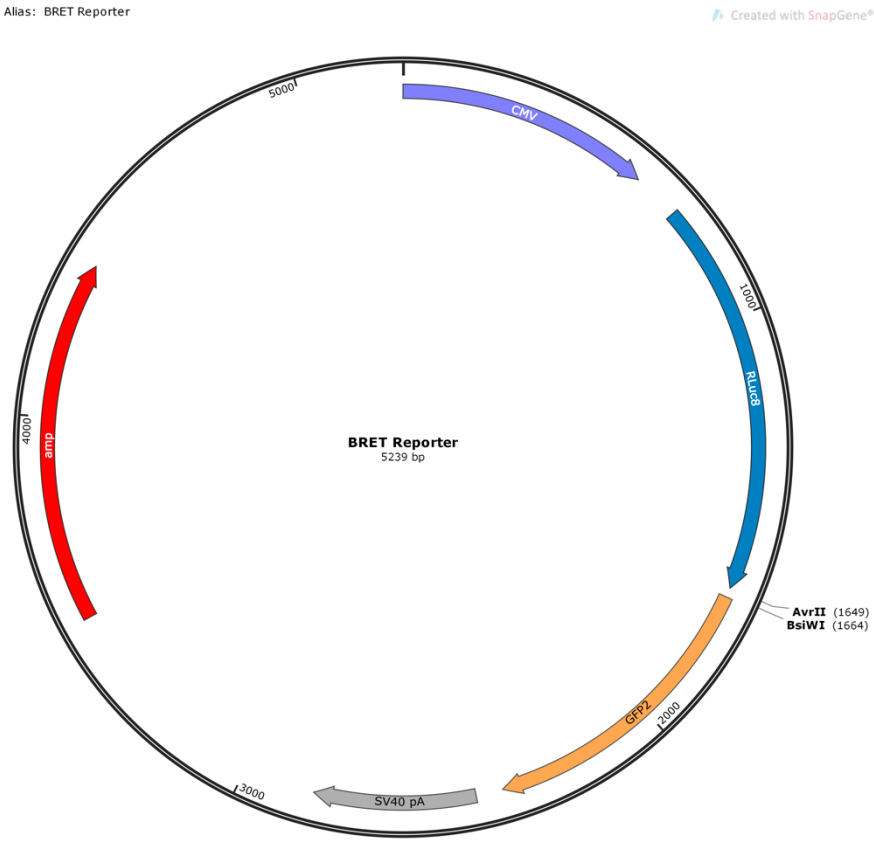


Abbildung 6: Vektorkarte NHEJ-Reporter-Plasmid (Wimmer et al., 2021)

(erstellt mit SnapGene)

peGFP-N1

Das peGFP-N1-Plasmid (https://www.novoprolabs.com/vector/V12021) wird hier als GFP-Plasmid bezeichnet. Es exprimiert ein grün-fluoreszierendes Protein (GFP). Die Regulation der Expression erfolgt über einen CMV-Promotor. Es enthält ebenfalls ein Ampicillin-Resistenzgen. Das Plasmid wurde in dieser Arbeit zur Transfektionskontrolle verwendet.

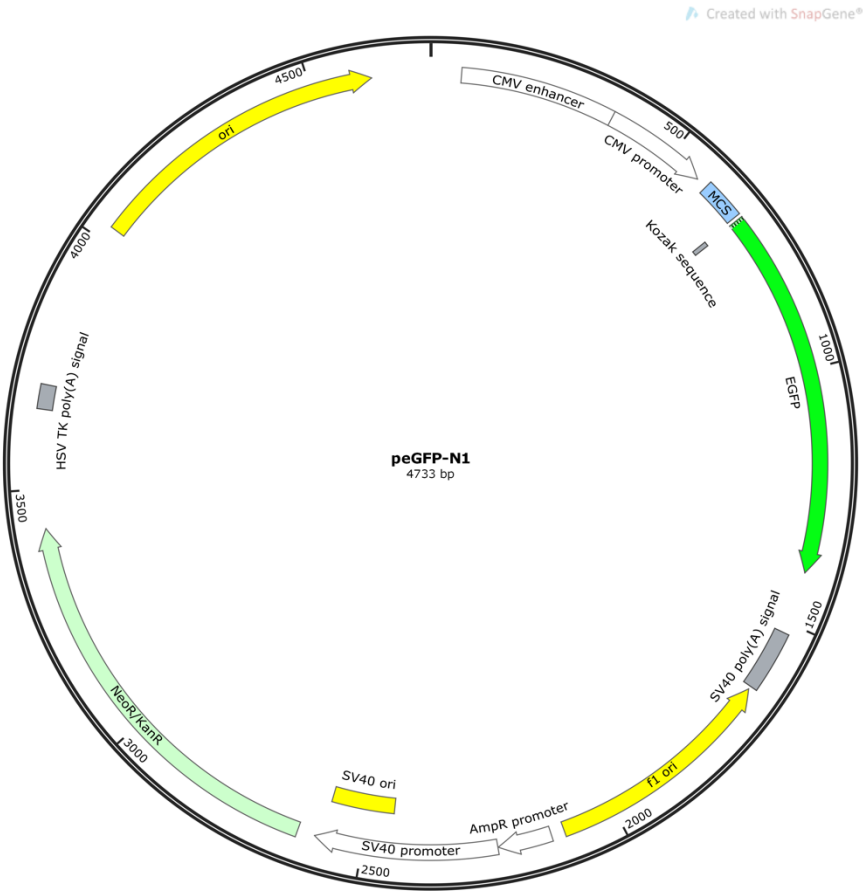


Abbildung 7: Vektorkarte GFP-Plasmid (Experimentelle Opthalmologie Gießen©) (erstellt mit SnapGene)

2.1.9 Eukaryotische Zellen und Bakterienstämme

Eukaryotische Zellen

- HEK 293-T: Humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC: CRL-3216)
- ipSC: Humane induzierte pluripotente Stammzellen (Phenocell, Grasse, Frankreich)

Bakterienstämme

- XL-1 Blue *E.coli* recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1

2.2 **Methoden**

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultur eukaryotischer Zellen

- Kultur von HEK 293-T

Die HEK 293-T Zellen wurden auf 100x20 mm Zellkulturplatten in DMEM +++ (siehe 2.1.5) bei 37 °C und 5 % CO_2 im luftfeuchtigkeitsgesättigten Brutschrank inkubiert.
Bei Erreichen von Konfluenz wurde das verbrauchte Nährmedium abgenommen. Die Zellen wurden mit 1 ml Accutase abgelöst und mit 9 ml DMEM +++ resuspendiert. 2 ml der Zell-Medium-Mischung wurden auf eine neue Zellkulturschale übertragen und mit DMEM +++ auf 10 ml aufgefüllt.

- Kultur von ipSC

Die ipSC wurden auf mit Laminin beschichteten 6-Well-Platten in mTeSR (siehe 2.1.5) bei 37 °C und 5 % CO_2 im luftfeuchtigkeitsgesättigten Brutschrank inkubiert. Die Lamininbeschichtung der Wellplatten dient der Verbesserung der Zelladhäsion und -proliferation. Hierfür wurden 100 µl Laminin mit 900 ml DPBS verdünnt, auf die Platten gegeben und diese über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde das Laminin wieder abgenommen.
Es erfolgte ein täglicher Wechsel des Nährmediums. Dazu wurde das verbrauchte Medium abgenommen und jeweils 2 ml frisches mTeSR pro Well hinzugegeben.
Bei Konfluenz wurde das verbrauchte Medium abgenommen, die Zellen mit 1 ml DPBS pro Well gewaschen, mit 200 µl Tryple-LE abgelöst und für circa 10 min bei 37 °C inkubiert (nach etwa 5 min sollte der Ablösefortschritt unter dem Mikroskop überprüft werden). Anschließend wurden die abgelösten Zellen mit 1,8 ml mTeSR resuspendiert und in ein 2 ml Tube pipettiert. Dieses wurde bei 4 °C und 100 x g für 10 min zentrifugiert. Währenddessen wurden die neuen Lamininplatten von überschüssigem Laminin befreit und 1 ml mTeSR vorgelegt. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Zellpellet mit 2 ml mTeSR resuspendiert. Von der Zell-Medium-Mischung wurde schließlich 1 ml in ein neues Well pipettiert.

2.2.1.2 Einfrieren eukaryotischer Zellen

- Einfrieren von HEK 293-T

Zur längeren Aufbewahrung wurden die Zellen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurde das verbrauchte Medium von den Zellen abgezogen, zum Ablösen der Zellen wird 1 ml Accutase hinzugegeben. Die abgelösten Zellen wurden mit 9 ml DMEM +++ resuspendiert und in ein 15 ml Falcon gegeben. Dieses wurde bei 4 °C und 280 x g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 1 ml Einfriermedium (siehe 2.1.5) resuspendiert und einige Tage bei -80 °C eingefroren bevor sie in der Stickstofftonne bei -196 °C aufbewahrt wurden.

- Einfrieren von ipSC

Zum Einfrieren der Zellen wurde vorgegangen wie bei einer Zellpassage (siehe 2.2.1.1), wobei jedoch nach der Zentrifugation und dem Abnehmen des Überstandes das Zellpellet mit 1 ml Einfriermedium resuspendiert wurde. Die Zellen wurden für einige Tage bei -80 °C und anschließend in der Stickstofftonne bei -196 °C eingefroren.

2.2.2 Zellkultur Prokaryoten

2.2.2.1 Herstellung elektrokompetenter XL1 *E.coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter XL1 *E.coli* Zellen wurde zunächst eine Übernachtkultur angesetzt aus 5 ml LB-Medium, 5 µl eines *E.coli* Glycerolstocks und 5 µl Tetracyclin (10 µg/ml). Diese Übernachtkultur wurde bei 37 °C und 180 rpm für 16 h auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 5 ml jener Kultur zu 200 ml LB-Medium und 200 µl Tetracyclin (10 µg/ml) hinzugegeben und erneut auf dem Schüttler inkubiert, bis eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,6 - 0,8 erreicht war. Danach wurde die Zellsuspension in 50 ml Falcons gegeben und zum Stopp des Wachstums für 30 min auf Eis gelagert. Nachfolgend wurde die Zellsuspension bei 4 °C und 5.100 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 50 ml gekühltem HEPES (1 mM) resuspendiert, gevortext und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Zellpellet wird mit 25 ml gekühltem HEPES (1mM) resuspendiert und zentrifugiert. Dies wurde noch zweimal wiederholt mit 10 ml und 5 ml gekühltem Glycerin (10 %). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 500 µl gekühltem Glycerin (10 %) resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden jeweils 50 µl in 2 ml Tubes alliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C gelagert.

2.2.3 Enzymatischer Restriktionsverdau

Zur anschließenden Ligation müssen die Plasmide, in die DNA eingesetzt werden soll, in linearisierter Form vorliegen, vorzugsweise mit sticky ends zur besseren Steuerung der DNA-Orientierung. Zuvor mussten die Plasmide mit Restriktionsenzymen geschnitten werden.

Es sollten die Plasmide px459-Plasmid und NHEJ-Reporter-Plasmid geschnitten werden. Hierfür wurden die Enzyme *BbsI* beziehungsweise *AvrII* und *BsiWI* verwendet (siehe 2.1.4). *BbsI* besitzt eine spezifische Bindedomäne, jedoch keine spezifische Restriktionsdomäne, sodass hier die Verwendung nur eines Restriktionsenzyms ausreicht.

Es werden 1.000 ng des jeweiligen Plasmids mit 2 µl Cut-Smart Puffer und je 1,5 µl des jeweiligen Restriktionsenzyms in ddH_2O angesetzt, sodass ein Gesamtvolumen von 20 µl erreicht wird. Die Ansätze werden gevortext, für 4 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und danach für 20 min bei 70 °C in den Heizblock gestellt, um die Restriktionsenzyme zu inaktivieren.

Tabelle 10: Restriktionsansätze

	px459+ (2x)	**NHEJ+ (2x)**	**Negativkontrolle (px459-)**	**Negativkontrolle (NHEJ-)**
Plasmid	1.000 ng	1.000 ng	1.000 ng	1.000 ng
CS-Puffer (5x)	2,00 µl	2,00 µl	2,00 µl	2,00 µl
BbsI (10.000 U/ml)	1,50 µl	-	-	-
AvrII (5.000 U/ml)	-	1,50 µl	-	-
BsiWI (10.000 U/ml)	-	1,50 µl	-	-
ddH_2O	15,12 µl	13,62 µl	16,62 µl	16,62 µl
Gesamtvolumen	**20,00 µl**	**20,00 µl**	**20,00 µl**	**20,00 µl**

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente der Größe nach aufteilen. Um ein 50 ml 1%iges Agarosegel herzustellen, wurden 50 ml 1x TBE-Puffer (siehe 2.1.5) mit 0,5 g Agarose-LE aufgekocht und dann auf etwa 50 °C abgekühlt, mit

4 µl DNA Stain Clear versetzt und für 30 min in der Gelelektrophoresekammer polymerisiert. Anschließend wurde das Gel in 1x TBE-Puffer eingelegt. Den zu analysierenden Restriktionsansätzen (20 µl) wurden 4 µl 6x Loading Buffer hinzugefügt, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Zur DNA-Größenbestimmung wurden die Taschen rechts und links am Rand des Gels mit 7 µl DNA-Größenstandard (1 kb DNA Ladder) befüllt. Die DNA-Fragmente wanderten dann größenabhängig für 45 min bei 120 V Spannung durch das Gel. Durch darauffolgende UV-Belichtung wurden die DNA-Banden sichtbar gemacht und das Gelbild dokumentiert (siehe 3.1.2, Abb. 11).

2.2.5 Klonierung

2.2.5.1 Hybridisierung

Um die einzelsträngigen forward- und reverse guideRNA- und Target-Oligonukleotide zu Doppelsträngen zusammenzufügen, wurden diese hybridisiert. Hierzu wurden jeweils 8 µl der forward- und der reverse-guideRNA-Oligonukleotide beziehungsweise der Target-Oligonukleotide zu 4 µl ddH_2O hinzugefügt. Die Ansätze wurden gevortext, für 10 min bei 95 °C in den Heizblock gestellt und dann für 30 min bei Raumtemperatur abgekühlt.

Tabelle 11: Hybridisierungsansätze hG1-4 und hT1-4

	Menge
ddH_2O	4 µl
Forward Oligo (G1f-G4f, T1f-T4f)	8 µl
Reverse Oligo (G1r-G4r, T1r-T4r)	8 µl
Gesamt	**20 µl**

2.2.5.2 Ligation

Die nun hybridisierten guideRNA- und Target-Inserts sollten durch Ligation in die Plasmide eingesetzt werden. Für jedes Insert wurden hierfür 20 µl, zusammengesetzt aus 2 µl des jeweiligen Plasmids, 5 µl des jeweiligen Inserts, 2 µl 10 x Ligase IV-Puffer, 1 µl Ligase IV und 10 µl ddH_2O, angesetzt. Die guideRNA-Inserts wurden den px459-Plasmiden und die Target-Inserts den NHEJ-Reporter-Plasmiden hinzugefügt. Die px459-Plasmide wurden nach erfolgreicher Ligation als gRNA/Cas9-Plasmide betitelt.

Tabelle 12: Ligationsansätze LG1-4 und LT1-4

	px459-Plasmid	**NHEJ-Reporter-Plasmid**
Plasmid (100 ng)	2 µl	2 µl
Inserts	5 µl hG1-4	5 µl hT1-4
10 x Ligase IV Puffer	2 µl	2 µl
Ligase IV	1 µl	1 µl
ddH_2O	10 µl	10 µl
Gesamt	**20 µl**	**20 µl**

2.2.5.3 Nachverdau

Da das NHEJ-Reporter-Plasmid mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten wurde, deren Bindungs- und Schnittstelle identisch ist, geht die Erkennungssequenz bei erfolgreicher Restriktion verloren. Um das Hintergrundsignal ungeschnittener Vektoren zu reduzieren, wurde im Nachverdau erneut das Restriktionsenzym *BsiWI* zu den Plasmiden hinzugefügt. Durch den Verlust der Erkennungssequenz werden korrekt ligierte Plasmide nicht erneut geschnitten, Re-liganden aber schon. Nur die Plasmide, die noch nicht geschnitten wurden, werden durch *BsiWI* linearisiert und in dieser Konformation bei anschließender Transformation nicht vom Bakterium aufgenommen.
Hierfür wurden zu den 20 µl der Ligationsansätze (LT1,2,3,4) 1 µl *BsiWI* hinzugegeben, gevortext und für 3 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Um das Restriktionsenzym anschließend zu inaktivieren, wurden die Ansätze für 20 min bei 70 °C in den Heizblock gestellt.
Für das px459-Plasmid ist dieser Schritt nicht möglich, da sich Bindungs- und Schnittstelle der Restriktionsenzyme an unterschiedlichen Orten auf dem Plasmid befinden.

Tabelle 13: Nachverdau der ligierten NHEJ-Reporter-Plasmide

	Menge
Ligationsansätze (LT1-4)	20 µl
BsiWI (10.000 U/ml)	1 µl

2.2.5.4 Elektroporation und Ausplattieren

Die Transformation der rekombinanten Plasmide in XL1 *E.coli* erfolgte mit Hilfe eines Elektroporators. Die Elektroporation erlaubt das Einschleusen der Plasmide in die Zellen, indem sie die Zellmembran durch Impulse hoher elektrischer Feldstärke zeitweise permeabel für Makromoleküle macht.
Zunächst wurden 3,5 µl der Ligationsansätze (LG1-4, LT1-4) zu 50 µl XL1 *E. coli* gegeben und für 5 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Ansätze luftblasenfrei in eine gekühlte Elektroporationsküvette pipettiert und bei 2.000 V für 5 ms elektroporiert. Den Ansätzen wurden dann zügig 900 µl SOC-Medium, welches zuvor auf 37 °C vorgewärmt wurde, zugegeben und sie wurden in 2 ml Tubes pipettiert.
Zur Selektion der Bakterien mit erfolgreicher Transformation befindet sich auf den Plasmiden eine Ampicillin-Resistenz, welche durch Inkubation der Ansätze für 1 h bei 37 °C und 180 rpm auf dem Schüttler ausgebildet wurde. Nachfolgend wurden die Bakteriensuspensionen bei 17.968 x g für 3 min zentrifugiert. Es wurden 800 µl des Überstandes abgenommen, das Zellpellet im restlichen Medium resuspendiert und auf eine mit ampicillinhaltigem LB-Agar ausplattiert. Die Inkubation über Nacht zum Wachstum der selektierten Klone erfolgte bei 37 °C im Brutschrank.

2.2.5.5 Beimpfen von Flüssigkulturen

Von den Bakterien wurden mit einer Pipettenspitze Klone von den Platten gepickt und in ein 50 ml Falcon zu 5 µl ampicillinhaltigem (Stockkonz.: 100 mg/ml) LB-Medium gegeben. Nach Vortexen wurden die Falcons bei 37 °C und 180 rpm über Nacht auf dem Schüttler inkubiert.

2.2.5.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Mit Hilfe des NucleoSpin Plasmid Miniprep Kits (siehe 2.1.6 und 2.2.6.1) wurde die Plasmid-DNA aus den selektierten Bakterien isoliert (mG1-4, mT1-4), an Microsynth SeqLab GmbH (Göttingen) geschickt und dort mittels Sanger-Sequenzierung (Software: Chromas light (siehe 2.1.7)) untersucht. Zur Vorbereitung der zu sequenzierenden Plasmide wurden jeweils 3 µl eines Primeransatzes zu 6 µl Plasmid und 6 µl ddH_2O gegeben.

Tabelle 14: Sequenzieransätze

	gRNA/Cas9-Plasmid	**NHEJ-Reporter-Plasmid**
ddH_2O	6 µl	6 µl
Plasmid (1.200 ng)	6 µl mG1-4	6 µl mT1-4
Primeransatz (1:10 verdünnt)	3 µl G-Seq-Primer	3 µl T-Seq-Primer
Gesamt	**15 µl**	**15 µl**

2.2.5.7 Glycerolstock

Zur längeren Aufbewahrung der selektierten Klone (siehe 2.2.5.5) wurden 700 µl der jeweiligen Bakterienkultur zu 500 µl 100%igem Glycerin (steril) gegeben, gevortext und bei -80 °C eingefroren (GG1-GG4, GT1-GT4).

2.2.6 Isolation von (Plasmid-)DNA

2.2.6.1 Mini-Preparation mit Puffern

Von den selektierten Flüssigkulturen wurden jeweils 2 ml in ein 2 ml-Tube übertragen und diese für 5 min bei 5.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden nacheinander jeweils 100 µl S1-(Resuspension), S2-(Lyse) und S3-(Neutralisation) Puffer (siehe 2.1.5) hinzugegeben und mit den Ansätzen durch Invertieren vermischt. Die Puffer bewirken den Aufschluss der Zellen mit anschließender Neutralisation, sodass sich die Plasmide und Proteine im Überstand lösen können. Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4 °C und 10.000 rpm konnte die im Überstand enthaltende Plasmid-DNA in neue Tubes übertragen werden. Die Plasmid-DNA wurde mit 700 µl eiskaltem absoluten Ethanol ausgefällt. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 17.968 x g wurde der Überstand verworfen und die im Zellpellet enthaltene DNA mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min bei 4 °C und 17.968 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet für 5 min luftgetrocknet, bevor 27 µl ddH_2O hinzugegeben, die Ansätze gevortext und bei 4 °C eingelagert wurden (mG1-4, mT1-4).

2.2.6.2 Mini-Preparation mit Kit

Zur Isolation von Plasmid-DNA im Mini-Maßstab wurde neben der Puffermethode (siehe 2.2.6.1) das NucleoSpin Plasmid Miniprep Kit von Machery-Nagel verwendet (siehe

2.1.6). Es wurden jeweils 2 ml der selektierten Klonkulturen für 30 s bei 11.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden mit 200 µl A1 Puffer resuspendiert und zur Zelllyse wurden 250 µl A2 Puffer hinzugegeben, die Tubes sechs- bis achtmal invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurden 300 µl des Neutralisationspuffers A3 hinzugegeben und erneut sechs bis acht-mal invertiert. Anschließend wurde für 5 min bei RT und 11.000 x g zentrifugiert.
Danach wurden NucleoSpin Plasmid Quick Pure Säulen in 2 ml-Tubes gestellt und 700 µl des Überstands der zuvor zentrifugierten Ansätze auf die Säulen pipettiert. Die Tubes zusammen mit den Säulen wurden dann für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss, aufgefangen in den 2 ml-Tubes, verworfen. Um die an die Säulenmembran gebundene Plasmid-DNA zu waschen, wurden den Säulen 450 µl Waschpuffer AQ hinzugefügt und diese für 3 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Die Säulen wurden schließlich in 1,5 ml-Tubes gestellt. Es wurden 27 µl ddH_2O auf die Membran pipettiert, für 1 min bei RT inkubiert und für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert, um die DNA von der Membran zu lösen. Dieser Schritt wurde wiederholt, um die DNA-Ausbeute zu erhöhen.
Bevor die DNA bei -20 °C eingelagert wurde (mG1-4, mT1-4), ist die Konzentration mit Hilfe des Photometers bestimmt worden (siehe 2.2.6.5).

2.2.6.3 Maxi-Preparation mit Kit

Zur Maxi-Preparation von Plasmid- DNA wurde das Plasmid Maxi Kit von Qiagen verwendet (siehe 2.1.6). Hierzu wurden zunächst *E.coli*-Kulturen hergestellt aus jeweils 100 ml LB-Medium, 1 µl Ampicillin (Stockkonz.: 100 mg/ml) und 100 µl des jeweiligen Glycerolstocks (siehe 2.2.5.7). Diese Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen in jeweils zwei 50 ml Falcons umgefüllt und für 15 min bei 6.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets mit 5 ml des RNase A-haltigen Puffers P1 resuspendiert und der Inhalt der jeweils zwei zusammengehörigen Falcons zusammengegeben. Nachfolgend wurden 10 ml des Lyse-Puffers P2 hinzugefügt, die Ansätze vier bis sechs Mal invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Zur nachfolgenden Neutralisation wurden 10 ml des gekühlten Puffers P3 hinzugegeben, die Ansätze erneut vier bis sechs Mal invertiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurden sie für 45 min bei 4 °C und 10.000 x g zentrifugiert.
Der nun die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde in neue Falcons gegeben und wiederum für 15 min bei 4 °C und 10.000 x g zentrifugiert. Während dieses Zentrifugationsschrittes wurden die Qiagen-tips in frische 50 ml Falcons gestellt und mit 10 ml QBT

Puffer equilibriert. Die zentrifugierten Überstände wurden auf die Membranen der Qiagen-tips pipettiert und ihre Passage durch die Membranen wurde unter Schwerkrafteinwirkung ermöglicht. Anschließend wurden die Membranen zur weiteren Aufreinigung zweimalig mit jeweils 30 ml QC Puffer gewaschen. Die Qiagen-tips wurden in neue 50 ml Falcons platziert und die Plasmid-DNA wurde schließlich mit 15 ml QF Puffer eluiert. Es wurden dann jeweils 10,5 ml Isopropanol hinzugegeben, die Falcons einmal invertiert und für 45 min bei 4 °C und 10.000 x g zentrifugiert, um die DNA auszufällen. Die entstandenen Zellpellets wurden mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 15 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen. Um die DNA-Pellets zu lösen, wurden ihnen jeweils 500 µl ddH_2O hinzugefügt. Sie wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert bevor sie zur längeren Aufbewahrung bei -20 °C eingelagert wurden (MG1-4, MT1-4).

2.2.6.4 Extraktion genomischer DNA

Zur Extraktion genomischer DNA wurde das Pure Link Genomic DNA Mini Kit von Invitrogen verwendet (siehe 2.1.6). Zur Vorbereitung wurde der Heizblock auf 55 °C vorgewärmt, den Wasch-Puffern 1 und 2 100% Ethanol hinzugefügt und 20 µl Proteinase K (Stockkonz.: 20 mg/ml) in ein 2 ml-Tube pipettiert.

Das verbrauchte Medium wurde von den circa 5 Millionen kultivierten ipSCs abgenommen und 200 µl Tryple-LE hinzugefügt, um die Zellen abzulösen. Die Zellen wurden so für ca. 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mit dem hinzugefügten Tryple-LE gespült und resuspendiert. Zum Entfernen des Tryple-LEs wurden die Ansätze in 2 ml-Tubes übertragen und für 5 min bei 100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Pellets wurden mit 200 µl DPBS (+Mg, +Ca) resuspendiert. Anschließend wurden die Ansätze in die mit Proteinase K vorbereiteten Tubes transferiert. Es wurden dann jeweils 20 µl RNase A (Stockkonz.: 20 mg/ml) hinzugegeben, kurz gevortext und für 2 min bei RT inkubiert. Als nächstes wurden 200 µl des Pure Link Genomic Lysis/Binding Puffers hinzupipettiert, gevortext und die Ansätze für 10 min bei 55 °C im Heizblock zum Proteinverdau inkubiert.

Dann wurden 200 µl 100 %iger Ethanol hinzugefügt und gevortext. Die Ansätze wurden auf im Kit enthaltende Säulen gegeben und für 1 min bei RT und 10.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Nachfolgend wurden 500 µl Waschpuffer 1 hinzugegeben, für 1 min bei RT und 10.000 x g zentrifugiert, danach 500 µl Waschpuffer 2 hinzugefügt und für 3 min bei RT und 17.968 x g zentrifugiert.

Die Säulen wurden hiernach in 1,5 ml-Tubes gestellt, es wurden 50 µl ddH_2O hinzupipettiert und zur Elution der DNA aus der Säule wurden die Ansätze für 1 min bei RT

inkubiert und anschließend für 1 min bei 17.968 x g zentrifugiert. Zur Erhöhung der DNA-Ausbeute wurde dieser Schritt wiederholt.
Die 1,5 ml-Tubes, die nun die aufgereinigte DNA enthalten, wurden zur längeren Aufbewahrung bei -20 °C eingefroren (EG1-4, ET1-4).

2.2.6.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung von DNA-Konzentrationen wurde im Photometer zunächst mit dem jeweils verwendeten Lösungsmedium ein Nullwert (Blank) eingestellt. Anschließend wurden pro Probe 7 µl in die Messküvette pipettiert und die Konzentration bei 230 nm gemessen.

2.2.7 Transfektion und Selektion von ipSCs

2.2.7.1 Transfektion

Maximal 30 min vor der Transfektion wurde das verbrauchte Medium mit frischen 4 ml mTeSR pro Well ersetzt.
Zur Vorbereitung der Transfektionsansätze wurden pro Ansatz 2 x 2 ml-Tubes vorbereitet. In Tube 1 wurden 100 µl mTeSR und 4 µl Lipofectamine Stem reagent (siehe 2.1.3) zusammenpipettiert. In Tube 2 wurden 100 µl mTeSR und 2.000 ng der jeweiligen gRNA/Cas9-Plasmid-DNA (MG1,2,3,4) gegeben und gevortext. Der Inhalt von Tube 2 wurde dann zu Tube 1 hinzugegeben, gevortext und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden tröpchenweise 200 µl der Transfektionsansätze auf jeweils ein Well übertragen.
Als Transfektionskontrolle wurden einem Well 2.000 ng GFP-Plasmid-DNA hinzugefügt und als Negativkontrolle wurde ein weiteres Well mit einem „leeren“ px459-Plasmid ohne guideRNA-Sequenz transfiziert.

Tabelle 15: Transfektionsansätze ipSC

	Plasmid-DNA	**mTeSR**	**Lipofectamine**
gRNA/Cas9-Plasmid bzw. GFP-Plasmid	2.000 ng	200 µl	4 µl

2.2.7.2 Selektion

Zur Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen, wurden jedem Well beim Mediumwechsel über 4-6 Tage 100 ng/ml Puromycin hinzugefügt.
Da die zu transfizierenden Plasmide eine Puromycinresistenz besitzen, wurden nur jene Zellen eliminiert, welche keine Plasmide aufgenommen haben.

2.2.8 TIDE-Analyse

Nach Transfektion und Selektion der ipSCs wurde die in den Zellen enthaltene genomische DNA nach einigen Tagen mittels Kit extrahiert (siehe 2.2.6.4) und die jeweiligen DNA-Konzentrationen gemessen. Anschließend wurde zur Vervielfältigung der DNA eine PCR durchgeführt. Hierfür wurden die Primer aus 2.1.8 (Tabelle 8) eins zu zehn verdünnt.

Tabelle 16: PCR-Ansätze

Mastermix	
ddH_2O	39,2 µl / 38,2 µl für gRNA/Cas9-Konstrukt 3
Puffer (5x)	12 µl
dNTP (10 mM)	4,8 µl
PrG1for-PrG4for	1,2 µl
PrG1rev-PrG4rev	1,2 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,6 µl
Mastermix-Gesamt	59 µl
gDNA (100 ng)	1 µl / 2 µl für gRNA/Cas9-Konstrukt 3
Gesamt	**60 µl**

Tabelle 17: PCR-Programm

	Menge / Temperatur	**Zeit**
Ansatzgröße	60 µl	
Polymerase		
Hot Start	98 °C	30 sec
Programm	**35 Zyklen:**	**Cycler:**
Denaturierung	98 °C	10 sec
Annealing	60-72 °C	15 sec
Abschluss	72 °C	90 sec
	72 °C	10 min
	10 °C	1 min

x 35

Den Ansätzen wurde danach jeweils 4 µl Orange Loading Dye hinzugegeben und pro Ansatz 6 x 10 µl in eine Tasche eines Agarosegels pipettiert. Eine Gelelektorphorese wurde durchgeführt. Die Banden wurden ausgestanzt, die enthaltene DNA mit dem PCR Purification Kit (siehe 2.1.6) gereinigt und an Microsynth SeqLab GmbH (Göttingen) für eine Sanger-Sequenzierung (Software: Chromas light (siehe 2.1.7)) geschickt. Hierfür sollten die zu versendenden Ansätze für die Sanger-Sequenzierung 15 µl umfassen. Es wurden daher zunächst DNA-Ansätze (à 12 µl) und ein Primer-Ansatz (20 µl für PrGfor) erstellt.
Die DNA-Konzentration in den DNA-Ansätzen sollte laut SeqLab 15 ng/µl entsprechen, da jeder Ansatz 12 µl umfassen sollte, musste die jeweilige Gesamtmenge an DNA 180 ng sein. Da der PCR-Ansatz für gRNA/Cas9-Konstrukt 3 2 µl DNA enthielt, wurde für die Sanger-Sequenzierung eine Gesamtmenge an DNA von 90 ng benötigt.

Tabelle 18: DNA-Ansätze für Sangersequenzierung

		gemessene DNA-Konzentration	**DNA** $\frac{180\ ng\ bzw.\ 90\ ng}{gemessene\ DNA-Konz.}$	**ddH_2O**
gRNA/Cas9-Konstrukt 1	**Pleer1**	15 ng/µl	12 µl	-
	Ppx1	29 ng/µl	6 µl	6 µl
	PG1.1	45 ng/µl	4 µl	8 µl
	PG1.2	36 ng/µl	5 µl	7 µl

gRNA/Cas9-Konstrukt 2	**Pleer2**	12 ng/µl	15 µl → 12 µl	-
	Ppx2	28 ng/µl	6,4 µl	5,6 µl
	PG2.1	42 ng/µl	4,3 µl	7,7 µl
	PG2.2	35 ng/µl	5,1 µl	6,9 µl
gRNA/Cas9-Konstrukt 3	**Pleer3**	10 ng/µl	9 µl	3 µl
	Ppx3	36 ng/µl	2,5 µl	9,5 µl
	PG3.1	36 ng/µl	2,5 µl	9,5 µl
	PG3.2	42 ng/µl	2,1 µl	9,9 µl
gRNA/Cas9-Konstrukt 4	**Pleer4**	10 ng/µl	12 µl	-
	Ppx4	33 ng/µl	5,5 µl	6,5 µl
	PG4.1	24 ng/µl	7,5 µl	4,5 µl
	PG4.2	26 ng/µl	7 µl	5 µl

Legende:

Proben: *PGx.1* = PCR-Ansatz gRNA/Cas9-Konstrukt Probe 1
PGx.2 = PCR-Ansatz gRNA/Cas9-Konstrukt Probe 2

Negativkontrollen: *Pleerx* = PCR-Ansatz genomische DNA aus ipSC
Ppxx = PCR-Ansatz px459-Plasmid

Tabelle 19: Gesamt-Ansätze für Sangersequenzierung

	Menge
DNA-Ansatz	12 µl
Primer-Ansatz (1:10 verdünnt)	3 µl
Gesamt	**15 µl**

Unter Zuhilfenahme des TIDE web tools (siehe 2.1.7), wurden die Sanger-Sequenzierungen auf Indels untersucht (vergleiche 1.3.3.3).

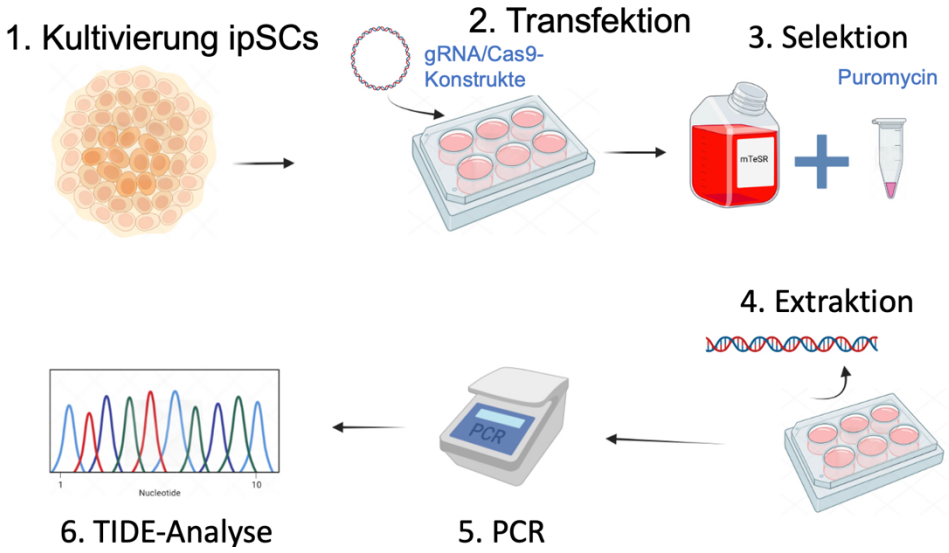


Abbildung 8: schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur TIDE-Analyse (erstellt mit BioRender.com)

2.2.9 T7-Endonuklease-I-Assay

Für das T7-Endonuklease-I-Assay wurde das Protokoll von New England BioLabs „Determining Genome Targeting Efficiency using T7 Endonuclease I (M0302)" angepasst und zum Teil angewendet (https://www.neb.com/en/protocols/2014/08/11/determining-genome-targeting-efficiency-using-t7-endonuclease-i).
Für den Verdau wurden die PCR-Produkte verwendet, welche bereits für die TIDE-Analyse hergestellt wurden (siehe 2.2.8).

Tabelle 20: Ansätze für Hybridisierungsreaktion

Komponenten	**19 µl Hybridisierungsreaktion**
DNA	10 µl
10X NEBuffer 2	2 µl
ddH_2O	7 µl

Tabelle 21: Programm für Hybridisierungsreaktion

Schritte	**Temperatur**	**Anstiegsrate**	**Zeit**
Initiale Denaturierung	95°C		5 min
Hybridisierung	95-85°C 85-25°C	-2°C / sec -0,1°C / sec	
Halten	4°C		

Tabelle 22: Ansätze für T7E1-Verdau

Komponenten	**20 µl Reaktion**
hybridisiertes PCR-Produkt	19 µl
T7 Endonuclease I (M0302)	1 µl
Inkubationszeit	15 min
Inkubationstemperatur	37°C

Der Verdau wurde nach 15 min gestoppt, indem 1,5 µl 0,25 M EDTA hinzugegeben wurden.
Den Ansätzen wurden schließlich jeweils 4,5 µl Purple Loading Dye hinzugefügt und es wurde eine Gelelektrophorese zur Überprüfung des Restriktionserfolges durchgeführt. Als Positivkontrolle diente ein laborintern erstelltes NHEJ-Plasmid (BRET-Reporter) mit zwei einzelnen Basenmutationen (Substitutionen) in den target-Regionen des CLN3-Gens (Experimentelle Ophthamologie Gießen©). Mutationen in diesem Gen führen zum Bild einer juvenilen neuronalen Ceroidlipofuscinose.

2.2.10 BRET-Analyse

2.2.10.1 Vorbereitung der 6-Well-Platten

Für die Transfektion der HEK-Zellen mit den rekombinanten Plasmiden (MG1-4, MT1-4) wurden pro guideRNA zwei Wells einer 6-Well-Platte vorbereitet, außerdem ein Well für die Luciferase als Standard 100%-Frameshiftrate.
Hierzu wurden auf einer 100x20 mm Zellplatte kultivierte HEK-Zellen mit 1 ml Accutase gelöst, mit 9 ml DMEM +++ resuspendiert und von der Suspension jeweils 750 µl auf die Wells verteilt. Es wurden pro Well 1,5 ml DMEM +++ hinzugegeben und die Wells über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.10.2 Transfektion der HEK-Zellen

Das Einbringen von DNA oder RNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Hierfür wurde das verbrauchte Medium der 6-Well-Platten (siehe 2.2.10.1) maximal 30 Minuten zuvor mit jeweils 1,5 ml frischem DMEM+++ zur Anregung der Zellteilung ausgetauscht. Für die Transfektionsansätze wurden pro Ansatz 200 µl NaCl in ein

2 ml-Tube pipettiert. Es wurden 2.000 ng des jeweiligen gRNA/Cas9-Plasmids und beziehungsweise oder 2.500 g der jeweiligen Target-DNA enthaltenden BRET-Reporter-Plasmide (siehe Tabelle 23) hinzupipettiert und gevortext.
Als Fällmittel wurden pro Ansatz 100 µl Polyethyleminin (PEI) (0,1 mg/ml) verwendet. PEI ist ein kationisches Polymer, das an DNA bindet und deren Aufnahme in die Zelle über Endozytose ermöglicht (Boussif et al., 1995; Longo et al., 2013). Nach Zugabe des PEI wurden die Ansätze erneut gevortext und für 20 min bei RT inkubiert.
Als Standard 100 % Frameshift-Rate wurde ein Well mit 1.000 ng RLuc8 Expressionsvektor transfiziert.
Zur Transfektion wurden diese Ansätze dann tropfenweise auf die vorbereiteten Wells pipettiert und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach 4 h wurde das Medium mit 2 ml frischem DMEM +++ ausgetauscht, um die zytotoxische Wirkung des PEIs zu minimieren.
Die Well-Platten wurden schließlich über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 23: Transfektionsansätze HEK

Komponenten	**Menge**
DNA	2.000 ng gRNA/Cas9- bzw. 2.500 ng NHEJ-Reporter- bzw. 1.000 ng RLuc8-Plasmid
NaCl (150 mM)	200 µl
PEI (0,1 mg/ml)	100 µl

2.2.10.3 BRET-Assay

Nach erfolgreicher Erstellung der designten Plasmide (siehe 2.2.5 und 2.2.6) erfolgte nun ihre Aktivitätsmessung mit Hilfe des BRET-Reporters (siehe 1.3.3.2). Dafür erfolgte zunächst eine Transfektion, also das Einbringen der erstellten Plasmide in HEK 293-T-Zellen und ihre Inkubation über Nacht (siehe 2.2.10.1 und 2.2.10.2).
Die eingebrachten Plasmide wurden hierdurch zur Herstellung der zum BRET-Assay benötigten Proteine transkribiert und translatiert. Am nächsten Tag erfolgte eine GFP-Transfektionskontrolle (siehe Abb. 19). Ein Nachweis von GFP-Lichtemission spricht hierbei für eine erfolgreiche Transfektion. Die Proteine wurden anschließend aus den Zellen extrahiert und ihre Lumineszenz und Fluoreszenz mit Hilfe eines Photometers gemessen.
Um die Proteine für das BRET-Assay aus den HEK 293T-Zellen zu extrahieren, wurde das verbrauchte Medium aus 2.2.10.2 zunächst abgenommen und die Zellen mit 1 ml 1

x PBS gewaschen. Es wurden 100 µl des PBS hinzugegeben, die Zellen mit einem Zellschaber von den Platten gelöst und anschließend resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in 2 ml-Tubes übertragen und mit Flüssigstickstoff zweimal schockgefroren, aufgetaut und gevortext, um die Zellen zu lysieren und die Proteine im PBS zu lösen. Eine darauffolgende Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 17.968 x g erlaubt die Trennung von Zelltrümmern und Proteinen, welche im Überstand vorhanden sind und in frische 2 ml-Tubes übertragen wurden.

Zur Lumineszenzmessung wurden pro Transfektionsansatz jeweils 10 µl in vier Wells einer weißen Lumineszenz 96-Well-Platte pipettiert.

Mit dem Multimode Platereader wurden automatisch jeweils 100 µl Luciferasesubstrat (Coelenterazine 400a, 10 ng/ml, verdünnt in 1x PBS) in jedes Well injiziert. Im Dual-Lumineszenz Mode wurde nachfolgend die Lichtemission der Luciferase (RLuc8) und des angeregten grünfluoreszierenden Proteins (GFP2) quantifiziert. Hierbei wurde mit dem Filter „Magenta“ (<450 nm) das Emissionsmaximum der Luciferase und mit dem Filter „Green“ (500-550 nm) das des GFPs erfasst.

Zur Auswertung des Assays wurde der Quotient aus GFP Emission und Intensität der Luciferase Emission berechnet und von diesem der Mittelwert der Luciferase-Messungen zur Normalisierung abgezogen.

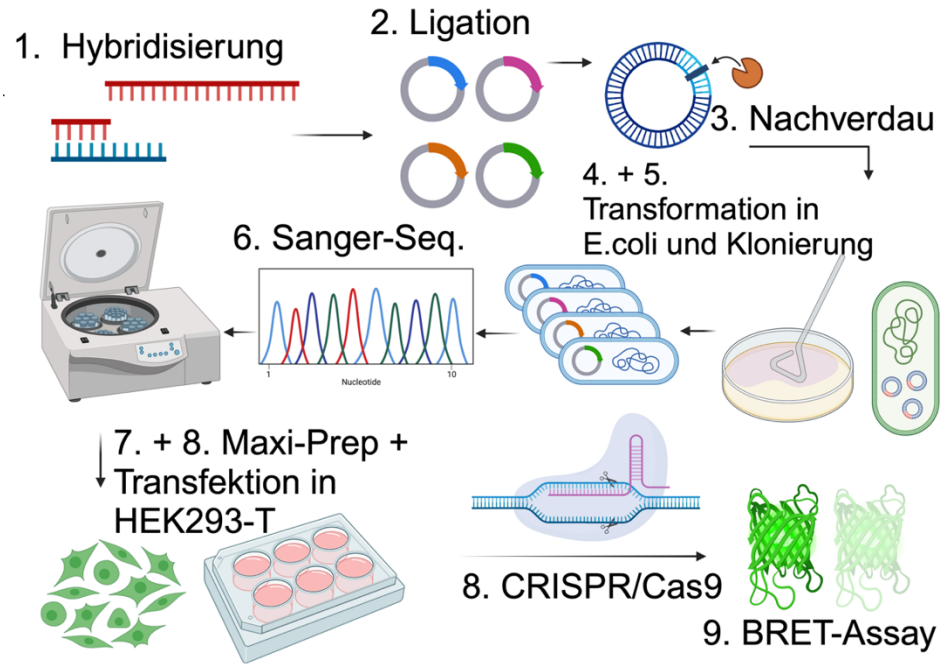


Abbildung 9: schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zum BRET-Assay
(erstellt mit BioRender.com)

2.2.11 Statistische Auswertung

Zur Bestimmung der Mittelwerte und Standardabweichungen wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt. Die TIDE-Analyse und das T7-Endonuklease I-Assay wurden einmalig (N = 1), das BRET-Assay dreimalig (N = 3) in Vierfachbestimmung durchgeführt. Zur statistischen Auswertung wurde der paired t-test, der Shapiro-Wilk-Test sowie der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test herangezogen. Die Berechnung erfolgte mittels SigmaPlot (siehe 2.1.7). P-Werte unter 0,05 ($*p < 0,05$) werden als statistisch signifikant, und unter 0,01 ($*p < 0,01$) als hochsignifikant bewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Design und Kontrolle der guideRNA-und target-Sequenzen

3.1.1 Design und Herstellung der guideRNA- und target-Sequenzen

Um mit CRISPR/Cas9 im Gen schneiden zu können, wurden zunächst die Zielsequenzen („target-Sequenzen“) und die guideRNA-Sequenzen designt. Ein Auswahlkriterium war dabei das Vorhandensein der PAM-Sequenz NGG für den forward-Strang und NCC für den reverse-Strang (siehe 1.3.1 und Tab. 7). N steht hierbei für eine beliebige Base. Die target- und guideRNA-Sequenzen erhielten außerdem einen bestimmten Basenüberhang (siehe Tab. 7) für den späteren Einbau in die jeweiligen Plasmide (vgl. 2.2.5). Zum Erstellen der Oligonukleotide wurde der „Cas-Designer“ auf rgenome.net verwendet (siehe 2.1.7).



Abbildung 10: Bindestellen der vier gRNAs (*G1-G4*) im *USH2A*-Gen

Aus Darstellungsgründen sind die Größenverhältnisse der gRNAs, Exons und Introns nicht maßstabsgetreu. *PA = Polyadenylierungssignal*

3.1.2 Vorbereitung der Plasmide

Zur Vorbereitung der Plasmide für die Integration der Oligonukleotide unterliefen diese einem enzymatischen Restriktionsverdau (siehe 2.2.3), nach welchem sie in linearisierter Form vorlagen und sogenannte „sticky ends“ besaßen, also Basenüberhänge, an die sich die guideRNA- bzw. target-Doppelstränge mit ihren komplementären Basenüberhängen später anlagern konnten. Zur Überprüfung der erfolgreichen Restriktion wurde ein Kontrollverdau durchgeführt und das Ergebnis mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht (vgl. 2.2.4).

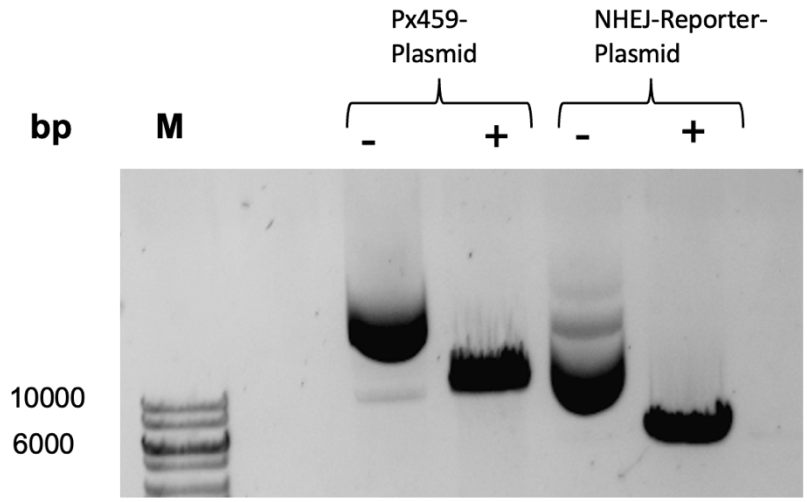


Abbildung 11: Kontrollverdau

Das Gelbild zeigt einen erfolgreichen Restriktionsverdau. Beide Negativkontrollen (-) zeigen unterschiedlich große Banden, hier liegen die Plasmide also in den drei verschiedenen Konformationen vor. Die Positivkontrollen (+) zeigen nur eine Bande, was darauf hinweist, dass das Plasmid nur in einer Konformation vorliegt, nämlich in der gewünschten linearisierten. *M*: Marker (GeneRuler 1 kb DNA-Ladder).

3.1.3 Verifizierung der Klonierung durch Sanger-Sequenzierung

Zur Kontrolle der erfolgreichen Plasmidintegration wurde aus einem Teil der transformierten Bakterien DNA mittels MiniPrep (siehe 2.2.6.1) isoliert und zur Überprüfung an Microsynth SeqLab GmbH (Göttingen) zur Sanger-Sequenzierung geschickt. Die Sanger-Sequenzierungen zeigten die korrekte guideRNA- beziehungsweise target-Sequenzen in den jeweiligen Plasmiden (siehe Abb. 12), was den erfolgreichen Einbau der Oligonukleotide bestätigt.

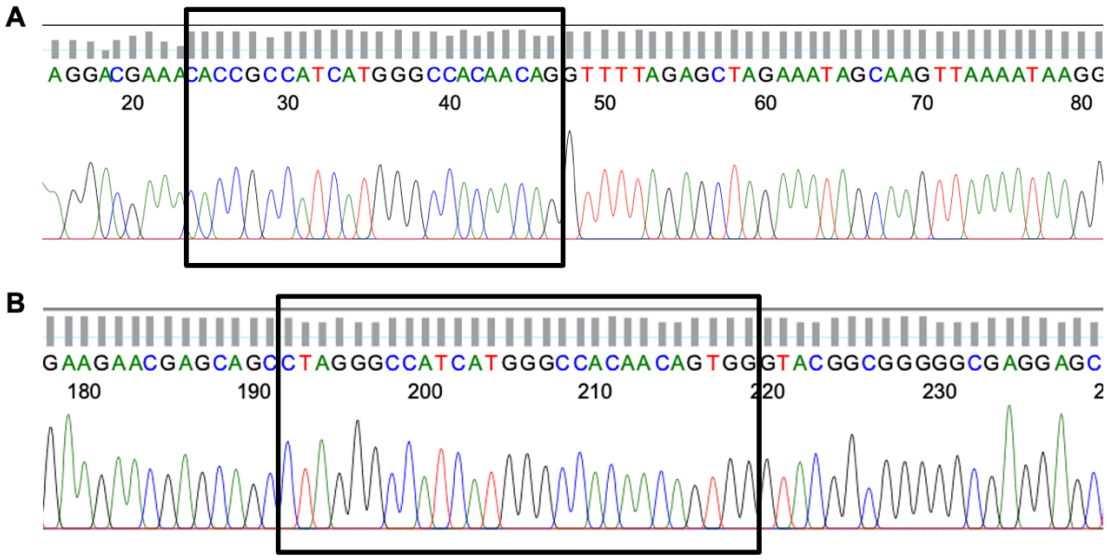


Abbildung 12: Ergebnisse der Sequenzierung nach Sanger

(**A**) Dargestellt am Beispiel für gRNA-Sequenz 1: Es zeigt sich die gRNA-Sequenz 1 im Genom (Sequenz schwarz umrahmt), was die erfolgreiche Integration der Sequenz in das px459 -Plasmid bestätigt. **B**) Dargestellt am Beispiel für Target-Sequenz 1: Auch hier zeigt sich die erfolgreiche Integration durch das Vorhandensein der korrekten Target-Sequenz 1 (schwarz umrahmt) im NHEJ-Reporter-Plasmid (vgl. G1f und T1f aus Tab. 7).

3.2 Vorbereitung der ipSCs

3.2.1 Etablierung eines Transfektionsprotokolls

Zur Durchführung der Analyse wurden zunächst induzierte pluripotente Stammzellen (ipSC) in Kultur gebracht (siehe 2.2.1.1), um sie anschließend der Transfektion mit den gRNA/Cas9-Konstrukt enthaltenden und den als Negativkontrollen dienenden „leeren“ px459-Plasmiden zu unterziehen (vergleiche 2.2.7). Zur Überprüfung der Transfektion wurde eine GFP Kontrolle mitgeführt (vergleiche 2.2.7.1). Sichtbar ist die Lichtemission des GFP in Abbildung 13, was für eine erfolgreiche Transfektion spricht.

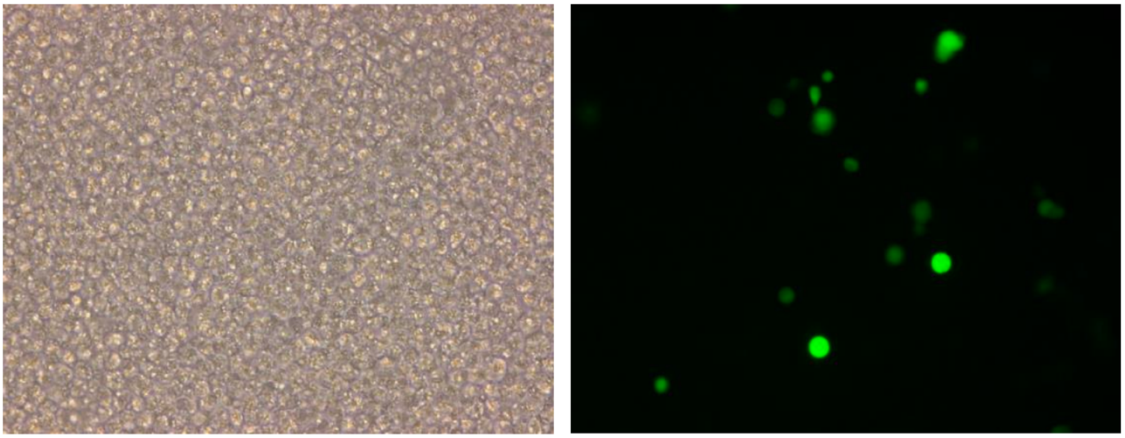


Abbildung 13: GFP-Transfektionskontrolle in ipSC

Die Lichtemission durch exprimiertes GFP in den ipSCs spricht für eine erfolgreiche Transfektion der Plasmide in die Zellen.

3.2.2 Vervielfältigung mittels PCR

Nach Selektion mit Puromycin zur Verringerung der nicht transfizierten Zellen (siehe 2.2.7.2) erfolgte die Extraktion der genomischen DNA aus den transfizierten ipSCs (siehe 2.2.6.4), die Vervielfältigung der gewonnenen DNA mittels PCR sowie die anschließende Gelelektrophorese. Um auf die für die weitere Analysen benötigte DNA-Konzentration zu kommen, wurde die PCR mehrfach simultan durchgeführt. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese sind in Abbildung 14 und 15 aufgeführt.

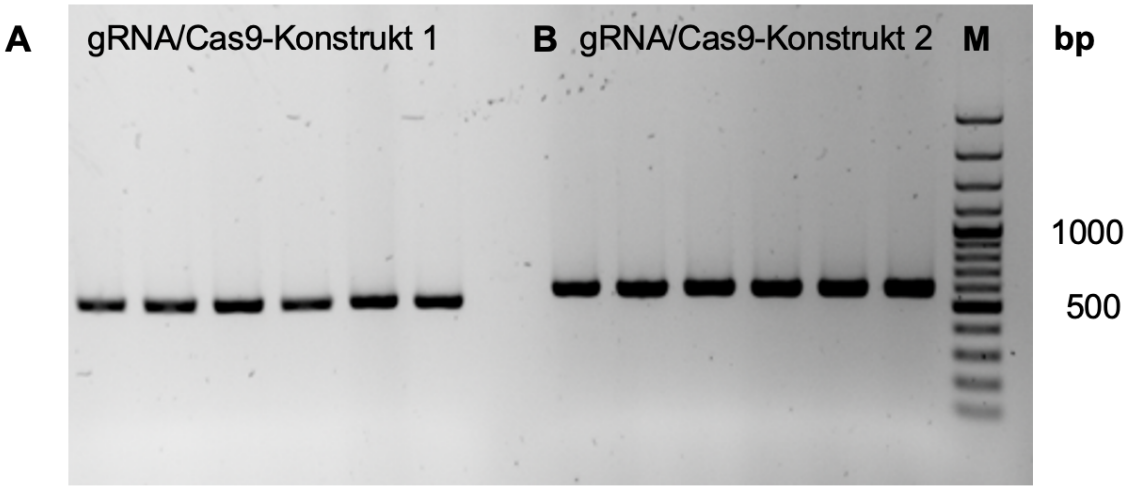


Abbildung 14: Gelektrophorese der ipSC-gDNA nach PCR

Dargestellt am Beispiel der Proben gRNA/Cas9-Konstrukt 1 (**A**) und gRNA/Cas9-Konstrukt 2 (**B**). *M*: Marker (GeneRuler 100 bp DNA-Ladder).

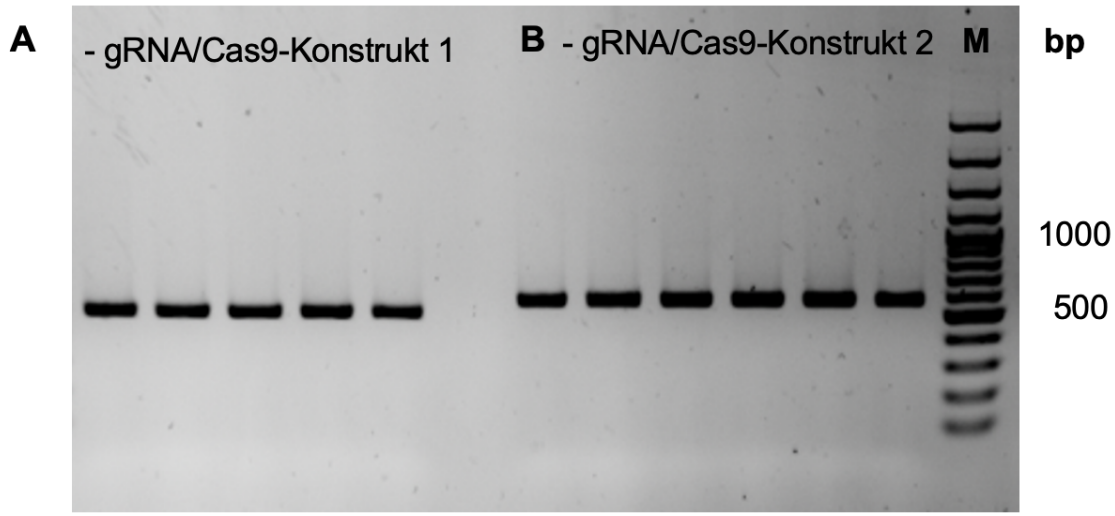


Abbildung 15: Gelelektrophorese der ipSC-gDNA nach PCR

Dargestellt am Beispiel der Negativkontrollen px459-Plasmid für gRNA/Cas9-Konstrukt 1 (**A**) und gRNA/Cas9-Konstrukt 2 (**B**). *M*: Marker (GeneRuler 100 bp DNA-Ladder).

3.2.3 Verifizierung durch Sangersequenzierung

Die in den Banden der Gelelektrophorese enthaltende DNA (siehe Abb.14 und 15) wurde aufgereinigt und zur Sanger-Sequenzierung an Microsynth SeqLab (Göttingen) geschickt (siehe 2.2.8). Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Abbildung 16 am Beispiel für gRNA/Cas9-Konstrukt 1 dargestellt. Erkennbar ist die Zielsequenz für die Cas9-Endonuklease im Genom.

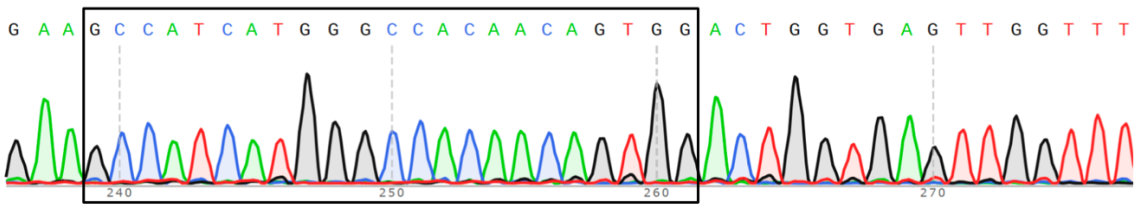


Abbildung 16: Ergebnisse der Sequenzierung nach Sanger

Dargestellt am Beispiel des gRNA/Cas9-Konstrukts 1. Die Zielsequenz einschließlich der PAM-Sequenz (vgl. Tab. 7, T1f) im Genom ist mit schwarzem Rahmen markiert.

3.3 Mismatch-Kontrolle mittels T7-Endonuklease-I-Assay

Zur Kontrolle der Effizienz der Doppelstrangbruchinduktion der gRNA/Cas9-Konstrukte erfolgte die Untersuchung auf Basenfehlpaarungen in der DNA im Rahmen eines T7-Endonuklease-I-Assays (siehe 2.2.9). Hier werden nach Doppelstrangbruch und anschließender zelleigener Reparatur auftretende Mismatches in der DNA erkannt und an

dieser Stelle geschnitten. Mittels Gelelektrophorese kann das Ergebnis der Restriktion sichtbar gemacht werden (vergleiche 1.3.3.1).
Die unter 3.2.2 dargestellten PCR-Produkte unterliefen, wie in 2.2.9 beschrieben, einem Verdau durch eine T7-Endonuklease I. Das Ergebnis dieses Verdaus veranschaulicht die in Abbildung 17 aufgeführte Gelelektrophorese.

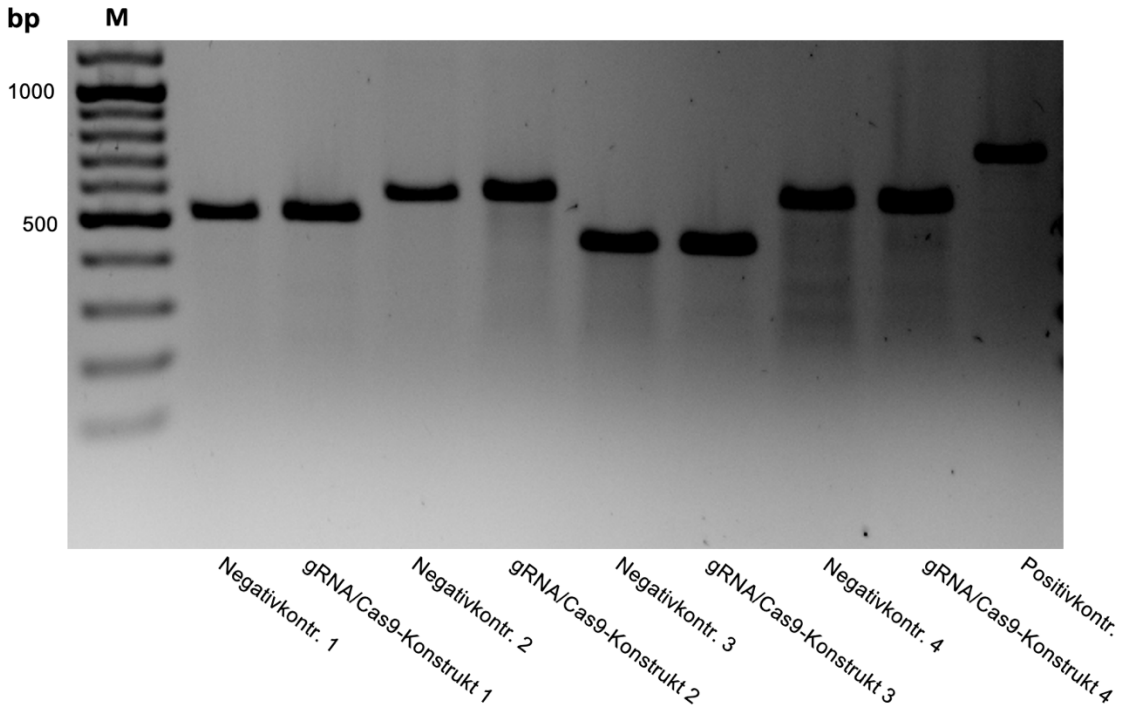


Abbildung 17: Gelelektrophorese des T7-Endonuklease-I-Assays
Hier zeigt sich die Spaltung für gRNA/Cas9-Konstrukt 1 und 2 am Ziellocus (genauere Darstellung siehe Abb. 18). Die Analyse für gRNA/Cas9-Konstrukt 3 und 4 bleibt im Vergleich zu den Negativkontrollen uneindeutig. *M* = Marker (GeneRuler 100 bp DNA-Ladder).

Es zeigt sich ein heterogenes Ergebnis. Für gRNA/Cas9-Konstrukt 1 und 2 können in den jeweiligen Positivkontrollen neben der parentalen Bande zusätzliche weitere schwache Banden erkannt werden, was für einen erfolgreichen Verdau spricht. Aufgrund der Blässe der Banden wurde das Gelbild für eine bessere Sichtbarkeit der Banden kontrastbearbeitet und der Bildausschnitt vergrößert. Hier sind die Banden deutlicher zu erkennen (siehe Abb. 18). Für gRNA/Cas9-Konstrukt 1 lassen sich zwei zusätzliche Banden erkennen, während die zugehörige Negativkontrolle nur die Wildtyp-Bande aufzeigt. Auch die Negativkontrolle für gRNA/Cas9-Konstrukt 2 zeigt lediglich die Wildtyp-Bande, wobei die gRNA/Cas9-Konstrukt 2-Positivkontrolle mehrere weitere Banden enthält.
Für gRNA/Cas9-Konstrukt 3 und 4 bleibt das Ergebnis uneindeutig. Hier sind mehrere Banden sichtbar sowohl in den Positiv- als auch in den Negativkontrollen, sodass kein

eindeutiger Zusammenhang zwischen Vorhandensein der gRNA/Cas9-Konstrukte und auftretender Mismatchs nachgewiesen werden konnte.

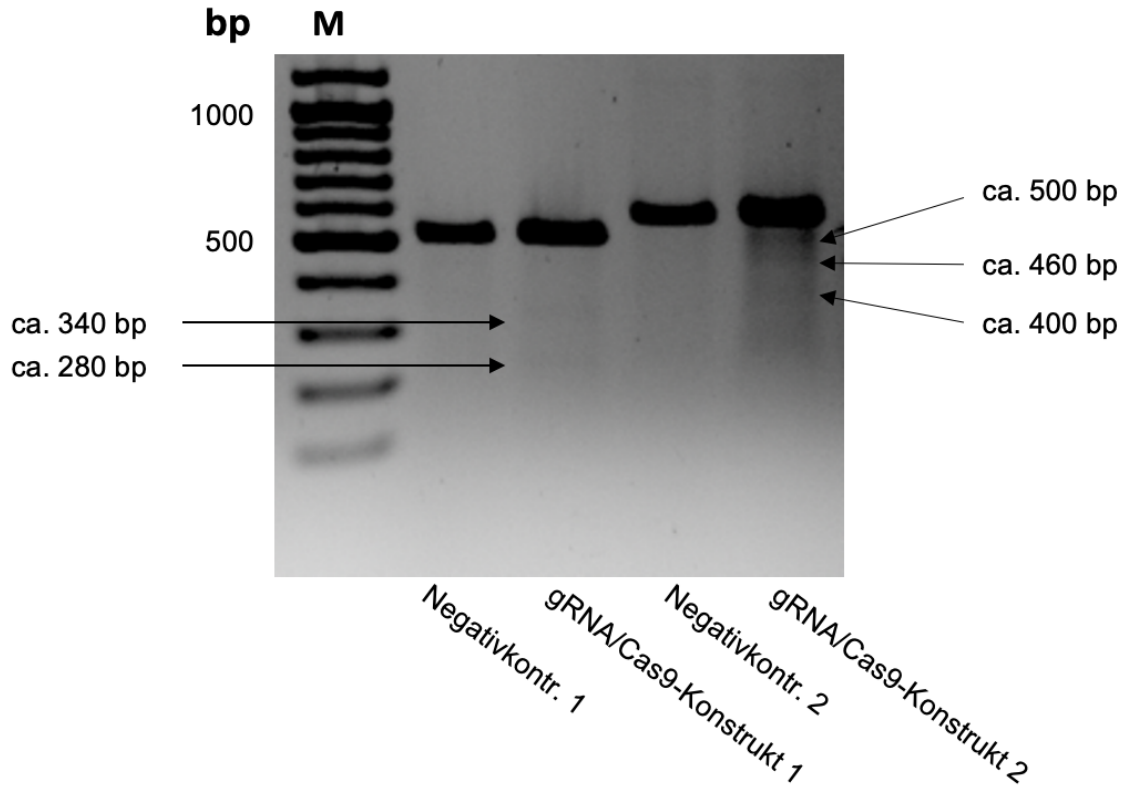


Abbildung 18: kontrastbearbeiteter Ausschnitt aus Abb. 17

Zur besseren Darstellung der Banden erfolgte eine Ausschnittsvergrößerung und Kontrastbearbeitung des Gelbilds aus Abbildung 18. Die in den Proben zusätzlich zur parentalen Bande sichtbaren Fragmente deuten auf eine Aktivität der T7 Endonuklease I hin. Da in den Negativkontrollen jeweils nur eine einzige Bande zu erkennen ist, spricht dies dafür, dass die beobachteten Spaltungen durch T7E1 auf Mismatches zurückzuführen sind, die durch die eingesetzten gRNA/Cas9-Konstrukte verursacht wurden. *M* = Marker (GeneRuler 100 bp DNA-Ladder).

3.4 BRET-Assay zur Quantifizierung der Frameshift-Aktivität

Nach erfolgreicher Klonierung der Plasmide (siehe 3.1) erfolgte nun ihre Aktivitätsmessung mit Hilfe des BRET-Reporters (siehe 1.3.3.2). Dafür erfolgte zunächst ihre Transfektion in HEK 293-T- Zellen (siehe 2.2.10.1 und 2.2.10.2). Als Nachweis der erfolgreichen Transfektion wurde eine GFP-Transfektionskontrolle, dargestellt in Abbildung 19, durchgeführt (vgl. 2.2.10.3).

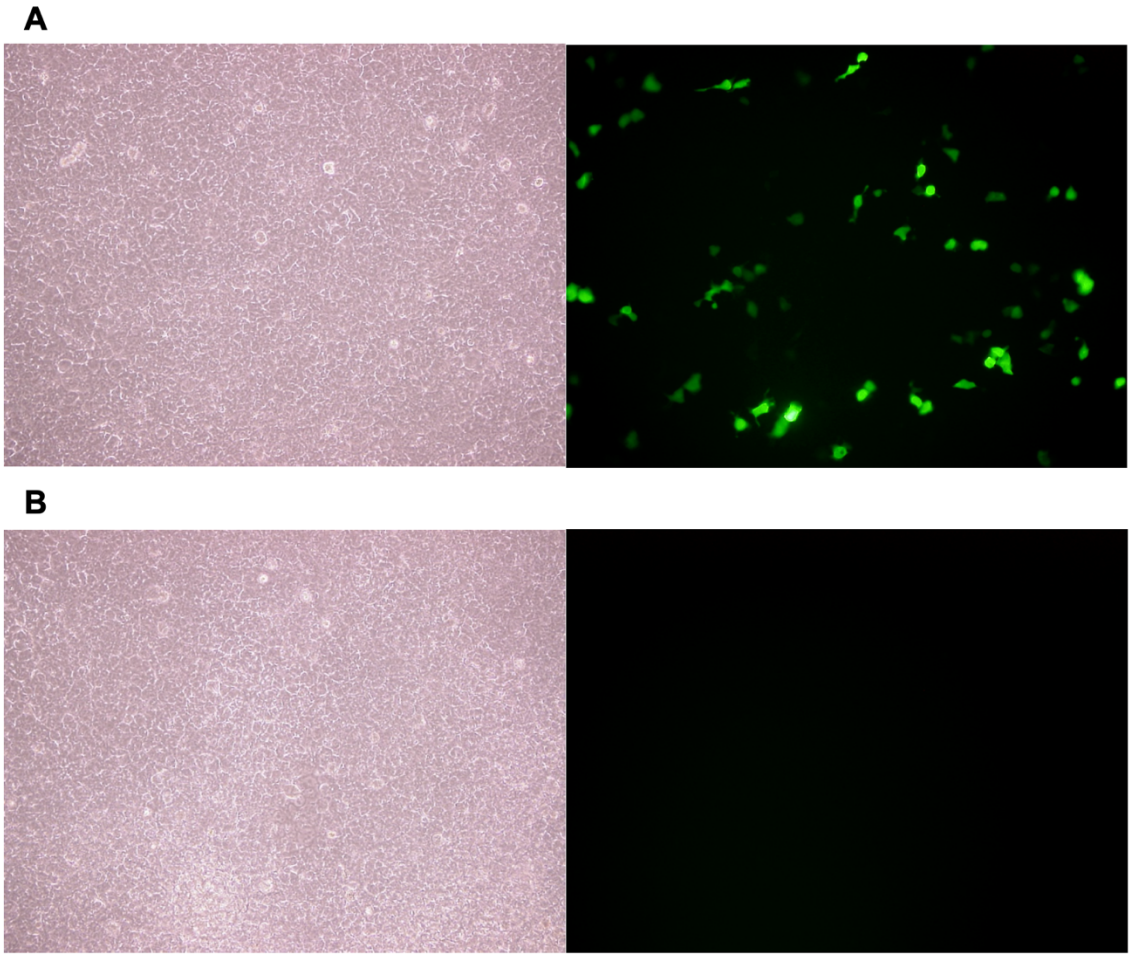


Abbildung 19: GFP-Transfektionskontrolle in HEK293-T

GFP-Kontrolle (**A**) und Negativkontrolle (**B**). Die GFP-Lichtemission in Bild A spricht für eine erfolgreiche Transfektion der Plasmide in die Zellen.

Die in den HEK 293T-Zellen exprimierten Proteine wurden anschließend aus den Zellen extrahiert und es folgte die Messung auf Lumineszenz und Fluoreszenz (siehe 2.2.10.3). Für alle vier gRNA/Cas9 Konstrukte konnte eine hoch signifikante ($p < 0{,}001$) Abnahme der BRET-Ratio gemessen werden. Die Ratio der Luciferase-Emission diente als Negativkontrolle (siehe Abb. 20).

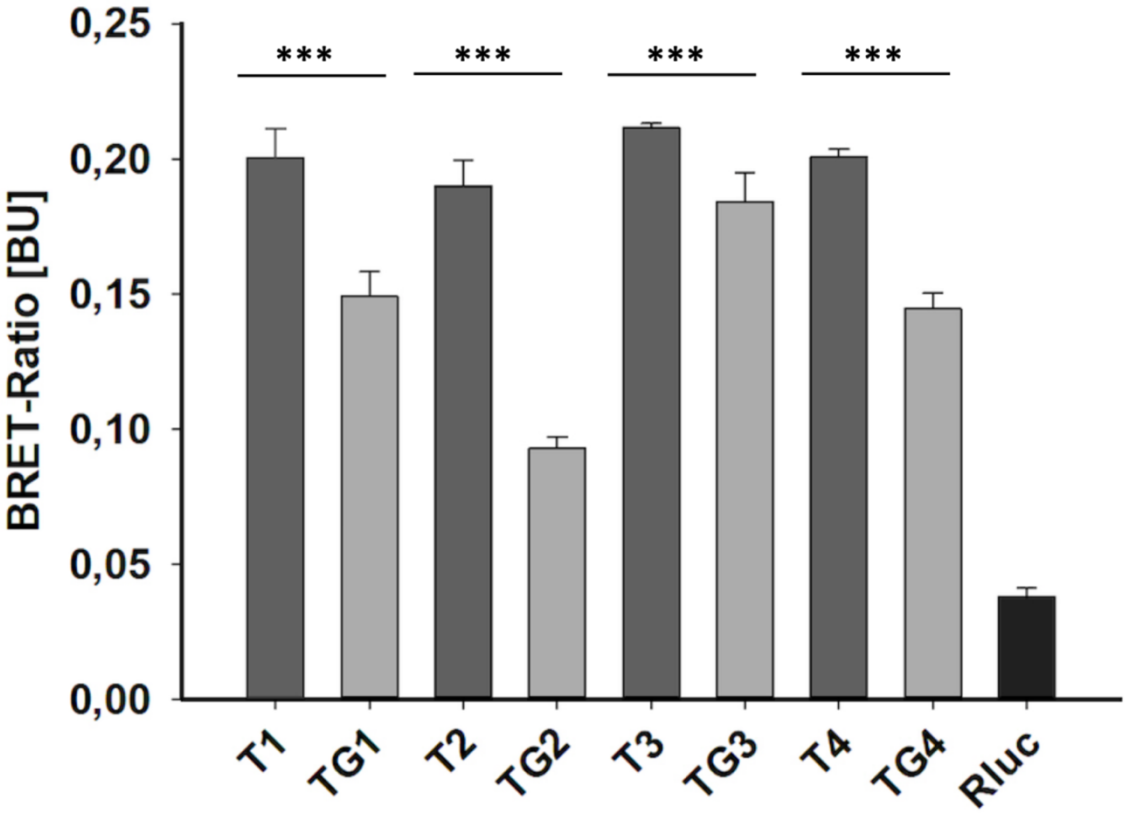


Abbildung 20: BRET-Ratio

Der Graph zeigt den hoch signifikanten (***=p<0,001) Unterschied zwischen der Emission des fluoreszierenden Proteins in den Proben, die nur die Target-Sequenz enthalten (Tx) im Vergleich zu den Proben, die zusätzlich die gRNA/Cas9-Konstrukte enthalten (TGx). Die Proben emittieren deutlich weniger Licht, was auf eine hohe Effizienz der gRNA/Cas9-Konstrukte rückschließen lässt.

Zur besseren Veranschaulichung der Effizienz der gRNA/Cas9-Konstrukte wurde ihre Frameshift-Rate berechnet und graphisch dargestellt (Abb. 21). Hierfür wurde die Ratio der Negativkontrolle RLuc von den Ergebnissen subtrahiert und die Differenz aus der BRET-Ratio der jeweiligen Kontrolle (Tx) und Probe (TGx) gebildet und in Prozent angegeben:

Rechenbeispiel für gRNA/Cas9-Konstrukt 1:

1. $\left(BRETRatio(T1) - BRETRatio(RLuc)\right) - \left(BRETRatio(TG1) - BRETRatio(RLuc)\right) = BRETRatio(T1 - TG1)$

2. $\frac{100}{\left(BRETRatio(T1) - BRETRatio(RLuc)\right)}\ x\ BRETRatio(T1 - TG1) = \boldsymbol{FrameshiftRate}\ (\%)$

Für gRNA/Cas9-Konstrukt 2 konnte die höchste Frameshift-Rate von 63,0 ± 7,2 % gemessen werden, gefolgt von gRNA/Cas9-Konstrukt 4 mit 33,7 ± 4,4 %, gRNA/Cas9-Konstrukt 1 mit 31,5 ± 8,8 % und gRNA/Cas9-Konstrukt 3 mit 15,3 ± 7,0 %.

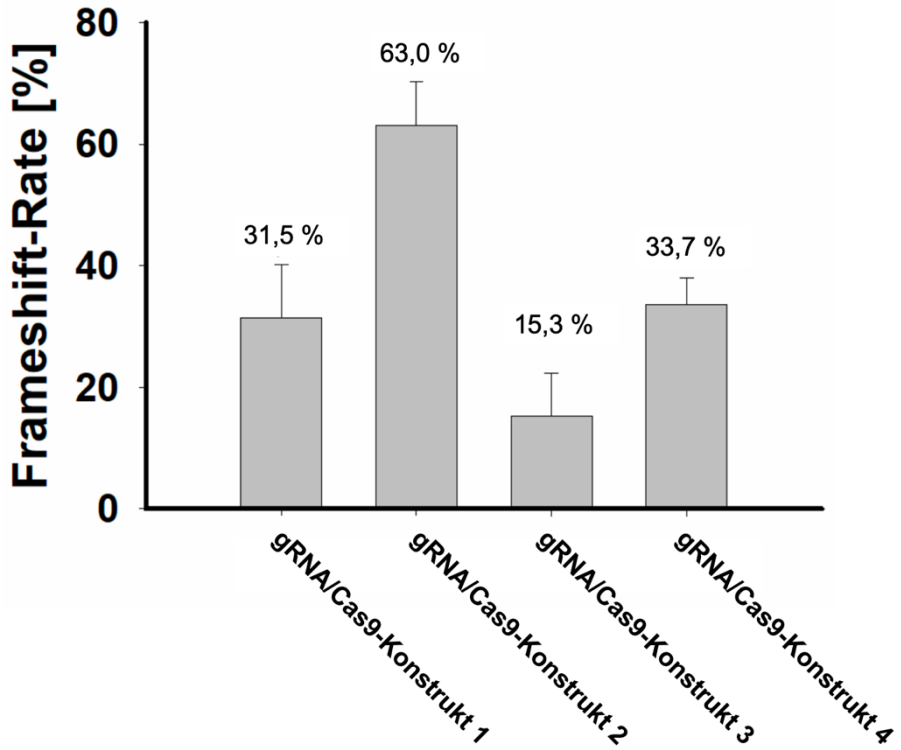


Abbildung 21: Frameshift-Raten der gRNA/Cas9-Konstrukte

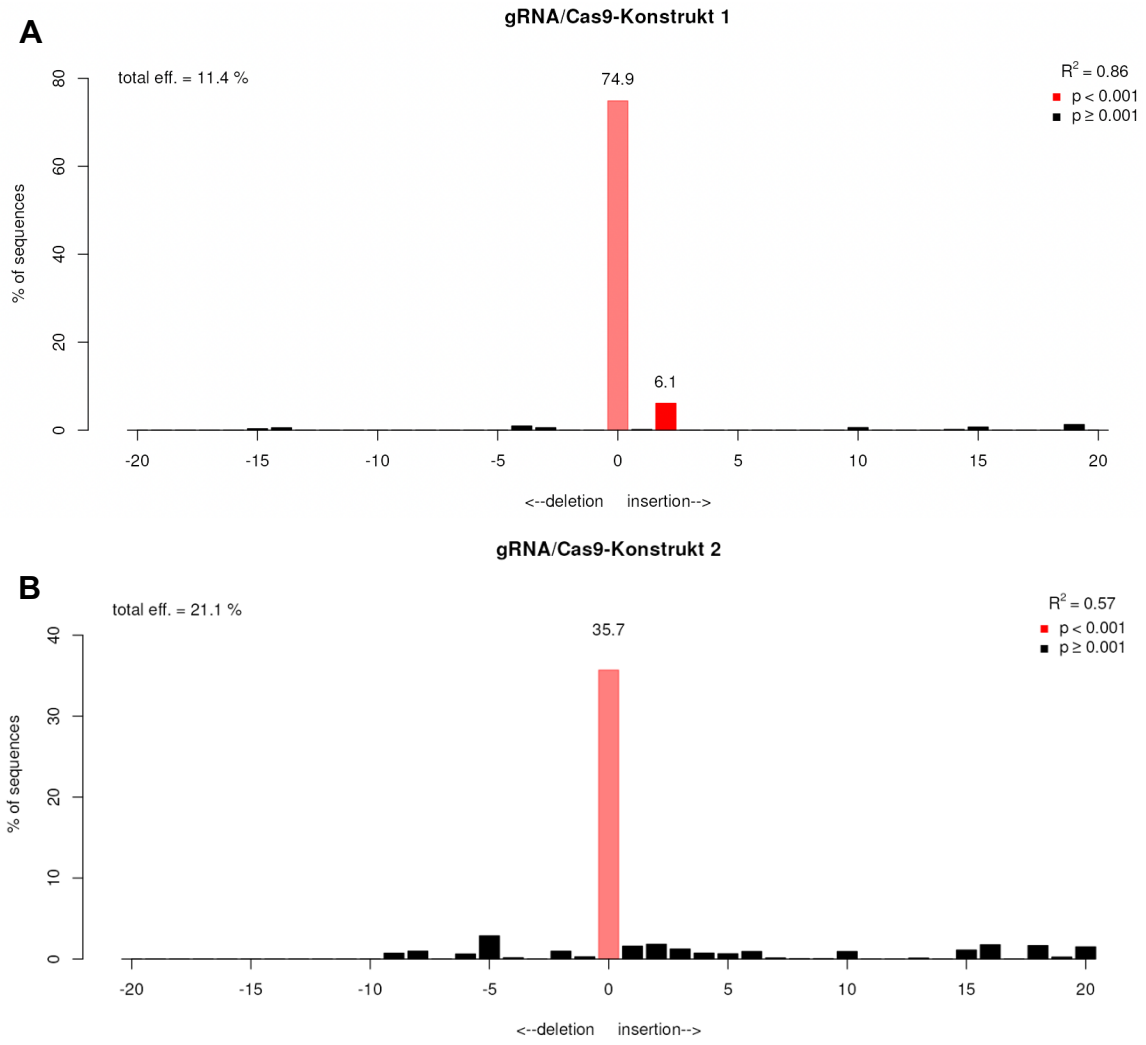
Es zeigt sich gRNA/Cas9-Konstrukt 2 als Konstrukt mit der höchsten Frameshift-Rate von 63,0 %. Rechenbeispiel siehe Text.

3.5 Schnittkontrolle via TIDE-Analyse

Es wurde anschließend eine TIDE-Analyse zur weiteren Bestimmung der Effektivität des Genome-Editing durch CRISPR/Cas9 durchgeführt. Mit Hilfe der TIDE-Analyse werden Insertionen und Deletionen identifiziert und analysiert (siehe 1.3.3.3).

Die unter 3.2.3 aufgeführten Sangersequenzierungen wurden für diese Analyse herangezogen. Die Ergebnisse der TIDE-Analyse sind in Abbildung 22 dargestellt. Der jeweilige Graph gibt neben der totalen Eiffizienz (total efficiency) der gRNA/Cas9-Konstrukte das festgestellte Spektrum an Insertionen und Deletionen und die Frequenz ihres Auftretens an. Des Weiteren liefert er einen R^2-Wert für die Qualität der Messung (vgl. 1.3.3.3) und stellt die Signifikanz der entdeckten Indels farbig dar. Rot steht hierbei für ein Signifikanzniveau von $p < 0{,}001$. Ein solches signifikantes Ergebnis ist in Bild **A** im Graphen für gRNA/Cas9-Konstrukt 1 zu erkennen, während die übrigen gRNA/Cas9-

Konstrukte Ereignisse mit einem Signifikanzniveau p ≥ 0,001 (schwarze Balken) zeigen (vgl. Abb. 22).



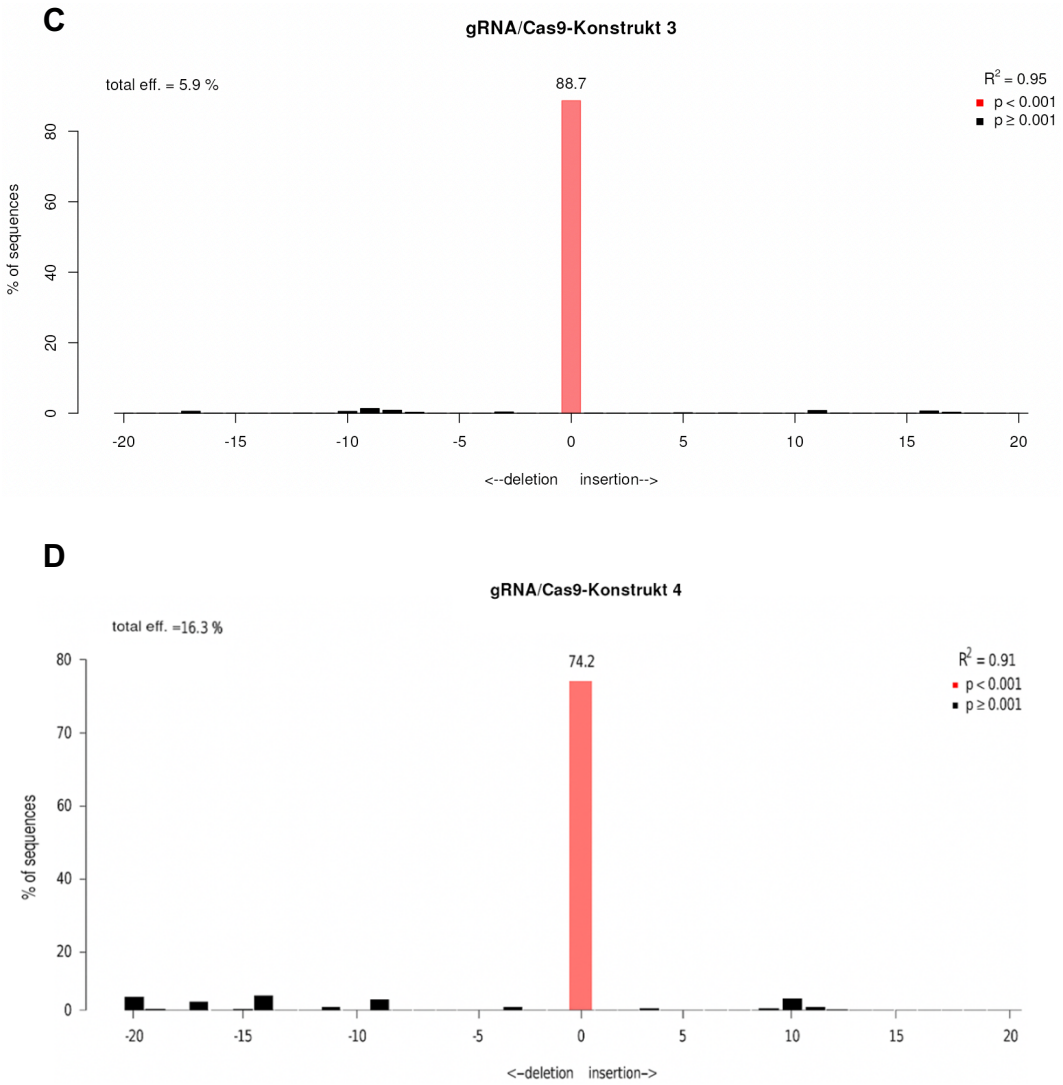


Abbildung 22: Ergebnisse der TIDE-Analyse

A) Ergebnis für gRNA/Cas9-Konstrukt 1: Dieses Konstrukt zeigt eine totale Effizienz von 11,4 % bei einem R^2-Wert von 0,86. **B**) Ergebnis für gRNA/Cas9-Konstrukt 2: Hier konnte eine totale Effizienz von 21,1 % gemessen werden bei einem R^2-Wert von 0,57. **C**) Ergebnis für gRNA/Cas9-Konstrukt 3: Die totale Effizienz beträgt 5,9 % bei einem R^2-Wert von 0,95. **D**) Ergebnis für gRNA/Cas9-Konstrukt 4: Die totale Effizienz beträgt 16,3 % bei einem R^2-Wert von 0,91. Erklärung siehe Text.

Zur besseren Veranschaulichung wurden die Effizienzen aller vier getesteten gRNA/Cas9-Konstrukte in Abbildung 23 in einem Graphen zusammengefasst. Die Untersuchung auf Indels mit Hilfe des TIDE web tools ergab die Doppelstrangbruch-Effizienz der Konstrukte, wobei gRNA/Cas9-Konstrukt 2 die höchste Effizienz mit 21,1 % aufweist. Für gRNA/Cas9-Konstrukt 1 konnte eine DSB-Effizienz von 11,4 %, für gRNA/Cas9-Konstrukt 3 von 5,9 % sowie für gRNA/Cas9-Konstrukt 4 von 16,3 % berechnet werden.

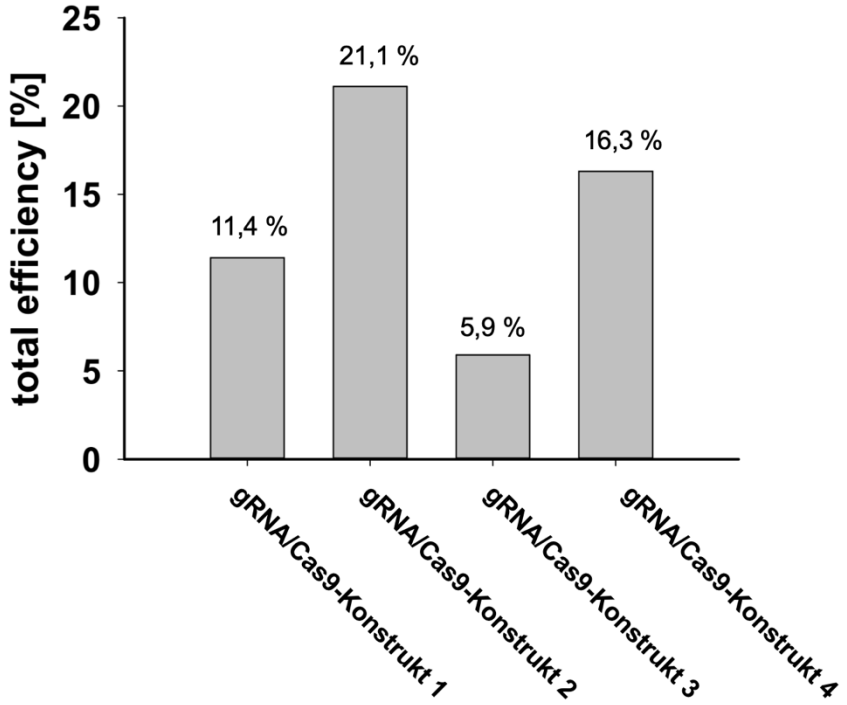


Abbildung 23: Effizienzen der NHEJ-Reparatur-Induktion durch Indel-Analyse mittels TIDE

Diese Ergebnisse zeigen mit denen des BRET-Assays übereinstimmende Aktivitäten der gRNA/Cas9-Konstrukte mit gRNA/Cas9-Konstrukt 2 als effizientestes aller getesteten. Diese deutliche Ähnlichkeit zeigt die in Abb. 24 aufgeführte Gegenüberstellung der Graphen aus beiden Untersuchungen.

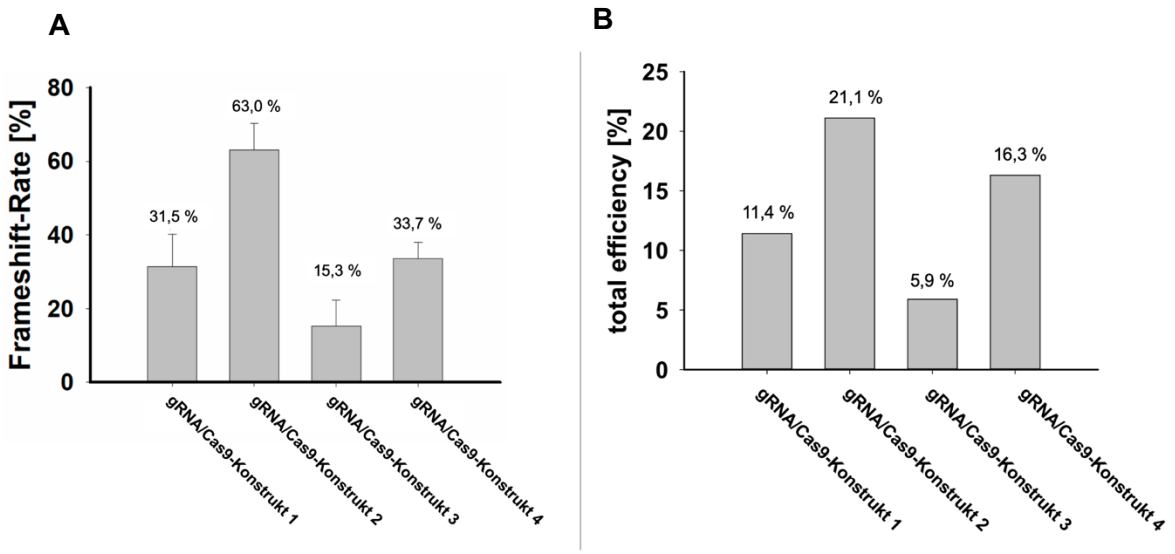


Abbildung 24: Gegenüberstellung der BRET- und TIDE-Ergebnisse

Erkennbar ist eine deutliche Ähnlichkeit der gRNA/Cas9-Konstrukt-Aktivitäten gemessen an der Frameshift-Rate im BRET-Assay (**A**) und der total efficiency in der TIDE-Analyse (**B**).

Im Gegensatz zu den hochsignifikanten Ergebnissen des BRET-Assays, zeigte die statistische Auswertung der TIDE-Ergebnisse keine kontinuierliche Signifikanz. Während gRNA/Cas9-Konstrukt 1 einen hochsignifikanten ($p < 0,005$) Indel-Wert bei einem annähernd erstrebenswertem R^2 von 0,86 aufweist, konnten für gRNA/Cas-Konstrukt 2, 3 und 4 keine signifikanten Ereignisse gemessen werden. Auffällig ist aber, dass G3 mit 0,95 den besten R^2 -Wert bietet.

Nichtsdestotrotz bestätigt die markante Übereinstimmung der Ergebnisse beider voneinander unabhängigen Untersuchungen (siehe Abb. 24) die Aussagekraft der Befunde und die Aktivität der untersuchten Konstrukte.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Untersuchung von vier gRNA/Cas9-Konstruten zur gezielten Genomeditierung im *USH2A*-Gen. Unter Verwendung von drei verschiedenen Methoden zur Evaluierung der CRISPR/Cas9-gesteuerten Genomeditierung im zellulären Modell konnte eine teils bedeutend vielversprechende Aktivität und Effizienz beobachtet werden. Hierbei zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede bezüglich Effizienz und Signifikanz. gRNA/Cas9-Konstrukt 2 zeigte die höchste, gRNA/Cas9-Konstrukt 3 die geringste Aktivität. Als bemerkenswert zeigten sich vor allem die hohe Übereinstimmigkeit der Rangfolge der Konstrukte in der BRET- und TIDE-Analyse sowie die hochsignifikanten Ergebnisse für alle untersuchten Konstrukte in der BRET-Analyse. In Gegenüberstellung der TIDE- und BRET-Ergebnisse (Abb. 24) zeigen die Ergebnisse der TIDE-Analyse eine Kongruenz zu jenen aus dem BRET-Assay. Zu beachten ist, dass die Aktivität der gRNA/Cas9-Konstrukte in diesen beiden Versuchen über verschiedene Parameter bestimmt wird. Während die Aktivität im BRET-Assay über die Frameshift-Rate anhand sinkender GFP-Fluoreszenz(intensität) gemessen wird (vgl. 1.3.3.2), liefert die TIDE-Analyse eine quantitative Aussage zur Aktivität über die overall efficiency anhand der Indel-Frequenz (vgl. 1.3.3.3). BRET ist also ein epsiomales Assay, während die TIDE-Analyse auf genomischer Ebene im Zellkern arbeitet. Dies ist der Grund, warum die absoluten Zahlen nicht miteinander übereinstimmen beziehungsweise warum diese Werte voneinander abweichen. Im relativen Vergleich der Aktivitäten zeigt sich jedoch in beiden Untersuchungen ein beinahe identisches Bild. gRNA/Cas9-Konstrukt 2 zeigt die höchste Aktivität, gRNA/Cas9-Konstrukt 3 die niedrigste und gRNA/Cas9-Konstrukt 1 und 4 zeigen ähnliche Aktivtäten, wobei gRNA/Cas9-Konstrukt 4 etwas bessere Werte erzielen konnte.
Eine Erhöhung der Probenanzahl und Testwiederholungen könnten Aufschlüsse liefern über die variierenden Ergebnisse der TIDE-Analyse und die Reliabilität dieses Versuchs erhöhen.
Interessant bleibt jedoch, dass sich, trotz der fehlenden Signifikanz für gRNA/Cas9-Konstrukt 2, 3 und 4, alle TIDE-Ergebnisse sehr ähnlich zu den hochsignifikanten Ergebnissen des BRET-Assays darstellen.

Die Variation der in der vorliegenden Arbeit gemessenen Aktivitätsniveaus für die gRNA/Cas9-Konstrukte hat verschiedene Ursachen. Am ehesten sind diese Unterschiede bedingt durch die abweichende Korrektheit des NHEJ-Reparaturmechanismus. Sowohl im BRET-Assay als auch in der TIDE-Analyse sind die Ergebnisse abhängig von auftretenden Indels nach Doppelstrangbruch. Die Nutzung des fehleranfälligen NHEJ-

Reparaturmechanismus ist daher sinnvoll. Allerdings kommt es bei nicht allen durch CRISPR/Cas9 erfolgreich induzierten Doppelstrangbrüchen zu einer fehlerhaften Reparatur. Viele werden auch wieder fehlerfrei verschlossen und sind so nicht mehr über auftretende Indels oder eine Leseraster-Verschiebung als erfolgreiche gRNA/Cas9-Aktivität messbar.

Stinson et al. (2020) bieten einen möglichen Ansatz zur Reduzierung dieses Effektes. Ihr Modell vermutet eine Steigerung des Auftretens NHEJ-bedingter Indels durch die Erhöhung der Zugänglichkeit von DNA-Enden für Prozessierungsenzyme vor der Ligation (Stinson et al., 2020).

Dem CRISPR/Cas9 induziertem Doppelstrangbruch folgt die Aktivierung der zelleigenen Reparaturmechanismen NHEJ und HDR. Während NHEJ eine schnelle, aber fehleranfällige Methode ist, den Bruch mittels Insertionen und Deletionen zu schließen, ermöglicht HDR, bei Vorhandensein eines Template, das Einfügen ganz neuer DNA-Abschnitte (vgl. 1.3.2). Für den genmanipulierenden Behandlungsansatz genetisch bedingter Erkrankungen ist das Austauschen pathologischer mit physiololgischen Gensequenzen essenziell, sodass HDR in diesem Fall der präferierte Mechanismus ist. Im Rahmen dieser Arbeit war zur Aktivitätstestung der gRNA/Cas9-Konstrukte jedoch das Non-homologous end joining erwünscht, da ihre Effizienz über das Auftreten von Indels gemessen wurde. Durch Insertionen und Deletionen kommt es zu einem Frameshift und damit zu fehlerhaften Proteinen, wie zum Beispiel dem GFP, wessen reduzierte Lichtemission im BRET-Assay zu messen ist (siehe 1.3.3.2 und 3.4). Im Hinblick auf den therapeutischen Einsatz der getesten gRNA/Cas9-Konstrukte müssten also zum Einsetzen einer Template-DNA die Bedingungen so gestaltet werden, dass vorwiegend HDR als Reparaturmechanismus zum Einsatz kommt. In Studien konnte gezeigt werden, dass bei Vorliegen eines passenden Templates das Auftreten der HDR-Reparatur erhöht ist (Yanik et al., 2017), es gibt aber auch Versuche mit Anwendung von NHEJ-Inhibitoren (Arnoult et al., 2017). Jedoch beeinflusst auch die Phase des Zellzyklus die Entscheidung, welcher Reparaturmechanismus zum Einsatz kommt (siehe 1.3.2). Da HDR hauptsächlich in der Replikationsphase aktiv ist, findet es in postmitotischen Zellen wie eben dem Retinalen Pigmentepithel und den Fotorezeptoren keine Anwendung (Pasquini et al., 2020). HDR ist vornehmlich in der S- und G2-Phase des Zellzyklus aktiv (vgl. 1.3.2). Infolgedessen muss zur Genomeditierung von retinalen Zellen auf Integrationstechniken des NHEJ-Mechanismus zurückgegriffen werden. Dazu zählt zum Beispiel Microhomology-mediated end joining (MMEJ). Hierbei ist kein Template notwendig, die Reparatur erfolgt nach DSB durch Resektion der Enden zur Entstehung von Einzelstrangüberhängen und anschließender Paarung mikrohomologer Sequenzen (Xue & Greene, 2021). Häufig ent-

stehen hierbei Deletionen. Obwohl bekannt ist, dass MMEJ ebenso wie HDR hauptsächlich in der S- und G2-Phase aktiv ist, konnte gezeigt werden, dass es im Gegensatz zu HDR nicht so streng an Phasen des Zellzyklus gebunden ist und weiterhin aktiv in nichtproliferierenden Zellen ist (Pasquini et al., 2020). Dadurch stellt MMEJ einen möglichen Reparaturmechanismus in postmitotischen retinalen Zellen dar. Eine weitere Unterform des NHEJ-Mechanismus stellt die Homology-independent targeted Integration (HITI) dar. 2016 konnten Suzuki et al. bereits mit Hilfe von HITI eine Sehverbesserung bei Retinitis pigmentosa im Ratten-Modell zeigen. HITI basiert auf dem Mechanismus, dass eine Cas9-Endonuklease sowohl das Zielgenom als auch die Donor-DNA an definierten Schnittstellen spaltet. Dadurch kann die Donor-Sequenz über NHEJ in das Genom integriert werden. Über eine spezielle Anordnung der Cas9-Schnittstellen wird die korrekt orientierte Integration gewährleistet. Falsch integrierte Donoren werden so lange wieder herausgeschnitten, bis die richtige Verknüpfung erfolgt ist (Suzuki et al., 2016). Dieser Mechanismus könnte also eine potenzielle Lösung für die Abwesenheit von HDR in postmitotischen Zellen darstellen. Allerdings weisen neuere Studien wie die Arbeit von Nishiyama et al. (2017) darauf hin, dass eine HDR-Reparatur auch in postmitotischen Zellen möglich sein könnte. Entscheidender Faktor hierbei ist das Vorhandensein eines Matrizenstrangs. In einigen Arbeiten konnten solche Templates mittels AAV in die Zellen eingeschleust und anschließend HDR-Aktivitäten in postmitotischen neuronalen Zellen und Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Nishiyama et al., 2017; Y. Zheng et al., 2022). Dies lässt annehmen, dass eine HDR-Reparatur auch in Fotorezeptorzellen und in Zellen des retinalen Pigmentepithels stattfinden kann, solange genügend Matrizenstränge zur Verfügung stehen.

Weitere Faktoren, die die Aktivität CRISPRs beeinflussen und somit mitverantwortlich sind für die Variation der gemessenen Konstruktaktivitäten, sind bestimmte Sequenzmerkmale. Zu diesen gehören die PAM-Sequenz, Nukleotidpositionen in Bezug auf diese PAM-Sequenz, der GC-Prozentgehalt und die Chromatinstuktur der Zielsequenz sowie die Sekundärstruktur der gRNAs (X. Liu et al., 2016; Xu et al., 2015). Diese verschiedenen Einflussfaktoren auf die Effizienz CRISPRs sind derzeit Gegenstand der aktuellen Forschung und noch nicht vollständig verstanden.

Eine Limitation des CRISPR/Cas9-Systems sind sogenannte off-target Mutationen. Da Cas9 leichte Mismatches zwischen gRNA und Zielsequenz verzeiht, können an zur Zielsequenz ähnlichen DNA-Sequenzen ebenfalls unbeabsichtigte Modifikationen durch Cas9 auftreten (Hryhorowicz et al., 2017; T. Zheng et al., 2017). Zur Verringerung solcher off-target Mutationen wurden daher in dieser Arbeit beim Design der gRNAs unter Zuhilfenahme eines Online-Cas Designers Zielsequenzen mit wenig entsprechenden off-target Sequenzen ausgewählt (siehe 2.1.7). Eine weitere Option zur Reduktion der

off-target Mutationen besteht in der Anwendung verkürzter gRNA-Sequenzen, die die Toleranz gegenüber Mismatches zwischen gRNA und Zielsequenz minimieren soll (Fu et al., 2014; Wimmer et al., 2025). Diese Verkürzung reduziert jedoch auch die absolute Effizienz am Ort der Zielsequenz (Hryhorowicz et al., 2017; Wimmer et al., 2025), weshalb in dieser Arbeit darauf verzichtet wurde. Eine neuere Entwicklung stellen modifizierte Cas9 Varianten dar. Hierzu zählen high fidelity Cas9 Typen wie SpCas9-HF1 (Kleinstiver et al., 2016), enhanced specifity Cas9 (eSpCas9) (Slaymaker et al., 2016) und hyper-accurate Cas9 (HypaCas9) (J. S. Chen et al., 2017; Wimmer et al., 2025). Sie sollen durch spezielle Mutationen unspezifische DNA-Bindungen destabilisieren und dadurch die off-target Aktivität reduzieren, ohne die on-target Aktivität zu beeinträchtigen (Kleinstiver et al., 2016).

Die eingesetzte CRISPR-assoziierte Endonuklease Cas9 beeinflusst folglich auch die gemessene Effizienz. Sie setzt gezielt Doppelstrangbrüche in der DNA und aktviert zelleigene Reparaturmechanismen (vgl. 1.3.1). Der Vorteil dieser Endonuklease besteht in ihrer einfachen Anwendung. Im Gegensatz zu Zinkfinger- oder Transkriptionsaktivator-ähnlichen Effektor-Nukleasen (TALEN) benötigt Cas9 keine spezifische Entwicklung von Proteinpaaren für jede Zielsequenz, sondern lediglich eine gRNA, welche Cas9 über Watson-Crick-Basenpaarung an die Zielsequenz heranführt (M. Chen et al., 2019; Hryhorowicz et al., 2017; Ma et al., 2014). Darüber hinaus ist es mit CRISPR/Cas9 möglich, durch die Verwendung multipler gRNAs, mehrere Zielsequenzen simultan anzusteuern (Hryhorowicz et al., 2017; Yanik et al., 2017). Jedoch ist die Effizienz und Präzision von Cas9 abhängig von einer PAM-Sequenz (vgl. 1.3.1), die je nach Bakterienspezies, aus der die Endonuklease stammt, variiert. Häufig und auch im Falle dieser Arbeit (siehe 3.1.1) handelt es sich um jene aus *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) mit der PAM-Sequenz *5`-NGG-3`* (Hryhorowicz et al., 2017; Yanik et al., 2017). Die Abhängigkeit zu einer solchen Sequenz limitiert die durch Cas9 möglich anzuzielenden Genloci. Andere Cas9-Varianten zeigen teilweise eine ähnliche Effizienz bezüglich der Genomeditierung (Friedland et al., 2015; C. M. Lee et al., 2016; Ran et al., 2015). So wird beispielsweise Cas9 aus *Staphylococcus aureus* (SaCas9) in einigen Arbeiten als Alternative zu SpCas9 beschrieben (Friedland et al., 2015; Ran et al., 2015). Vorteil von SaCas9 ist ihre geringere Größe mit über 1 kb weniger im Vergleich zu SpCas9 mit ca. 4,2 kb. Dies erleichtert den Transport in die Zelle mittels AAV, die eine Transportkapazität von ca. 4,7 kb aufweisen (Ran et al., 2015). Ein entscheidender limitierender Faktor ist hingegen ihre komplexe PAM-Sequenz (*5`-NNGRRT-3`*), die deutlich seltener im Genom zu finden ist (Hu et al., 2018). Eine weitere Cas9-Variante ist Cas9 aus *Neisseria menigitidis* (NmeCas9). Ihre PAM-Sequenz ist mit 8 Basenpaaren (5´- NNNNGATT-3`) noch länger als die der SaCas9. Dies soll eine höhere Spezifität des CRISPR/Cas9-

Komplexes und geringere off-target Ereignisse ermöglichen. Nichtsdestotrotz findet sich diese komplexe PAM-Sequenz ebenso selten im Genom. Während nämlich die PAM-Sequenz von SpCas9 im Genom ca. alle 8 Basen vorkommt, so findet sich jene von NmeCas9 lediglich alle 128 bp (C. M. Lee et al., 2016). Aus diesem Grund ist SpCas9 derzeit im Rahmen der CRISPR-Genomeditierung die am häufigsten verwendete Cas9-Endonuklease (Walton et al., 2020). Mittlerweile ist es allerdings auch möglich, PAM-Sequenzen anderen Ursprungs zu verwenden oder sogar fast unabhängig von einer PAM-Sequenz zu arbeiten (Walton et al., 2020; Yanik et al., 2017). So entwickelten Walton et al. 2020 beispielsweise eine Cas9 Variante, mit erhöhtem Spektrum an PAM-Sequenzen, welche die Unabhängigkeit gegenüber jenen Genloci erhöht (Walton et al., 2020). Diese Varianten müssen jedoch noch weiter untersucht werden, bevor sie die bisherigen Cas9 Varianten effektiv ersetzen können.

Zur Überprüfung der CRISPR/Cas9-Aktivität stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Wie in 1.3.3.1 bereits erwähnt, ist das T7E1-Assay eines der ältesten Verfahren, um Mutationen im Genom nachzuweisen. Es gehört zu den „mismatch cleavage assays“ und wird gerne zur Überprüfung von CRISPR/Cas9 angewandt, da es kostengünstig und technisch unaufwendig ist. Alternativ zur T7 Endonuklease I kann eine Surveyor Nuklease verwendet werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die T7E1, bei Substraten, die Indels enthalten, vergleichsweise eine höhere Sensitivität und weniger Hintergrundsignale aufweist (Vouillot et al., 2015). Jedoch hängt das Ergebnis stark von den sensiblen Reaktionsbedingungen ab und so kommt es, dass Mutationsfrequenzen häufig unterschätzt werden und die Ergebnisse häufig nicht mit der tatsächlichen Editierungsfrequenz durch CRISPR/Cas9 übereinstimmen (Sentmanat et al., 2018; Zischewski et al., 2017). Da das Assay eine PCR-gestützte Analyse ist, können größere Mutationen, die die Primer-Bindestellen beeinflussen nicht erkannt werden und stellen damit, neben der Qualität der PCR-Produkte, einen weiteren limitierenden Faktor dar. Auch hoch aktive gRNA/Cas9-Konstrukte, die keine komplexen Indels sondern ein dominantes produzieren, scheinen schlechter durch T7E1 detektiert werden zu können (Sentmanat et al., 2018). Nichtsdestotrotz kann das T7E1- Assay hilfreiche Ergebnisse liefern. Es eignet sich für die vorangehende Testung der zu untersuchenden gRNA/Cas9-Konstrukte und erlaubt eine erste Vorhersage über ihre Effizienz.
Zur weiteren Validierung der designten Konstrukte wurde eine TIDE-Analyse durchgeführt. Sie identifiziert und quantifiziert Indels durch den Vergleich von Sangersequenzierungen von Probe und Negativkontrolle (vgl. 1.3.3.3). Sie ist eine neuere Methode und liefert im Vergleich zum T7E1-Assay präzisere Ergebnisse bezüglich der Indel-Charakterisierung, indem sie eine Aussage über die Indel-Typen und ihre Lokalisation trifft (Yao

et al., 2025). Genau wie das T7E1-Assay ist die TIDE-Analyse ein PCR-basiertes Verfahren, was zu oben genannten Limitationen führt. Auch hängt die Reliabilität von TIDE von der Qualität der Sanger-Sequenzierungen ab (Brinkman et al., 2014). Es sei dennoch zusätzlich anzumerken, dass Sentmanat et al. (2018) in ihrer Arbeit verschiedene CRISPR/Cas9 Validierungsverfahren überprüft haben. Hier haben sie auffälligerweise keine falsch-positiven Ergebnisse in der TIDE-Analyse und im T7E1-Assay feststellen können. Dies erlaubt die Annahme, dass positive Ergebnisse, wie jene in dieser Arbeit, mit hoher Wahrscheinlichkeit für eine tatsächliche gRNA/Cas9-Konstrukt-Aktivität sprechen (Sentmanat et al., 2018).

Das BRET-Assay ist eine Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen basierend auf dem Energietransfer zwischen einem Donor- und einem Akzeptormolekül (vgl. 1.3.2). Im Rahmen der CRISPR/Cas9-Genomeditierung kann es als Validierungsverfahren herangezogen werden, da es die quantitative und qualitative Messung von DNA-Editierungsereignissen, im Sinne von Leserasterverscheibungen, erlaubt. BRET Reporter Systeme zeigen eine hohe Sensitivität, wodurch sie auch niedrige Aktivitätsniveaus detektieren können (Wimmer et al., 2025). Diese hohe Sensitivität ensteht zum einen durch den Umstand, dass BRET, anders als FRET, keine externe Lichtanregung benötigt (vgl. 1.3.2). Dadurch entfallen die durch Zellautofluoreszenz enstehenden Hintergrundsignale. Außerdem umgehen sie damit die Gefahr des phototoxischen Zelltodes der zu untersuchenden Zellen (Wimmer et al., 2025). Ein weiterer Grund besteht darin, dass die Energieübertragung nur bei kurzer Distanz (< 10 nm) stattfindet (Borroto-Escuela et al., 2013), sodass auch hier Hintergrundsignale durch zufällige Co-Lokalisierung reduziert werden. Die interne Normalisierung mittels Korrekturfaktor (siehe 2.2.10.3) reduziert den Einfluss von Störfaktoren und erlaubt die Vergleichbarkeit zwischen den Experimenten (Wimmer et al., 2021). Des Weiteren ist es mit dem BRET-Reporter System möglich, die zellulären Prozesse *in vivo* zu beobachten, was mit der TIDE-Analyse und dem T7E1-Assay nicht möglich ist (White *et al.*, 2017). Anders als die TIDE-Analyse gibt das BRET-Assay jedoch keine genauen Informationen über die Indel-Typen und ist etwas aufwendiger im Versuchsaufbau.

Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den genannten Testverfahren sind vor diesem Hintergrund einzuordnen. Das BRET-Assay liefert die genausten Ergebnisse, gefolgt von der TIDE-Analyse, die zwar womöglich Aktivitätsniveaus unterschätzt, jedoch hilfreiche Typisierungen der Indels ermöglicht. Das T7-Endonuklease I Assay ist im Vergleich die unpräziseste Untersuchung, gestattet aber eine schnelle und einfache Möglichkeit, einen Nachweis für eine Genomeditierungsaktivität zu bringen. Des Weiteren wurden in dem T7-Endonuklease-I-Assay und in der TIDE-Analyse Stammzellen (ipSC) und im BRET-Assay HEK293-T-Zellen verwendet, was anzunehmen lässt, dass auch

der Zelltyp die Effizenz CRISPRs beeinflusst. Schlussfolgernd sind die hochsignifikanten Ergebnisse des BRET-Assays die aussagekräftigsten dieser Arbeit.

Die Ätiologie der verbreitetsten Unterform des Usher-Syndroms, USH Typ 2, basiert am häufigsten auf Mutationen im *USH2A*-Gen (siehe 1.2.4). Viele Studien konzentrieren sich auf Genom-Editierung im Exon 13 des *USH2A*-Gens, da hier global mit 18,4 % die häufigsten ursächlichen Mutationen zu finden sind. An zweiter Stelle konnte Exon 63 mit einer globalen Mutationsfrequenz von 10 % und nachfolgend Exon 61 mit 5,5 % identifiziert werden (Su et al., 2022). Bekannt ist jedoch auch, dass sich die für das Usher-Syndrom ursächlichen Mutationen über das gesamte *USH2A*-Gen erstrecken (McGee et al., 2010; Ordoñez-Labastida et al., 2023). Daher hat die vorliegende Arbeit, unter Berücksichtigung der Auswahlkriterien zum Design der guide- und target-Sequenzen, neben Exon 61 als Ort mit der dritthäufigsten Mutationsfrequenz auch drei weitere Zielsequenzen in noch selten untersuchten Exons eingeschlossen (siehe 3.1.1). Es wurde hierbei nun auch ihre Ansteuerbarkeit mittels gRNA/Cas9-Konstrukten und deren Effizienztestung bezüglich ihrer Doppelstrangbruchinduktion geprüft. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum Teil eine beachtliche Aktivität der Konstrukte. Vor dem Hintergrund der bisher fehlenden kausalen Therapiemöglichkeit des *USH2A*-assoziierten Usher-Syndroms stellen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen von Genomeditierungsverfahren dar. Zukünfitig müssen die Konstrukte in retinalen Zellmodellen geprüft, geeignete Integrationsstrategien evaluiert sowie die off-target Effekte CRISPRs kontrolliert werden.

5 Zusammenfassung

In Europa sind etwa 200.000 Menschen von erblichen Netzhauterkrankungen betroffen, wobei das Usher-Syndrom eine der häufigsten ist. Es wird durch Mutationen im *USH2A*-Gen verursacht und äußert sich als Kombination aus Retinitis pigmentosa und progredientem Hörverlust. Bislang gibt es keine etablierte kausale Therapie, doch es wird intensiv an gentherapeutischen Ansätzen geforscht. Der vielversprechende AAV-Ansatz ist derzeit jedoch keine Option für größere Gene wie *USH2A*, da die Vektor-Kapazität begrenzt ist. Zur Entwicklung einer alternativen therapeutische Strategie für das Usher-Syndrom, entwarfen und untersuchten wir vier spezifische guideRNA/Cas9-Konstrukte sowie die dazugehörigen Zielsequenzen für CRISPR/Cas9-induzierte Doppelstrangbrüche im *USH2A*-Gen. Konstrukt 1 zielt auf Exon 60, Konstrukt 2 auf Exon 61, Konstrukt 3 auf Exon 67 und Konstrukt 4 auf Exon 71 ab.

Wir untersuchten die Effizienz dieser gRNA/Cas9-Kostrukte mit drei Methoden. Im T7-Endonuklease-I-Assay identifiziert und verdaut die T7-Endonuklease fehlgepaarte DNA, die nach einem Doppelstrangbruch entsteht. Ein erfolgreicher Bruch zeigt sich in der Gelelektrophorese durch drei Banden. Für gRNA/Cas9-Konstrukt 1 und 2 konnte eine erfolgreiche Verdauung nachgewiesen werden, während die Analyse für gRNA/Cas9-Konstrukt 3 und 4 uneindeutig blieb.

Im Anschluss führten wir eine TIDE-Analyse durch, mit der Indels identifiziert und quantifiziert werden können, die häufig nach einem DNA-Doppelstrangbruch entstehen. Diese Methode ermöglicht es, die Effizienz der gRNA/Cas9-Konstrukte zu berechnen. Die Ergebnisse zeigten eine Effizienz von 11,4 % für Konstrukt 1, 21,1 % für Konstrukt 2, 5,9 % für Konstrukt 3 und 16,3 % für Konstrukt 4.

Zusätzlich wurde ein BRET-Assay durchgeführt, das einen hochsignifikanten Unterschied in der Fluoreszenzprotein-Emission zwischen den Proben und den Kontrollen zeigte. Die Frameshift-Raten der gRNA/Cas9-Konstrukte lagen bei 31,5 %, 63,0 %, 15,3 % und 33,7 %.

Vergleicht man die Ergebnisse der TIDE-Analyse mit denen des BRET-Assays, zeigt sich ein übereinstimmendes relatives Aktivitätsniveau der Konstrukte, wobei gRNA/Cas9-Konstrukt 2 in beiden Untersuchungen die höchste Aktivität aufwies.

Mit den von uns entwickelten, effizienten gRNA/Cas9-Konstrukten könnte durch CRISPR/Cas9 ein Austausch defekter DNA-Sequenzen ermöglicht werden, was eine potenzielle Behandlung für das Usher-Syndrom darstellen könnte. Darüber hinaus könnte dieser Ansatz auch eine vielversprechende Therapie für andere genetische Erkrankungen bieten.

6 Summary

In Europe, approximately 200,000 people are affected by inherited retinal diseases, with Usher syndrome being one of the most common. It is caused by mutations in the *USH2A* gene and manifests as a combination of retinitis pigmentosa and progressive hearing loss. To date, there is no established causal therapy, although intensive research is underway into gene therapeutic approaches. The promising AAV (adeno-associated virus) vector-based approach, however, is currently not an option for larger genes like *USH2A* due to limited cargo capacity.

To develop an alternative therapeutic strategy for Usher syndrome, we designed and investigated four specific guideRNA/Cas9 constructs and their corresponding target sequences for CRISPR/Cas9-induced double-strand breaks in the *USH2A* gene. gRNA/Cas9 construct 1 targets exon 60, construct 2 targets exon 61, construct 3 targets exon 67 and construct 4 targets exon 71.

We assessed the efficiency of these gRNA/Cas9 constructs using three methods. In the T7 endonuclease I assay, the T7 endonuclease identifies and digests mismatched DNA that results from a double-strand break. A successful break is indicated by three bands in the gel electrophoresis. We confirmed successful digestion for constructs 1 and 2, while the analysis for gRNA/Cas9 constructs 3 and 4 remained ambiguous.

We then performed a TIDE analysis, which identifies and quantifies indels that often arise after a DNA double-strand break. This method allows the calculation of gRNA/Cas9 construct efficiency. The results showed an efficiency of 11.4% for construct 1, 21.1% for construct 2, 5.9% for construct 3, and 16.3% for construct 4.

Additionally, a BRET assay was conducted, which revealed a highly significant difference in fluorescence protein emission between the samples and controls. The frameshift rates for the gRNA/Cas9 constructs were 31.5%, 63.0%, 15.3% and 33.7%.

When comparing the results of the TIDE analysis with those of the BRET assay, the relative activity levels of the constructs were largely consistent, with gRNA/Cas9 construct 2 showing the highest activity in both tests.

Using the efficient gRNA/Cas9 constructs we developed, CRISPR/Cas9 could facilitate the replacement of defective DNA sequences, potentially providing a treatment for Usher syndrome. Moreover, this approach could also offer a promising therapy for other genetic diseases.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C ..... *Grad Celsius*
A ..... *Adenin*
AAV ..... *Adeno-assoziierte Viren*
BRET ..... *Bioluminescence Resonance Energy Transfer*
C ..... *Cytosin*
Cas9 ..... *CRISPR-associated protein 9*
cm ..... *Zentimeter*
CO_2 ..... *Kohlenstoffdioxid*
CRISPR ..... *Clustered RegularlyInterspaced Short Palindromic Repeats*
ddH_2O ..... *bi-destilliertes Wasser*
dH_2O ..... *destilliertes Wasser*
DMEM ..... *Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium*
DMSO ..... *Dimethylsulfoxid*
DNA ..... *Deoxyribonucleic Acid*
DSB ..... *Doppelstrangbruch*
FKS ..... *Fötales Kälberserum*
g ..... *Gramm*
G ..... *Guanin*
G2 ..... *guideRNA 2*
G3 ..... guideRNA 3
GFP ..... *Grün-Fluoreszierendes Protein*
gRNA ..... *guideRNA*
h ..... *Stunden*
HDR ..... *Homology Directed Repair*
HEK-Zellen ..... *Human Embryonic Kidney-Zellen*
HEPES ..... *2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure*
Indels ..... *Insertionen und Deletionen*
ipSC ..... *induced pluripotent Stem Cells*
IRD ..... *Inherited Retinal Diseases*
kb ..... *Kilobase*
l ..... *Liter*
LB ..... *Lysogeny Broth*
M ..... *Molare Masse*
min ..... *Minuten*

ml ..... *Milliliter*
mm ..... *Millimeter*
NaCl ..... *Natriumchlorid*
ng ..... *Nanogramm*
NHEJ ..... *Non-Homologous End Joining*, *Non-Homologous End Joining*
PAM ..... *Proto-Spacer-Adjacent Motif*
PBS ..... *Phosphate-Buffered Saline*
PCR ..... *Polymerasekettenreaktion*
PEI ..... *Polyethyleminin*
RLuc8 ..... *Renilla Luciferase 8*
RNA ..... *Ribonucleic Acid*
rpm ..... *revolutions per minute*
RT ..... *Raumtemperatur*
sec ..... *Sekunden*
SOC ..... *Superoptimales Medium mit katabolem Repressor*
T ..... *Thymin*
T7E1 ..... *T7-Endonuklease I*
TIDE ..... *Tracking of Indels by DEcomposition*
UV ..... *ultraviolett*
V ..... *Volt*
x g ..... *mal Erdbeschleunigung*
µ ..... *Mikro*
µl ..... *Mikroliter*

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genomeditierung durch CRISPR/Cas9 7

Abbildung 2: Gelbild eines T7E1-Verdaus 9

Abbildung 3: Funktionsprinzip des BRET-Reporters 10

Abbildung 4: Vektorkarte RLuc8 Expressionsvektor 21

Abbildung 5: Vektorkarte px459-Plasmid 22

Abbildung 6: Vektorkarte NHEJ-Reporter-Plasmid 23

Abbildung 7: Vektorkarte GFP-Plasmid 24

Abbildung 8: schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur TIDE-Analyse 38

Abbildung 9: schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zum BRET-Assay 41

Abbildung 10: Bindestellen der vier gRNAs (*G1-G4*) im *USH2A*-Gen 43

Abbildung 11: Kontrollverdau 44

Abbildung 12: Ergebnisse der Sequenzierung nach Sanger 45

Abbildung 13: GFP-Transfektionskontrolle in ipSC 46

Abbildung 14: Gelektrophorese der ipSC-gDNA nach PCR 46

Abbildung 15: Gelelektrophorese der ipSC-gDNA nach PCR 47

Abbildung 16: Ergebnisse der Sequenzierung nach Sanger 47

Abbildung 17: Gelelektrophorese des T7-Endonuklease-I-Assays 48

Abbildung 18: kontrastbearbeiteter Ausschnitt aus Abb. 17 49

Abbildung 19: GFP-Transfektionskontrolle in HEK293-T 50

Abbildung 20: BRET-Ratio 51

Abbildung 21: Frameshift-Raten der gRNA/Cas9-Konstrukte 52

Abbildung 22: Ergebnisse der TIDE-Analyse 54

Abbildung 23: Effizienzen der NHEJ-Reparatur-Induktion durch Indel-Analyse mittels TIDE 55

Abbildung 24: Gegenüberstellung der BRET- und TIDE-Ergebnisse 56

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräteliste 13

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien 14

Tabelle 3: Chemikalien 15

Tabelle 4: Enzyme 17

Tabelle 5: Kitsysteme 18

Tabelle 6: Software 18

Tabelle 7: Oligonukleotide 19

Tabelle 8: PCR-Primer 20

Tabelle 9: Plasmide 20

Tabelle 10: Restriktionsansätze 27

Tabelle 11: Hybridisierungsansätze hG1-4 und hT1-4 28

Tabelle 12: Ligationsansätze LG1-4 und LT1-4 29

Tabelle 13: Nachverdau der ligierten NHEJ-Reporter-Plasmide 29

Tabelle 14: Sequenzieransätze 31

Tabelle 15: Transfektionsansätze ipSC 34

Tabelle 16: PCR-Ansätze 35

Tabelle 17: PCR-Programm 36

Tabelle 18: DNA-Ansätze für Sangersequenzierung 36

Tabelle 19: Gesamt-Ansätze für Sangersequenzierung 37

Tabelle 20: Ansätze für Hybridisierungsreaktion 38

Tabelle 21: Programm für Hybridisierungsreaktion 38

Tabelle 22: Ansätze für T7E1-Verdau 39

Tabelle 23: Transfektionsansätze HEK 40

10 Literaturverzeichnis

Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., Chen, P. J., Wilson, C., Newby, G. A., Raguram, A., & Liu, D. R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, *576*(7785), 149–157. https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4

Arnoult, N., Correia, A., Ma, J., Merlo, A., Garcia-Gomez, S., Maric, M., Tognetti, M., Benner, C. W., Boulton, S. J., Saghatelian, A., & Karlseder, J. (2017). Regulation of DNA repair pathway choice in S and G2 phases by the NHEJ inhibitor CYREN. *Nature*, *549*(7673), 548–552. https://doi.org/10.1038/nature24023

Assawachananont, J., Mandai, M., Okamoto, S., Yamada, C., Eiraku, M., Yonemura, S., Sasai, Y., & Takahashi, M. (2014). Transplantation of Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cell-Derived 3D Retinal Sheets into Retinal Degenerative Mice. *Stem Cell Reports*, *2*(5), 662–674. https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.03.011

Ben-Yosef, T. (2022). Inherited Retinal Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(21), 13467. https://doi.org/10.3390/ijms232113467

Bonnet, C., Riahi, Z., Chantot-Bastaraud, S., Smagghe, L., Letexier, M., Marcaillou, C., Lefèvre, G. M., Hardelin, J.-P., El-Amraoui, A., Singh-Estivalet, A., Mohand-Saïd, S., Kohl, S., Kurtenbach, A., Sliesoraityte, I., Zobor, D., Gherbi, S., Testa, F., Simonelli, F., Banfi, S., … Petit, C. (2016). An innovative strategy for the molecular diagnosis of Usher syndrome identifies causal biallelic mutations in 93% of European patients. *European Journal of Human Genetics*, *24*(12), 1730–1738. https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.99

Borroto-Escuela, D. O., Flajolet, M., Agnati, L. F., Greengard, P., & Fuxe, K. (2013). Bioluminiscence resonance energy transfer (bret) methods to study G protein-coupled receptor—Receptor tyrosine kinase heteroreceptor complexes. *Methods*

in cell biology, *117*, 141–164. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408143-7.00008-6

Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(16), 7297–7301. https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297

Brinkman, E. K., Chen, T., Amendola, M., & van Steensel, B. (2014). Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Research*, *42*(22), e168–e168. https://doi.org/10.1093/nar/gku936

Brinkman, E. K., & Van Steensel, B. (2019). Rapid Quantitative Evaluation of CRISPR Genome Editing by TIDE and TIDER. In Y. Luo (Hrsg.), *CRISPR Gene Editing* (Bd. 1961, S. 29–44). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9170-9_3

Chan, L. Y., Kosuri, S., & Endy, D. (2005). Refactoring bacteriophage T7. *Molecular Systems Biology*, *1*, 2005.0018. https://doi.org/10.1038/msb4100025

Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*, *58*(5), 235–263. https://doi.org/10.1002/em.22087

Chen, J. S., Dagdas, Y. S., Kleinstiver, B. P., Welch, M. M., Sousa, A. A., Harrington, L. B., Sternberg, S. H., Joung, J. K., Yildiz, A., & Doudna, J. A. (2017). Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*, *550*(7676), 407–410. https://doi.org/10.1038/nature24268

Chen, M., Mao, A., Xu, M., Weng, Q., Mao, J., & Ji, J. (2019). CRISPR-Cas9 for cancer therapy: Opportunities and challenges. *Cancer Letters*, *447*, 48–55. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.01.017

Collin, R. W., Den Hollander, A. I., Van Der Velde-Visser, S. D., Bennicelli, J., Bennett, J., & Cremers, F. P. (2012). Antisense Oligonucleotide (AON)-based Therapy for

Leber Congenital Amaurosis Caused by a Frequent Mutation in CEP290. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *1*, e14. https://doi.org/10.1038/mtna.2012.3

Ding, Q., Strong, A., Patel, K. M., Ng, S.-L., Gosis, B. S., Regan, S. N., Rader, D. J., & Musunuru, K. (2014). Permanent Alteration of PCSK9 With In Vivo CRISPR-Cas9 Genome Editing. *Circulation research*, *115*(5), 488–492. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.304351

Dona, M., Slijkerman, R., Lerner, K., Broekman, S., Wegner, J., Howat, T., Peters, T., Hetterschijt, L., Boon, N., de Vrieze, E., Sorusch, N., Wolfrum, U., Kremer, H., Neuhauss, S., Zang, J., Kamermans, M., Westerfield, M., Phillips, J., & van Wijk, E. (2018). Usherin defects lead to early-onset retinal dysfunction in zebrafish. *Experimental eye research*, *173*, 148–159. https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.05.015

Dulla, K., Slijkerman, R., Van Diepen, H. C., Albert, S., Dona, M., Beumer, W., Turunen, J. J., Chan, H. L., Schulkens, I. A., Vorthoren, L., Den Besten, C., Buil, L., Schmidt, I., Miao, J., Venselaar, H., Zang, J., Neuhauss, S. C. F., Peters, T., Broekman, S., … Van Wijk, E. (2021). Antisense oligonucleotide-based treatment of retinitis pigmentosa caused by USH2A exon 13 mutations. *Molecular Therapy*, *29*(8), 2441–2455. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.04.024

Friedland, A. E., Baral, R., Singhal, P., Loveluck, K., Shen, S., Sanchez, M., Marco, E., Gotta, G. M., Maeder, M. L., Kennedy, E. M., Kornepati, A. V. R., Sousa, A., Collins, M. A., Jayaram, H., Cullen, B. R., & Bumcrot, D. (2015). Characterization of Staphylococcus aureus Cas9: A smaller Cas9 for all-in-one adeno-associated virus delivery and paired nickase applications. *Genome Biology*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s13059-015-0817-8

Frigerio, C., Di Nisio, E., Galli, M., Colombo, C. V., Negri, R., & Clerici, M. (2023). The Chromatin Landscape around DNA Double-Strand Breaks in Yeast and Its Influence on DNA Repair Pathway Choice. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(4), 3248. https://doi.org/10.3390/ijms24043248

Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M., & Joung, J. K. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature biotechnology*, *32*(3), 279–284. https://doi.org/10.1038/nbt.2808

Fuster-García, C., García-Bohórquez, B., Rodríguez-Muñoz, A., Aller, E., Jaijo, T., Millán, J. M., & García-García, G. (2021). Usher Syndrome: Genetics of a Human Ciliopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(13), 6723. https://doi.org/10.3390/ijms22136723

Fuster-García, C., García-García, G., González-Romero, E., Jaijo, T., Sequedo, M. D., Ayuso, C., Vázquez-Manrique, R. P., Millán, J. M., & Aller, E. (2017). USH2A Gene Editing Using the CRISPR System. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, *8*, 529–541. https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.08.003

Grehn, F. (2019). *Augenheilkunde*. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-59154-3

Happi Mbakam, C., Lamothe, G., Tremblay, G., & Tremblay, J. P. (2022). CRISPR-Cas9 Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Neurotherapeutics*, *19*(3), 931–941. https://doi.org/10.1007/s13311-022-01197-9

Hoy, S. M. (2023). Delandistrogene Moxeparvovec: First Approval. *Drugs*, *83*(14), 1323–1329. https://doi.org/10.1007/s40265-023-01929-x

Hryhorowicz, M., Lipiński, D., Zeyland, J., & Słomski, R. (2017). CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, *65*(3), 233–240. https://doi.org/10.1007/s00005-016-0427-5

Hu, J. H., Miller, S. M., Geurts, M. H., Tang, W., Chen, L., Sun, N., Zeina, C. M., Gao, X., Rees, H. A., Lin, Z., & Liu, D. R. (2018). Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, *556*(7699), 57–63. https://doi.org/10.1038/nature26155

Jachimowicz, R. D., Goergens, J., & Reinhardt, H. C. (2019). DNA double-strand break repair pathway choice—From basic biology to clinical exploitation. *Cell Cycle*, *18*(13), 1423–1434. https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1618542

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 2012 Aug 17;337(6096):816-21. doi: 10.1126/science.1225829. Epub 2012 Jun 28. PMID: 22745249; PMCID: PMC6286148.

Kantor, A., McClements, M. E., & MacLaren, R. E. (2020). CRISPR-Cas9 DNA Base-Editing and Prime-Editing. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 6240. https://doi.org/10.3390/ijms21176240

Karali, M., Testa, F., Di Iorio, V., Torella, A., Zeuli, R., Scarpato, M., Romano, F., Onore, M. E., Pizzo, M., Melillo, P., Brunetti-Pierri, R., Passerini, I., Pelo, E., Cremers, F. P. M., Esposito, G., Nigro, V., Simonelli, F., & Banfi, S. (2022). Genetic epidemiology of inherited retinal diseases in a large patient cohort followed at a single center in Italy. *Scientific Reports*, *12*, 20815. https://doi.org/10.1038/s41598-022-24636-1

Kleinstiver, B. P., Pattanayak, V., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Nguyen, N., Zheng, Z., & Joung, J. K. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 variants with undetectable genome-wide off-targets. *Nature*, *529*(7587), 490–495. https://doi.org/10.1038/nature16526

Lee, C. M., Cradick, T. J., & Bao, G. (2016). The Neisseria meningitidis CRISPR-Cas9 System Enables Specific Genome Editing in Mammalian Cells. *Molecular Therapy*, *24*(3), 645–654. https://doi.org/10.1038/mt.2016.8

Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., Zhao, C., Zeng, Z., Shu, Y., Wu, X., Lei, J., Li, Y., Zhang, W., Yang, C., Wu, K., Wu, Y., Ho, S., Athiviraham, A., Lee, M. J., … He, T.-C. (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of

personalized medicine. *Genes & Diseases*, *4*(2), 43–63. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001

Lei, T., Du, S., Peng, Z., & Chen, L. (2022). Multifaceted regulation and functions of 53BP1 in NHEJ-mediated DSB repair (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, *50*(1), 90. https://doi.org/10.3892/ijmm.2022.5145

Liu, W., Liu, S., Li, P., & Yao, K. (2022). Retinitis Pigmentosa: Progress in Molecular Pathology and Biotherapeutical Strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(9), 4883. https://doi.org/10.3390/ijms23094883

Liu, X., Homma, A., Sayadi, J., Yang, S., Ohashi, J., & Takumi, T. (2016). Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, *6*, 19675. https://doi.org/10.1038/srep19675

Loening, A. M. (2006). Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. *Protein Engineering Design and Selection*, *19*(9), 391–400. https://doi.org/10.1093/protein/gzl023

Longo, P. A., Kavran, J. M., Kim, M.-S., & Leahy, D. J. (2013). Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI). *Methods in enzymology*, *529*, 227–240. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5

Ma, Y., Zhang, L., & Huang, X. (2014). Genome modification by CRISPR/Cas9. *The FEBS Journal*, *281*(23), 5186–5193. https://doi.org/10.1111/febs.13110

Maddalena, A., Tornabene, P., Tiberi, P., Minopoli, R., Manfredi, A., Mutarelli, M., Rossi, S., Simonelli, F., Naggert, J. K., Cacchiarelli, D., & Auricchio, A. (2018). Triple Vectors Expand AAV Transfer Capacity in the Retina. *Molecular Therapy*, *26*(2), 524–541. https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.11.019

Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., Terada, M., Nomiya, Y., Tanishima, S., Nakamura, M., Kamao, H., Sugita, S., Onishi, A., Ito, T., Fujita, K., … Takahashi,

M. (2017). Autologous Induced Stem-Cell–Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *New England Journal of Medicine*, *376*(11), 1038–1046. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1608368

Max-Planck-Gesellschaft. (o. J.). *Arbeitsweise von CRISPR-Cas9*. Max-Planck-Gesellschaft. Abgerufen am 25. September 2023 von https://www.mpg.de/11032932/crispr-cas9-mechanismus

McGee, T. L., Seyedahmadi, B. J., Sweeney, M. O., Dryja, T. P., & Berson, E. L. (2010). Novel mutations in the long isoform of the USH2A gene in patients with Usher syndrome type II or non-syndromic retinitis pigmentosa. *Journal of medical genetics*, *47*(7), 499–506. https://doi.org/10.1136/jmg.2009.075143

Millán, J. M., Aller, E., Jaijo, T., Blanco-Kelly, F., Gimenez-Pardo, A., & Ayuso, C. (2011). An Update on the Genetics of Usher Syndrome. *Journal of Ophthalmology*, *2011*, 417217. https://doi.org/10.1155/2011/417217

Ney, S. (2020). *Herstellung einer VEGF depletierten RPE Zelllinie zur Etablierung eines VEGF Biosensorsystems für die nicht-invasive Messung im Auge* [Universitätsbibliothek Gießen]. https://doi.org/10.22029/JLUPUB-14891

Nishiyama, J., Mikuni, T., & Yasuda, R. (2017). Virus-Mediated Genome Editing via Homology-Directed Repair in Mitotic and Postmitotic Cells in Mammalian Brain. *Neuron*, *96*(4), 755-768.e5. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.10.004

Ordoñez-Labastida, V., Chacon-Camacho, O. F., Lopez-Rodriguez, V. R., & Zenteno, J. C. (2023). USH2A mutational spectrum causing syndromic and non-syndromic retinal dystrophies in a large cohort of Mexican patients. *Molecular Vision*, *29*, 31–38.

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*, *21*(4), 1380. https://doi.org/10.3390/ijms21041380

Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., Zetsche, B., Shalem, O., Wu, X., Makarova, K. S., Koonin, E., Sharp, P. A., & Zhang, F. (2015). In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature*, *520*(7546), 186–191. https://doi.org/10.1038/nature14299

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*, *8*(11), 2281–2308. https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143

Redman, M., King, A., Watson, C., & King, D. (2016). What is CRISPR/Cas9? *Archives of Disease in Childhood. Education and Practice Edition*, *101*(4), 213–215. https://doi.org/10.1136/archdischild-2016-310459

RetNet. (o. J.). *Summaries of Genes and Loci Causing Retinal Diseases*. RetNet. Abgerufen am 04. März 2026 von https://retnet.org/summaries

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. *Lancet (London, England)*, *390*(10097), 849–860. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31868-8

Savić, N., & Schwank, G. (2016). Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Translational Research*, *168*, 15–21. https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.09.008

Schmidt, R. F., Lang, F., & Heckmann, M. (Hrsg.). (2017). *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie: mit Online-Repetitorium* (Sonderausgabe der 31. Auflage). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-01651-6

Scully, R., Panday, A., Elango, R., & Willis, N. A. (2019). DNA double strand break repair pathway choice in somatic mammalian cells. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *20*(11), 698–714. https://doi.org/10.1038/s41580-019-0152-0

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*, *8*(1), 888. https://doi.org/10.1038/s41598-018-19441-8

Shirai, H., Mandai, M., Matsushita, K., Kuwahara, A., Yonemura, S., Nakano, T., Assawachananont, J., Kimura, T., Saito, K., Terasaki, H., Eiraku, M., Sasai, Y., & Takahashi, M. (2016). Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(1), E81–E90. https://doi.org/10.1073/pnas.1512590113

Slaymaker, I. M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D. A., Yan, W. X., & Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science (New York, N.Y.)*, *351*(6268), 84–88. https://doi.org/10.1126/science.aad5227

Slijkerman, R. W., Vaché, C., Dona, M., García-García, G., Claustres, M., Hetterschijt, L., Peters, T. A., Hartel, B. P., Pennings, R. J., Millan, J. M., Aller, E., Garanto, A., Collin, R. W., Kremer, H., Roux, A.-F., & Van Wijk, E. (2016). Antisense Oligonucleotide-based Splice Correction for USH2A-associated Retinal Degeneration Caused by a Frequent Deep-intronic Mutation. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, *5*, e381. https://doi.org/10.1038/mtna.2016.89

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

Stumpf, C., Wimmer, T., Lorenz, B., & Stieger, K. (2020). Creation of different bioluminescence resonance energy transfer based biosensors with high affinity to VEGF. *PLoS ONE*, *15*(3), e0230344. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230344

Su, B.-N., Shen, R.-J., Liu, Z.-L., Li, Y., & Jin, Z.-B. (2022). Global spectrum of USH2A mutation in inherited retinal dystrophies: Prompt message for development of

base editing therapy. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *14*, 948279. https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.948279

Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J., Kim, E. J., Hatanaka, F., Yamamoto, M., Araoka, T., Li, Z., Kurita, M., Hishida, T., Li, M., Aizawa, E., Guo, S., Chen, S., Goebl, A., Soligalla, R. D., Qu, J., … Belmonte, J. C. I. (2016). In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*, *540*(7631), 144–149. https://doi.org/10.1038/nature20565

Toualbi, L., Toms, M., & Moosajee, M. (2020). USH2A-retinopathy: From genetics to therapeutics. *Experimental Eye Research*, *201*, 108330. https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108330

van Wijk, E., Pennings, R. J. E., te Brinke, H., Claassen, A., Yntema, H. G., Hoefsloot, L. H., Cremers, F. P. M., Cremers, Cor. W. R. J., & Kremer, H. (2004). Identification of 51 Novel Exons of the Usher Syndrome Type 2A (USH2A) Gene That Encode Multiple Conserved Functional Domains and That Are Mutated in Patients with Usher Syndrome Type II. *American Journal of Human Genetics*, *74*(4), 738–744. https://doi.org/10.1086/383096

Verbakel, S. K. (2018). Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Progress in Retinal and Eye Research*. https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.03.005

Vouillot, L., Thélie, A., & Pollet, N. (2015). Comparison of T7E1 and Surveyor Mismatch Cleavage Assays to Detect Mutations Triggered by Engineered Nucleases. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, *5*(3), 407–415. https://doi.org/10.1534/g3.114.015834

Walton, R. T., Christie, K. A., Whittaker, M. N., & Kleinstiver, B. P. (2020). Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants. *Science*, *368*(6488), 290–296. https://doi.org/10.1126/science.aba8853

Watari, K., Yamasaki, S., Tu, H.-Y., Shikamura, M., Kamei, T., Adachi, H., Tochitani, T., Kita, Y., Nakamura, A., Ueyama, K., Ono, K., Morinaga, C., Matsuyama, T., Sho,

J., Nakamura, M., Fujiwara, M., Hori, Y., Tanabe, A., Hirai, R., … Kuwahara, A. (2023). Self-organization, quality control, and preclinical studies of human iPSC-derived retinal sheets for tissue-transplantation therapy. *Communications Biology*, *6*, 164. https://doi.org/10.1038/s42003-023-04543-5

White, C. W., Vanyai, H. K., See, H. B., Johnstone, E. K. M., & Pfleger, K. D. G. (2017). Using nanoBRET and CRISPR/Cas9 to monitor proximity to a genome-edited protein in real-time. *Scientific Reports*, *7*(1), 3187. https://doi.org/10.1038/s41598-017-03486-2

Wimmer, T. (2018). *Entwicklung eines Systems zur Kontrolle des „Vascular Endothelial Growth Factor" Spiegels im Auge*. http://dx.doi.org/10.22029/jlupub-14646

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. *The CRISPR Journal*, *4*(6), 884–895. https://doi.org/10.1089/crispr.2021.0023

Wimmer, T., Lorenz, A., Hossfeld, L. T., Goud Ponnam, S. P., Lytvynchuk, L., & Stieger, K. (2025). Evaluation of CRISPR-Cas9 mismatch activity using a BRET-based reporter system. *Microchemical Journal*, *208*, 112256. https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.112256

Wimmer, T., Schroeter, E., Lorenz, B., & Stieger, K. (2017). Detection of the Vascular Endothelial Growth Factor with a Novel Bioluminescence Resonance Energy Transfer Pair Using a Two-Component System. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *17*(1), 145. https://doi.org/10.3390/s17010145

Wu, Y., & Jiang, T. (2022). Developments in FRET- and BRET-Based Biosensors. *Micromachines*, *13*(10), 1789. https://doi.org/10.3390/mi13101789

Wu, Z., Yang, H., & Colosi, P. (2010). Effect of Genome Size on AAV Vector Packaging. *Molecular Therapy*, *18*(1), 80–86. https://doi.org/10.1038/mt.2009.255

Xu, H., Xiao, T., Chen, C.-H., Li, W., Meyer, C. A., Wu, Q., Wu, D., Cong, L., Zhang, F., Liu, J. S., Brown, M., & Liu, X. S. (2015). Sequence determinants of improved

CRISPR sgRNA design. *Genome Research*, *25*(8), 1147–1157. https://doi.org/10.1101/gr.191452.115

Xue, C., & Greene, E. C. (2021). DNA repair pathway choices in CRISPR-Cas9 mediated genome editing. *Trends in genetics : TIG*, *37*(7), 639–656. https://doi.org/10.1016/j.tig.2021.02.008

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

Yao, B., Yang, Q., Gonçalves, M. A. F. V., Schiffelers, R., Sluijter, J. P. G., & Lei, Z. (2025). Comparative Analysis of Methods for Assessing On-Target Gene Editing Efficiencies. *Methods and Protocols*, *8*(2), 23. https://doi.org/10.3390/mps8020023

Yin, H., Xue, W., Chen, S., Bogorad, R. L., Benedetti, E., Grompe, M., Koteliansky, V., Sharp, P. A., Jacks, T., & Anderson, D. G. (2014). Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nature Biotechnology*, *32*(6), 551–553. https://doi.org/10.1038/nbt.2884

Zhao, Z., Shang, P., Mohanraju, P., & Geijsen, N. (2023). Prime editing: Advances and therapeutic applications. *Trends in Biotechnology*, *41*(8), 1000–1012. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2023.03.004

Zheng, T., Hou, Y., Zhang, P., Zhang, Z., Xu, Y., Zhang, L., Niu, L., Yang, Y., Liang, D., Yi, F., Peng, W., Feng, W., Yang, Y., Chen, J., Zhu, Y. Y., Zhang, L.-H., & Du, Q. (2017). Profiling single-guide RNA specificity reveals a mismatch sensitive core sequence. *Scientific Reports*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/srep40638

Zheng, Y., VanDusen, N. J., Butler, C. E., Ma, Q., King, J. S., & Pu, W. T. (2022). Efficient in vivo homology-directed repair within cardiomyocytes. *Circulation*, *145*(10), 787–789. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.052383

Zischewski, J., Fischer, R., & Bortesi, L. (2017). Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnology Advances*, *35*(1), 95–104. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.12.003

11 Ehrenwörtliche Erklärung

„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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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

12 Publikationsverzeichnis

Posterpräsentation

Jacobi V, Wimmer T, Stieger K – Identification and analysis of guideRNAs for CRISPR/Cas9 induced double strand breaks in the USH2A-gene

5. Science Day am Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, November 2022

13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger für die Aufnahme als Doktorandin und die Bereitstellung des Dissertationsthemas bedanken. Vielen Dank für die stets wertschätzende Betreuung und die kontinuierliche Erreichbarkeit bei Fragen!

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Rehak für die Bereitstellung der Labor- und Büroräume.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Tobias Wimmer für die tägliche Betreuung im Labor, seine geduldigen Erklärungen, wertvollen wissenschaftlichen Anregungen sowie das Korrekturlesen dieser Arbeit. Die gemeinsamen Gespräche haben mir oft meine während der Fertigstellung dieser Arbeit auftretenden Sorgen genommen und mich stets motiviert.

Ein weiterer Dank geht an Frau Annabella Janise und Frau Dr. Maria Weller für ihre Unterstützung im Labor, die hilfreichen Tipps und die Beantwortung vieler Fragen.

Vielen Dank auch an das gesamte Team im Labor und Büro für die freundliche Aufnahme und die interessanten Diskussionen während der Lab Meetings. An die Zeit bei Euch werde ich mich gerne zurückerinnern.

Abschließend möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, für ihre emotionale und finanzielle Unterstützung sowie für die zeitliche Entlastung während der Erstellung dieser Arbeit und meines gesamten Studiums danken. All dies wäre ohne Euch nicht realisierbar gewesen.

Vielen Dank!