

*CRISPR/Cas-Mismatch-Analyse unter der Verwendung von Wildtyp-SpCas9  
sowie eSpCas9(1.1) als modifizierte Endonuklease zur Optimierung von  
Therapiemöglichkeiten im Rahmen eines Genome Editing*

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

vorgelegt von Lorenz, Anthony  
aus Lingen (Ems)

Gießen 2024

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

AG Experimentelle Ophthalmologie

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Gutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann

Tag der Disputation: 16.05.2025

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	<b>Gentherapie am Auge</b> .....	<b>1</b>
1.2	<b>Genome Editing</b> .....	<b>4</b>
1.2.1	CRISPR/Cas9 .....	5
1.2.2	Off-Target-Aktivität und Mismatch-Analyse .....	9
1.3	<b>Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen</b> .....	<b>12</b>
1.3.1	Non-homologous end joining.....	13
1.3.2	Microhomology-mediated end joining.....	13
1.3.3	Homology directed repair .....	14
1.3.4	Reparaturmechanismen im Rahmen von Genome Editing .....	14
1.4	<b>Modifizierte Endonukleasen</b> .....	<b>15</b>
1.4.1	Enhanced specificity SpCas9.....	15
1.4.2	High-fidelity SpCas9.....	16
1.4.3	Sniper-SpCas9 .....	17
1.5	<b>BRET-Reporter-System</b> .....	<b>18</b>
1.6	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
2.1	<b>Material</b> .....	<b>21</b>
2.1.1	Geräteliste .....	21
2.1.2	Kits .....	23
2.1.3	Software .....	24
2.1.4	Verbrauchsmaterialien .....	25
2.1.5	Chemikalien.....	26
2.1.6	Puffer und Lösungen .....	27
2.1.7	Antibiotika.....	28
2.1.8	Kulturmedien für bakterielle und eukaryotische Kulturen .....	29
2.1.9	Bakterienstämme und Eukaryotische Zelllinien .....	30
2.1.10	Enzyme .....	30
2.1.11	Plasmide.....	31

2.1.12	Oligonukleotide und Primer .....	36
<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>41</b>
2.2.1	Restriktionsverdau.....	41
2.2.2	Agarosegelelektrophorese.....	42
2.2.3	Hybridisierung von Oligonukleotiden .....	43
2.2.4	Ligation.....	43
2.2.5	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	44
2.2.6	DNA-Sequenzierung .....	44
<b>2.3</b>	<b>Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>45</b>
2.3.1	Herstellung elektrokompetenter Zellen .....	45
2.3.2	Transformation/Elektroporation und Kultivierung von Bakterien....	46
2.3.3	Herstellung von Glycerolstocks .....	46
2.3.4	Plasmidisolierung/Plasmidpräparation.....	47
<b>2.4</b>	<b>Zellbiologische Methoden .....</b>	<b>48</b>
2.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	48
2.4.2	Transfektion.....	49
2.4.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	51
<b>2.5</b>	<b>Proteinbiologische Methoden .....</b>	<b>51</b>
2.5.1	Zelllyse und Proteinextraktion .....	51
2.5.2	BRET-Assay.....	52
<b>2.6</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>53</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
<b>3.1</b>	<b>WT-SpCas9-Analyse mit 1 bp-Mismatch-Sequenzen.....</b>	<b>55</b>
3.1.1	Klonierung der BRET-Reporter-Plasmide.....	55
3.1.2	Klonierung von px459(In6G5).....	57
3.1.3	Transfektion der BRET-Reporter Plasmide mit px459(In6G5).....	58
3.1.4	Messung der Mismatch-Schneideaktivität mit dem BRET-Assay ..	62
<b>3.2</b>	<b>Subgruppenanalysen der WT-SpCas9-Schneideaktivität</b>	<b>66</b>
3.2.1	Untersuchung der Unterbrechung kanonischer Basenpaarungen.	66
3.2.2	Untersuchung basenspezifischer Target-Strang-Mutationen .....	67
3.2.3	Untersuchung von Mismatch-Basenpaarungen.....	69

3.2.4	Untersuchung von Purin- und Pyrimidinbasen .....	70
3.2.5	Untersuchung der Mismatch-Position.....	71
<b>3.3</b>	<b>eSpCas9(1.1)-Analyse mit 1 bp-Mismatch-Sequenzen ....</b>	<b>72</b>
3.3.1	Transfektion der BRET-Reporter-Plasmide mit eSpCas9(1.1) .....	72
3.3.2	Messung der Mismatch-Schneideaktivität von eSpCas9(1.1) mit dem BRET-Assay .....	75
<b>3.4</b>	<b>Einfluss der Guide-Sequenz auf die Schneideaktivität ...</b>	<b>76</b>
3.4.1	Transfektion der Cas9-Plasmide mit einem intrinsischen Guanin an Position 20 der Guide-Sequenz.....	76
3.4.2	Messung der Schneideaktivität von Cas9 mit einem intrinsischen Guanin an Position 20 der Guide-Sequenz mit dem BRET-Assay .....	77
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>79</b>
<b>4.1</b>	<b>Mismatch Analyse der WT-SpCas9 .....</b>	<b>79</b>
4.1.1	Stabilität kanonischer Basenpaarungen .....	79
4.1.2	Nicht-kanonische Basenpaarungen.....	80
4.1.3	Positionsabhängige Mismatch-Toleranz.....	82
<b>4.2</b>	<b>eSpCas9(1.1) als modifizierte Endonuklease .....</b>	<b>85</b>
<b>4.3</b>	<b>Mismatch-Analyse mit dem BRET-Reporter-System .....</b>	<b>87</b>
<b>4.4</b>	<b>Evaluation und Perspektiven von CRISPR/Cas9.....</b>	<b>90</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	<b>Summary.....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>102</b>

<b>11</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>122</b>
<b>11.1</b>	<b>Nutzungsgenehmigungen .....</b>	<b>122</b>
<b>11.2</b>	<b>Daten und Abbildungen .....</b>	<b>123</b>
<b>12</b>	<b>Publikation.....</b>	<b>131</b>
<b>13</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>132</b>
<b>14</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>133</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Gentherapie am Auge

Gemäß der Definition der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) handelt es sich bei einem Gentherapeutikum um ein biologisches Präparat, dessen Wirkung in einem direkten Zusammenhang mit der enthaltenen rekombinanten Nukleinsäure oder dem resultierenden Produkt nach genetischer Expression steht. Im oder am menschlichen Körper wird es eingesetzt, um genetische Sequenzen zu regulieren, zu reparieren, zu ersetzen, hinzuzufügen oder zu löschen. (Wirth et al. 2013)

Grundsätzlich unterscheidet man in der Gentherapie zwischen zwei Systematiken. Die Keimbahntherapie basiert auf der vererblichen Modifikation von Keimzellen. Die somatische Gentherapie hingegen ist durch die Einflussnahme auf das Genom von Körperzellen des einzelnen Individuums charakterisiert und stellt die Grundlage für zugelassene Methoden in der aktuellen Forschung dar. (Tang und Xu 2020)

Weiterhin ist eine Unterteilung in *ex-vivo*-Ansätze, wobei entnommene Zellen nach Veränderung wieder implantiert werden, und *in-vivo*-Verfahren, bei denen Korrekturen mithilfe von Vektoren direkt im Patienten vorgenommen werden, möglich (Anguela und High 2019). Bei den am häufigsten verwendeten Vektoren handelt es sich derzeit um Adeno-assoziierte Viren (AAV) (Rodrigues et al. 2018).

Aktuell sind das Thema Gentherapie betreffend 1687 Projekte auf ClinicalTrials.gov und 1658 Einträge für 1330 klinische Studien auf dem Suchportal der International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP) der World Health Organization (WHO) erfasst (ClinicalTrials.gov 2024; ICTRP 2024). Mit Voretigen-Neparvovec erfolgte unter dem Handelsnamen Luxturna 2018 die erste Zulassung eines Gentherapeutikums für eine Augenerkrankung in Europa (Keeler und Flotte 2019). Entwickelt wurde das Medikament zur Behandlung von Patienten mit Leberscher kongenitaler Amaurose (LCA) Typ 2 (Russell et al. 2017). Dabei handelt es sich um eine vererbliche Erkrankung mit schnell progredienter Netzhautdegeneration und einhergehendem Visusverlust, beginnend im frühen Kindesalter sowie anschließender Erblindung (Maguire et al. 2008). Der Grund ist eine biallelische Mutation des *RPE65*-Gens, welche durch einen Enzymfunktionsverlust den Retinoidzyklus unterbricht (Russell et al. 2017). Voraussetzungen für eine Augmentationstherapie mit Voretigen-Neparvovec sind neben einer biallelischen

autosomal-rezessiven Mutation des *RPE65*-Gens eine ausreichend lebensfähige Retina (Russell et al. 2017).

Diverse weitere auf Gentherapie basierende Therapiestrategien stellen in der Augenheilkunde erfolgversprechende Ansätze zur Behandlung von erblichen Netzhautdystrophien, wie der Retinitis pigmentosa (RP), oder von Chorioretinopathien, wie der Chorioideremie (CHM), bei der neben der Retina auch die Choroidea betroffen ist, dar (Ziccardi et al. 2019).

Vereinfacht werden gentherapeutische Anwendungen am Auge durch die leicht zugängliche Anatomie des Organs für Diagnostik und Therapie (Choi et al. 2023). Eine Immunprivilegierung führt außerdem zu einer erhöhten Toleranz für Antigene (Peddle und MacLaren 2017). Aufgrund einer Protektion durch die Blut-Retina-Schranke besteht zudem eine geringere Wahrscheinlichkeit für systemische Nebenwirkungen respektive Off-Target-Effekte (Peddle und MacLaren 2017).

Die Ziele und Funktionsweisen der gentherapeutischen Verfahren sind unterschiedlich. Bei der Einbringung eines funktionalen Gens und dessen Expression im therapeutischen Maßstab, welche im Verlauf zu einem Funktionsgewinn in den Zellen des Patienten führt, spricht man von Gen-Augmentation oder auch Gen-Addition (Anguela und High 2019). Das defekte rezessive Gen mit einer *loss-of-function*-Mutation wird dabei in der Zelle belassen. Ein prominentes Beispiel dieser Methodik ist das bereits erwähnte Medikament Voretigen-Neparvovec. Das funktionsfähige *RPE65*-Gen wird hierbei mithilfe eines AAV-Vektors übertragen (Keeler und Flotte 2019). Limitiert ist die Gen-Addition durch eine begrenzte Vektorkapazität (Pulman et al. 2022). Während AAV-Vektoren zwar eine hohe Transduktionseffizienz und Sicherheit aufweisen, aber nur eine Kapazität von ca. 4,7 kB besitzen, verfügen Lentiviren über ein Aufnahmevermögen von ca. 8-10 kB, sind jedoch ungeeignet, Photorezeptoren effizient zu transduzieren (Ziccardi et al. 2019). Der Einsatz dualer Vektorsysteme, um die Kapazitätsgrenze zu umgehen, ist aufgrund einer verringerten Wirksamkeit erschwert (Trapani et al. 2021). Auch die Unwirksamkeit in Bezug auf autosomal-dominante *gain-of-function*- oder dominant-negative Mutationen stellt eine Einschränkung der Gen-Addition dar (Pulman et al. 2022).

Mithilfe der Gen-Suppression kann in diesen Fällen das implementierte Gen genutzt werden, um das pathologische dominante Gen zu unterdrücken und so ein Gen-Silencing zu bewirken (Anguela und High 2019). Die Heterogenität der dominanten Mutationen macht es jedoch schwierig sequenzspezifische Inhibitoren zu generieren (Pulman et al.

2022). Mutationsunabhängige Methoden mit der Disruption beider Allele und einer ergänzenden Gen-Addition bieten hierfür eine Option an (Stieger und Lorenz 2010).

Eine Alternative zur Gen-Addition und -Suppression präsentiert das Genome Editing. Das Verfahren ermöglicht die Korrektur eines spezifischen Gens, indem die fehlerhafte Sequenz geschnitten oder entfernt wird (Robb 2019). Wahlweise kann sie zusätzlich anhand von homologer Rekombination repariert oder mithilfe von Templates, Base Editing, Prime Editing sowie anderer Verfahren durch eine physiologische Sequenz ersetzt werden (Doudna 2020; Fichter et al. 2023). Auch das alleinige gezielte Ausschalten eines Gens im Sinne eines Gen-Silencing ist durch die Insertion eines Doppelstrangbruchs (DSB) möglich (Peddle und MacLaren 2017). Der Einsatz eines viralen Vektorsystems mit permanenter Expression der Effektor-Endonuklease ist zwar umsetzbar, jedoch nicht notwendig (Pulman et al. 2022). Mithilfe einer Transfektion durch nicht-virale Vektorsysteme wie Lipid-basierte Nanopartikel kann eine transiente Expression erreicht werden (van Haasteren et al. 2020). So kann die Wahrscheinlichkeit für Off-Target-Effekte und Immunreaktionen bereits initial reduziert werden (Pulman et al. 2022).

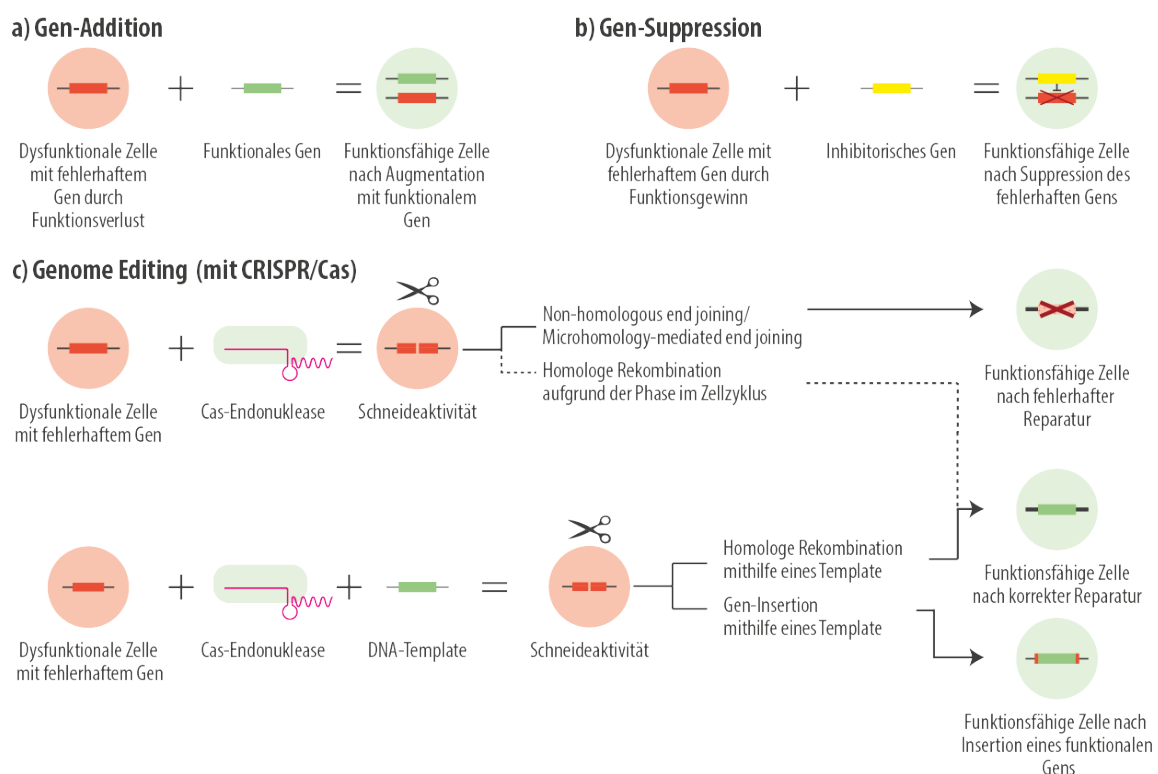


Abbildung 1.1: Modalitäten der Gentherapie

Schematisch abgebildet ist die Gen-Addition, bei der die Funktionsfähigkeit der Zelle durch das Hinzufügen eines funktionalen Gens wiederhergestellt wird (a), die Gen-Suppression, bei der ein Gen mit

Fehlfunktion durch ein inhibitorisches Gen unterdrückt wird, um eine Funktionsfähigkeit der Zelle zu bewirken (b) und die Modifikationsmöglichkeiten des Genome Editing hier beispielhaft mit CRISPR/Cas dargestellt (c). (Auf Grundlage von Anguela und High 2019) Für Erläuterungen s. Abschnitt 11.1.

## 1.2 Genome Editing

Die erstmalige Sequenzierung des vollständigen menschlichen Genoms im Jahr 2000 durch das Human Genome Project legt den Grundstein für die Umsetzung eines therapeutischen Genome Editing (Lander et al. 2001). Definitionsgemäß ist damit das Verfahren der gezielten Modifikation spezifischer Sequenzen innerhalb der gesamten genomischen DNA unter Auslösung der verschiedenen DNA-Reparaturmechanismen gemeint (Robb 2019).

Die Modifikationen zielen darauf ab, gewünschte Gene einzufügen oder bestehende Gene direkt oder indirekt über genregulatorische Sequenzen zu manipulieren (Robb 2019). Für die Durchführung größerer Änderungen an Genen mit multiplen oder variablen Mutationen stellt der HDR-Reparaturmechanismus bislang die bevorzugte Strategie dar (Fichter et al. 2023). Der Einsatz von Genome Editing erweitert nicht nur das Verständnis der Genetik, sondern ebnet auch den Weg zur Therapie zahlreicher erblicher Krankheiten (Lu et al. 2023). Ein zielgerichteter Eingriff bietet sich hier besonders bei Erkrankungen an, die durch ein Defizit in einem spezifischen Gen verursacht werden (Doudna 2020). Auch an Therapieansätzen zur Behandlung von Erbkrankheiten mit heterogenen Mutationen wie der LCA, RP oder Morbus Stargardt wird intensiv geforscht (Choi et al. 2023). Ebenso gilt dies für multifaktorielle Erkrankungen wie die diabetische Retinopathie und die Immuntherapie tumoraler Entitäten (Lu et al. 2023).

Werkzeuge des Genome Editing sind sequenzspezifische Endonukleasen wie Zinkfinger-Nukleasen (ZFNs), Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) oder clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR/Cas), welche alle die Fähigkeit besitzen, DSBs in Gensequenzen einzufügen (Wimmer et al. 2021). Während ZFNs Hybride aus einer bakteriellen DNA-Schneidedomäne und Zinkfingern aus eukaryotischen Transkriptionsfaktoren darstellen, handelt es sich bei TALENs um die Kombination der gleichen bakteriellen Domäne mit DNA-Erkennungsdomänen aus Transkriptionsfaktoren pflanzenpathogener Bakterien (Carroll 2017; Joung und Sander 2013; Urnov et al. 2010). Gemeinsame Nachteile umfassen ein zeit- und kostenaufwendiges Design sowie größenbedingte Einschränkungen bei der Applikation (Segurado et al. 2022). Das CRISPR/Cas-System stellt ursprünglich einen

prokaryotischen Schutzmechanismus gegen fremdes genetisches Material dar, welches erstmals in Bakterien entdeckt wurde (Jinek et al. 2012). Es zeichnet sich durch seine Fortschrittlichkeit und einfache Handhabung aus.

Um die Funktionalität des Gens und die Integrität des DNA-Duplexes wiederherzustellen, sind im Anschluss an einen DSB zelleigene DNA-Reparaturmechanismen wie Homology directed repair (HDR), Non-homologous end joining (NHEJ), Microhomology-mediated end joining (MMEJ) oder selten auch das Single-strand annealing (SSA) notwendig (Aparicio et al. 2014; Fichter et al. 2023).

Letztlich entscheidend für eine Evaluation der Wirksamkeit der angewandten Verfahren ist die Zielgenauigkeit des eingefügten DSB und die anschließende Reparatur durch die verschiedenen zellulären Mechanismen (Carroll 2017).

### **1.2.1 CRISPR/Cas9**

CRISPR fungieren natürlicherweise als eine Art adaptives Immunsystem in Archaeen und Bakterien (Doudna und Charpentier 2014). Sie dienen dem Schutz vor einer Bedrohung durch fremde DNA, hauptsächlich durch Plasmide und Viren, insbesondere Bakteriophagen (Garneau et al. 2010). Ihre Entdeckung lässt sich auf die Untersuchung repetitiver Elemente in *Escheria coli* (*E. coli*) zurückführen, welche durch sogenannte Spacer voneinander getrennt sind (Ishino et al. 1987). Diese haben ihren Ursprung in viralem Genmaterial und liegen in räumlicher Nähe zu Sequenzen, die für verschiedene CRISPR assoziierte Proteine (Cas) kodieren, welche fremde DNA erkennen, binden und schneiden können (Carroll 2017). Nach der Integration der Protospacer sowie der Transkription und enzymatischen Prozessierung entsteht short RNA (crRNA) mit Komplementarität zur viralen DNA (Barrangou et al. 2007; Wiedenheft et al. 2012). Gemeinsam mit der trans-acting RNA (tracrRNA), die für die crRNA-Prozessierung und die Schneideaktivität wichtig ist, besitzen sie die Fähigkeit, das Cas-Protein als katalytische Einheit zum Ziel zu führen (Barrangou und Marraffini 2014; Deltcheva et al. 2011). Abgeleitet von diesem Prinzip wird inzwischen oftmals zur Vereinfachung eine chimäre single Guide-RNA (sgRNA) verwendet, welche die Funktionen der vorangegangenen RNAs erfüllt (Jinek et al. 2012). Zusätzlich für die Zielerkennung erforderlich ist eine sogenannte PAM-Sequenz (protospacer-adjacent motifs). Diese befindet sich direkt neben der zu erkennenden Target-Sequenz (Gasiunas et al. 2012). Als

Effektorendonuklease wird im experimentellen Kontext häufig das Cas9 eingesetzt, das aus *Streptococcus pyogenes* isoliert wurde (Doudna 2020).

Cas9 besitzt eine bilobäre Struktur, bestehend aus dem Nuclease Lobe (NUC) und einem Recognition Lobe (REC) (Nishimasu et al. 2014). Der NUC-Lappen wiederum enthält mit der HNH- sowie der RuvC-Domäne zwei Nukleasedomänen und die sogenannte C-terminale PAM-interagierende Domäne (PI) (Nishimasu et al. 2014; Wilkinson et al. 2019). Der REC-Lappen besteht aus drei  $\alpha$ -helikalen Erkennungsdomänen (REC1-3) und der Brückenhelix (BH), welche die beiden Lappen miteinander verbindet (Nishimasu et al. 2014; Wilkinson et al. 2019).

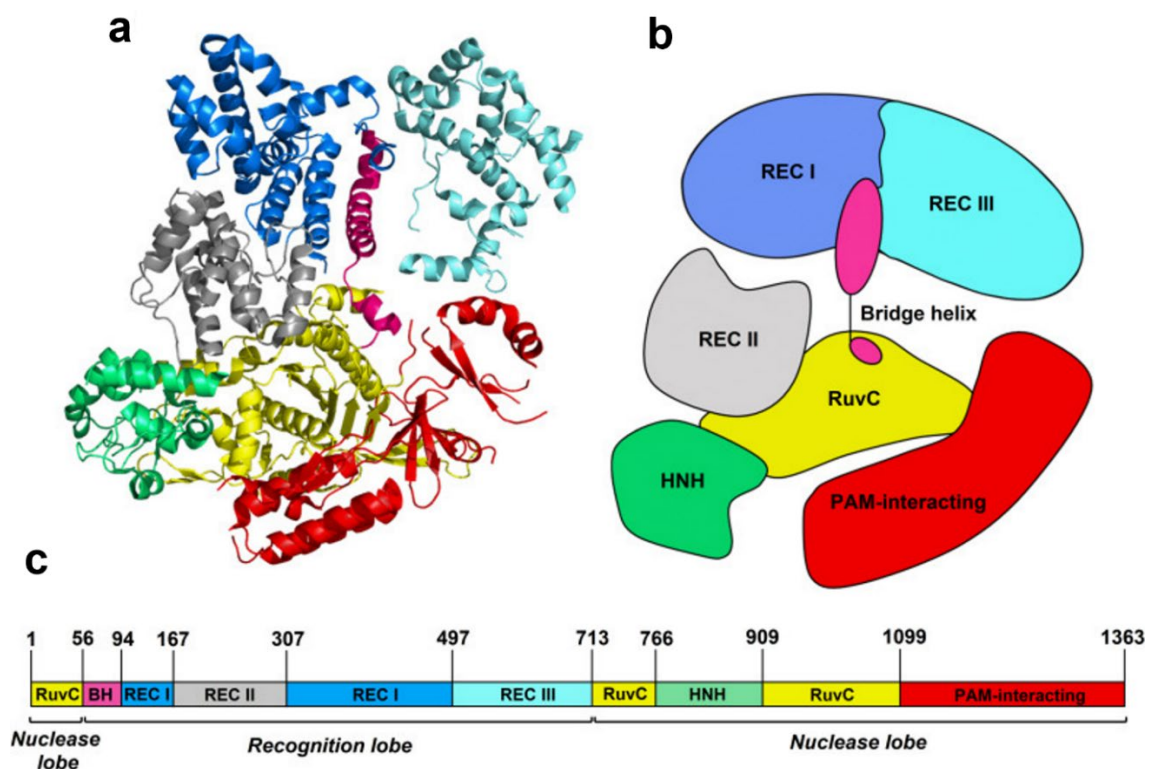


Abbildung 1.2: Bilobäre Struktur von CRISPR/Cas9

Die Struktur des SpCas9-Proteins dargestellt als Kristallstruktur (a), schematische Zeichnung (b) und als lineare Abbildung der Domänen (c). (Halat et al. 2021) Für Erläuterungen zur Abbildung s. Abschnitt 11.1.

Die Erkennung und Bindung der Zielsequenz durch Cas9 erfordert wie beschrieben eine PAM-Sequenz, welche dem Nukleotidspacer auf dem Non-Target-Strang in 3'-Richtung anliegt (Ivanov et al. 2020; Sternberg et al. 2014). Dieses NGG Trinukleotid ermöglicht der Endonuklease die Unterscheidung von fremdem und eigenem DNA-Material (Jinek et al. 2012; Marraffini und Sontheimer 2010; Mojica et al. 2009; Szczelkun et al. 2014). Im Rahmen des Kontaktes mit dem fremden Genom rangiert Cas9 zufällig durch die DNA der Zielzelle, bis es auf die notwendige PAM-Sequenz trifft (Sternberg et al. 2014). Bei

Erkennung der PAM-Sequenz bindet der Cas9- Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex und destabilisiert die DNA wodurch eine partielle Entwindung sowie Aufschmelzung des Duplexes erfolgt (Jinek et al. 2012; Sternberg et al. 2014). Bei Abwesenheit dieser PAM-Sequenz dissoziiert Cas9 von der DNA und setzt die Suche fort (Sternberg et al. 2014). Im Falle einer Passgenauigkeit wird die Formation der R-Loop-Struktur initiiert und es vollzieht sich in einem mehrschrittigen Vorgang durch Basenpaarung die Hybridisierung der zielspezifischen crRNA der Guide-RNA und der komplementären DNA des Target-Strangs von der PAM-proximalen-Region aus in Richtung der PAM-distalen-Region, wobei der Non-Target-Strang deplatziert wird (Jiang et al. 2016; Pacesa et al. 2022b; Szczelkun et al. 2014). Eine übereinstimmende Komplementarität von Target-Strang und Guide-RNA in der PAM-proximalen Seed-Sequenz, welche sich vom 3'-Ende der Guide-Sequenz bis zu 12 bp stromaufwärts erstreckt, ist dabei für das Fortlaufen der Reaktion von besonderer Wichtigkeit (Sternberg et al. 2014). Gravierende Mismatches können das DNA-Zipping an dieser Stelle bereits vorzeitig unterbrechen (Singh et al. 2016; Zhang et al. 2020). Während dieses von Konformationsänderungen, Umpositionierungen und Umstrukturierungen begleiteten Vorgangs der Hybridisierung von PAM-proximal nach PAM-distal interagiert die PAM-distale Region des DNA-Duplexes frühzeitig mit der REC2- sowie der REC3-Domäne und wird von diesen stabilisiert (Chen et al. 2017; Jiang et al. 2016; Pacesa et al. 2022b). REC2-Reste stehen dabei durch Wechselwirkungen in Verbindung zum Non-Target-Strang und REC3-Reste zum Target-Strang (Pacesa et al. 2022b). Die Basenpaarung der PAM-distalen-Region an den Positionen 12-20 induziert schließlich die Konformationsänderung und Translokation der HNH-Domäne sowie im Verlauf die Aktivierung der schneideaktiven RuvC-Domäne wie auch der eigenen Schneidefunktion (Sternberg et al. 2015). Mithilfe dieser beiden Nuklease-Domänen ist der Proteinkomplex nun in der Lage, durch die RuvC-Domäne einen Schnitt auf dem PAM-seitigen Non-Target-Strang einzufügen und durch die HNH-Domäne gleichzeitig einen Schnitt der DNA an dem nicht PAM-seitigen Target-Strang, dessen Basenabfolge mit der zielspezifischen Sequenz der Guide-RNA hybridisiert ist, zu katalysieren (Jinek et al. 2012). Auf diese Weise entsteht ein glatter DSB 3 bp in 5'-Richtung von der PAM-Sequenz entfernt mit sogenannten *blunt ends*, das heißt einem Schnitt auf gleicher Höhe bei beiden DNA-Strängen (Gasiunas et al. 2012; Jinek et al. 2012).

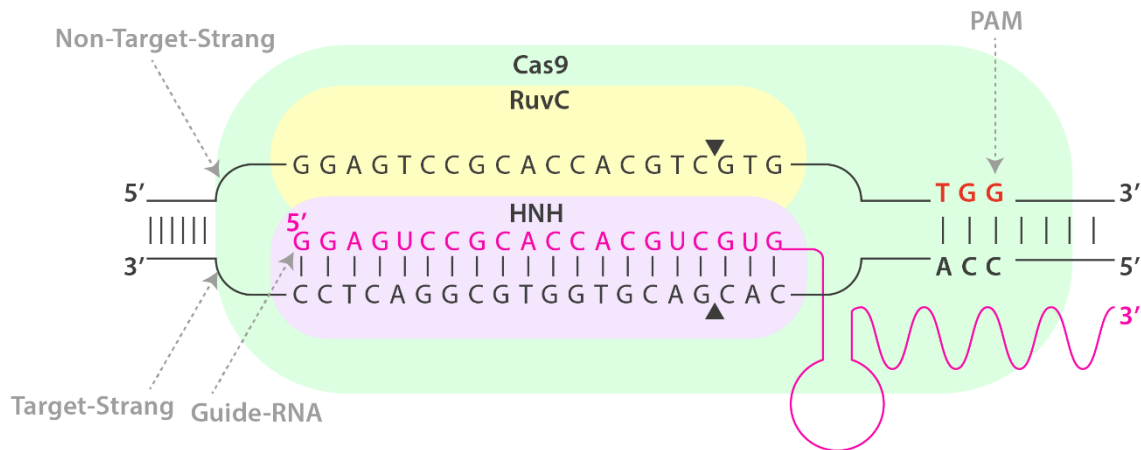


Abbildung 1.3: CRISPR/Cas9

Abgebildet ist ein Cas9-Enzym im Komplex mit einer Guide-RNA gebunden an die Target-DNA. Target- und Non-Target-Strang des DNA-Duplexes sind voneinander separiert, was eine Hybridisierung der Guide-RNA in Form von durchgängig kanonischen Bindungen an die Target-Sequenz der DNA ermöglicht. Die Guide-RNA, hier als sgRNA dargestellt, besteht aus der 20 bp langen Guide-Sequenz, die vom 5'-Ende ausgehend auf der crRNA liegt, welcher sich in 3'-Richtung folgend die charakteristisch gewundene tracrRNA anschließt. Als Guide-Sequenz wurde zur schematischen Darstellung die in dieser Arbeit verwendete Sequenz ARTG1 verwendet. Die zu dieser Guide-Sequenz vollständig komplementäre Target-Sequenz ARTT1 liegt in 3'-5'-Richtung auf dem Target-Strang der DNA. Die PAM-Sequenz mit den Nukleotiden TGG befindet sich am 3'-Ende des Non-Target-Strangs. Zusätzlich illustriert sind die beiden Nuklease-Domänen RuvC und HNH, deren zugehörige Schnittstellen 3 bp von der PAM-Sequenz ausgehend auf dem Non-Target- respektive auf dem Target-Strang markiert sind.

Ausgehend vom traditionellen Genome Editing wurden verschiedene CRISPR/Cas gestützte Verfahren entwickelt. Der paarweise Einsatz von zwei zu Nickasen modifizierten Cas-Proteinen, welche jeweils einen DNA-Strang erkennen und schneiden, ermöglicht es, die Genauigkeit der Sequenzerkennung zu erhöhen (Ran et al. 2013a). Durch sogenanntes Base Editing sollen Cas-Proteine mithilfe von Deaminasen in der Lage sein, einzelne Basen auszutauschen, ohne einen DSB in die Target-DNA einzufügen (Komor et al. 2016). Prime Editing integriert ebenfalls ohne einen DSB durch eine Reverse Transkriptase eine gewünschte Sequenz von einer Prime Editing Guide-RNA (pegRNA) in die DNA des Ziels (Anzalone et al. 2019). Um die Spezifität zu steigern, kann ein katalytisch inaktives SpCas9 (dSpCas9) an eine nicht spezifische FokI-Nuklease gekoppelt werden (Tsai et al. 2014). CRISPR interference (CRISPRi) und CRISPR activation (CRISPRa) beeinflussen gezielt genomregulatorische Elemente (Gilbert et al. 2014; Qi et al. 2013). Insbesondere Modifikationen der Cas-Endonukleasen auf molekularbiologischer Ebene und die daraus folgende Optimierung der verschiedenen Eigenschaften wie Sensitivität, Spezifität und Schneideaktivität sind Gegenstand der

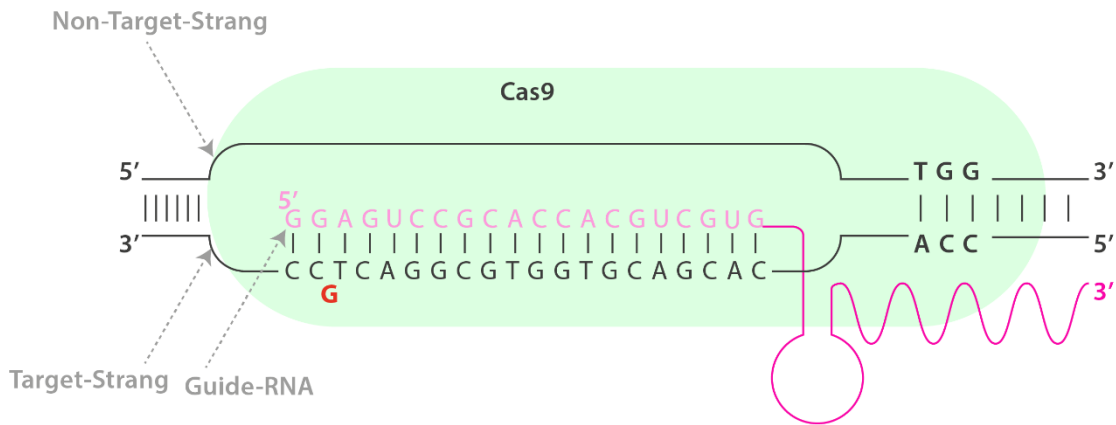
aktuellen Forschung. In der jüngeren Vergangenheit wurde das Verfahren bereits bei der Behandlung der Beta-Thalassämie sowie Sichelzellanämie klinisch erprobt und zugelassen (Ferraresi et al. 2023; Frangoul et al. 2020; Frangoul et al. 2021; Locatelli et al. 2022; Parums 2024).

### **1.2.2 Off-Target-Aktivität und Mismatch-Analyse**

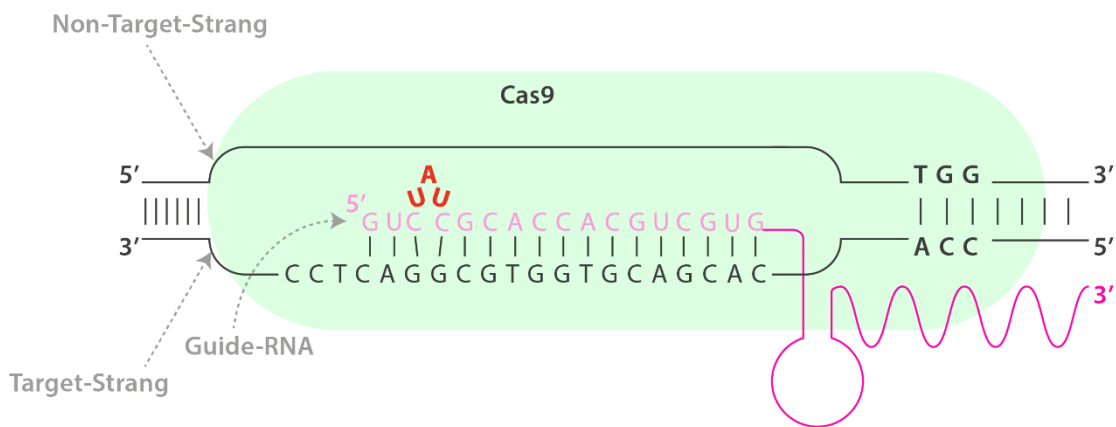
Zentrale Problematik des CRISPR/Cas-Systems, wie auch anderer programmierbarer Endonukleasen und damit größte Hürde bei einer klinischen Anwendung ist die Eigenschaft, unspezifische DSBs an Positionen des Genoms zu katalysieren, die nicht der eigentlichen Bestimmung entsprechen. Diese Off-Target-Aktivität wird durch eine Ähnlichkeit der Off-Target-Site zur Zielsequenz an der On-Target-Site hervorgerufen (Jiang und Doudna 2017). Die Grundlage dieser Promiskuität liegt vermutlich in der ursprünglichen Rolle von CRISPR/Cas als Teil des prokaryotischen Immunsystems. In dieser biologischen Funktion war es vorteilhaft, DNA oder Plasmide zu eliminieren, die den aus der viralen DNA entnommenen Spacern ähneln. Ziel dabei ist es, einer Adaption der Viren oder ihrer Verteidigungsmechanismen zuvorzukommen (van Houte et al. 2016; Yaung et al. 2014).

Durch verschiedene Vorgänge kommt es zu einer Fehlpaarung zwischen der zielbestimmenden 20 bp Guide-Sequenz und der DNA des Genoms (Pacesa et al. 2022a). Ein bekannter Mechanismus, der unspezifische Bindungen zulässt, ist die Ausbildung von Mismatches zwischen Guide-RNA und Off-Target-Site an einer oder mehreren Positionen bei gleicher Sequenzlänge (Fu et al. 2013). Festzustellen ist hier, dass Mismatches in der PAM-Sequenz sowie der Seed-Sequenz, welche sich im Bereich von PAM-proximal bis ca. 8-12 bp in 5'-Richtung der Guide-Sequenz zählend befindet, deutlich weniger toleriert werden (Hsu et al. 2013; Pattanayak et al. 2013). Eine weitere Form von Fehlpaarung wird durch die Entstehung von sogenannten Bulges erleichtert. Wenn auf der Off-Target-Site eine oder mehrere zusätzliche Basen vorliegen, spricht man von einer Insertion und beim Fehlen von Deletion (Lin et al. 2014). Ersteres kann zu Vorwölbungen der DNA (DNA-Bulge) und zweiteres zu Vorwölbungen der Guide-RNA (RNA-Bulge) führen. Beide können trotz Unterschieden von DNA und Guide-RNA in Basenabfolge sowie Sequenzlänge eine Bindung ermöglichen (Lin et al. 2014).

a) DNA - Bulge



b) RNA - Bulge



c) Nicht-kanonische Basenpaarung

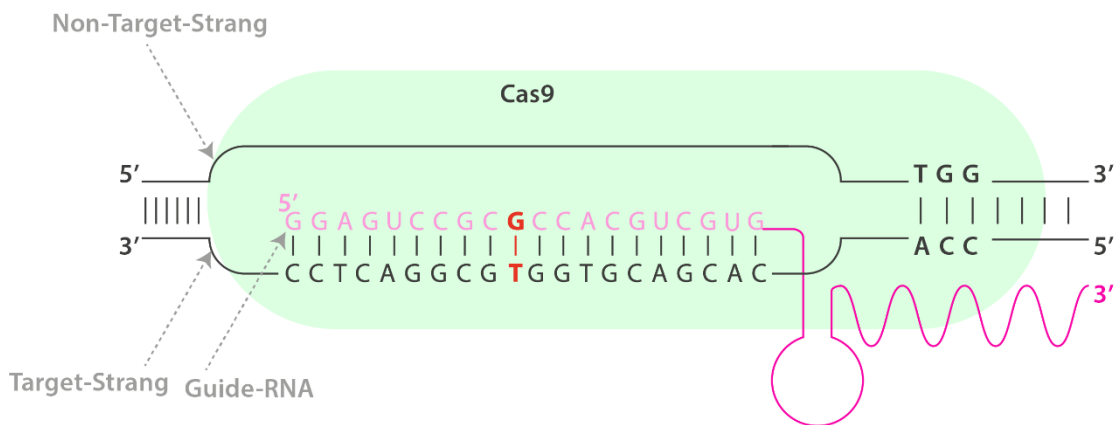


Abbildung 1.4: Mismatchmechanismen

Schematisch dargestellt sind hier drei verschiedene Mechanismen, die zur Begünstigung einer Fehlpaarung zwischen Guide-RNA und Target-DNA beitragen. a) Die Vorwölbung der Target-Strang-DNA und die Entstehung eines DNA-Bulge, hier beispielhaft als 1 bp G DNA-Bulge. b) Die noch ausgeprägter tolerierte Deplatziierung der Guide-RNA und die Bildung eines RNA-Bulges, hier als 3 bp UAU RNA-Bulge. c) Die Formation einer nicht-kanonischen Bindung zwischen Guide-RNA und Target-DNA, hier porträtiert als prominentes Wobble-Basenpaar G-T an Position 11.

Die Gefahr einer Schneideaktivität an falscher Stelle besteht nicht nur in einer gesteigerten Zelltoxizität, sondern auch in der Erzeugung von Mutationen und unerwünschten chromosomalen Rearrangements wie Deletionen, Inversionen und Translokationen durch eine fehlerhafte Reparatur der entstandenen DSBs (Kim et al. 2009; Cho et al. 2014; Chen et al. 2020). Im weiteren Verlauf kann dies die Aktivierung von Onkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen auslösen und somit die Entstehung von Tumoren provozieren (Cho et al. 2014).

Essenziell für eine perspektivische therapeutische Anwendung von CRISPR/Cas ist es, potenzielle Off-Target-Sites zu identifizieren und die Muster, nach denen sich Mismatches bilden, zu verstehen. Im Kontext einer Off-Target-Analyse können mithilfe verschiedener biochemischer Assays mit *in-vivo*- und *in-vitro*-Setting wie dem GUIDE-Sequencing oder dem in dieser Arbeit verwendeten BRET-Assay, Off-Target-Aktivität und Mismatches untersucht und quantifiziert werden (Tsai et al. 2015; Naeem et al. 2020). Zur Analyse existieren weiterhin bereits diverse Algorithmus- und Deep Learning-basierte *in silico*-Tools wie Cas-OFFinder, DeepCRISPR und Elevation, die anhand der bisher generierten Daten mögliche Off-Targets vorhersagen können (Bae et al. 2014; Chuai et al. 2018; Listgarten et al. 2018).

Ein erweiterter Wissenshorizont kann dazu genutzt werden, sowohl Sensitivität als auch Spezifität von CRISPR/Cas zu erhöhen. Methoden, die zur Optimierung der On-Target-Aktivität sowie der Verhinderung einer Off-Target-Aktivität untersucht werden, sind eine praktikable Auswahl der Targets, die Verwendung modifizierter Guide-RNAs und Cas-Endonukleasen, deren gemeinsame Verbringung beispielsweise als RNP-Komplex, was einen schnelleren Abbau ermöglicht, und CRISPR/Cas-gestützte Verfahren (s. Abschnitt 1.2.1) (Naeem et al. 2020). Derzeit erwogen werden insbesondere Guide-RNAs verschiedener Basenabfolge und Sequenzlänge sowie Cas9-Varianten mit erhöhter Spezifität (Lin et al. 2014; Kleinstiver et al. 2016; Slaymaker et al. 2016).

Diese Arbeit verwendet die Target-Sequenz CLN3 In6T5 als Modell für die CRISPR/Cas9-Mismatch-Analyse. Dabei handelt es sich um eine intronische Sequenz des *CLN3*-Gens. Eine rezessive Mutation dieses Gens löst die häufigste Neuronale Ceroid-Lipofuszinose (NCL), die Juvenile Neuronale Ceroid-Lipofuszinose (CLN3), aus (Cárcel-Trullols et al. 2015). Die NCL beschreiben eine Gruppe erblicher liposomaler Speichererkrankungen, welche aufgrund von Mutationen in verschiedenen Genen zu einer neuronalen und retinalen Degeneration führen (Goebel und Wisniewski 2004).

Trotz Forschungen an enzymersatzenden-, genterapeutischen- und pharmakologischen-Verfahren stehen für die NCL derzeit keine kurativen Therapieansätze zur Verfügung (Mole et al. 2019). Die Behandlung erfolgt zumeist symptomatisch und palliativ.

### **1.3 Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen**

Von DSBs spricht man, wenn das Phosphatdesoxyribosegerüst auf beiden Seiten der DNA-Helix gespalten ist, was zu der Entstehung zweier getrennter Moleküle führt. Schätzungsweise zehn DSBs verschiedener Genesen treten pro Zelle täglich auf (Lieber 2010). Pathologische Ursachen für DSBs können Brüche der Chromatiden in der S-Phase der Mitose, Sauerstoffradikale, ionisierende Strahlung, radiomimetische Chemikalien, Fehlfunktionen nukleärer Enzyme und mechanische Belastung sein (Adachi et al. 2003; Lieber 2010; Murnane 2006; Riballo et al. 2004). Physiologische Hintergründe sind das Antigenrezeptor-Genrearrangement von Lymphozyten und Immunglobulinen sowie DSBs im Rahmen eines Crossing-Over von Chromosomen in der Meiose (Aparicio et al. 2014; Zickler und Kleckner 1999). Auch im Zuge einer Chemo- oder Radiotherapie können Mittel eingesetzt werden, die DSBs hervorrufen, da Krebszellen gegenüber diesen oftmals sensitiver sind als gesunde Zellen (Aparicio et al. 2014).

Die DNA-Fragmentierung und der Verlust genetischer Information können zu genomischer Instabilität, Zelltod sowie zu einer onkogenen Transformation oder dem Funktionsverlust tumorsuppressiver Komponenten im Kontext einer Karzinogenese führen (Aparicio et al. 2014). Chromosomale Brüche und Translokationen infolge von DSBs sind mit Entwicklungsstörungen, Immunschwäche, Neurodegeneration, Strahlenempfindlichkeit und Sterilität vergesellschaftet (Wang und Xu 2017). Um die Chromosomenintegrität sicherzustellen, ist die Verknüpfung getrennter DNA-Moleküle durch zelleigene Reparaturmechanismen essenziell (Aparicio et al. 2014).

Die vorherrschenden Mechanismen sind HDR und NHEJ (Aparicio et al. 2014). Außerdem bekannt ist MMEJ als Vertreter des alternativen NHEJ (a-NHEJ) (Yanik et al. 2017). Ein weiterer seltener Reparaturmechanismus mit einer Ähnlichkeit zu MMEJ und einem hohen mutagenen Potenzial ist das Single-strand annealing (SSA) (Bhargava et al. 2016). Abhängig vom Zeitpunkt im Zellzyklus, Cyklin abhängigen Kinasen und dem Vorliegen eines DNA-Template sind verschiedene Reparaturwege bestimmend (Ceccaldi et al. 2016). Während NHEJ jederzeit eingesetzt werden kann, benötigt HDR ein DNA-Template in Form des Schwesterchromatids und kann daher nur in der S- und G2-Phase

des Zellzyklus zur Anwendung kommen (Lieber 2008; Sonoda et al. 2006; Yanik et al. 2017).

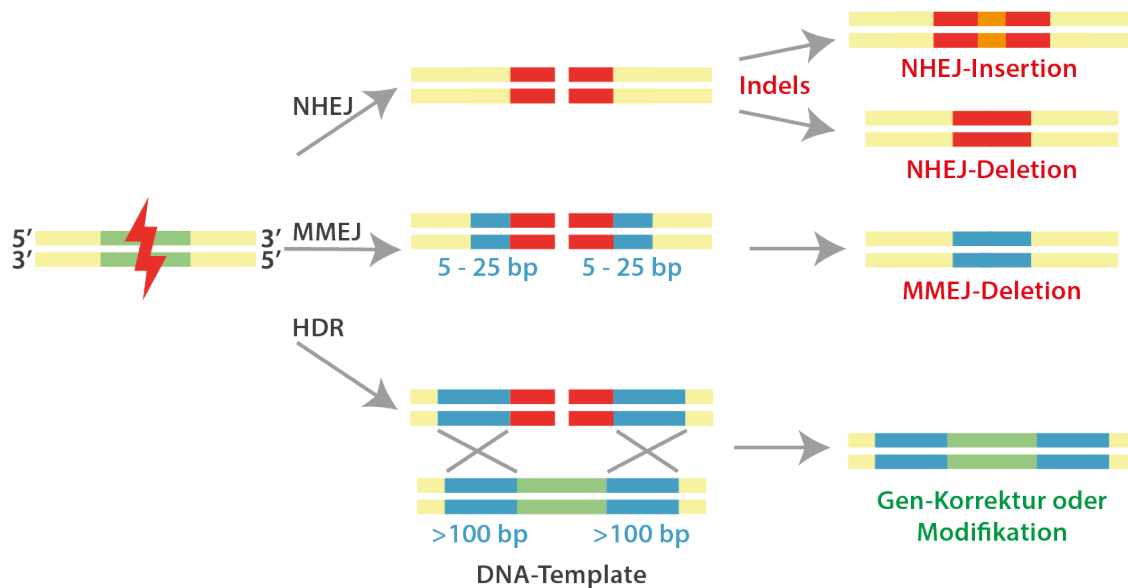


Abbildung 1.5: DNA-Reparaturmechanismen

Abgebildet sind die drei häufigsten DNA-Reparaturmechanismen als Basis des Genome Editing: Non-homologous end joining (NHEJ), Microhomology-mediated end joining (MMEJ) und Homology directed repair (HDR). (Auf Grundlage von Yanik et al. 2017) Für Erläuterungen s. Abschnitt 11.1.

### 1.3.1 Non-homologous end joining

Das NHEJ ist ein schneller, jedoch fehleranfälliger Reparaturmechanismus, welcher die vorliegenden DNA-Segmente direkt ligiert, was Insertionen oder Deletionen (Indels) verursachen kann (Yanik et al. 2017). Ein Ku70/80 Heterodimer bindet an die proteinmarkierten zu verknüpfenden Moleküle und löst eine Signalkaskade aus (Pannunzio et al. 2018). Diese führt dazu, dass die DNA-Enden prozessiert werden und einzelne Nukleotide von den Polymerasen  $\lambda$  und  $\mu$  hinzugefügt werden. Abschließend wird die Verbindung der Segmente durch die DNA-Ligase IV vorgenommen. NHEJ kann während aller Phasen des Zellzyklus zur Anwendung kommen. Man findet ihn jedoch vermehrt in der  $G_1$ -Phase vor, wenn kein Schwesterchromatid als Template zur Verfügung steht (Yanik et al. 2017).

### 1.3.2 Microhomology-mediated end joining

Beim MMEJ werden homologe Sequenzen mit einer Länge von 5 bis 25 Nukleotiden zur Basenpaarung zweier durch einen DSB getrennte Segmente genutzt, wobei Deletionen verschiedener Größe entstehen, die das MMEJ ebenfalls als einen fehleranfälligen

Reparaturmechanismus charakterisieren (McVey und Lee 2008). Das MMEJ ist in der S-Phase des Zellzyklus vorzufinden, wo es mit HDR in Konkurrenz steht, mit der es sich ebenfalls den einleitenden Schritt teilt (Truong et al. 2013). Bei diesem Schritt handelt es sich um die Prozessierung der DNA-Enden durch einen MRN-Proteinkomplex, welcher Einzelstrang-DNA (ssDNA) auf beiden Seiten des DSB freilegt (Symington und Gautier 2011). Es kommt zu einem Annealing der mikrohomologen Regionen und einer zu Deletionen führenden Entfernung der heterologen Überhänge an den 3'-Enden. Daraufhin folgt das Auffüllen der Nukleotide in den nicht homologen Bereichen durch eine DNA-Polymerase und anschließend die Verbindung der Enden durch die Ligasen I und III (Wang und Xu 2017). MMEJ ist im Gegensatz zu NHEJ nicht nur unabhängig von Ku- und Ligase IV, sondern ermöglicht, sofern eine Template-DNA mit mikrohomologen Regionen vorliegt, ein spezifisches Genome Editing (Yanik et al. 2017). Aufgrund der Verwendung kurzer homologer Sequenzen bestehen Gemeinsamkeiten mit dem seltenen SSA-Reparaturmechanismus, welcher aufgrund von Deletionen ebenfalls ein hohes Risiko für Mutationen birgt (Bhargava et al. 2016; McVey und Lee 2008).

### **1.3.3 Homology directed repair**

Bei der HDR wird die Kontinuität der Sequenz durch homologe Rekombination anhand einer Template-DNA wiederhergestellt, was sie zu einem präzisen und zuverlässigen Reparaturweg macht (Liu et al. 2018). Die Verwendung des Schwesterchromatids zu dem Zweck der Korrektur der fehlerhaften Sequenz begrenzt den Mechanismus vor allem auf die S- und G<sub>2</sub>-Phase (Yang et al. 2020). Nach der Erkennung des DSB wird wie bei dem MMEJ ein MRN-Komplex rekrutiert und es werden einzelsträngige 3'-Überhänge erzeugt (Yanik et al. 2017). Die weitere Kaskade resultiert in der Bindung von Rad51 an die Überhänge, was die Suche nach der passenden Template-DNA und die Invasion des homologen Strangs sowie die Rekombination initiiert (Buisson et al. 2014). Die Polymerase  $\delta$  synthetisiert den neuen Strang und die entstandenen Holliday Junctions werden von Nickasen abgetrennt (Devkota 2018). Anschließend wird die endgültige Verknüpfung durchgeführt, wobei Ligase I beteiligt ist (Goetz et al. 2005; Sallmyr et al. 2020).

### **1.3.4 Reparaturmechanismen im Rahmen von Genome Editing**

Beim Genome Editing werden Endonukleasen dazu verwendet, DSBs einzufügen. Zelluläre Reparaturmechanismen werden aktiviert und führen im Falle einer

Überaktivierung der NHEJ- und MMEJ-Wege zu Indels, die genregulatorische Sequenzen unterbrechen oder das Leseraster durch einen Frameshift verschieben können (Robb 2019). Dies kann dazu verwendet werden, maligne Gene durch einen Knockout auszuschalten. Auch größere Deletionen können unter Verwendung von mehreren Nukleasen erreicht werden (Han et al. 2014). Durch den HDR-Mechanismus hingegen ist, sofern ein Template zur Verfügung gestellt wird, die sequenzspezifische Implementierung von DNA möglich (Robb 2019).

## 1.4 Modifizierte Endonukleasen

Die Off-Target-Aktivität und die Aktivierung fehleranfälliger Reparaturmechanismen bedrohen die klinische Anwendung von CRISPR/Cas im Sinne eines Genome Editing (Rabinowitz und Offen 2021). Die Erhöhung der Spezifität und Sensitivität sind somit wesentliche Ziele auf dem Weg zu einem therapeutischen Einsatz des Verfahrens. Ein Ansatz zur Optimierung besteht darin, Cas9 durch Modifikationen anzupassen. Entwicklungsverfahren können gezielte Veränderungen auf molekularbiologischer Ebene im Sinne eines Protein Engineering beinhalten (Rabinowitz und Offen 2021). Beispiele sind das *enhanced specificity* SpCas9 (eSpCas9(1.1)), entwickelt von Slaymaker et al., und das *high-fidelity variant* SpCas9 (SpCas9-HF1), konstruiert von Kleinstiver et al., beide basierend auf dem Wildtyp-Cas9 des *Streptococcus pyogenes* (WT-SpCas9) (Slaymaker et al. 2016; Kleinstiver et al. 2016). Alternative Strategien bedienen sich randomisierter Schemata wie dem Einsatz von gerichteter Evolution, um vorteilhafte Mutationen zu identifizieren (Lee et al. 2018; Rabinowitz und Offen 2021). Die gewonnenen Erkenntnisse über funktionelle Strukturen der Endonukleasen können dazu beitragen, CRISPR/Cas9 zu optimieren (Rabinowitz und Offen 2021).

### 1.4.1 Enhanced specificity SpCas9

Eine Cas9-vermittelte Schneideaktivität setzt die Trennung von Target- und Non-Target-Strang voraus, um die Hybridisierung mit der Guide-RNA zu ermöglichen und die Bildung eines R-Loops zu initiieren (s. Abschnitt 1.2.1). Die Gruppe um Slaymaker et al. stellt die Hypothese auf, dass eine Einschränkung der Helikase-Aktivität von Cas9 die Trennung des DNA-Duplexes erschwert, was wiederum Mismatches zwischen sgRNA und Target-DNA energetisch unvorteilhafter gestaltet (Slaymaker et al. 2016). Die verminderte Toleranz für Mismatches soll zu einer verbesserten Spezifität der Endonuklease führen und als Effekt die Off-Target-Schneideaktivität vermindern. Die

Strukturanalyse von Cas9 im Komplex mit der Target-DNA und der Guide-RNA gibt eine positive geladene Furche zwischen HNH-, RuvC- und PI-Domäne zu erkennen, in die sich der Non-Target-Strang einbettet und von der er stabilisiert wird (Nishimasu et al. 2014). Die Neutralisation positiv geladener Reste in dieser Non-Target-Strang-Furche (nt-groove) soll die Bindung von Cas9 zum Non-Target-Strang schwächen und eine Re-Hybridisierung zwischen Target- und Non-Target-Strang fördern (Slaymaker et al. 2016). In der Konsequenz könnte eine stärkere Komplementarität zwischen Target-DNA und Guide-RNA im Sinne kanonischer Watson-Crick-Basenpaarungen forciert werden (Slaymaker et al. 2016). Davon ausgehend entwickeln Slaymaker et al. verschiedene SpCas9-Mutanten mit Alanin Substitutionen an 32 unterschiedlichen positiv geladenen Resten in der nt-groove. Neuere Forschungen zeigen, dass diese Modifikationen vermutlich weniger die Affinität für das Substrat verringern, sondern vielmehr den Übergang der Cas9-Struktur von einer inaktiven zu einer aktiven Konformation verzögern und diesen Prozess vulnerabler für Fehlpaarungen zwischen RNA und DNA gestalten (Chen et al. 2017; Vakulskas et al. 2018). Nach Prüfung an designierten On- und Off-Target-Sites in embryonischen Nierenzellen (HEK) profilierte sich das in dieser Arbeit verwendete eSpCas9(1.1) durch eine hohe On-Target-Aktivität bei erhöhter Spezifität (Slaymaker et al. 2016). Zusätzlich konnte eine genomweite Verringerung der Off-Target-Aktivität festgestellt werden, ohne dass neue Off-Target-Sites ermittelt wurden (Slaymaker et al. 2016). Die Ergebnisse ließen sich ebenfalls bei der Verwendung von auf 18 und 17 Basenpaare gekürzten Guide-RNAs sowie solchen mit eingefügten Einzel- und Doppel-Mismatches konsolidieren (Slaymaker et al. 2016). Es wird deutlich, dass die durch strukturelles Protein Engineering synthetisierte Endonuklease eSpCas9(1.1) dazu beitragen kann, die Spezifität von CRISPR/Cas9 im Rahmen eines Genome Editings zu verbessern.

#### **1.4.2 High-fidelity SpCas9**

Kleinstiver et al. stellen die Hypothese auf, dass der SpCas9-sgRNA-Komplex mehr Energie besitzt als für eine optimale Erkennung der gewünschten DNA-Target-Site ausreichend wäre. Der energetische Überschuss provoziert so eine Bindung und Schneideaktivität an Off-Target-Sites (Fu et al. 2014; Kleinstiver et al. 2016). Um die Off-Target-Aktivität durch eine Reduzierung nicht spezifischer Bindungen mit dem Zielgenom zu minimieren, unterbrechen sie über Wasserstoffbrücken vermittelte Kontakte von SpCas9-Resten zum Phosphat-Gerüst des Target-DNA-Strangs (Anders et

al. 2014; Kleinstiver et al. 2016; Nishimasu et al. 2014). Die Disruption der Kontakte N497A, R661A, Q695A und Q926A soll den energetischen Status des SpCas9-sgRNA-Komplexes so verändern, dass bei starker Komplementarität mit der Target-DNA eine solide On-Target-Aktivität beibehalten wird, während eine mit destabilisierenden Mismatches in Verbindung stehende Off-Target-Aktivität verhindert werden soll (Kleinstiver et al. 2016). Anzunehmen ist, dass die Auswirkungen der Alanin-Substitutionen vielschichtig sind und sich auf die Formation, Konformationsänderungen und die Off-Target-Erkennung des aktiven SpCas9-Komplexes auswirken (Kleinstiver et al. 2016). Insbesondere die Quadrupel-Mutante SpCas9-HF1 mit Alanin-Substitutionen an allen vier Kontakten kann eine stark verminderte Off-Target-Aktivität sowie eine Reduktion der Off-Target-Sites bei vergleichbarer On-Target-Aktivität vorweisen (Kleinstiver et al. 2016). SpCas9-HF1 scheint auch bei einfachen Repeat- und homopolymerischen Sequenzen im Vergleich zum WT-SpCas9 einen Vorteil zu besitzen (Kleinstiver et al. 2016). Eine Zielsetzung nicht repetitiver Target-Sequenzen erscheint jedoch vorteilhafter. Es ist hingegen festzuhalten, dass die Verwendung von gekürzten Guide-RNAs die On-Target-Schneideaktivität reduziert (Kleinstiver et al. 2016).

### **1.4.3 Sniper-SpCas9**

Lee et al. widmeten sich der Problematik einer geringen On-Target-Aktivität von strukturell modifizierten Endonukleasen an multiplen Target-Sites (Kim et al. 2017). Die Mutanten erzielen zwar eine optimierte Spezifität, weisen jedoch eine geringe Effizienz beim Einsatz in menschlichen Zellen auf (Lee et al. 2018). Der Entwicklungsprozess von Sniper-SpCas9 bedient sich der gerichteten Evolution mithilfe einer *E. coli*-basierten Selektionsmethode (Lee et al. 2018). SpCas9-Varianten wurden durch randomisierte Mutationen in der gesamten Cas9-Sequenz und durch DNA-Shuffling konstruiert. Daraufhin wurde ein positiver Selektionsdruck angewendet, der durch die Schneideaktivität an einer vollständig übereinstimmenden Target-Site bedingt ist, welche den Knockout eines letalen Gens bewirkt. Zusätzlich wurde ein negativer Selektionsdruck eingeführt. Dieser ist durch eine Off-Target-Site mit wenigen Basenmismatches charakterisiert, an der das Einfügen eines DSB den Zelltod auslösen würde. Die erfolgreiche Selektion und Isolation führte schließlich zur Entwicklung von Sniper-Cas9 (Lee et al. 2018). Sniper-Cas9 konnte im Verlauf mit WT-SpCas9 und mit anderen modifizierten Varianten verglichen werden. Die Besonderheiten liegen in einer Reduktion der Off-Target-Aktivität unter erhaltener On-Target-Aktivität auch bei der

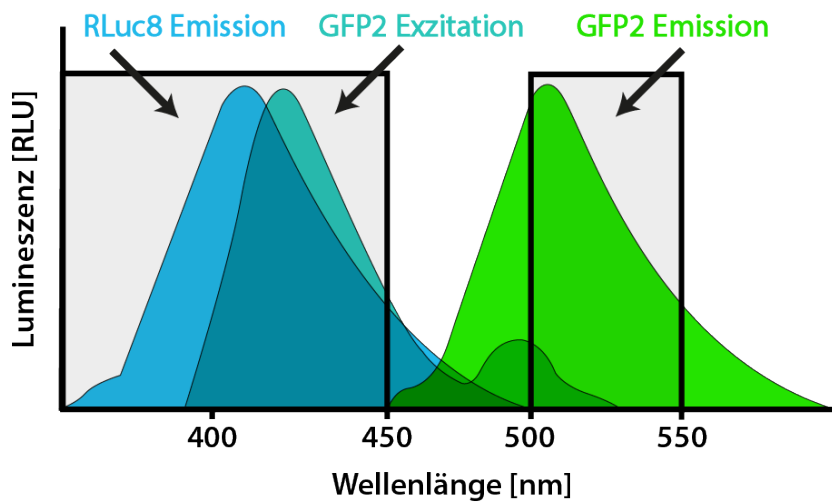
Verwendung von gekürzten sgRNAs und in einer Verbringung als RNP zum Einsatz im DNA-freien Genome Editing (Lee et al. 2018). Eine weitere synthetische Endonuklease, bei der das Verfahren der gerichteten Evolution genutzt wurde, ist evoCas9 mit Modifikationen in der REC3-Domäne (Casini et al. 2018).

## 1.5 BRET-Reporter-System

Die Methodik des Bioluminescence Resonance Energy Transfer–Based (BRET)-Reporter-Systems basiert auf dem Energietransfers des Donors RLuc8 (*Renilla* Luciferase 8) zu dem Akzeptor GFP2 (*green fluorescent protein 2*) und der Messung der resultierenden Emissionen in verschiedenen Lichtspektren (Xu et al. 1999; Wimmer et al. 2017). RLuc8 und GFP2 sind auf dem BRET-Reporter-Plasmid angelegt und werden gemeinsam als ein Protein exprimiert (Wimmer et al. 2021). Zwischen den beiden befindet sich die Klonierungsbox, in die verschiedene Target-Sequenzen integriert werden können. RLuc8 kann das Substrat Coelenterazine 400a katalytisch spalten und luminesziert bei einem Emissionsmaximum von  $\sim 410$  nm (Wimmer et al. 2021). Bei einer intakten Sequenz in der Klonierungsbox, also korrekter Expressierung des Proteins, erfolgt ein Energietransfer zum GFP2, welches daraufhin angeregt wird und bei einem Emissionsmaximum von  $\sim 506$  nm fluoresziert (Wimmer et al. 2021). Dies funktioniert, da die Luciferase als Energie-Donor in einem Lichtwellenbereich emittiert, der sich mit dem zur Anregung notwendigen Bereich des Energie-Akzeptors GFP2 überschneidet (Loening et al. 2007; Wimmer et al. 2021). Man spricht von einer spektralen Überlappung (s. Abbildung 1.6). Die Intensität der Anregung wird durch den Grad der spektralen Überlappung, die Dipolmomente, sowie den Abstand und die Lage von Donor und Akzeptor zueinander beeinflusst (Dacres et al. 2012; Wimmer et al. 2017). Anhand der Lichtemissionen von RLuc8 und GFP2 kann die BRET-Ratio bestimmt werden, die konzentrationsunabhängig ist (Dragulescu-Andrasi et al. 2011).

Wenn sowohl das BRET-Reporter-Plasmid als auch das Cas9/Guide-Plasmid kotransfiziert werden, kann es zur Induktion eines DSB durch die Endonuklease kommen. Dies geschieht, wenn die Guide-Sequenz von Cas9 vollständig oder ausreichend komplementär zur Target-Sequenz auf dem Reporter-Plasmid ist. Dabei liegt entweder eine korrekte Schnittstelle oder ein Off-Target vor. Die fehleranfälligen Reparaturmechanismen werden aktiviert und können Indels hervorrufen, welche wiederum zu einem Frameshift in der Sequenz oder zu verfrühten Stop-Codons führen

können (Wimmer et al. 2021). Das Protein kann nicht korrekt exprimiert werden und es kommt zu einer reduzierten GFP2-Aktivität (Wimmer et al. 2021). Der Abfall der Fluoreszenz kann mit dem BRET-Assay (s. Abschnitt 2.5.2) gemessen werden und resultiert in einer verringerten BRET-Ratio (s. Abbildung 2.7). Die für den Energietransfer notwendige korrekte Expression des Proteins wird genutzt, um die NHEJ/MMEJ-Aktivität und damit die Aktivität der Endonuklease zu bestimmen (Wimmer et al. 2021). So lassen sich Off-Targets im Rahmen einer Mismatch-Analyse quantifizieren (Wimmer et al. 2021).



Transmission (Filter: Blue) (<450 nm)

Transmission (Filter: Green) (500-550 nm)

Abbildung 1.6: Energietransfer durch spektrale Überlappung

Dargestellt sind das Emissionsspektrum von RLuc8 sowie die Emissions- und Exzitationsspektren von GFP2. Kennlich gemacht sind außerdem die durch die Filter voreingestellten Detektionsspektren im BRET-Assay. (Auf Grundlage von Wimmer et al. 2016) Für Erläuterungen s. Abschnitt 11.1.

## 1.6 Zielsetzung

Das Hauptziel dieser explorativen Thesis besteht darin, das leistungsfähige Instrument CRISPR/Cas9 für das zielgerichtete Einsetzen von DSBs im Rahmen des Genome Editing zu erforschen und zu erproben. Dabei liegt der Fokus auf einer Mismatch-Analyse der Modellsequenz In6T5, die aus dem murinen *CLN3*-Gen stammt (s. Abschnitt 1.2.2). Das übergeordnete Ziel ist es, die Off-Target-Aktivität sowie Toxizität zu untersuchen, um insbesondere zu beleuchten, wie bestimmte Mismatches und deren Position die Off-Target-Aktivität beeinflussen können. Insbesondere soll dabei evaluiert werden, ob sich aus den Ergebnissen Muster ableiten lassen.

Die Target-Sequenz In6T5 mit der zugehörigen Guide-Sequenz In6G5 wurden im Vorfeld durch die Forschungsgruppe als schneideaktive Elemente verifiziert und konnten deswegen für die Experimente ausgewählt werden. Von der Target-Sequenz als Referenz ausgehend kann eine Gruppe von modifizierten Oligonukleotiden entwickelt werden. Diese weisen jeweils einen Basenaustausch im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz (WT-Sequenz) auf und können nach einer erfolgreichen Hybridisierung in die entsprechenden Reporter-Plasmide eingebettet werden. Anschließend werden diese Plasmide in *E. coli* transformiert und im weiteren Verlauf in HEK293-T-Zellen transfiziert. Die Mismatch-Analyse erfolgt dann mithilfe des von der Arbeitsgruppe um Knut Stieger und Tobias Wimmer entwickelten BRET-Reporters (Wimmer et al. 2021). Zusätzlich wird das Verfahren durch eine visuelle Überprüfung mittels Fluoreszenzmikroskopie unterstützt.

Die Wahl der Untersuchung von Einzelpunktmutationen wurde aufgrund der Tatsache einer besonders schwierigen Diskrimination und ihrer herausragenden klinischen Relevanz getroffen, da Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) mit 58 % einen erheblichen Teil der krankheitsassoziierten genetischen Variationen beim Menschen darstellen (Rabinowitz und Offen 2021; Rees und Liu 2018).

Ergänzt wird die Arbeit mit einer Untersuchung von eSpCas9(1.1) als Repräsentant der modifizierten Cas9-Endonukleasen mit verbesserter Spezifität. Dies ermöglicht es, Aussagen über die potenzielle Verbesserung von CRISPR/Cas9 zu treffen und eine Validierung durch das BRET-Reportersystem durchzuführen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräteliste

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
Autoklav	DX-65	Systec, <i>Linden</i>
Bunsenbrenner	Fireboy	Integra Biosciences, <i>Biebertal</i>
Dest. H <sub>2</sub> O Anlage	arium 611DI	Sartorius, <i>Göttingen</i>
Elektroporationsgerät	Multiporator	Eppendorf, <i>Hamburg</i>
Elektroporationsküvette	GenePulser/MicroPulser 0.1cm Gap	Bio-Rad, <i>München</i>
Flockeneisbereiter	AF 80	Scotsman, <i>Berlin</i>
Fluoreszenzmikroskop	BioZero	Keyence, <i>Neu-Isenburg</i>
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr Premium	Liebherr, <i>Biberach an der Riß</i>
Gefrierschrank (-80 °C)	Hera Freeze	Thermo Fisher Scientific, <i>Dreieich</i>
Gelelektrophoresekammer	Biometra Compact XS/S und M	Biometra, <i>Göttingen</i>
Inkubator (eukaryotische Zellen)	C150	Binder, <i>Tuttlingen</i>
Inkubator (prokaryotische Zellen)	BD115	Binder, <i>Tuttlingen</i>
Kryolagerungsbehälter (Stickstoff, -196 °C)	Thermolyne Locator Plus 6	Thermolyne, <i>Pfullingen</i>

Kühlschrank (+4 °C)	KT3L17	Bosch, <i>Gerlingen</i>
Kühlschrank (+4 °C)	TP 1760	Liebherr, <i>Biberach an der Riß</i>
Laborschüttler mit Inkubationssystem	Certomat H / MO II	Sartorius, <i>Göttingen</i>
Magnetischer Heizrührer	IKA RCT classic	IKA, <i>Staufen</i>
Mikroskop	IT400	VWR International, <i>Darmstadt</i>
Mikrowelle		Siemens, <i>München</i>
Multimode Platerreader	Tecan Infinite M1000Pro	Tecan, <i>Crailsheim</i>
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, <i>Hamburg</i>
Pipette	0,5-10 µl/ 2-20 µl/ 20-200µl/ 100-1000 µl/ 0,5-5,0 ml	Brand, <i>Wertheim</i>
Pipette	Eppendorf Reference 0,5-10 µl/ 2-20 µl/ 10-100 µl/ 100-1000 µl	Eppendorf, <i>Hamburg</i>
Pipette	Eppendorf Research Plus 20-200 µl/ 100-1000 µl	Eppendorf, <i>Hamburg</i>
Pipettierhilfe	Pipetboy acu 2	Integra Biosciences, <i>Biebertal</i>
Power Supply (Elektrophorese)	PS305T	Whatman-Biometra, <i>Göttingen</i>
Sicherheitswerkbank	MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, <i>Dreieich</i>
Spülmaschine	Professional G7883	Miele, <i>Gütersloh</i>
Thermoblock	Biometra TB2	Biometra, <i>Göttingen</i>
UV-Transilluminator	BioDoc Analyze	Biometra, <i>Göttingen</i>

Vortexer	Digital Vortex Mixer	VWR International, <i>Darmstadt</i>
Vortexer	Q04	VWR International, <i>Darmstadt</i>
Vortexer	uniTexer1	LLG Labware, <i>Meckenheim</i>
Waage	Pioneer	Ohaus, <i>Naenikon</i>
Wasseraufbereitungssystem	arium 611 DI	Sartorius, <i>Göttingen</i>
Wasserbad	Julabo TW12	Julabo, <i>Seelbach</i>
Zentrifuge	Mikro200	Hettich, <i>Tuttlingen</i>
Zentrifuge	MiniStar silverline	VWR International, <i>Darmstadt</i>
Zentrifuge	1-15 PK	Sigma, <i>Osterode am Harz</i>
Zentrifuge	4K15	Sigma, <i>Osterode am Harz</i>

## 2.1.2 Kits

Tabelle 2.2: Verwendete Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
NucleoSpin Plasmid QuickPure Kit (Mini-Präparation)	Macherey-Nagel, <i>Düren</i>
QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Maxi-Präparation)	Qiagen, <i>Hilden</i>

### 2.1.3 Software

Tabelle 2.3: Verwendete Software

<b>Programm</b>	<b>Hersteller, Ort</b>	<b>Verwendung</b>
Adobe Acrobat, Adobe Illustrator	Adobe Inc., <i>München</i>	Literaturbearbeitung, Abbildungen der Einleitung
BioDoc Analyzer Software	Thermo Fisher Scientific, <i>Dreieich</i>	Auswertung: Gelelektrophorese
BZ Analyzer	Keyence, <i>Neu-Isenburg</i>	Analyse Fluoreszenzbilder, Erstellung der Overlays
BZ-8100 Observation Application v.1.10 (BZ Viewer)	Keyence, <i>Neu-Isenburg</i>	Bedienung: Fluoreszenzmikroskop BioZero
Citavi 6	Swiss Academic Software GmbH, <i>Wädenswil, Schweiz</i>	Zitierung
FinchTV	Geospiza Inc., <i>Seattle, USA</i>	Auswertung: DNA-Sequenzierung
GraphPad Prism 10	GraphPad Software, Inc., <i>Boston, USA</i>	Statistische Auswertung, Abbildungen der Ergebnisse
icontrol v.1.11	Tecan, <i>Crailsheim</i>	Bedienung: Tecan Infinite M1000Pro Platereader
Microsoft Office 365 (Excel, PowerPoint, Word)	Microsoft Corporation, <i>München-Schwabing</i>	Textbearbeitung, Bildbearbeitung, Datenarbeit und Auswertung: BRET-Assay
SigmaPlot v.12.0	Systat, <i>Düsseldorf</i>	Statistische Auswertung, Abbildungen der Ergebnisse
SnapGene	Dotmatics, <i>Boston, USA</i>	Plasmidvisualisierung

## 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.4: Verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
Bakterienkulturplatte	Petri Dish 100 x 15	Greiner Bio-One, <i>Frickenhausen</i>
Erlenmeyerkolben	100 ml/ 300 ml/ 500 ml	Schott Duran/ DWK Life Sciences, <i>Wertheim</i>
Filteraufsatz	Rapid-Filtermax	TPP, <i>Trasadingen</i>
Filterpipettenspitzen	10 µl/ 100 µl /200 µl/ 1250 µl	Nerbe plus, <i>Winsen</i>
Kryoröhrchen	CryoPure 1,6 ml	Sarstedt, <i>Nümbrecht</i>
Messpipetten (Glas)	5 ml/ 10 ml/ 20 ml	Hirschmann, <i>Eberstadt</i>
Messzylinder	100 ml	Schott Duran/ DWK Life Sciences , <i>Wertheim</i>
Paraffin-Verschlussfilm	Parafilm	Bemis, <i>Neeah</i>
PCR-Tubes	0,2 ml	Biozym, <i>Hess. Oldendorf</i>
Pipettenspitzen	1-10 µl	Biozym, <i>Hess. Oldendorf</i>
Pipettenspitzen	1-10 µl	Brand, <i>Wertheim</i>
Pipettenspitzen	2-200 µl	Sarstedt, <i>Nümbrecht</i>
Pipettenspitzen	100-1000 µl	Sarstedt, <i>Nümbrecht</i>
Pipettenspitzen	0,5-5 ml	Brand, <i>Wertheim</i>
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Sarstedt, <i>Nümbrecht</i>
Reaktionsgefäße	2,0 ml	Sarstedt, <i>Nümbrecht</i>
Zellkulturplatte	Cellstar Cell Culture Dishes 100 x 20 mm	Greiner Bio-One, <i>Frickenhausen</i>
Zellschaber	Cell Scraper 16 cm	Sarstedt, <i>Nümbrecht</i>

Zentrifugenröhrchen	15 ml Falcon	Greiner Bio-One, <i>Frickenhausen</i>
Zentrifugenröhrchen	50 ml Falcon	Greiner Bio-One, <i>Frickenhausen</i>
6-Well Platte	Cellstar Cell Culture Multiwell	Greiner Bio-One, <i>Frickenhausen</i>
24-Well Platte	Cellstar Cell Culture Multiwell	Greiner Bio-One, <i>Frickenhausen</i>
96-Well Platte	Costar 96 Flat White	Corning, <i>Kaiserslautern</i>

### 2.1.5 Chemikalien

Tabelle 2.5: Verwendete Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
Agar	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, <i>Darmstadt</i>
Agarose LE	Genaxxon Bioscience, <i>Ulm</i>
Borsäure	Merck, <i>Darmstadt</i>
Coelenterazine 400a	Nanolight Technology, <i>Pinetop</i>
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Roth, <i>Karlsruhe</i>
DNA Stain Clear G	Serva Electrophoresis, <i>Heidelberg</i>
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Ethanol	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Fetales Kälberserum (FKS)	Anprotec, <i>Bruckberg</i>
GeneRuler 100 bp DNA Plus Ladder	Life Technologies/Thermo Fisher, <i>Darmstadt</i>
Glucose	Merck, <i>Darmstadt</i>
Glycerin	Merck, <i>Darmstadt</i>

Hefeextrakt	Roth, <i>Karlsruhe</i>
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Isopropanol	Sigma-Aldrich, <i>Darmstadt</i>
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, <i>Darmstadt</i>
L-Glutamin	Anprotec, <i>Bruckberg</i>
Luria Broth Base (LB)	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, <i>Darmstadt</i>
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) (25mM)	Promega, <i>Walldorf</i>
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) x 7 H <sub>2</sub> O	Merck, <i>Darmstadt</i>
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck, <i>Darmstadt</i>
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, <i>Darmstadt</i>
PEI (Polyethylenimin)	Polysciences Europe, <i>Hirschberg an der Bergstraße</i>
Stickstoff (flüssig)	Linde, <i>Pullach</i>
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth, <i>Karlsruhe</i>
Trypton	Roth, <i>Karlsruhe</i>

### 2.1.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.6: Puffer aus eigener Herstellung

#### **PBS (10x):**

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

**PEI-Mix:**

PEI	0,1 g/l
NaCl	150 mM

**TBE (10x):**

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

Tabelle 2.7: Erworbene Puffer

<b>Puffer</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
10x CutSmart-Puffer	New England Biosciences, <i>Frankfurt a. M.</i>
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, <i>Darmstadt</i>
HF-Puffer (5x)	Thermo Fisher Scientific, <i>Darmstadt</i>
Ligase-Puffer (10x)	New England Biosciences, <i>Frankfurt a. M.</i>

**2.1.7 Antibiotika**

Tabelle 2.8: Verwendete Antibiotika

<b>Bezeichnung</b>	<b>Stockkonzentration</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml	Sigma-Aldrich, <i>Darmstadt</i>
Penicillin- Streptomycin	Pen.: 10000 U/ml Strep.: 10 mg/ml	Pen.: 200 U/ml Strep.: 200 µg/µl	Anprotec, <i>Bruckberg</i>
Tetracyclin	12,5 µg/µl	12,5 µg/µl	Sigma-Aldrich, <i>Darmstadt</i>

## 2.1.8 Kulturmedien für bakterielle und eukaryotische Kulturen

*E. coli*-Kulturen wurden entweder in LB-Medium oder auf LB-Agar angezüchtet. LB-Medien wurden nach dem Ansetzen stets autoklaviert. Zur Durchführung der Transformationen wurde steriles SOC-Medium (Super Optimal Broth mit Katabolitrepession) verwendet.

Tabelle 2.9: Medien für Bakterien

### LB-Medium:

Luria Broth Base	25,0 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

### LB-Ampicillin-Platten:

LB-Medium	500 ml
Agar	1,5 % (w/v)
Ampicilin	0,1 %

### SOC-Medium:

Trypton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glukose	20 mM
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

Das Nährmedium DMEM<sup>+++</sup> (Dulbeccos Modified Eagle Medium) wurde zur Kultivierung von HEK293-T-Zellen verwendet.

Tabelle 2.10: Medium für Zellkulturen

### DMEM<sup>+++</sup>:

Penicillin/Streptomycin	1 % (v/v)
FKS	10 % (v/v)
L-Glutamin	4 mM
DMEM	ad 500 ml

### 2.1.9 Bakterienstämme und Eukaryotische Zelllinien

Zur Klonierung wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tetr)] verwendet, mit welchem für die Transformation elektrokompente Zellen hergestellt wurden.

Für die Transfektion wurden immortalisierte Human Embryonic Kidney Cells (HEK293-T) (ATCC: CRL-3216) genutzt. Bei den von Graham et al. erstbeschriebenen HEK293-Zellen handelt es sich um embryonale Nierenzellen, in die DNA-Fragmente des Adenovirus Typ 5 transfiziert wurden (Graham et al. 1977). Die hier zum Einsatz kommenden HEK293-T-Zellen sind außerdem mit dem SV40 large T-Antigen modifiziert und leicht transfizierbar sowie aufgrund ihrer Eigenschaften sinnvoll für die Arbeit anzuwenden.

### 2.1.10 Enzyme

Die alphabetisch aufgeführten Enzyme wurden in Kombination mit den von den Herstellern zur Verfügung gestellten Puffern verwendet und nach den vorgeschriebenen Angaben genutzt. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind mit Pfeilen kenntlich gemacht.

Tabelle 2.11: Verwendete Restriktionsenzyme

Enzym	Erkennungssequenz	Hersteller, Ort
AvrII	5'...C↓CTAGG...3' 3'...GGATC↑C...5'	New England Biolabs, <i>Frankfurt a. M.</i>
BbsI-HF	5'...GAAGAC(N) <sub>2</sub> ↓...3' 3'...CTTCTG(N) <sub>6</sub> ↑...5'	New England Biolabs, <i>Frankfurt a. M.</i>
BsiWI-HF	5'...C↓GTACG...3' 3'...GCATG↑C...5'	New England Biolabs, <i>Frankfurt a. M.</i>

Tabelle 2.12: Weitere Enzyme

Enzym	Hersteller, Ort
Accutase	Anprotec, Bruckberg
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a. M.

### 2.1.11 Plasmide

Tabelle 2.13: Plasmide

Plasmid	Hersteller
px459 (pU6-BbsI/BbsI-CBA-Cas9)	Bereitgestellt durch Feng Zhang, addgene # 62988 (Ran et al. 2013b)
BRET-Reporter: pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2	Bereitgestellt durch Tobias Wimmer aus eigener Herstellung (Wimmer et al. 2021)
px459 (In6G5)	Eigene Herstellung aus addgene #62988
px459 (ARTG1)	Eigene Herstellung aus addgene #62988
BRET-Reporter (In6T5) WT	Eigene Herstellung
BRET-Reporter (T MM 1-60)	Eigene Herstellung
BRET-Reporter (ARTT1)	Eigene Herstellung
pCMVRLuc8	RLuc8 bereitgestellt durch Sanjiv Sam Gambhir, addgene # 87121 (Loening et al. 2006)
eSpCas9(1.1)	Bereitgestellt durch Feng Zhang, addgene # 71814 (Slaymaker et al. 2016)
eSpCas9(1.1) (In6G5)	Eigene Herstellung aus addgene # 71814
eSpCas9(1.1) (ARTG1)	Eigene Herstellung aus addgene # 71814

Vektorkarten wurden mithilfe von SnapGene generiert.

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

Das px459-Plasmid wird verwendet, um WT-SpCas9 und die Guide-RNA zu klonieren. Die Expression von WT-SpCas9 steht unter der Kontrolle eines CBA-Promotors (chicken  $\beta$ -actin). Ein Guide-RNA-Gerüst (gRNA scaffold) ermöglicht die Integration von Guide-Sequenzen durch BbsI-Schnittstellen. Die integrierte Guide-Sequenz wird durch einen U6-Promoter reguliert. Das Plasmid besitzt eine Ampicillin-Resistenz zur bakteriellen Kultivierung.



Abbildung 2.1: Vektorkarte px459 (pU6-BbsI/BbsI-CBA-Cas9)

## pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2

Das Plasmid dient zur Klonierung des BRET-Reporters nach Integration verschiedener Target-Sequenzen. RLuc8 und GFP2 sind auf dem Plasmid unter der Kontrolle eines CMV-Promoters (Cytomegalievirus) kodiert. Zwischen ihnen liegt die Klonierungsbox. Durch AvrII- und BsiWI-Schnittstellen wird die Integration der Target-Sequenzen ermöglicht. Zur bakteriellen Kultivierung besitzt das Plasmid ein Ampicillin-Resistenzgen.

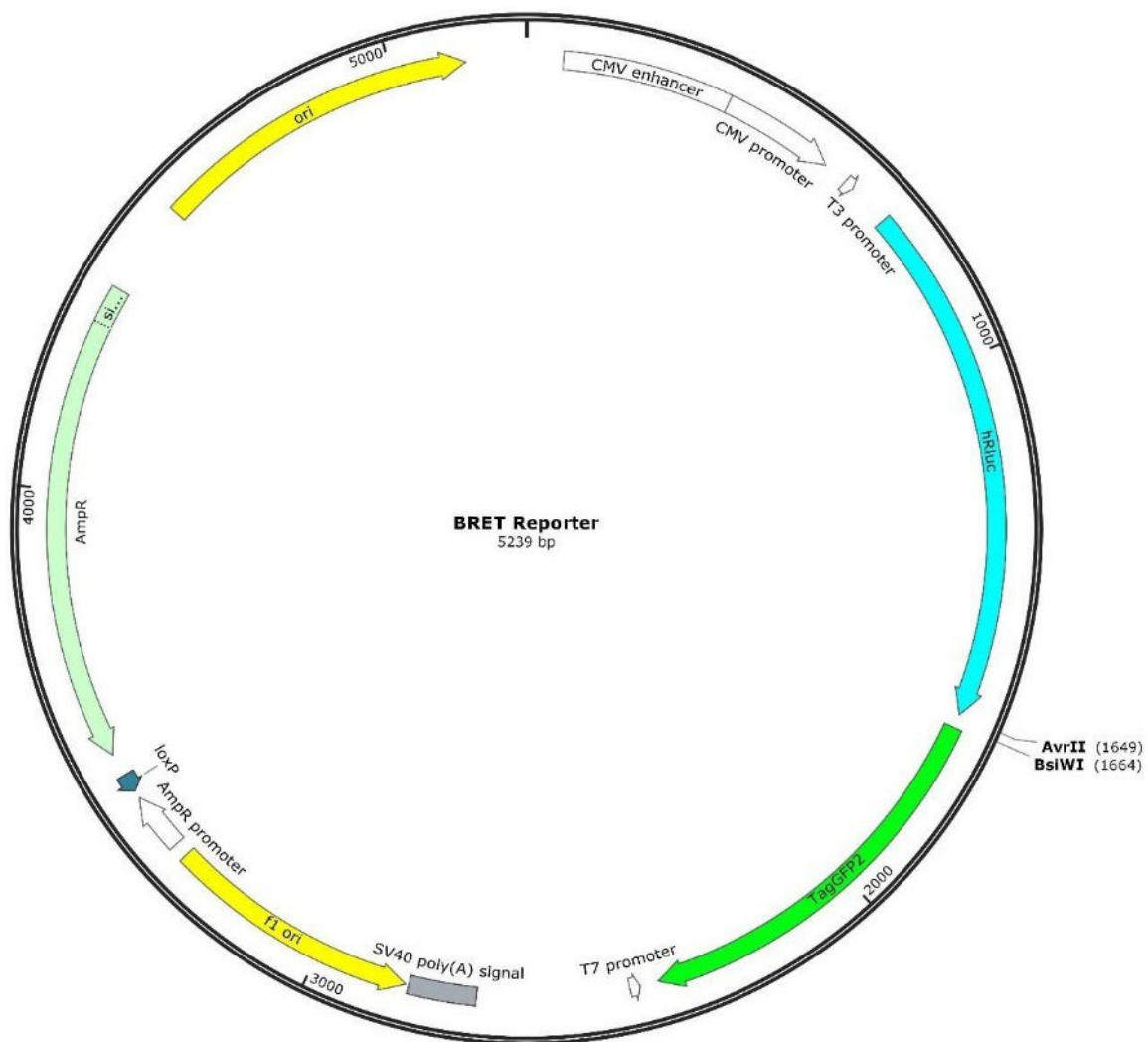


Abbildung 2.2: Vektorkarte des BRET-Reporter-Plasmids

## eSpCas9(1.1)

Das Plasmid enthält die Sequenz für eSpCas9(1.1), welche durch einen CBA-Promoter reguliert wird. Ein gRNA scaffold mit BbsI-Schnittstellen ermöglicht die Insertion einer Guide-Sequenz. Diese steht unter der Kontrolle eines U6-Promoters. Zur bakteriellen Kultivierung ist eine Ampicillin-Resistenz kodiert.



Abbildung 2.3: Vektorkarte eSpCas9(1.1)

## pCMVRLuc8

Auf dem Plasmid ist eine Sequenz angelegt, die für RLuc8 kodiert. Diese wird durch einen CMV-Promoter reguliert. Es liegt ein Ampicillin-Resistenzgen zur bakteriellen Kultivierung vor.

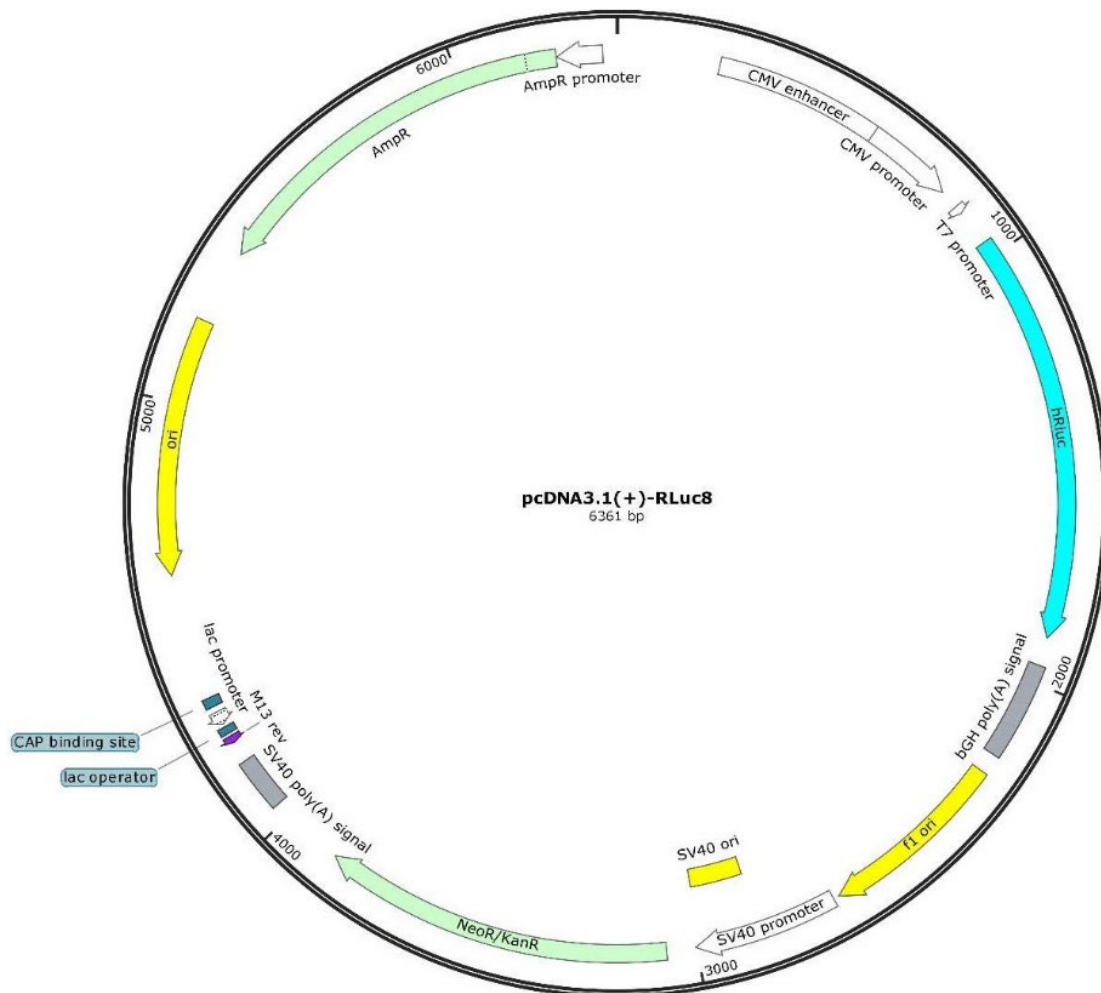


Abbildung 2.4: Vektorkarte pCMVRLuc8

## 2.1.12 Oligonukleotide und Primer

Die für die Off-Target-Analyse notwendigen Oligonukleotide und Primer wurden je nach Zielsetzung konstruiert, extern bei der Firma Metabion (Planegg) synthetisiert und eigenständig hybridisiert. Oligonukleotide, die für die Mismatch-Analyse mit WT-SpCas9 und eSpCas9(1.1) verwendet wurden, sind in Tabelle 2.14 aufgeführt. Die Benennung der Sequenzen erfolgte nach der Mutation des reverse-Oligonukleotids (r), welches den Target-Strang darstellt und entscheidend für die Verbindung zur Guide-RNA ist. Die Positionen der Targetmutationen wurden nach der PAM-Sequenz, welche auf dem forward-Oligonukleotid (f) respektive dem Non-Target-Strang liegt, in 5' Richtung aufsteigend von 1-20 durchnummeriert. Oligonukleotide, welche zur erweiterten Untersuchung von eSpCas9(1.1) genutzt wurden, sind in Tabelle 2.15 aufgelistet. Die Sequenzierungsprimer sind in Tabelle 2.16 angegeben.

In den Tabellen wurden Überhänge in **Blau** und die verschiedenen Punktmutationen in **Rot** kenntlich gemacht.

Tabelle 2.14: Verwendete Oligonukleotide für Guide und Targets der In6G5/In6T5-Mismatch-Analyse

Kassette	Oligonukleotid	Sequenz
WT-Guide CLN3 In6G5	WT-Guide-f	5'-cacc TGC TCT GAT GTG GTT CCT CG-3'
	WT-Guide-r	3'-ACG AGA CTA CAC CAA GGA GC caaa-5'
WT-Target CLN3 In6T5	WT-Target-f	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	WT-Target-r	3'-c ACG AGA CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 1	Pos20A-Tf	5'-ctagg AGC TCT GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos20A-Tr	3'-c TCG AGA CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 2	Pos20A-Cf	5'-ctagg GGC TCT GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos20A-Cr	3'-c CCG AGA CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 3	Pos20A-Gf	5'-ctagg CGC TCT GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos20A-Gr	3'-c GCG AGA CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 4	Pos19C-Af	5'-ctagg TTC TCT GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos19C-Ar	3'-c AAG AGA CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 5	Pos19C-Tf	5'-ctagg TAC TCT GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos19C-Tr	3'-c ATG AGA CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'

Mismatch 6	Pos19C-Gf	5'-ctagg TCC TCT GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos19C-Gr	3'-c AGG AGA CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 7	Pos18G-Af	5'-ctagg TGT TCT GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos18G-Ar	3'-c ACA AGA CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 8	Pos18G-Tf	5'-ctagg TGA TCT GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos18G-Tr	3'-c ACT AGA CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 9	Pos18G-Cf	5'-ctagg TGG TCT GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos18G-Cr	3'-c ACC AGA CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 10	Pos17A-Tf	5'-ctagg TGC ACT GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos17A-Tr	3'-c ACG TGA CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 11	Pos17A-Cf	5'-ctagg TGC GCT GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos17A-Cr	3'-c ACG CGA CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 12	Pos17A-Gf	5'-ctagg TGC CCT GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos17A-Gr	3'-c ACG GGA CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 13	Pos16G-Af	5'-ctagg TGC TTT GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos16G-Ar	3'-c ACG AAA CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 14	Pos16G-Tf	5'-ctagg TGC TAT GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos16G-Tr	3'-c ACG ATA CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 15	Pos16G-Cf	5'-ctagg TGC TGT GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos16G-Cr	3'-c ACG ACA CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 16	Pos15A-Tf	5'-ctagg TGC TCA GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos15A-Tr	3'-c ACG AGT CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 17	Pos15A-Cf	5'-ctagg TGC TCG GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos15A-Cr	3'-c ACG AGC CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 18	Pos15A-Gf	5'-ctagg TGC TCC GAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos15A-Gr	3'-c ACG AGG CTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 19	Pos14C-Af	5'-ctagg TGC TCT TAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos14C-Ar	3'-c ACG AGA ATA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'

Mismatch 20	Pos14C-Tf	5'-ctagg TGC TCT AAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos14C-Tr	3'-c ACG AGA TTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 21	Pos14C-Gf	5'-ctagg TGC TCT CAT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos14C-Gr	3'-c ACG AGA GTA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 22	Pos13T-Af	5'-ctagg TGC TCT GTT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos13T-Ar	3'-c ACG AGA CAA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 23	Pos13T-Cf	5'-ctagg TGC TCT GGT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos13T-Cr	3'-c ACG AGA CCA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 24	Pos13T-Gf	5'-ctagg TGC TCT GCT GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos13T-Gr	3'-c ACG AGA CGA CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 25	Pos12A-Tf	5'-ctagg TGC TCT GAA GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos12A-Tr	3'-c ACG AGA CTT CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 26	Pos12A-Cf	5'-ctagg TGC TCT GAG GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos12A-Cr	3'-c ACG AGA CTC CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 27	Pos12A-Gf	5'-ctagg TGC TCT GAC GTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos12A-Gr	3'-c ACG AGA CTG CAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 28	Pos11C-Af	5'-ctagg TGC TCT GAT TTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos11C-Ar	3'-c ACG AGA CTA AAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 29	Pos11C-Tf	5'-ctagg TGC TCT GAT ATG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos11C-Tr	3'-c ACG AGA CTA TAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 30	Pos11C-Gf	5'-ctagg TGC TCT GAT CTG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos11C-Gr	3'-c ACG AGA CTA GAC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 31	Pos10A-Tf	5'-ctagg TGC TCT GAT GAG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos10A-Tr	3'-c ACG AGA CTA CTC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 32	Pos10A-Cf	5'-ctagg TGC TCT GAT GGG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos10A-Cr	3'-c ACG AGA CTA CCC CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 33	Pos10A-Gf	5'-ctagg TGC TCT GAT GCG GTT CCT CG GGG-3'
	Pos10A-Gr	3'-c ACG AGA CTA CGC CAA GGA GC CCC catg-5'

Mismatch 34	Pos9C-Af	5'-ctagg TGC TCT GAT GTT GTT CCT CG GGG-3'
	Pos9C-Ar	3'-c ACG AGA CTA CAA CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 35	Pos9C-Tf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTA GTT CCT CG GGG-3'
	Pos9C-Tr	3'-c ACG AGA CTA CAT CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 36	Pos9C-Gf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTC GTT CCT CG GGG-3'
	Pos9C-Gr	3'-c ACG AGA CTA CAG CAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 37	Pos8C-Af	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG TTT CCT CG GGG-3'
	Pos8C-Ar	3'-c ACG AGA CTA CAC AAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 38	Pos8C-Tf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG ATT CCT CG GGG-3'
	Pos8C-Tr	3'-c ACG AGA CTA CAC TAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 39	Pos8C-Gf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG CTT CCT CG GGG-3'
	Pos8C-Gr	3'-c ACG AGA CTA CAC GAA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 40	Pos7A-Tf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GAT CCT CG GGG-3'
	Pos7A-Tr	3'-c ACG AGA CTA CAC CTA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 41	Pos7A-Cf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GGT CCT CG GGG-3'
	Pos7A-Cr	3'-c ACG AGA CTA CAC CCA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 42	Pos7A-Gf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GCT CCT CG GGG-3'
	Pos7A-Gr	3'-c ACG AGA CTA CAC CGA GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 43	Pos6A-Tf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTA CCT CG GGG-3'
	Pos6A-Tr	3'-c ACG AGA CTA CAC CAT GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 44	Pos6A-Cf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTG CCT CG GGG-3'
	Pos6A-Cr	3'-c ACG AGA CTA CAC CAC GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 45	Pos6A-Gf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTC CCT CG GGG-3'
	Pos6A-Gr	3'-c ACG AGA CTA CAC CAG GGA GC CCC catg-5'
Mismatch 46	Pos5G-Af	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTT TCT CG GGG-3'
	Pos5G-Ar	3'-c ACG AGA CTA CAC CAA AGA GC CCC catg-5'
Mismatch 47	Pos5G-Tf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTT ACT CG GGG-3'
	Pos5G-Tr	3'-c ACG AGA CTA CAC CAA TGA GC CCC catg-5'

Mismatch 48	Pos5G-Cf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTT GCT CG GGG-3'
	Pos5G-Cr	3'-c ACG AGA CTA CAC CAA CGA GC CCC catg-5'
Mismatch 49	Pos4G-Af	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTT CTT CG GGG-3'
	Pos4G-Ar	3'-c ACG AGA CTA CAC CAA GAA GC CCC catg-5'
Mismatch 50	Pos4G-Tf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTT CAT CG GGG-3'
	Pos4G-Tr	3'-c ACG AGA CTA CAC CAA GTA GC CCC catg-5'
Mismatch 51	Pos4G-Cf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTT CGT CG GGG-3'
	Pos4G-Cr	3'-c ACG AGA CTA CAC CAA GCA GC CCC catg-5'
Mismatch 52	Pos3A-Tf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTT CCA CG GGG-3'
	Pos3A-Tr	3'-c ACG AGA CTA CAC CAA GGT GC CCC catg-5'
Mismatch 53	Pos3A-Cf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTT CCG CG GGG-3'
	Pos3A-Cr	3'-c ACG AGA CTA CAC CAA GGC GC CCC catg-5'
Mismatch 54	Pos3A-Gf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTT CCC CG GGG-3'
	Pos3A-Gr	3'-c ACG AGA CTA CAC CAA GGG GC CCC catg-5'
Mismatch 55	Pos2G-Af	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTT CCT TG GGG-3'
	Pos2G-Ar	3'-c ACG AGA CTA CAC CAA GGA AC CCC catg-5'
Mismatch 56	Pos2G-Tf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTT CCT AG GGG-3'
	Pos2G-Tr	3'-c ACG AGA CTA CAC CAA GGA TC CCC catg-5'
Mismatch 57	Pos2G-Cf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTT CCT GG GGG-3'
	Pos2G-Cr	3'-c ACG AGA CTA CAC CAA GGA CC CCC catg-5'
Mismatch 58	Pos1C-Af	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTT CCT CT GGG-3'
	Pos1C-Ar	3'-c ACG AGA CTA CAC CAA GGA GA CCC catg-5'
Mismatch 59	Pos1C-Tf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTT CCT CA GGG-3'
	Pos1C-Tr	3'-c ACG AGA CTA CAC CAA GGA GT CCC catg-5'
Mismatch 60	Pos1C-Gf	5'-ctagg TGC TCT GAT GTG GTT CCT CC GGG-3'
	Pos1C-Gr	3'-c ACG AGA CTA CAC CAA GGA GG CCC catg-5'

Tabelle 2.15: Oligonukleotide für Guide- und Target-Sequenz des erweiterten eSpCas9(1.1)-Experiments

Kassette	Oligonukleotid	Sequenz
Guide ARTG1	ART G1-f	5'-cacc GGA GTC CGC ACC ACG TCG TG-3'
	ART G1-r	3'-CCT CAG GCG TGG TGC AGC AC caaa-5'
Target ARTT1	ART T1-f	5'-ctagg GGA GTC CGC ACC ACG TCG TG TGG-3'
	ART T1-r	3'-c CCT CAG GCG TGG TGC AGC ACA CC catg-5'

Tabelle 2.16: Verwendete Sequenzierungsprimer

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
SeqKas #4041	GAC TAT CAT ATG CTT ACC GT
Wolle610 #3056	AGC CCG ACG TCG TCC AGA TTG

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Restriktionsverdau

Für die Restriktionsklonierung war es notwendig, die Guide- bzw. Target-Sequenzen als Insert in zuvor hydrolysierte Plasmide zu integrieren. Die verwendeten Plasmide wurden mit Restriktionsenzymen, die palindromische Erkennungssequenzen besitzen, verdaut (s. Abschnitt 2.1.10). Dabei entstehen durch Hydrolyse enzymespezifische Schnittstellen. In dieser Arbeit wurden Typ II Restriktionsenzyme dazu verwendet, die WT-Guide-Sequenz In6G5 und die Sequenz ARTG1 in die Guide/SpCas9-Plasmide px459 (pU6-BbsI/BbsI-CBA-Cas9) und eSpCas9(1.1) sowie die Target-Sequenzen in das BRET-Reporter-Plasmid pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 zu integrieren (s. Abschnitte 2.1.11 u. 2.1.12). Alle Restriktionsenzyme wurden nach Angaben des Herstellers verwendet.

Zur Durchführung wurden 1000 bzw. 2000 ng des gewünschten Plasmids in ein Volumen in  $\mu\text{l}$  umgerechnet. Dies wurde zu doppelt destilliertem Wasser ( $\text{ddH}_2\text{O}$ ) hinzugegeben, sodass gemeinsam mit allen Komponenten ein Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  vorlag. Zusätzlich wurden 2  $\mu\text{l}$  10x CutSmart Puffer und die gewünschten Restriktionsenzyme eingebracht. Die Ansätze wurden über Nacht in PCR-Tubes bei 37 °C im Wasserbad

inkubiert (s. Abschnitt 2.1.1). Um den Verdau abubrechen und die Restriktionsenzyme zu denaturieren, wurden sie für 20 min bei 65 °C im Thermoblock behandelt (s. Abschnitt 2.1.1). Anschließend erfolgte die Lagerung im Gefrierschrank bei -20 °C.

Tabelle 2.17: Restriktionsverdau pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2

Plasmid-DNA (2000ng)	x µl
Restriktionspuffer 10x CutSmart	2 µl
Restriktionsenzym Avr II	1,5 µl
Restriktionsenzym BsiWI-HF	1,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl
	<hr/> 20 µl

Tabelle 2.18: Restriktionsverdau px459 und eSpCas(1.1)

Plasmid-DNA (1000 ng)	x µl
Restriktionspuffer 10x CutSmart	2 µl
Restriktionsenzym BbsI-HF	1,5 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl
	<hr/> 20 µl

Tabelle 2.19: Kontrolle Gelelektrophorese

Plasmid-DNA (2000ng)	x µl
Restriktionspuffer 10x CutSmart	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl
	<hr/> 20 µl

## 2.2.2 Agarosegelelektrophorese

Der Erfolg des Restriktionsverdau wurde durch die Elektrophorese auf Agarosegel überprüft, in der die Plasmide anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Hierbei wurde einerseits ein Verdau mit Plasmid und passenden Restriktionsenzymen und andererseits eine Kontrolle ohne Restriktionsenzyme verwendet (s. Abschnitt 2.2.1). Zur Herstellung des Gels wurde 1x TBE-Puffer (s. Abschnitt 2.1.6) mit Agarose LE Pulver (s. Abschnitt 2.1.5) vermischt und dabei ein Agaroseanteil von 1 % erzeugt. Der Ansatz wurde mit einer Mikrowelle bei 600 W für 2 min aufgekocht. Der Gewichtsverlust durch Verdampfen wurde mit ddH<sub>2</sub>O ausgeglichen. Nach dem Abkühlen wurde 5 µl DNA Stain Clear G hinzugefügt (s. Abschnitt 2.1.5). Der Ansatz wurde luftblasenfrei in eine Form gegossen, in die ein Kamm eingesetzt wurde. Dieser konnte nach 30 min entfernt werden. Das ausgehärtete Gel wurde in die Gelelektrophoresekammer übertragen (s. Abschnitt 2.1.1). Als Laufpuffer wurde 1x TBE-Puffer verwendet. 10 µl der Proben wurden mit 4 µl 6x DNA Loading Dye vermennt (s. Abschnitt 2.1.6). Davon wurden

12 µl in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde 7 µl GeneRuler 100 bp in die Seiten pipettiert (s. Abschnitt 2.1.5). Für 45 min wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Zur Auswertung wurde der UV- Transilluminator genutzt (s. Abschnitt 2.1.1).

### 2.2.3 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Zur Herstellung eines doppelsträngigen DNA-Inserts wurden zwei synthetisierte einzelsträngige Oligonukleotide (je 100 nM) hybridisiert. Es wurden 4 µl ddH<sub>2</sub>O in ein PCR-Tube vorgelegt. Hinzugegeben wurden dann 8 µl des forward- und 8 µl des reverse-Oligonukleotids, sodass ein Gesamtvolumen von 20 µl vorlag. Die Reaktionsgefäße wurden für 10 min bei 98 °C im Thermoblock erhitzt und kühlten für 30 min bei Raumtemperatur ab. Danach konnten die Inserts bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert werden.

Tabelle 2.20: Primerhybridisierung

Oligonukleotid (forward)	8 µl
Oligonukleotid (reverse)	8 µl
ddH <sub>2</sub> O	4 µl
	<hr/>
	20 µl

### 2.2.4 Ligation

Mit der Ligation wird die Integration des DNA-Inserts in das gewünschte Plasmid erreicht. Hierbei kam die T4-DNA-Ligase (s. Abschnitt 2.1.10) zur Anwendung, welche die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den Hydroxylenden doppelsträngiger DNA ermöglicht. In PCR-Tubes als Reaktionsgefäß wurden auf 10 µl ddH<sub>2</sub>O, 100 bzw. 200 ng des Plasmids verdünnt in 2 µl pipettiert. Es folgten 5 µl des zuvor hybridisierten Inserts im Überschuss und der 10x T4-Ligase-Puffer (s. Abschnitt 2.1.6). Zuletzt wurde 1 µl der T4-Ligase hinzugefügt. Die Ansätze wurden daraufhin bei 4 °C über die Nacht im Kühlschrank inkubiert. Um die Ligation zu inaktivieren, wurden die Reaktionsgefäße zuerst mit 2000 x g für 10 s bei Raumtemperatur zentrifugiert und dann für 20 min bei 65 °C in den Thermoblock gestellt. Nach kurzer Lagerung auf Eis wurde ein Restriktionsenzym hinzupipettiert. Dabei wurde für px459- oder eSpCas9(1.1)-Plasmide 1,5 µl BbsI-HF und für BRET-Reporter-Plasmide 0,5 µl BsiWI-HF verwendet (s. Abschnitte 2.1.10 u. 2.1.11). Der Ansatz für 2 Stunden im Wasserbad bei 37 °C nachverdaut. Abschließend wurde eine zweite

Hitzebehandlung für 20 min im Thermoblock bei 65 °C durchgeführt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C im Gefrierschrank.

Tabelle 2.21: Ligation BRET-Reporter-Plasmid pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2

BRET-Reporter (verdaut) (200 ng)	x µl
Insert/Target-Sequenz	5 µl
10x T4-Ligase-Puffer	2 µl
T4-Ligase	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl
	20 µl

Tabelle 2.22: Ligation von px459 (pU6-BbsI/BbsI-CBA-Cas9) oder eSpCas9(1.1)

px459 o. eSpCas9(1.1) (verdaut) (100 ng)	x µl
Insert/Guide-Sequenz	5 µl
10x T4-Ligase-Puffer	2 µl
T4-Ligase	1 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 20 µl
	20 µl

## 2.2.5 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Messung der DNA-Konzentration wurde nach der Plasmidextraktion mit dem Photometer (s. Abschnitt 2.1.1) im dsDNA-Modus bei einer Wellenlänge von 260 nm vorgenommen. Zu Beginn erfolgte die Leerprobe mit ddH<sub>2</sub>O. Zur Erhöhung der Trennschärfe wurden die Proben mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt, um eine Messung im linearen Bereich zu ermöglichen. Dieser wurde auf Absorptionswerte zwischen 0,1 und 1,1 festgelegt. Lagen die erhaltenen Extinktionswerte außerhalb des linearen Messbereichs, wurden die Proben erneut mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

## 2.2.6 DNA-Sequenzierung

Um die Transformation sowie die vorangehende Ligation mit dem spezifischen Insert zu prüfen, wurde das aus der Mini-Präparation der *E. coli*-Kulturen gewonnene Plasmid sequenziert und analysiert. Dies erfolgte extern bei dem Anbieter Microsynth SeqLab (Göttingen). Die Sequenzierungsansätze sind in Tabelle 2.23 und Tabelle 2.24 aufgeführt. Zur Auswertung wurde das Programm FinchTV verwendet (s. Abschnitt 2.1.3).

Tabelle 2.23: Sequenzierung der BRET-Reporter-Plasmide

BRET-Reporter-Plasmid (1200 ng)	x $\mu$ l
Primer #4041 SeqKas (1:9)	3 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	ad 15 $\mu$ l
	15 $\mu$ l

Tabelle 2.24: Sequenzierung der px459- und eSpCas9(1.1)-Plasmide

px459 oder eSpCas9(1.1)-Plasmid (1200 ng)	x $\mu$ l
Primer #3056 Wolle610 (1:9)	3 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	ad 15 $\mu$ l
	15 $\mu$ l

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

Um *E. coli* (XL1-Blue; s. Abschnitt 2.1.9) für die Transformation durch Elektroporation vorzubereiten und als bakteriellen Klonierungsvektor zu nutzen, war es erforderlich, sie mit Elektrokompentenz auszustatten. Das Ansetzen einer Kultur erfolgte in 50 ml Reaktionsgefäßen mit jeweils 5 ml LB-Medium (s. Abschnitt 2.1.8), 5  $\mu$ l Tetracyclin (12,5  $\mu$ g/ $\mu$ l) (s. Abschnitt 2.1.7) und 5  $\mu$ l XL1-Blue aus einem Glycerolstock. Die Kultur wurde bei 37 °C und 180 rpm über Nacht im Laborschüttler inkubiert (s. Abschnitt 2.1.1). Am folgenden Tag wurden jeweils 5 ml der Kultur in 200 ml vorgewärmtes LB-Medium mit 200  $\mu$ l Tetracyclin überführt. Es schloss sich eine Inkubation unter gleichen Bedingungen für 2-3 Stunden an. Nach 2 Stunden wurde die Kontrolle der optischen Dichte mit dem Photometer durchgeführt (s. Abschnitt 2.1.1). Sobald ein OD<sub>600</sub>-Wert von 0,6-0,8 erreicht war, wurden die Kulturen in 50 ml Reaktionsgefäße für 30 min auf Eis gekühlt und dann für 10 min bei einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge (s. Abschnitt 2.1.1) bei 5.100 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 10 ml auf Eis vorgekühltem 1 mM HEPES-Puffer (s. Abschnitt 2.1.5) durch ausgiebiges Vortexen resuspendiert. Jeweils 2 Reaktionsgefäße konnten zusammengeführt werden und wurden mit weiteren 30 ml HEPES-Puffer aufgefüllt. Es erfolgte erneut eine Zentrifugation bei gleichen Bedingungen für 10 min und die Entfernung des Überstandes. Das Pellet wurde erneut in 25 ml HEPES-Puffer resuspendiert und wieder für 10 min zentrifugiert. Nach der Abnahme des Überstandes wurde das Pellet diesmal in 10 ml auf Eis vorgekühltem 10 % Glycerin resuspendiert. Durch zwei weitere jeweils 5-minütige Zentrifugationsschritte und die anschließende Resuspension des Pellets in erst 5 ml und

dann 0,5 ml 10 % Glycerin wurde das Zellmaterial aufkonzentriert. Zur Lagerung bei -80 °C im Tiefkühlschrank erfolgte die Aliquotierung in 50 µl-Proben und das Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff.

### **2.3.2 Transformation/Elektroporation und Kultivierung von Bakterien**

Bei der Transformation durch Elektroporation handelt es sich um eine Form des DNA-Transfers. Es bezeichnet die Aufnahme genetischen Materials durch einen bakteriellen Klonierungsvektor mithilfe eines Elektroporators. Durch einen elektrischen Impuls wird die Permeabilität der bakteriellen Membran kurzzeitig verändert und so die Aufnahme des Plasmids in die Zelle ermöglicht (Gehl 2003). Hierzu wurden 3 µl des Plasmids zu einem aufgetauten 50 µl Aliquot XL1-Blue gegeben und für 5-10 min auf Eis inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde luftblasenfrei in den Spalt einer auf Eis vorgekühlten Küvette pipettiert und von dem Elektroporator (s. Abschnitt 2.1.1) mit den Voreinstellungen 2000 V und 5 ms im Bakterienmodus geschockt. Anschließend wurde zügig 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes SOC-Medium (s. Abschnitt 2.1.8) zupipettiert. Der gesamte Ansatz wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, in dem er dann zur Regeneration sowie Ausbildung der Antibiotikaresistenz eine Stunde bei 37 °C 180 rpm im Laborschüttler inkubiert wurde. Es erfolgte die Konzentration des Ansatzes durch Zentrifugation bei 11000 x g 4 °C für 5 min und anschließender Resuspension in einem um 80 % reduzierten Volumen. Die 200 µl des konzentrierten Ansatzes wurden mit einem sterilisierten Glasspatel auf einer vorgewärmten LB-Ampicillin-Platten (s. Abschnitt 2.1.8) ausgestrichen und zur Inkubation bei 37° im Brutschrank inkubiert. Nach 14-16 Stunden konnten Klone gepickt werden.

Die gepickten Klone wurden durch bakterielle Flüssigkulturen in LB-Medium (s. Abschnitt 2.1.8) vermehrt. Dabei wurden 5 ml Medium mit 5 µl Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml; s. Abschnitt 2.1.7) in 50 ml Reaktionsgefäßen verwendet. Die Inkubation erfolgte für 14-18 Stunden bei 37 °C 180 rpm im Laborschüttler.

### **2.3.3 Herstellung von Glycerolstocks**

Nach der Überprüfung der erfolgreichen Plasmid-Klonierung mittels Sequenzierung (s. Abschnitt 2.2.6) wurden aus der LB-Kultur Glycerolstocks angelegt. Hierzu wurden 0,5 ml steriles Glycerin und 1 ml Bakterienkultur in ein Kryoröhrchen (s. Abschnitt 2.1.4) gegeben und gevortext. Die Lagerung erfolgte im Gefrierschrank bei -80 °C.

### **2.3.4 Plasmidisolation/Plasmidpräparation**

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte aus den Kulturen der transformierten *E. coli*-Bakterien nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Eine alkalische Verschiebung des pH-Werts führt zur Denaturierung der DNA. Plasmid-DNA hybridisiert nach der Neutralisierung wieder. Die größere chromosomale DNA bleibt einzelsträngig und fällt aus. (Mülhardt 2013)

Für das Verfahren wurden kommerziell erhältliche Kits verwendet (s. Abschnitt 2.1.2). Bei der Plasmidisolation zur Sequenzierung nach der Klonierung wurde die Mini-Präparation genutzt. Um hochreine transfizierbare Plasmid-DNA zu isolieren, wurde die Maxi-Präparation durchgeführt.

#### **Mini-Präparation**

2 ml der *E. coli*-Kultur wurden bei 11000 x g für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl A1-Puffer resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 250 µl des Lyse-Puffers A2. Die Proben wurden 6-8-mal invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 300 µl des Neutralisation-Puffers A3 wurden die Proben erneut 6-8-mal invertiert und für 5 min bei 11000 x g zentrifugiert. Der Überstand, welcher das Plasmid enthält, wurde bis zu einem Maximum von 750 µl auf die Isolations-Säule, die in einem Auffanggefäß platziert worden ist, pipettiert und für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. 450 µl des Waschpuffers AQ wurden in die Säule pipettiert. Nach der Zentrifugation für 3 min bei 11000 x g, in der die Säule trocknete, konnte sie in einem neuen 1,5 ml-Reaktionsgefäß platziert werden. Nach der Zugabe von 27 µl ddH<sub>2</sub>O folgte die Inkubation bei Raumtemperatur für 1 min. Abschließend wurde eluiert, indem erneut für 1 min bei 11000 x g zentrifugiert wurde. Das Plasmid wurde bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

#### **Maxi-Präparation**

100 ml LB-Medium mit 100 µl Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml; s. Abschnitt 2.1.7) wurden in einem 300 ml Kolben mit 100 µl *E. coli*-Bakterienkultur aus Glycerolstocks (s. Abschnitt 2.3.3) beimpft. Die Inkubation erfolgte für 14-18 Stunden bei 37 °C 180 rpm im Laborschüttler.

Die 100 ml der *E. coli*-Kulturen wurden auf zwei 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt und mit einem auf 4 °C vorgekühlten Gerät bei 6000 x g für 15 min zentrifugiert. Die nun im Zellpellet enthaltenen Bakterien konnten nach Entfernung des Überstandes auch

bei -20 °C gelagert werden. Die Pellets der beiden Reaktionsgefäße wurden in jeweils 5 ml Resuspensions-Puffer P1 gelöst und in ein gemeinsames Gefäß überführt. Es wurde 10 ml Lyse-Puffer P2 hinzugefügt und 4-6-mal invertiert. Nach der Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurde der Neutralisations-Puffer P3 hinzupipettiert und erneut 4-6-mal invertiert. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min in Eis inkubiert. Es folgte die Zentrifugation bei 11627 x g 4 °C für 45 min. Der Überstand, der das Plasmid enthält, wurde in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und ein weiteres Mal bei 11627 x g 4 °C für 15 min zentrifugiert. Die flüssige Phase, die vom Zellschrott separiert worden ist, wurde auf die vorher mit 10 ml QBT-Puffer equilibrierten Säulen QIAGEN-tip 500 geladen und durchfloss diese mithilfe der Schwerkraft. Es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 30 ml Wasch-Puffer QC. Es schloss sich die Elution mit 15 ml Elutions-Puffer QF an. Die DNA wurde durch die Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und darauffolgender Zentrifugation für 45 min bei 11627 x g 4 °C präzipitiert. Vor der Beladung der Zentrifuge wurde die Probe einmal invertiert. Die flüssige Phase wurde verworfen und das Zellpellet wurde mit 5 ml 70 % Ethanol versetzt und in der Zentrifuge für 10 min bei 11627 x g 4 °C gewaschen. Das Zellpellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet. Nach 10 min wurde 0,5 ml ddH<sub>2</sub>O auf das Pellet gegeben und der Ansatz über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C verwahrt. Dann wurde die Probe gevortext und die Konzentration bestimmt. Das Plasmid wurde bei -20 °C im Gefrierschrank gelagert.

## **2.4 Zellbiologische Methoden**

### **2.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Als eukaryotische Zelllinie für die Transfektion mit dem aus der Maxipräparation gewonnenen Plasmid wurden HEK293-T-Zellen verwendet (s. Abschnitt 2.1.9). Diese wurden in Zellkulturplatten von 10 cm Durchmesser mit DMEM+++ (s. Abschnitt 2.1.8) adhären kultiviert. Eine regelmäßige Passagierung wurde bei Konfluenz im Abstand von 4 Tagen vorgenommen. Die Zellen wurden hier mit 1 ml vorgewärmter Accutase (s. Abschnitt 2.1.10) abgelöst und nach einer Inkubationszeit von 5 min in 9 ml frischem, auf 37 °C vorgewärmtem DMEM+++ resuspendiert. 1 ml dieser Suspension wurde daraufhin in eine neue Zellkulturplatte überführt und mit weiteren 9 ml DMEM+++ vermengt. Die Passagierung der Zellen erfolgte unter der sterilen Werkbank mit sterilen Glas- und Filterpipetten. Die HEK293-T-Zellen wurden im Inkubator bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> gelagert.

## 2.4.2 Transfektion

Als Transfektion wird die Übertragung von genetischem Material verpackt als Nukleinsäure in eukaryotische Zellen bezeichnet (Kim und Eberwine 2010). In dieser Arbeit wurde der Gentransfer mithilfe von Polyethylenimin (PEI) (s. Abschnitt 2.1.5) genutzt, um die BRET-Reporter- und die Cas9/Guide-Plasmide in die adhärenen HEK293-T-Zellen zu applizieren, welche als Modell verwendet wurden. Die Zellen exprimierten die plasmidspezifischen Proteine, welche extrahiert und quantifiziert werden konnten (s. Abschnitt 2.5.1). Die Interaktion der verschiedenen Plasmide wurde im weiteren Verlauf mithilfe des BRET-Assays proteinbiologisch untersucht (s. Abschnitt 2.5.2).

Die Transfektionen wurden in 24-Well-Platten durchgeführt. Es wurde mit auf 37 °C vorgewärmtem DMEM<sup>+++</sup> gearbeitet. Das Medium von einer 10 cm Zellkulturplatte HEK293-T-Zellen wurde abgenommen und 1 ml vorgewärmte Accutase hinzugefügt. Die Zellen wurden 5 min. inkubiert und mit 9 ml DMEM<sup>+++</sup> resuspendiert. Jeweils 250 µl der Suspension wurden mit weiteren 750 µl DMEM<sup>+++</sup> in einen Well gegeben und für 16-18 Stunden bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Vor der Zugabe des Transfektionsansatzes (s. Tabelle 2.25) wurde das Medium vollständig aus den Wells entfernt und durch die definierte Menge von 400 µl DMEM<sup>+++</sup> ersetzt. Es schloss sich die Inkubation für 30 min im Brutschrank an.

Mit Hinblick auf die Auswertung durch den BRET-Assay wurde jedes BRET-Reporter-Plasmid mit der enthaltenen Target-Sequenz (s. Abschnitt 2.1.12) jeweils ohne und mit dem Cas9/Guide-Plasmid transfiziert. Jeweils 4 der 60 ausgewählten BRET-Reporter-Plasmide konnten pro 24er Platte transfiziert werden (s. Abbildung 2.5).

Zur Herstellung der Transfektionsansätze wurden in 2 ml Reaktionsgefäße 30 µl NaCl vorgelegt. Es wurden 600 ng des Target-Plasmids in einen Ansatz und 600 ng des Target-Plasmids gemeinsam mit 600 ng des Cas9/Guide-Plasmids in den zugehörigen Ansatz des Experiments pipettiert und gevortext. Es wurde 40 µl PEI-Mix (s. Abschnitt 2.1.6) zupipettiert und erneut gevortext. Vor dem Applizieren auf die HEK293-T-Zellen wurden die Ansätze für 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Ansätze wurden auf- und abpipettiert und auf die Zellen in den Wells getropft. Jeweils nach 3 Wells wurde die Platte horizontal und vertikal bewegt.

Nachdem die Platte für 5 h bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert wurde, konnten Medium und Ansatz von den Zellen entfernt werden und 1 ml frisches DMEM<sup>+++</sup> pro Well zugefügt werden. Die Zellen wurden nun erneut für ca. 18 Stunden inkubiert.

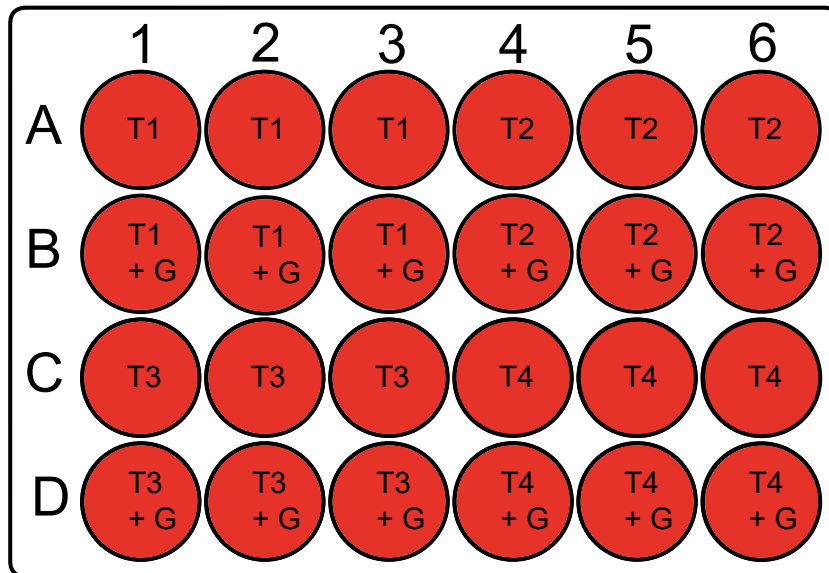


Abbildung 2.5: Pipettierschema Transfektion

Tabelle 2.25: Transfektionsansätze

Ansatz	pRLuc8	BRET-Reporter (WT-Sequenz)	BRET-Reporter (MM-Sequenz)	Cas9/Guide (WT-Sequenz)	NaCl	PEI- Mix
100% DSB	600 ng	-	-	-	30 µl	40 µl
0% DSB	-	600 ng	-	-	30 µl	40 µl
WT- Target + WT- Guide	-	600 ng	-	600 ng	30 µl	40 µl
MM- Target + WT- Guide	-	-	600 ng	600 ng	30 µl	40 µl

### 2.4.3 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Kontrolle der Transfektion und zum optischen Vergleich wurden ca. 24 Stunden nach der Transfektion Bilder von den transfizierten HEK293-T-Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop BioZero (s. Abschnitt 2.1.1) aufgenommen. Das Medium wurde hierbei abpipettiert. Es wurde im Phasenkontrast und im GFP-Modus bei 20x optischer und 10x digitaler Vergrößerung dokumentiert sowie ein Overlay beider Bilder erzeugt (s. Abbildung 2.6). Durch die Belichtung im GFP-Modus wird das von den BRET-Reporter-Plasmiden exprimierte Protein GFP2 angeregt und emittiert grünes Licht. Die Fluoreszenzaufnahmen der Monotransfektionen der BRET-Reporter-Plasmide konnten den Kotransfektionen aus BRET-Reporter-Plasmiden und Cas9/Guide-Plasmiden gegenübergestellt werden.

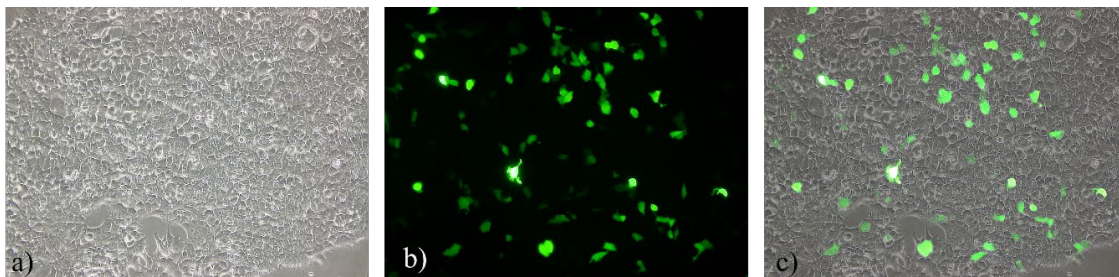


Abbildung 2.6: Erstellung von Fluoreszenz/Phasenkontrast-Overlay-Aufnahmen

Dargestellt ist zur Veranschaulichung des Overlay-Verfahrens eine Monotransfektion des BRET-Reporter-Plasmids. Es wurden jeweils eine Fluoreszenzaufnahme (a) und eine Phasenkontrastaufnahme (b) vorgenommen. Durch eine standardisierte Überlagerung wurde daraus ein Overlay (c) erzeugt.

## 2.5 Proteinbiologische Methoden

### 2.5.1 Zellyse und Proteinextraktion

Um die in den transfizierten HEK293-T-Zellen exprimierten Proteine *in-vitro* mithilfe des BRET-Assays zu untersuchen, mussten diese extrahiert werden. Dies erfolgte durch die Freeze-Thaw-Methode. Eingangs wurde das Medium aus den Wells abgenommen und die Zellen mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen (s. Abschnitt 2.1.6). Im Anschluss wurden jeweils 100  $\mu$ l PBS-Puffer in die Wells gegeben. Die Zellen wurden mit der Pipettenspitze durch Schaben sowie Auf- und Abpipettieren abgelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer kurzen Zentrifugation bei 17968 x g in einer auf 4 °C vorgekühlten Maschine wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und gevortext. Es folgte ein weiteres Schockgefrieren mit

darauffolgendem Auftauen und Vortexen. Nachdem die Probe ein weiteres Mal für 5 min bei 17968 x g zentrifugiert wurden, konnten sie auf Eis zwischengelagert werden. Der Überstand, welcher die Proteine enthält, wurde in neue Reaktionsgefäße überführt.

### **2.5.2 BRET-Assay**

Jeweils 10 µl des bei der Proteinextraktion gewonnenen Lysats wurden in einen Well einer 96-Well Costar Flat White-Platte (s. Abschnitt 2.1.4) pipettiert. Pro BRET-Assay wurden die Proteine aus der Monotransfektion der Target-Plasmide und aus der Kotransfektion mit den Guide-Plasmiden untersucht. Als Luciferase-Substrat wurde Coelenterazine 400a (s. Abschnitt 2.1.5) verwendet. Dieses wurde zunächst in 100 % Ethanol gelöst, um eine Konzentration von 1 mg/ml zu erhalten und daraufhin hundertfach mit PBS (1x) verdünnt (Endkonzentration: 10 µg/ml). Das Reaktionsgefäß wurde lichtgeschützt für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Emissionen der Proteine wurden mit einem Tecan Infinite M1000Pro Platereader (s. Abschnitt 2.1.1) nach Substratzugabe unter Benutzung der Software iconcontrol (s. Abschnitt 2.1.3) gemessen. Das Gerät wurde nach Angaben des Herstellers verwendet. Als Voreinstellungen wurden der Filter Magenta für die Luciferase mit einem Detektionsspektrum bis 450 nm und der Filter Green für das GFP2 mit einem Spektrum von 500 bis 550 nm ausgewählt. Es wurden 100 µl des Substrats injiziert. Die Leitung wurde vor den Messungen geprimt. Die Messungen erfolgten wellweise nacheinander.

Anhand des emittierten Lichts wurde die BRET-Ratio ermittelt. Zur Einordnung der verschiedenen BRET-Ratios wurde zur 0 % DSB-Kontrolle eine Monotransfektion mit dem BRET-Reporter-Plasmid und zur 100 % DSB-Kontrolle eine Monotransfektion mit dem RLuc8-Plasmid durchgeführt. (s. Abbildung 2.7) Aus dem Abfall der BRET-Ratio bei einer Kotransfektion des BRET-Reporter-Plasmids mit dem Cas9/Guide-Plasmid, welche zu DSBs und zur Aktivierung von Reparaturmechanismen führt, ergibt sich der Anteil der Frameshift-Mutationen (s. Abschnitt 2.6). Die Frameshift-Rate wird stets  $\pm$  die Standardabweichung angegeben.

**a**

$$\text{BRET-Ratio} = \frac{\text{Lichtemission GFP2}}{\text{Lichtemission RLuc8}}$$

**b**

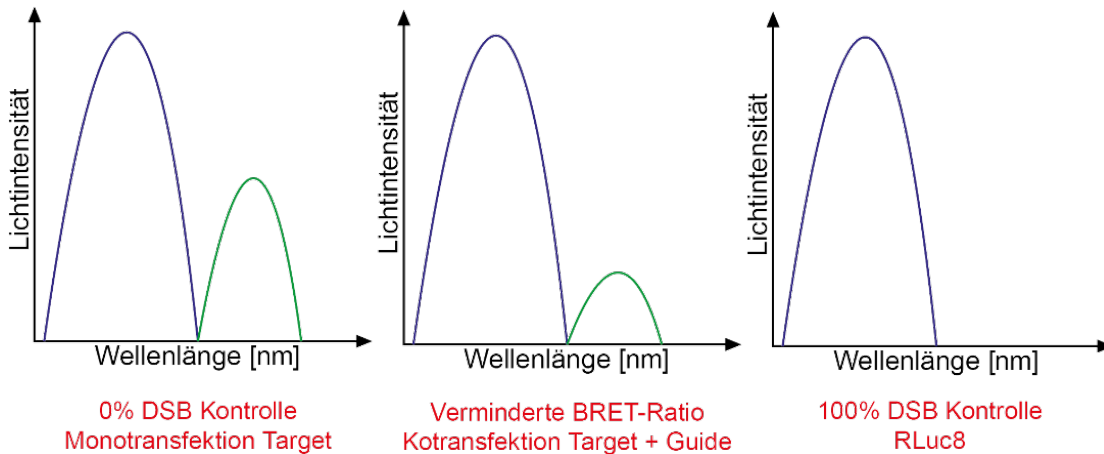


Abbildung 2.7: BRET-Ratio

a) Formel: BRET-Ratio b) Emissionen bei Monotransfektion, Kotransfektion und 100 % DSB-Kontrolle. Lichtintensität in Photonen/s (RLU). Nach Tobias Wimmer (Wimmer et al. 2021).

## 2.6 Statistik

Wenn nicht anders angegeben, wurde jedes Experiment in Dreifachbestimmung durchgeführt, wobei jede Probe für 4 Messungen im BRET-Assay genutzt wurde. Für die statistische Auswertung wurden die Messwerte der Triplikate verwendet. Um eine Normalverteilung zu erreichen, wurden die Daten logarithmiert. Die Normalverteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft. Zur Ermittlung der P-Werte für einen Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde bei Normalverteilung der ungepaarte Student's-t-Test verwendet. Für den Vergleich mehrerer Gruppen untereinander kam bei Normalverteilung der ANOVA-Test zum Einsatz. Dem ANOVA-Test folgte post hoc eine Analyse mit der Dunnett-Methode. Zur statistischen Analyse des Framshifts wurde ein Quotient der BRET-Ratios der Triplikate aus der Transfektion von Target + Cas9/Guide und Target gebildet und logarithmiert. Die Auswertung der BRET-Ratios erfolgte anhand der logarithmierten Messwerte der Triplikate. Für die Berechnung der Signifikanz wurde GraphPad Prism verwendet (s. Abschnitt 2.1.3). P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet und mit \* markiert. P-Werte <0,01 wurden als

statistisch hoch signifikant beurteilt und mit \*\* markiert. P-Werte <0,001 wurden als statistisch höchst signifikant angesehen und mit \*\*\* markiert. Die aus dem BRET-Assay resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen wurden zur Berechnung der Frameshift-Rate verwendet. Die Frameshift-Rate wurde als stets  $\geq 0\%$  definiert. Negative Werte werden durch Fluktuationen der Messwerte verursacht und wurden als nicht detektierbar (nd) gekennzeichnet.

**Frameshift-Rate:**

$$MW_{Frameshift.norm.}(T) = MW(T) - RLuc8.abs.$$

$$MW_{Frameshift.norm.}(T + G) = MW(T + G) - RLuc8.abs.$$

$$MMact\% = \frac{MW_{Frameshift.norm.}(T + G)}{MW_{Frameshift.norm.}(T)}$$

$$Frameshift\% = (1 - MMact\%) \times 100$$

$$Frameshift\% = \left( 1 - \frac{(MW(T + G) - RLuc8.abs.)}{(MW(T) - RLuc8.abs.)} \right) \times 100$$

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 WT-SpCas9-Analyse mit 1 bp-Mismatch-Sequenzen**

Im Rahmen einer Off-Target-Analyse sollten Unterschiede der Schneideaktivität von WT-SpCas9 bei Verwendung von Target-Sequenzen mit einem 1 bp-Mismatch im Vergleich zur Schneideaktivität bei Einsatz der WT-Target-Sequenz ohne Mismatch untersucht werden. Hierzu wurde die Modellsequenz CLN3In6T5 verwendet (s. Abschnitt 1.2.2). Ziel ist eine Analyse im BRET-Assay nach einer Transfektion des Cas9/Guide-Plasmids px459(In6G5) (s. Abschnitt 2.1.11) zusammen mit verschiedenen BRET-Reporter-Plasmiden.

#### **3.1.1 Klonierung der BRET-Reporter-Plasmide**

Mithilfe der 20 bp langen WT-Sequenz wurden verschiedene Mismatch-Sequenzen erstellt und in den pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2-Vektor (s. Abschnitt 2.1.11), als BRET-Reporter-Plasmid bezeichnet, kloniert. Jedes dieser Konstrukte enthält im Vergleich zur WT-Sequenz eine Punktmutation an einer Basenposition. Um jeden Basenaustausch an jeder Position zu simulieren, wurden ausgehend von der WT-Sequenz 60 verschiedene Target-Sequenzen mit jeweils einer 1 bp-Mismatch-Mutation konstruiert (s. Abschnitt 2.1.12). Die Systematik der Target-Sequenz-Gestaltung ist in Abbildung 3.1 veranschaulicht.

## WT-Target-Sequenz

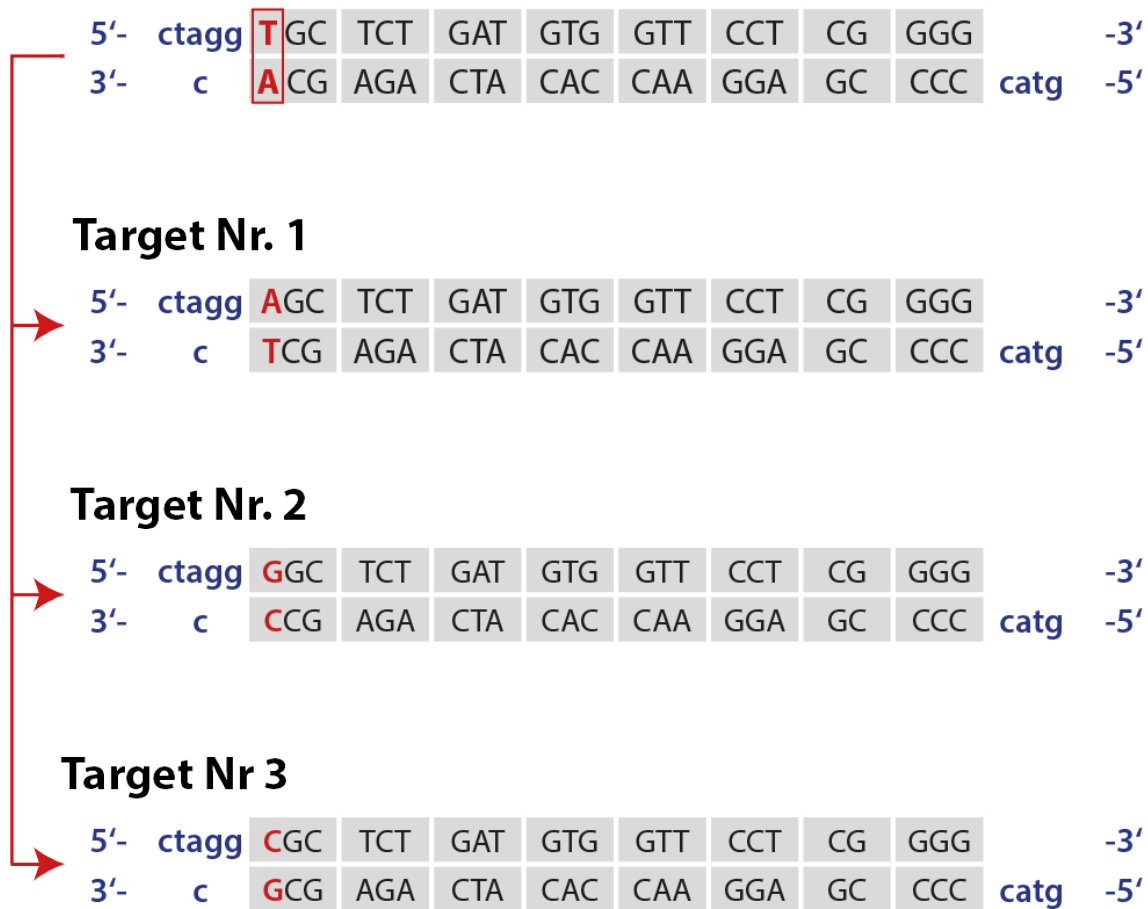


Abbildung 3.1: Konstruktion der Targets

Überhänge wurden in **Blau** und die durchgeführten Punktmutationen in **Rot** kenntlich gemacht. Aufführung aller Sequenzen in Abschnitt 2.1.12.

Die 60 verschiedenen Target-Sequenzen und die WT-Sequenz wurden durch Ligation (s. Abschnitt 2.2.4) in die Klonierungsbox des zuvor durch einen Restriktionsverdau (s. Abschnitt 2.2.1) linearisierten Vektors pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 eingebracht (s. Abbildung 3.2). Ein Kontrollverdau mit zugehöriger Gelelektrophorese zeigte die gewünschten Fragmentlängen und bestätigte die Richtigkeit des linearisierten Vektors. Es folgte die Transformation und Selektion in *E. coli* (s. Abschnitt 2.3.2). Das Plasmid wurde isoliert (s. Abschnitt 2.3.4) und es wurde eine Sequenzierung durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.6). Dies gewährleistete das Vorliegen eines korrekten Klons. Exemplarisch ist in Abbildung 3.2 das Chromatogramm des Mismatch-Target Nr.1 dargestellt.

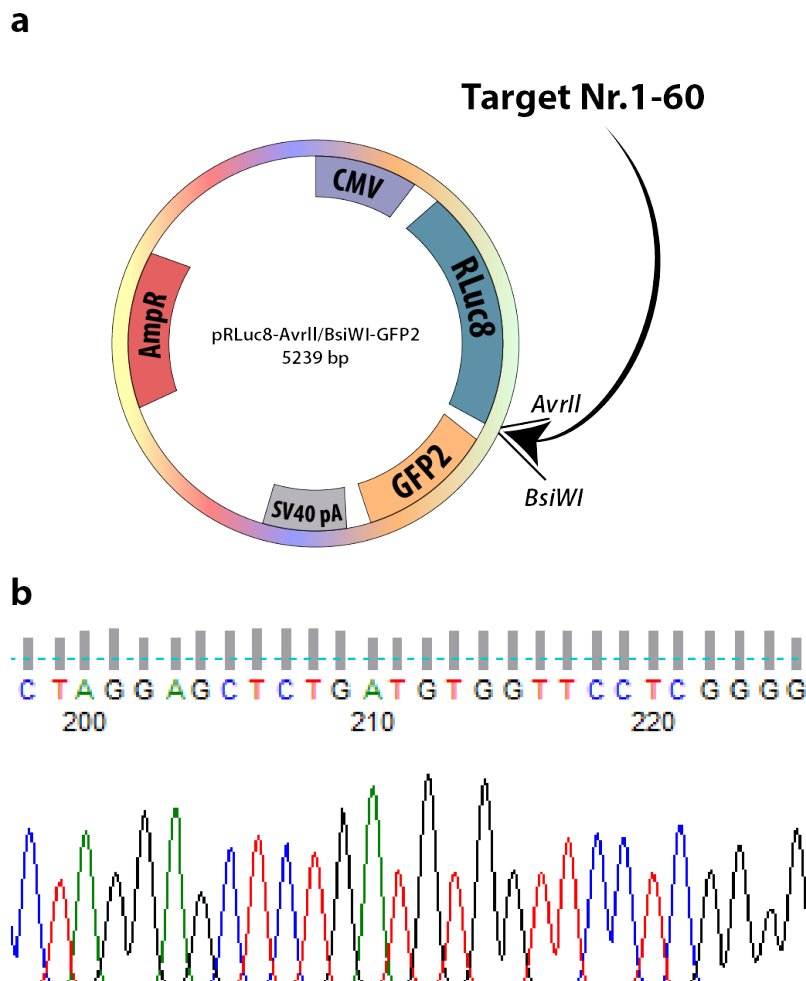


Abbildung 3.2: Integration der Target-Sequenzen und Sanger Sequenzierung

**a** Die Integration der Target-Sequenzen 1-60 in das BRET-Reporter-Plasmid pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2.  
**b** Ein Chromatogramm als Ergebnis der Sanger-Sequenzierung. Hier exemplarische Darstellung des Targets Nr.1.

### 3.1.2 Klonierung von px459(In6G5)

Das Plasmid px459 (pU6-BbsI/BbsI-CBA-Cas9) exprimiert die SpCas9-Endonuklease. Damit diese spezifische DSBs einsetzen kann, benötigt sie eine Guide-RNA. Verwendet wurde die Guide-Sequenz In6G5, welche die WT-Target-Sequenz In6T5 schneidet. Diese Sequenz konnte nach der Linearisierung von px459 durch Ligation in den Vektor integriert werden. Der Vektor wurde in *E. coli* transformiert. Es erfolgte eine Plasmidisolierung und eine Überprüfung durch Sequenzierung (s. Abbildung 3.3).

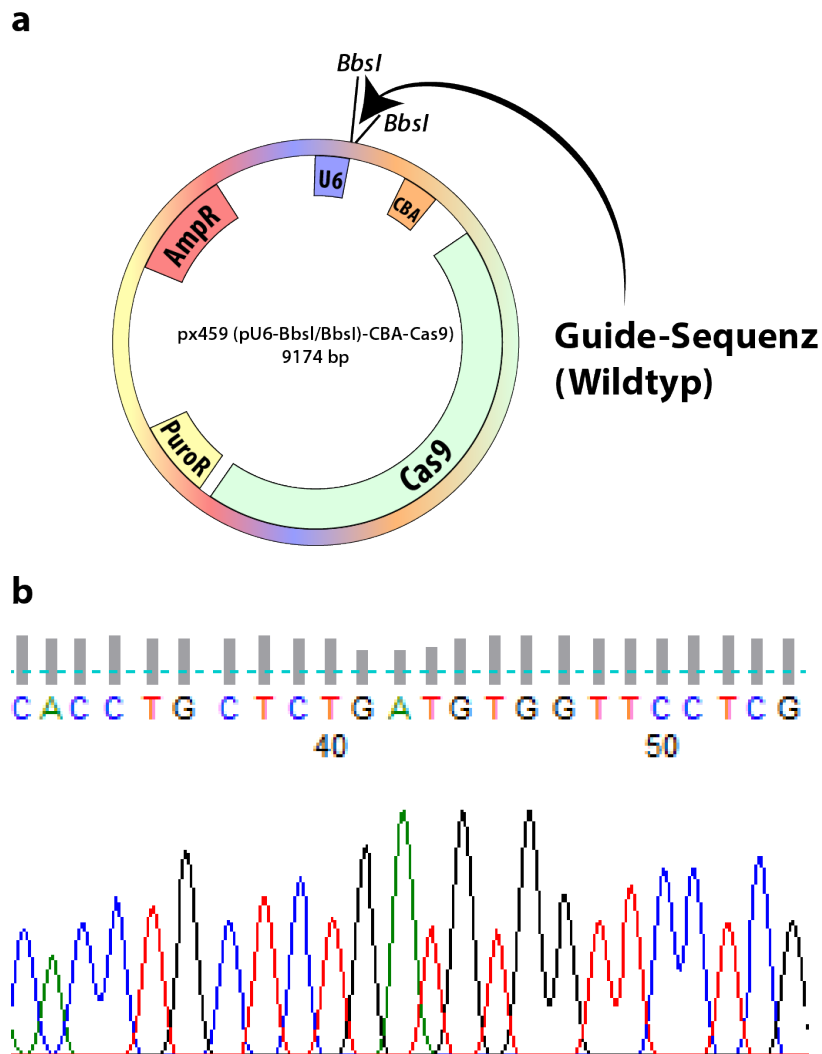


Abbildung 3.3: Integration der Guide-Sequenz und Sequenzierung

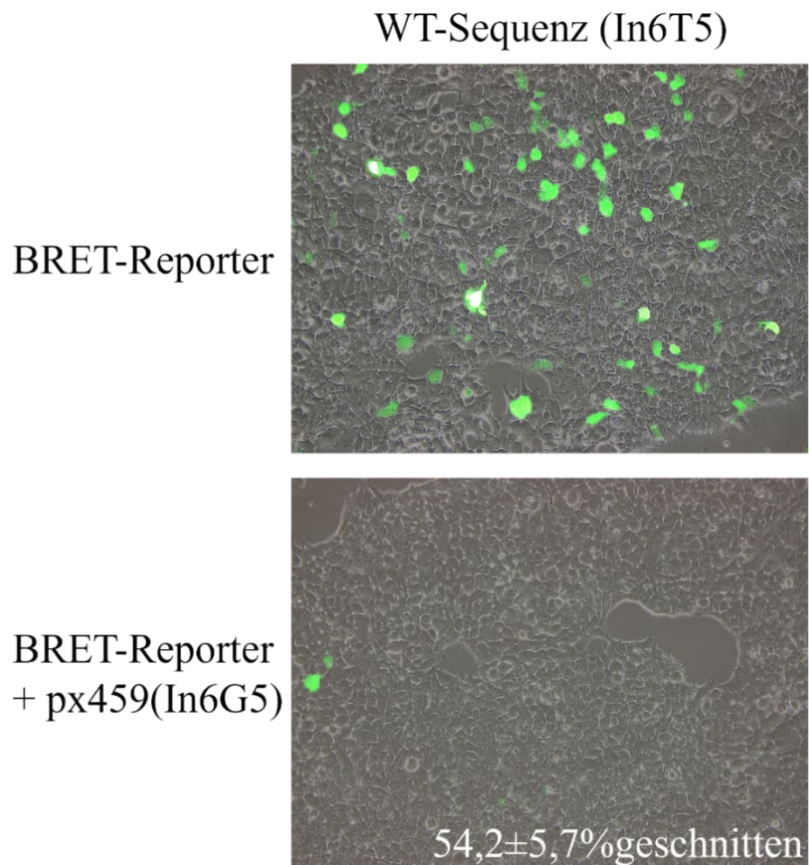
**a** Die Integration der WT-Guide-Sequenz. **b** Chromatogramm der integrierten Guide-Sequenz In6G5.

### 3.1.3 Transfektion der BRET-Reporter Plasmide mit px459(In6G5)

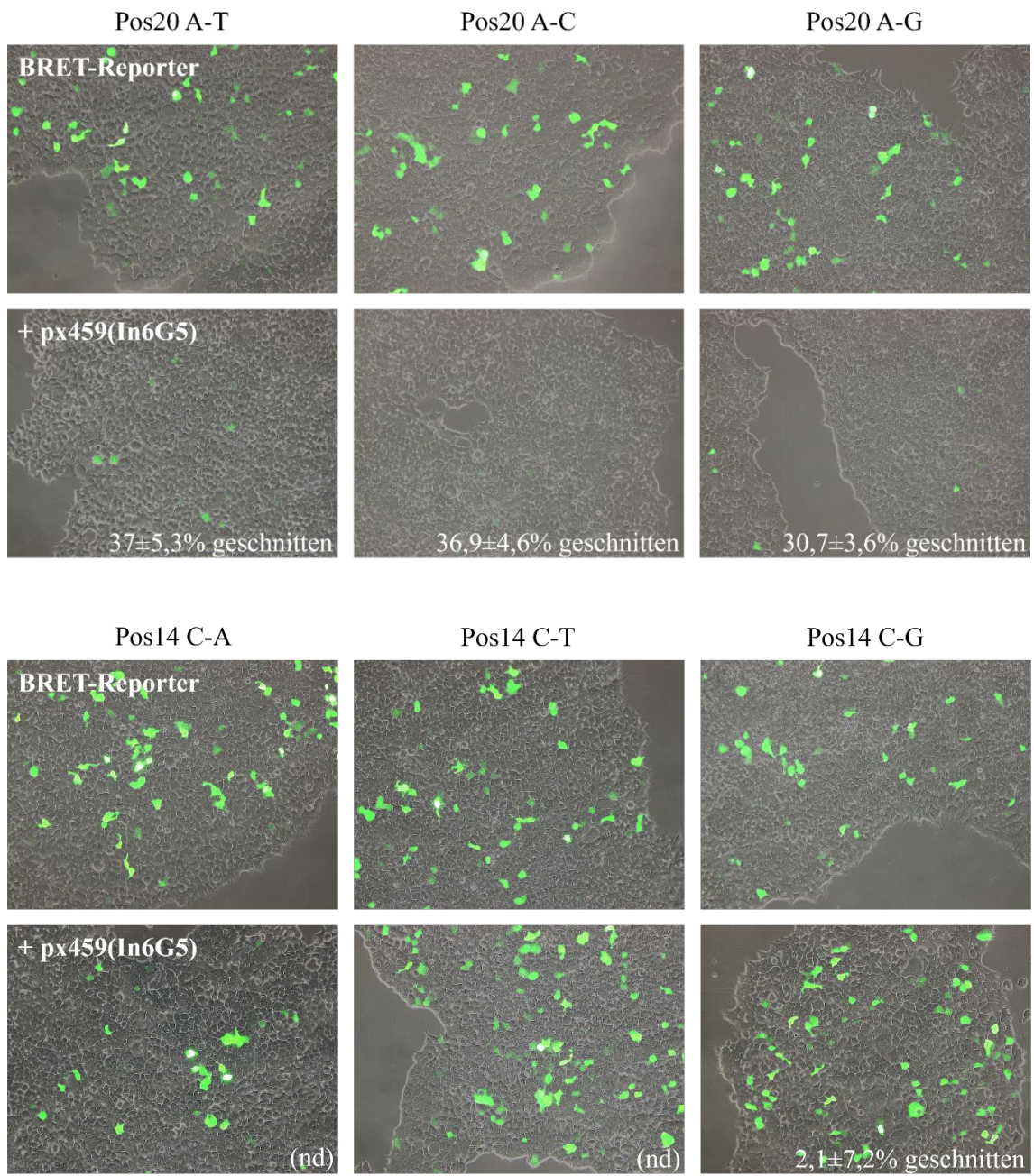
Um den Einfluss der verschiedenen Mismatches auf die Schneideaktivität der WT-SpCas9-Endonuklease zu untersuchen, wurden die unterschiedlichen BRET-Reporter-Plasmide mit den Target Sequenzen Nr. 1-60 jeweils einzeln und gemeinsam mit dem px459(In6G5)-Vektor in HEK293-T-Zellen transfiziert. Die Fluoreszenz/Phasenkontrast-Overlay-Aufnahmen (s. Abschnitt 2.4.3) der transfizierten HEK293-T Zellen zeigen eine erfolgreiche Transfektion der BRET-Reporter-Plasmide. Die transfizierten Zellen exprimieren das Protein GFP2, welches grün fluoresziert (s. Abbildung 3.4). Eine Ausnahme stellt das BRET-Reporter-Plasmid der Target-Sequenz Nr. 8 dar, bei der die eingefügte Mutation ein Stop-Codon erzeugt (s. Abbildung 11.3 im Anhang). Weil so eine Evaluation des Mismatch verhindert wird,

wurde die Target-Sequenz aus der folgenden Mismatch-Analyse ausgeschlossen. Die Kotransfektion des Plasmids px459(In6G5) und des BRET-Reporter-Plasmids mit der WT-Sequenz In6T5 führt zu einer verringerten Intensität der Lichtemissionen (s. Abbildung 3.4 (a)). Bei der Verwendung von BRET-Reportern mit verschiedenen Mismatch-Sequenzen ist entweder eine unterschiedliche oder keine Reduktion der GFP2-Fluoreszenz auffällig (s. Abbildung 3.4 (b)).

**a**



**b**



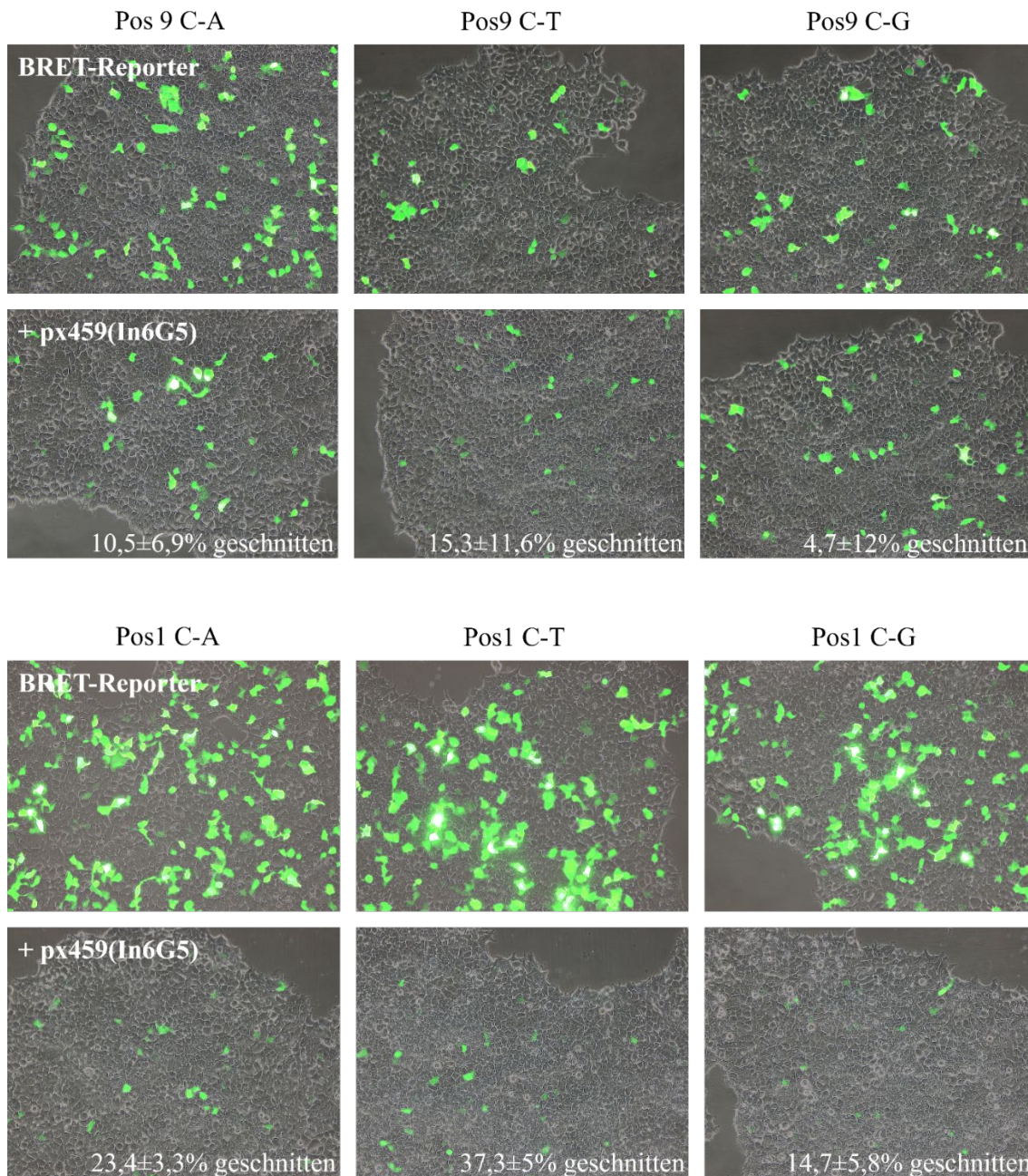


Abbildung 3.4: Fluoreszenz/Phasenkontrast-Overlay-Aufnahmen der mit dem BRET-Reporter-System transfizierten Zellen

Dargestellt sind die WT-Sequenz (a) und die ausgewählten Mismatch-Target-Sequenzen Nr. 1, 2 und 3 für Position 20, Nr. 19, 20 und 21 für die Position 14, Nr. 34, 35 und 36 für Position 9 und 58, 59 und 60 für Position 1 (b). Es fällt ein unterschiedlicher Abfall der GFP-Fluoreszenz für verschiedene Basenpaar-Mismatches und Mismatch-Positionen auf. Zur Veranschaulichung sind den Aufnahmen den im BRET-Assay (s. Abschnitt 3.1.4) ermittelten Schneideaktivitäten angefügt.

### 3.1.4 Messung der Mismatch-Schneideaktivität mit dem BRET-Assay

Anhand der aus den HEK293-T-Zellen extrahierten Proteine konnte anschließend mit dem BRET-Assay (s. Abschnitte 1.5 u. 2.5.2) die WT-SpCas9-Mismatch-Schneideaktivität (Frameshift-Rate [%] (s. Abschnitt 2.6)) auf molekularer Ebene bestimmt werden. Um schneideaktive Kombinationen aus den Target-Sequenzen und WT-SpCas9 mit der Guide-Sequenz zu identifizieren, wurden die ermittelten BRET-Ratios der Transfektion der BRET-Reporter-Plasmide mit den BRET-Ratios der entsprechenden Kotransfektion des Cas9/Guide-Plasmids verglichen (s. Abbildung 3.5). Sieben Target-Sequenzen zeigen eine signifikante Abnahme der BRET-Ratio (\* $p < 0,05$ ), neun eine hoch signifikante Abnahme (\*\* $p < 0,01$ ) und 24 eine höchst signifikante Abnahme (\*\*\*) $p < 0,001$ ). 21 Target-Sequenzen, darunter auch die ausgeschlossene Sequenz Nr. 8, zeigen keine signifikante Reduktion. Ein signifikanter Rückgang der BRET-Ratio weist auf eine signifikante Schneideaktivität hin. Die WT-Target-Sequenz sowie ca. 61 % der 1 bp-Mismatch-Sequenzen weisen eine mindestens signifikante Schneideaktivität auf. Die Schneideaktivität von WT-SpCas9 in Kombination mit den Mismatch-Target-Sequenzen wurde ermittelt und konnte auf signifikante Unterschiede im Vergleich zur Verwendung der WT-Target-Sequenz überprüft werden (s. Abbildung 3.6). Eine Auflistung der Schneideaktivitäten ist in Tabelle 11.1 im Anhang zusammengetragen.

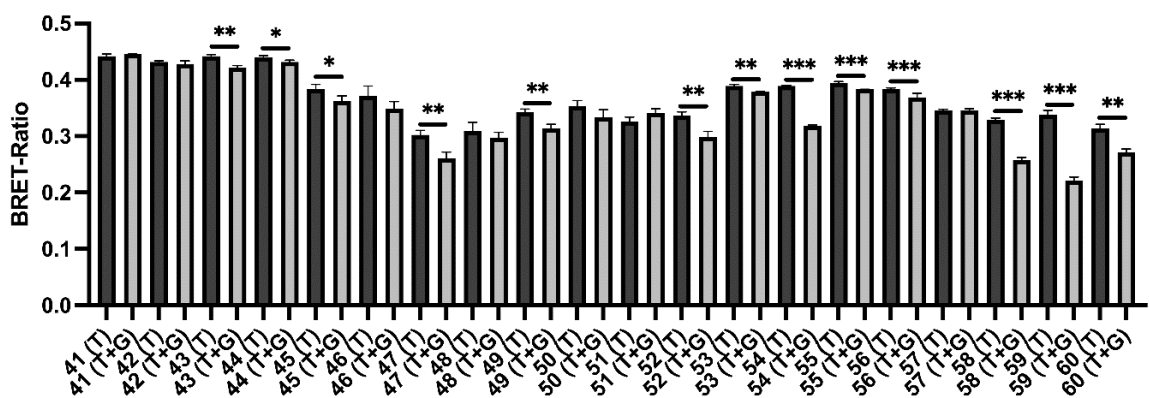
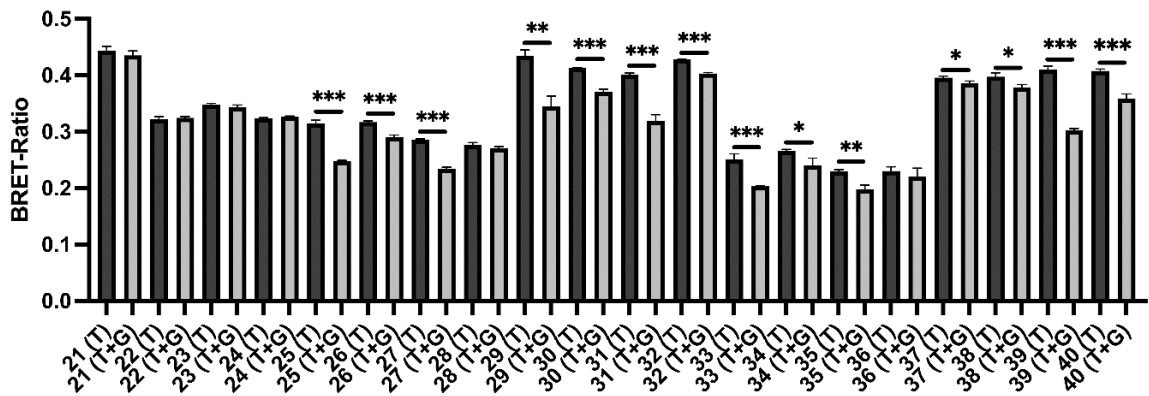
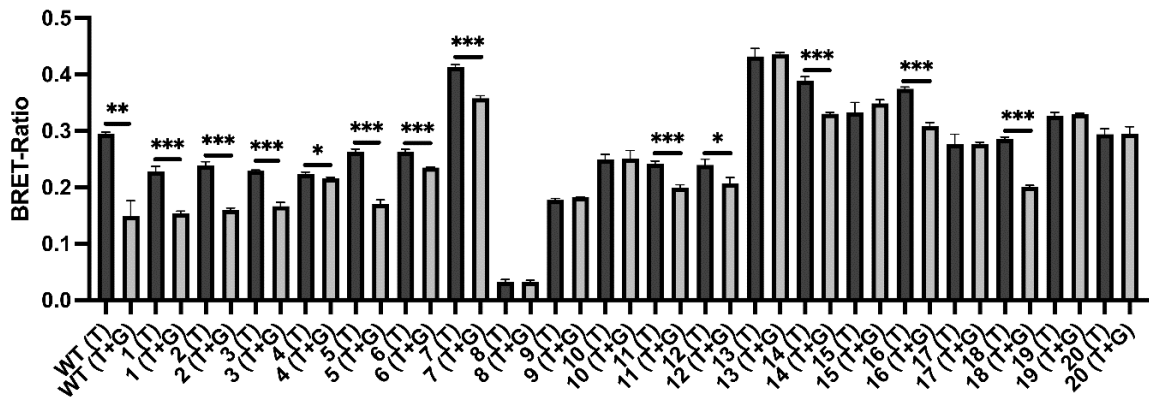


Abbildung 3.5: BRET-Ratios des Basisexperiments

Abgebildet sind die BRET-Ratios der Transfektionen der BRET-Reporter-Plasmide (T) und der Kotransfektionen mit WT-SpCas9, gemessen durch den BRET-Assay (T+G). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  für signifikante Abnahme nach ungepaartem t-Test.

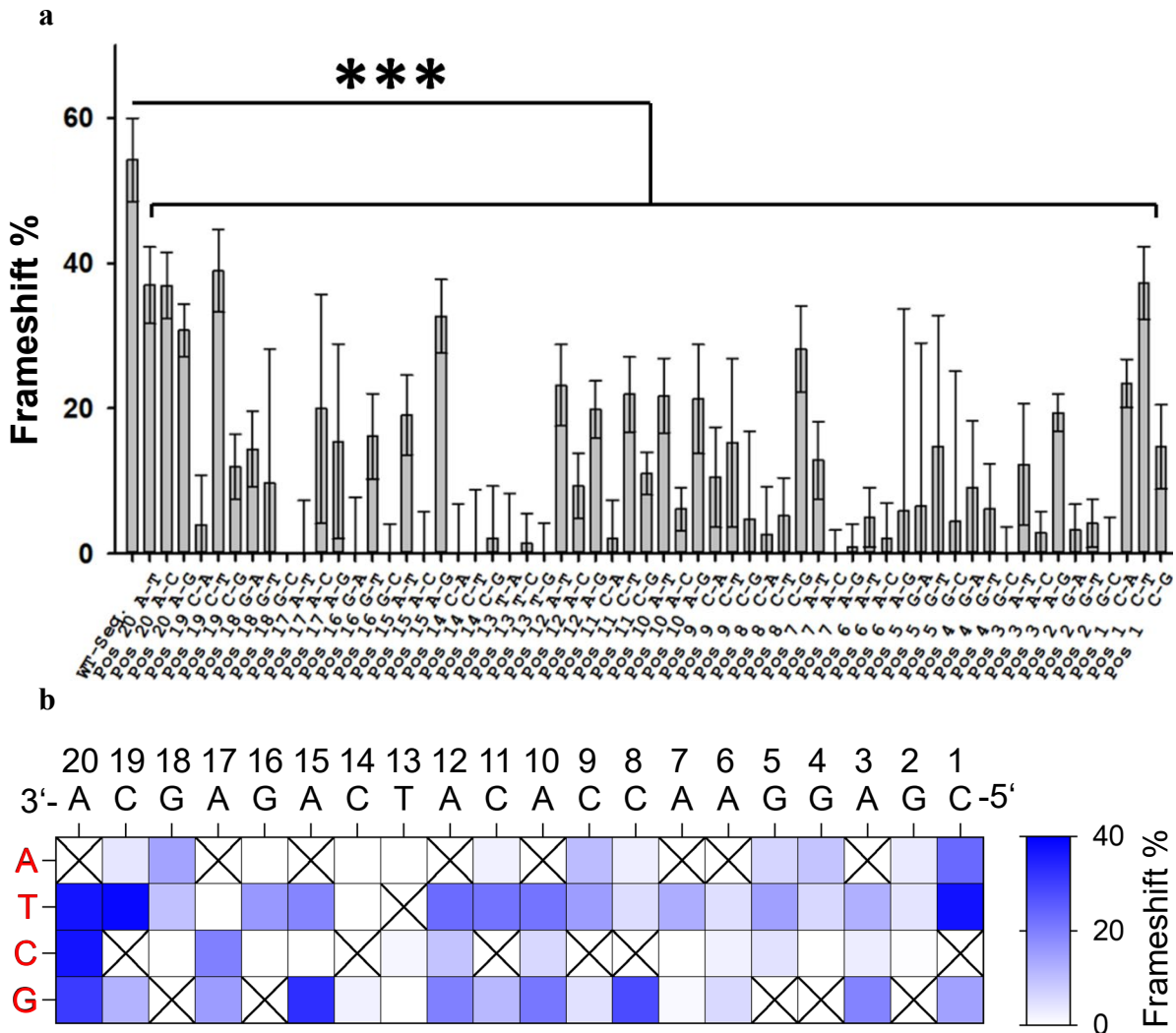


Abbildung 3.6: Schneideaktivität der WT-SpCas9 in Abhängigkeit der Art und Position des Mismatches  
**a:** Abgebildet ist die Schneideaktivität als Frameshift in % von WT-SpCas9 mit der Guide-Sequenz In6G5 bei Kotransfektion mit der WT-Target-Sequenz In6T5 sowie mit 60 verschiedenen Mismatch-Target-Sequenzen. Die Frameshift-Rate ist auf die Y-Achse projiziert. Die Target-Sequenzen sind auf der X-Achse durch ihre 1 bp-Mutation am Target-Strang und der Position in der Sequenz gekennzeichnet. \*\*\* $p < 0.001$  nach one-way ANOVA mit anschließender Analyse der Mismatch-Target-Sequenzen im Vergleich zur WT-Sequenz mit der Dunnett-Methode.

**b:** Dargestellt ist eine Heat-Map. Die 20 bp lange WT-Sequenz CLN3In6T5 ist oberhalb aufgeführt. Die Basen werden aufsteigend nach ihrem Abstand zur PAM-Sequenz, welche sich auf dem Non-Target-Strang befindet, nummeriert. Die spezifische Basenmutation ist auf der linken Seite aufgeführt. Mithilfe eines Farbverlaufs wird der Frameshift von 0-40% bei der Verwendung von WT-SpCas9 festgehalten.

Zu sehen ist, dass WT-SpCas9 bei einer Kombination der Guide-Sequenz In6G5 mit dem WT-Target einen Frameshift von  $54 \pm 5,7$  % besitzt. Dieses Ergebnis unterscheidet sich signifikant vom Frameshift bei Verwendung der Mismatch-Target-Sequenzen (s. Abbildung 3.6). In Bezug auf die Off-Targets fällt auf, dass sowohl Mismatches an bestimmten Positionen wie auch der Austausch spezifischer Basen unterschiedliche

Schneideaktivitäten aufweisen. Während an Position 20 mit  $37\pm 5,3\%$ ,  $36,9\pm 4,6\%$  und  $30,7\pm 3,6\%$  alle möglichen Mismatches einen Frameshift von  $>30\%$  zeigen, liegt an Position 19 nur bei einem Austausch von Cytosin (C) durch Thymin (T) am Target-Strang ein Frameshift von  $38,9\pm 5,7\%$  vor. Ein Austausch durch Guanin (G) wird mit  $11,9\pm 4,5\%$  weniger toleriert und ein Austausch durch Adenin (A) zeigt mit  $3,9\pm 6,8\%$  einen geringfügigen Frameshift. An Position 18 liegt nur bei einem Austausch von G durch A ein signifikanter Frameshift mit  $14,4\pm 5,3\%$  vor. Hinzuzufügen ist, dass an Position 18 mit einer Mutation von G zu T ein Stop-Codon entsteht, welches die Proteinsynthese abbricht. An der Position 17 lässt sich bei einem Austausch von A durch C ein signifikanter Frameshift von  $19,9\pm 15,8\%$  und bei G von  $15,4\pm 13,4\%$  feststellen. Nur ein Austausch von G durch T an Position 16 zeigt mit  $16,1\pm 5,9\%$  noch einen signifikanten Frameshift. Für Position 15 fällt auf, dass ein Austausch von A durch G mit einem Frameshift von  $32,7\pm 5,1\%$  toleriert wird. Wohingegen ein Austausch durch T mit  $19,1\pm 5,5\%$  zu einem geringeren Frameshift führt und ein Austausch mit C keine signifikante Schneideaktivität auslöst. An Position 14 gilt, dass jedes mögliche Mismatch zu einer Eliminierung der Schneideaktivität führt. Auch an Position 13 supprimiert ein Basenaustausch die Schneideaktivität vollständig. Ein Austausch von A durch T mit  $23,2\pm 5,6\%$  oder G mit  $19,9\pm 3,9\%$  wird an Position 12 mehr toleriert als durch C mit  $9,3\pm 4,5\%$ . An Position 11 werden bei einem Austausch von C durch T an  $21,9\pm 5,2\%$  und bei einem Tausch durch G an  $11,0\pm 2,9\%$  der Sequenzen ein Frameshift ausgelöst. Ein Austausch durch A führt zu keiner signifikanten Schneideaktivität. Ein Wechsel von A zu T oder G hat an Position 10 mit  $21,8\pm 5,1\%$  und  $21,3\pm 7,5\%$  einen geringeren Einfluss auf den Frameshift als ein Wechsel zu C mit  $6,1\pm 2,9\%$ . Während an Position 9 ein Austausch von C durch T mit  $15,3\pm 11,6\%$  oder A mit  $10,5\pm 6,9\%$  noch einen signifikanten Frameshift aufweist, ist eine Aktivität bei einem Austausch durch G verringert. Für Position 8 wird ein Austausch von C durch G mit einem Frameshift von  $28,2\pm 5,9\%$  toleriert, während ein Austausch durch A oder T zu einem geringfügigen Frameshift führt. An Position 7 löst ein Austausch von A durch T mit  $12,8\pm 5,3\%$  einen signifikanten Frameshift aus. Jeder Mismatch an Position 6 führt zu einer geringfügigen Aktivität. Für Position 5 wird nur bei einem Austausch von G durch T ein signifikanter Frameshift festgestellt. Jedoch liegt hier eine Standardabweichung von  $>18\%$  vor. An Position 4 zeigt ein Austausch von G durch A einen signifikanten Frameshift bei einer Standardabweichung von  $>9\%$ . An Position 3 hebt sich der verbliebene Frameshift bei einem Austausch von A durch G mit  $19,4\pm 2,5\%$  oder T mit  $12,3\pm 8,4\%$  von einem

Wechsel durch C ab. Auch wenn an Position 2 Mismatches geringfügig toleriert werden, liegt an Position 1 wieder ein Frameshift für alle Mismatches vor, mit  $37,3 \pm 5,0$  %, bei einem Basenaustausch von C durch T,  $23,4 \pm 3,3$  % bei einem Tausch durch A und  $14,7 \pm 5,8$  % bei einem Wechsel mit G. Eine Aufführung der Schneideaktivität von WT-SpCas9 bei verschiedenen Target-Sequenzen liegt in Tabelle 11.1 im Anhang vor. Die Nomenklatur der Sequenzen erfolgte nach der im Vergleich zum WT vorhandenen Punktmutation des Target-Strangs. Die Daten aus dem BRET-Assay decken sich mit dem optischen Vergleich (s. Abschnitt 3.1.3). Exemplarisch sind in Abbildung 3.4 einige Aufnahmen mit im BRET-Assay gemessener Schneideaktivität zusammengestellt.

## **3.2 Subgruppenanalysen der WT-SpCas9-Schneideaktivität**

Zur Veranschaulichung der Daten aus dem Basisexperiment wurden verschiedene Subgruppenanalysen durchgeführt, um zentrale Tendenzen innerhalb der Datensätze herauszuarbeiten. Auf die Darstellung von Standardabweichungen wurde in einigen Abbildungen bewusst verzichtet, da die Gruppierung der Daten primär der Simplifizierung dient und eine Darstellung von Streuungen in diesem Kontext methodisch aufgrund der Einbeziehung einer Vielzahl an beteiligten Variablen nicht zielführend wäre. Die statistische Auswertung erfolgt auf Basis der zugrunde liegenden Rohdaten, sodass die Validität der Ergebnisse unabhängig davon gewährleistet ist (s. Abschnitt. 2.6). Die in den Abbildungen repräsentierten Mittelwerte dienen primär der Visualisierung relevanter Muster und Kernaussagen.

### **3.2.1 Untersuchung der Unterbrechung kanonischer Basenpaarungen**

Um zu evaluieren, inwiefern die Unterbrechungen von A-T(U)- und G-C-Basenpaaren durch Mutationen auf dem Target-Strang einen unterschiedlichen Einfluss auf die Off-Target-Schneideaktivität von WT-SpCas9 haben, wurden die aus dem BRET-Assay ermittelten Daten in zwei Gruppen aufgeteilt (s. Abbildung 3.7).

Der Frameshift bei Unterbrechung einer G-C-Paarung ist mit ca. 9,2 % im Verhältnis zur Unterbrechung einer A-T(U)-Paarung mit einer durchschnittlichen Aktivität von ca. 13 % leicht erniedrigt. Es liegt eine hohe Streuung der Messwerte innerhalb der Gruppen vor.

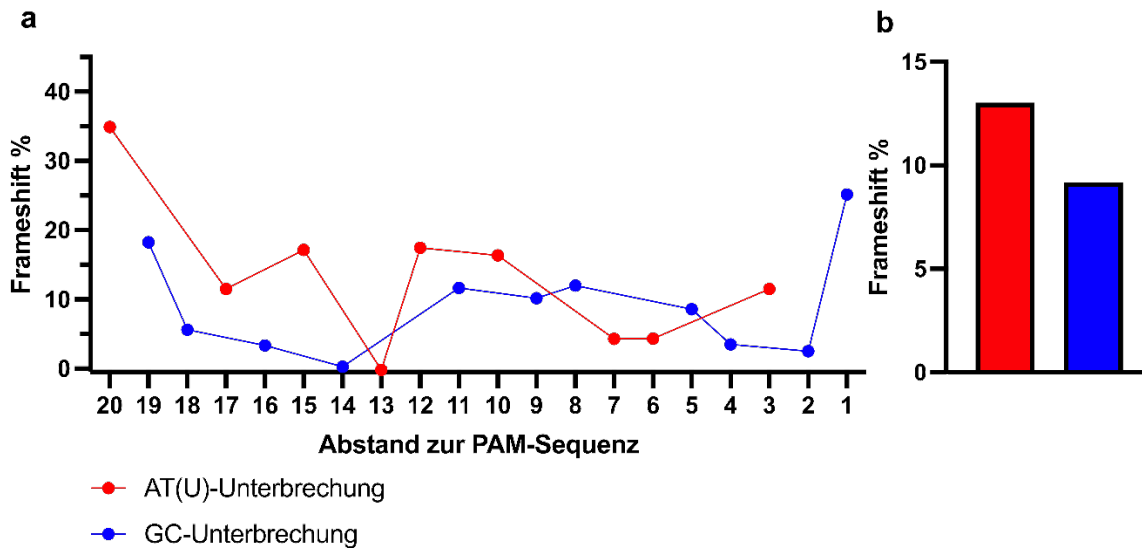


Abbildung 3.7: Frameshift bei Unterbrechung von A-T(U)- und G-C-Basenpaarungen

Dargestellt sind die Mittelwerte des positionsspezifischen Frameshifts bei der Unterbrechung von A-T(U) und G-C-Basenpaarungen durch eine Punktmutation am Target-Strang der DNA (a) sowie der Durchschnitt der Mittelwerte bei einer A-T(U)- und G-C-Unterbrechung (b). Für Erläuterungen zur Standardabweichung s. Abschnitt 3.2.

### 3.2.2 Untersuchung basenspezifischer Target-Strang-Mutationen

Zur Untersuchung, ob die eingebrachte Base im Rahmen einer Mismatch-Basenpaarung einen unterschiedlichen Einfluss auf die Off-Target-Schneideaktivität von WT-SpCa9 hat, wurden die Ergebnisse des BRET-Assays anhand der am Target-Strang hervorgerufenen Base gruppiert (s. Abbildung 3.8).

Eine Punktmutation zu G mit einem durchschnittlichen Frameshift von 16,1 % und zu T mit einem Frameshift von 14,5 % supprimiert die Schneideaktivität weniger als eine Einbringung von C mit einem Frameshift von 4,9 % und A mit einem Frameshift von 6,1 %.

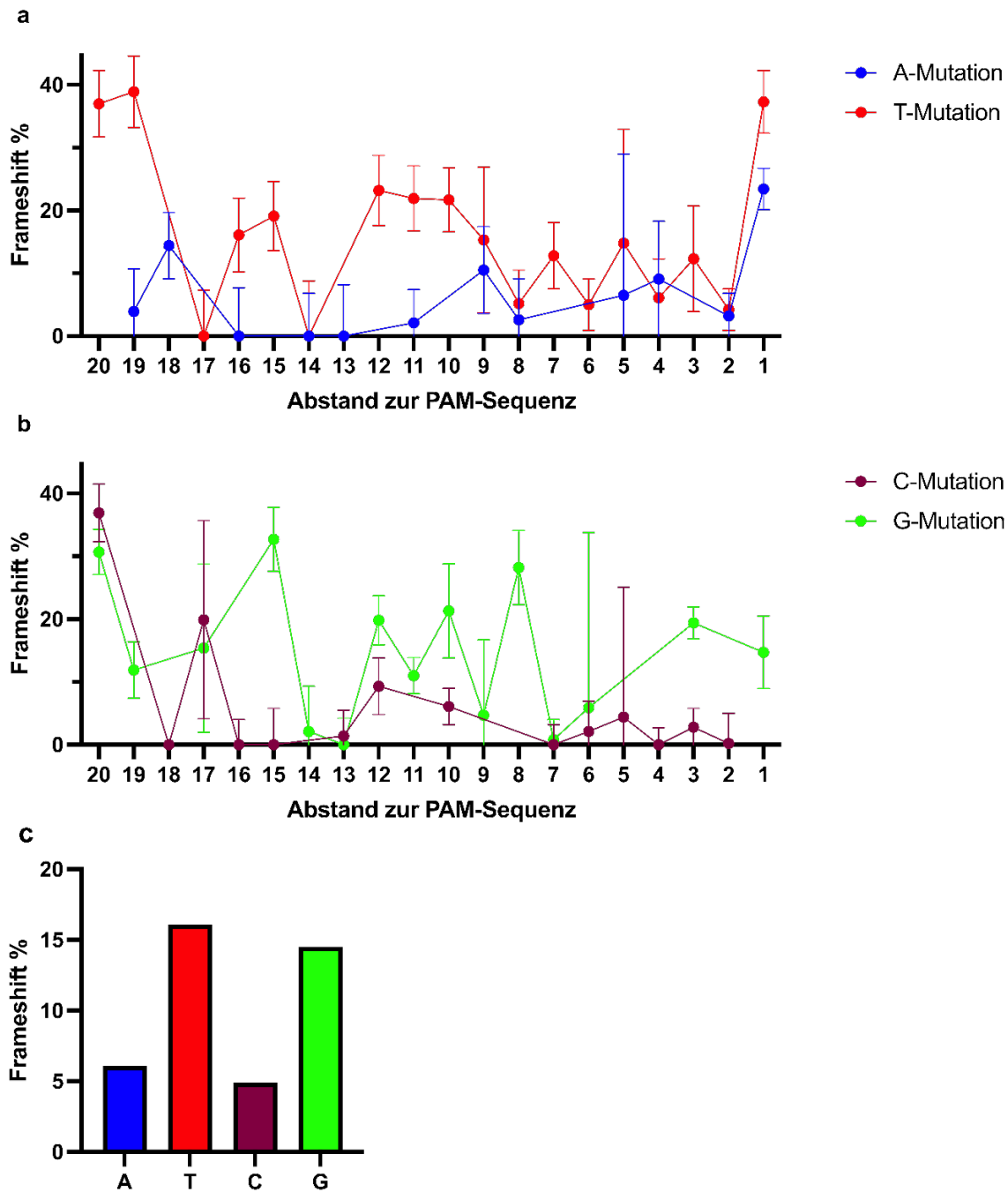
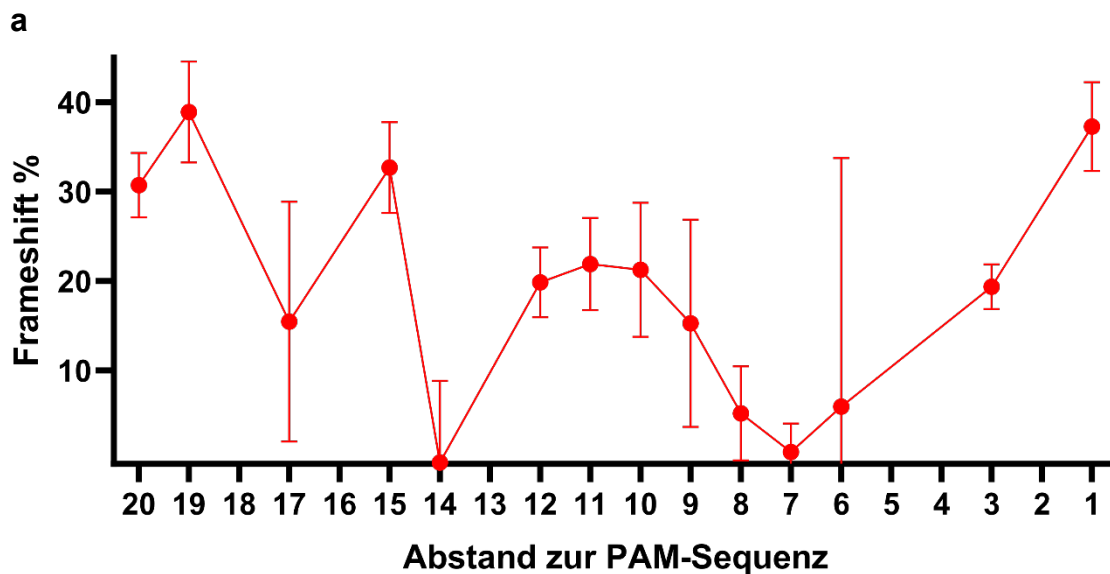


Abbildung 3.8: Frameshift bei Punktmutationen unter Einbringung unterschiedlicher Basen

Dargestellt ist der Frameshift und damit die Schneideaktivität von WT-SpCas9 bei der Einbringung von Adenin und Thymin (a) sowie Cytosin und Guanin (b) mithilfe von Punktmutationen an verschiedenen Positionen des Target-Strangs. Außerdem abgebildet ist der durchschnittliche Frameshift (c). Für Erläuterungen zur Standardabweichung s. Abschnitt 3.2.

### 3.2.3 Untersuchung von Mismatch-Basenpaarungen

Die im BRET-Assay ermittelten Ergebnisse wurden anhand der entstandenen Mismatches gruppiert, um festzustellen, ob verschiedene Mismatch-Basenpaarungen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Schneideaktivität von WT-SpCas9 zeigen (s. Abbildung 3.9). Die Entstehung des Wobble-Basenpaares G-T(U) beeinflusst die Schneideaktivität von WT-SpCas9 am wenigsten und hat mit einem durchschnittlichen Frameshift von 18,9 % unter allen möglichen Mismatches die höchste Aktivität. T-T(U)-Mismatches weisen einen durchschnittlichen Frameshift von 16,3 % und G-G-Mismatches einen Frameshift von 12,1 % auf. Auch C-T(U)-Mismatches lassen mit einem durchschnittlichen Frameshift von 9,8 % Schneideaktivität zu. Der durchschnittliche Frameshift bei A-G-Mismatches wird auf 5,8 % und bei A-C-Mismatches auf 5,6 % reduziert. Bei C-C-Mismatches wird die Schneideaktivität fast vollständig annihiliert.



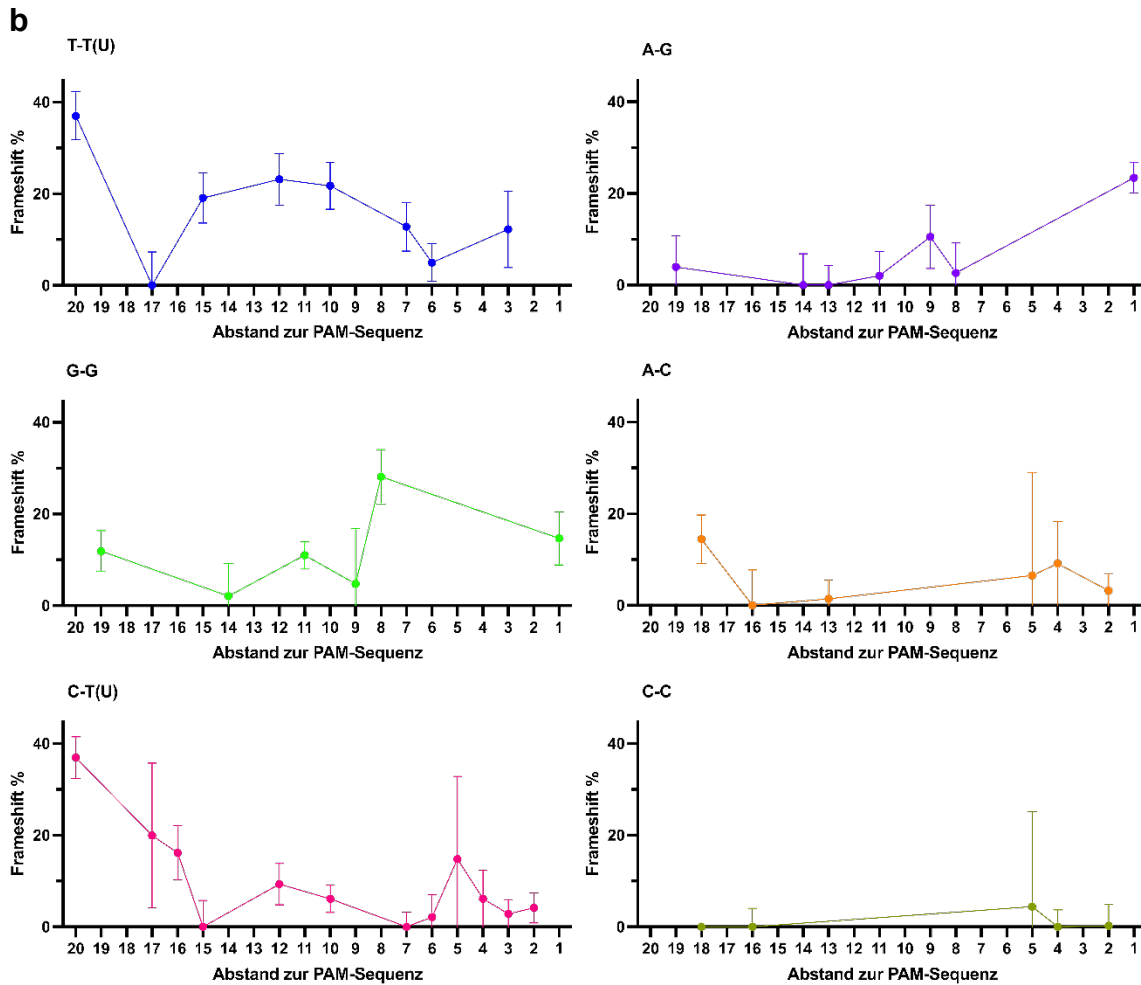


Abbildung 3.9: Frameshift verschiedener Mismatch-Basenpaarungen an verschiedenen Positionen

a: Frameshift der Mismatch-Basenpaarung G-T(U); b: Frameshift der Basenpaarungen T-T(U), G-G, C-T(U), A-G, A-C, C-C.

### 3.2.4 Untersuchung von Purin- und Pyrimidinbasen

Um zu untersuchen, inwiefern Unterschiede der WT-SpCas9-Schneideaktivität beim homologen sowie heterologen Austausch von Purin- und Pyrimidinbasen in der Target-Sequenz vorliegen, wurden die Daten aus dem BRET-Assay in Gruppen zugeordnet (s. Abbildung 3.10). Eine homologe Auswechslung einer Pyrimidinbase in der Target-Sequenz zu einer anderen Pyrimidinbase hin supprimiert die Schneideaktivität mit einem durchschnittlich erhaltenen Frameshift von 17,1 % am wenigsten. Ein Austausch von einer Purinbase zu einer anderen Purinbase behält durchschnittlich 13,7 % Frameshift bei. Davon abzugrenzen ist, dass ein heterologer Basentausch von einer Pyrimidinbase zu einer Purinbase einen Frameshift von 9,6 % hervorruft und eine Auswechslung von einer Purinbase zu einer Pyrimidinbase hin durchschnittlich einen Frameshift von 8 % liefert.

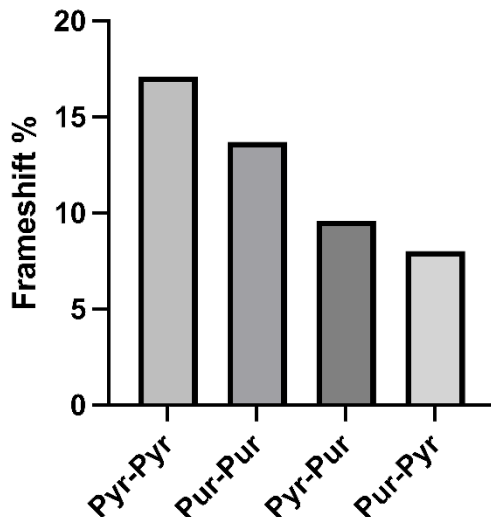


Abbildung 3.10: Frameshift Nukleinbasenaustausch

Abgebildet ist der durchschnittliche Frameshift bei homologen (Pyrimidin-Pyrimidin; Purin-Purin) und heterologen (Pyrimidin-Purin; Purin-Pyrimidin) Nukleinbasenauswechslungen. Für Erläuterungen zur Standardabweichung s. Abschnitt 3.2.

### 3.2.5 Untersuchung der Mismatch-Position

Es wurde die durchschnittliche Schneideaktivität der Mismatch-Target-Sequenzen für jede Position aus den Daten des BRET-Assays (s. Abbildung 3.6) ermittelt, um den Einfluss der Mismatch-Position auf die Schneideaktivität von WT-SpCas9 zu untersuchen (s. Abbildung 3.11). Die Cas9 Endonuklease mit der Guide-Sequenz In6G5 weist sowohl an der am weitesten distal von der PAM-Sequenz gelegenen Position 20 wie auch an der direkt proximal an der PAM-Sequenz gelegenen Position 1 eine erhöhte Mismatch-Toleranz auf. Die Schneideaktivität ist an diesen beiden Positionen am höchsten. Zwischen diesen beiden Positionen ist der Bereich von Position 14-13 mit einem vollständigen Abfall des Frameshifts prominent. Flankiert wird dieser Abschnitt in beide Richtungen mit Positionen durchschnittlich erhöhter Mismatch-Toleranz. Abseits dieser Bereiche scheint die spezifische Mismatch-Toleranz weniger durch die Position bedingt zu sein.

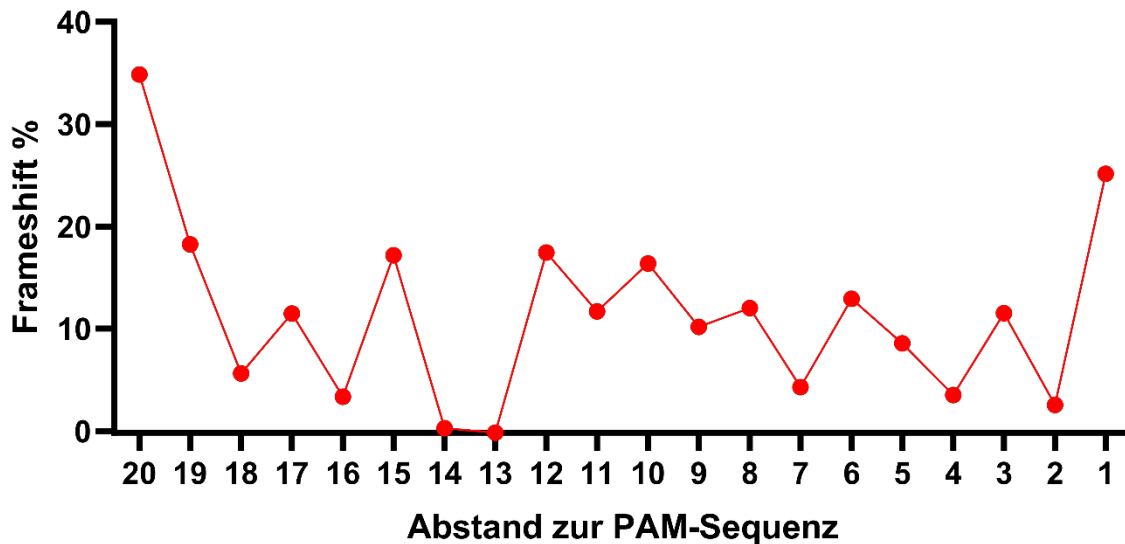


Abbildung 3.11: Durchschnittlicher Frameshift von WT-SpCas9 mit der Guide-Sequenz In6G5

Dargestellt ist der positionsspezifische durchschnittliche Frameshift, berechnet aus den Mittelwerten der WT-SpCas9-Schneideaktivität bei der Verwendung der jeweiligen Mismatch-Target-Sequenzen. Für Erläuterungen zur Standardabweichung s. Abschnitt 3.2.

### 3.3 eSpCas9(1.1)-Analyse mit 1 bp-Mismatch-Sequenzen

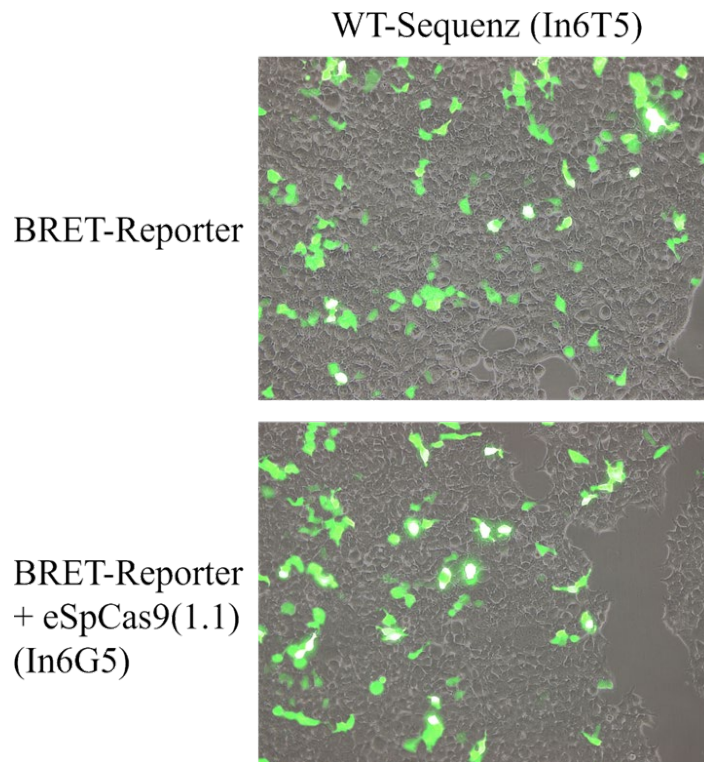
Für die Ermittlung der Schneideaktivität von enhanced specificity SpCas9(1.1) (s. Abschnitt 1.4.1) bei gleicher Guide-Sequenz In6G5, um so die modifizierte Endonuklease zu evaluieren, war es notwendig, das Plasmid (s. Abschnitt 2.1.11) aus *E. coli* zu extrahieren und einen Restriktionsverdau durchzuführen (s. Abschnitt 2.2.1). Nach Ligation wurde das Plasmid in *E. coli* transformiert und dann mithilfe von Ampicillin auf einer LB-Agarplatte selektiert (s. Abschnitte 2.2.4 u. 2.3.2). Es erfolgte eine Plasmidisolation und eine Überprüfung durch Sequenzierung (s. Abschnitte 2.3.4 u. 2.2.6).

#### 3.3.1 Transfektion der BRET-Reporter-Plasmide mit eSpCas9(1.1)

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse aus der Off-Target-Analyse von WT-SpCas9 (s. Abschnitt 3.1) wurden die Target-Sequenzen mit Mutationen an den Positionen 20, 14, 9 und 1 (s. Abschnitt 2.1.12) ausgewählt, um die Schneideaktivität von eSpCas9(1.1) zu untersuchen. Die BRET-Reporter-Plasmide wurden jeweils als Monotransfektion und als Kotransfektion mit dem Plasmid eSpCas9(1.1)(In6G5) transfiziert (s. Abschnitt 2.4.2). Ebenfalls wurde eine Mono- und eine Kotransfektion inklusive dem BRET-Reporter-Plasmid mit der WT-Target-Sequenz InGT5 vorgenommen. Es wurden Phasenkontrast/Fluoreszenz-Overlay-Aufnahmen (s. Abschnitt 2.4.3) angefertigt, von

denen einige in Abbildung 3.12 exemplarisch abgebildet sind (s. Anhang Abbildung 11.4). Grün-fluoreszierende Zellen zeigen eine erfolgreiche Transfektion der BRET-Reporter-Plasmide und eine Expressierung von GFP2 an. Die Persistenz grüner Lichtemissionen nach Kotransfektion mit dem Cas9/Guide-Plasmid weist auf eine allerhöchstens geringfügige Schneideaktivität hin.

**a**



**b**

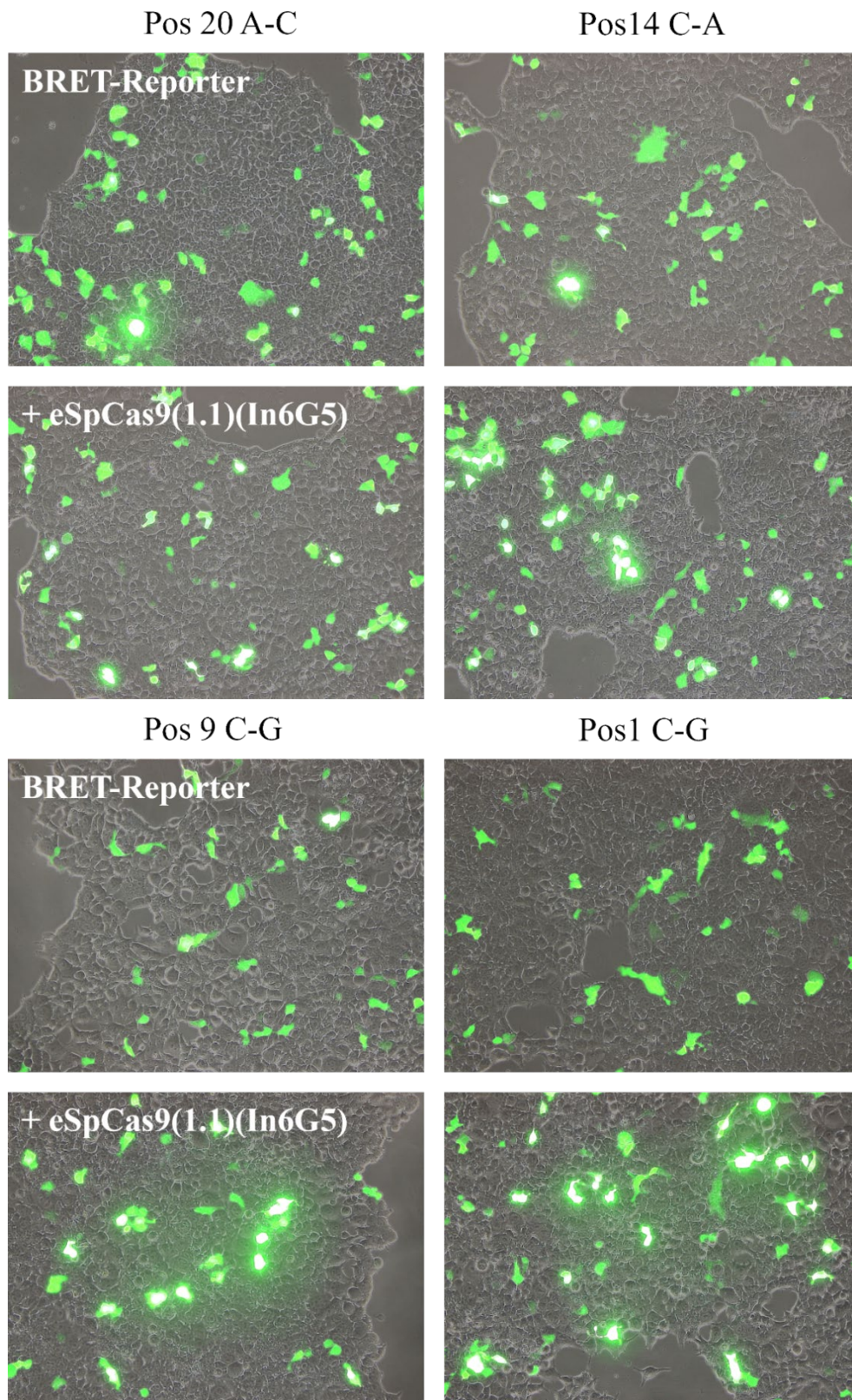


Abbildung 3.12: Fluoreszenz/Phasenkontrast-Overlay-Aufnahmen der mit dem BRET-Reporter-System und eSpCas9(1.1) transfizierten Zellen

Dargestellt wurden die WT-Sequenz (a) und die ausgewählten Mismatch-Target-Sequenzen Nr. 2, 19, 36 und 60 (b).

### 3.3.2 Messung der Mismatch-Schneideaktivität von eSpCas9(1.1) mit dem BRET-Assay

Mithilfe des BRET-Assays (s. Abschnitte 1.5 u. 2.5.2) wurde die Schneideaktivität von eSpCas9(1.1) bei Verwendung der unterschiedlichen Target-Sequenzen ermittelt (s. Abbildung 3.13). Gegenüber der Monotransfektion der BRET-Reporter wird nur bei den Targets Nr. 2 und Nr. 19 bei Kotransfektion mit eSpCas9(1.1) ein signifikanter Abfall der BRET-Ratio und damit eine signifikante Schneideaktivität festgestellt\* (s. Abbildung 11.1 im Anhang). Gegenüber der WT-Sequenz zeigt keine Mismatch-Target-Sequenz einen signifikant unterschiedlichen Frameshift (s. Abbildung 3.13).

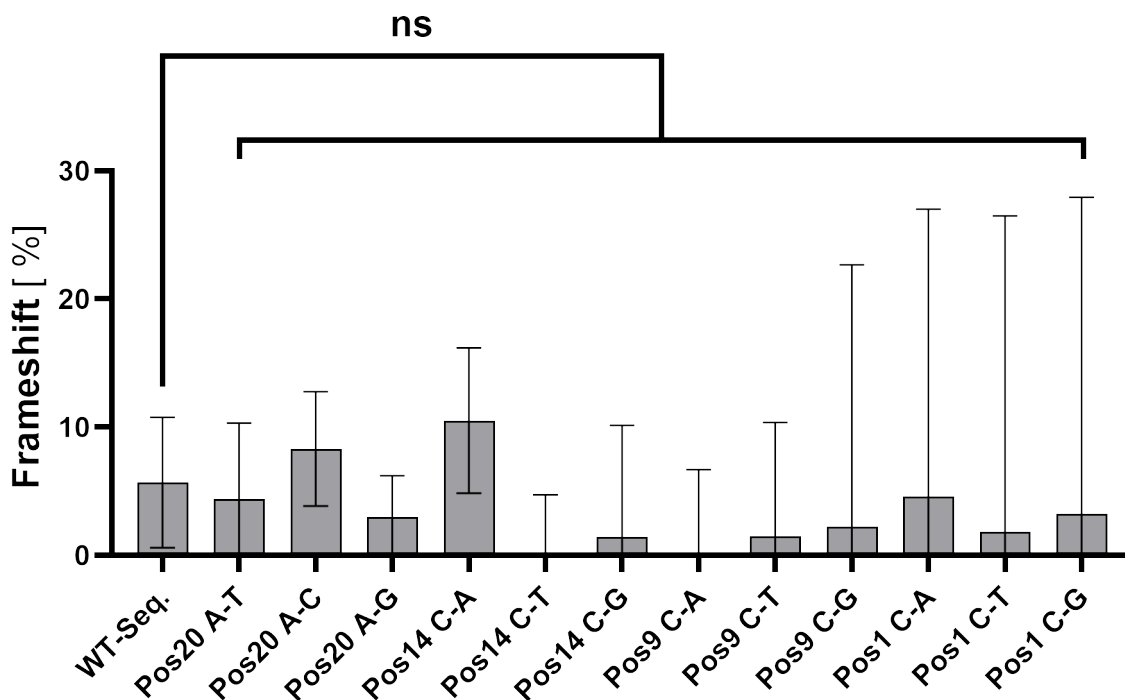


Abbildung 3.13: Schneideaktivität von eSpCas9(1.1) mit der Guide-Sequenz In6G5

Abgebildet ist die Schneideaktivität der modifizierten Cas-Endonuklease eSpCas9(1.1) als Frameshift-Rate in %. Verwendet wurde die Guide-Sequenz In6G5 und aus dem Basisexperiment ausgewählte Target-Sequenzen. Nicht signifikante Unterschiede (ns;  $p > 0.05$ ) der Mismatch-Target-Sequenzen im Vergleich zur WT-Sequenz nach one-way ANOVA mit anschließender Analyse durch die Dunnett-Methode.

Obwohl die Schneideaktivität bei allen Target-Sequenzen sinkt, fällt auf, dass die Schneideaktivität an dem eigentlichen Ziel der WT-Sequenz mit einem Frameshift von  $5,7 \pm 5,1$  % nicht signifikant ist (s. Abbildung 11.1 im Anhang). Sie ist erniedrigt gegenüber Mismatch-Sequenzen wie dem Target Nr. 2 mit einem Austausch von A durch C an Position 20 und einem Frameshift von  $8,3 \pm 4,5$  %. Ebenfalls ist die Aktivität im Vergleich zum Target Nr. 19 geringer, bei dem ein Austausch von C durch A an Position

14 vorliegt. Hier wird an  $10,5 \pm 5,7\%$  der BRET-Reporter-Plasmide ein Frameshift ausgelöst. Weiterhin kann man Standardabweichungen von  $> 3,2\%$  Frameshift an Position 20,  $> 5,5\%$  an Position 14,  $> 8,8\%$  an Position 9 und  $> 22,4\%$  an Position 1 feststellen. Eine Auflistung der Schneideaktivität von eSpCas9(1.1) bei verschiedenen Target-Sequenzen erfolgt in Tabelle 11.2 im Anhang.

### **3.4 Einfluss der Guide-Sequenz auf die Schneideaktivität**

Es wurde die Hypothese einer reduzierten Schneideaktivität von eSpCas9(1.1) aufgrund des Fehlens eines intrinsischen Guanins an Position 20 der Guide-Sequenz geprüft. Dieses G spielt eine Rolle bei der Expression der sgRNA durch den U6-Promoter (Gao et al. 2017; Kim et al. 2017; Mali et al. 2013; Wang et al. 2019; Zhang et al. 2017). Eine neue Guide- und Target-Sequenz mit einem G an Position 20 am 5'-Ende des Guide-Protopacers wurde ausgewählt, um eine Wiederherstellung der Schneideaktivität zu zeigen. Hierbei handelt es sich um die Guide-Sequenz ARTG1 und die komplementäre Target-Sequenz ARTT1 (s. Abschnitt 2.1.12). Diese Target-Sequenz konnte in das BRET-Reporter-Plasmid eingefügt werden. Um einen direkten Vergleich der modifizierten Endonuklease und WT-SpCas9 zu ermöglichen, wurde die Guide-Sequenz sowohl in das eSpCas9(1.1)- als auch in das px459-Plasmid eingesetzt (s. Abschnitt 2.1.11). Die Plasmide wurden in *E. coli* transformiert (s. Abschnitt 2.3.2). Nach einer Selektion erfolgten eine Plasmidisolation und eine Überprüfung durch Sequenzierung (s. Abschnitte 2.3.4 u. 2.2.6).

#### **3.4.1 Transfektion der Cas9-Plasmide mit einem intrinsischen Guanin an Position 20 der Guide-Sequenz**

Das BRET-Reporter-Plasmid mit der Target-Sequenz ARTT1 wurde jeweils ohne und mit den Cas9/Guide-Plasmiden px459(ARTG1) respektive eSpCas9(1.1)(ARTG1) in HEK293-T-Zellen transfiziert (s. Abschnitt 2.4.2). Zum optischen Vergleich der Ergebnisse wurden Phasenkontrast/Fluoreszenz-Overlay-Aufnahmen erstellt (s. Abschnitt 2.4.3). Grüne Lichtemissionen zeigen eine erfolgreiche Transfektion des BRET-Reporter-Plasmids und eine korrekte Expressierung von GFP2. Die Kotransfektion mit den Cas9/Guide-Plasmiden führt zu einem Abfall der GFP-Fluoreszenz.

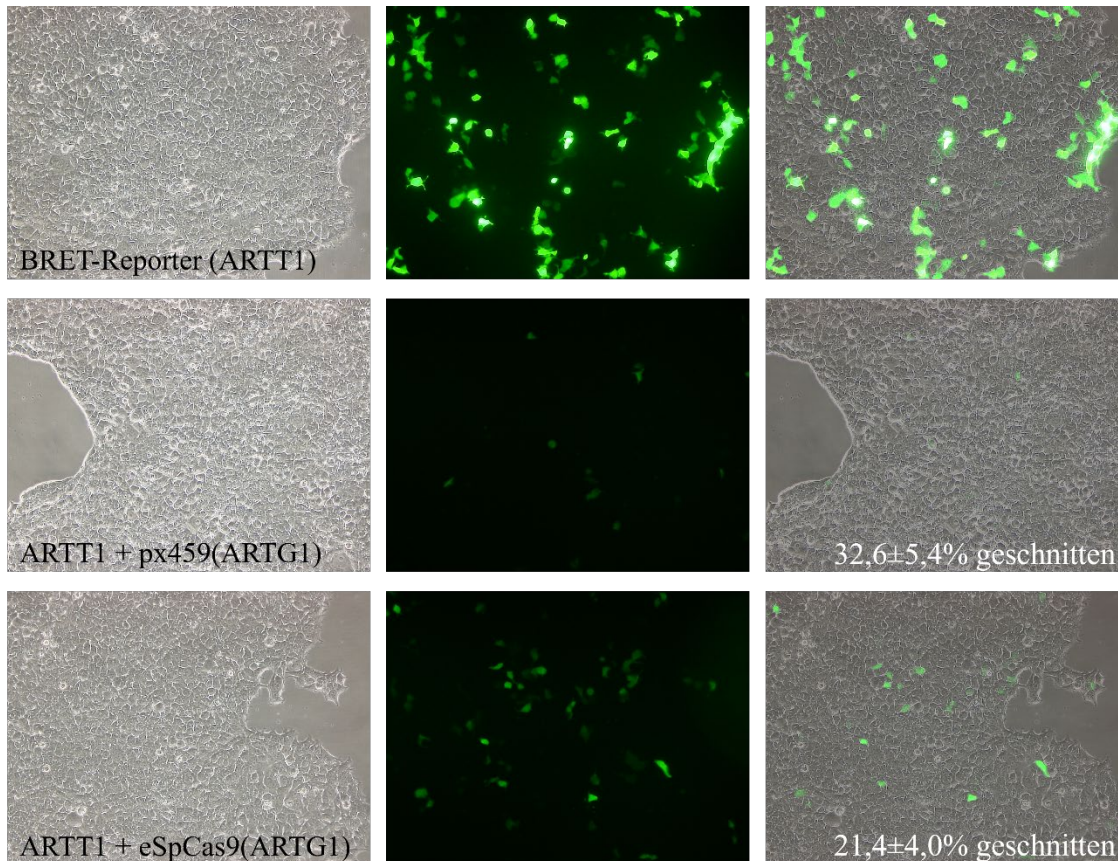


Abbildung 3.14: Fluoreszenzaufnahmen der Transfektionen des BRET-Reporter-Plasmids ARTT1 mit px459(ARTG1) und eSpCas9(ARTG1)

Dargestellt ist die Transfektion des BRET-Reporter Plasmids mit der Target-Sequenz ARTT1 sowie die Kotransfektionen des BRET-Reporter-Plasmides sowohl mit WT-SpCas9 des Plasmids px459 als auch mit der modifizierten Endonuklease eSpCas9(1.1) jeweils mit der Guide-Sequenz ARTG1. Für jede Transfektion werden Phasenkontrast-, GFP-Fluoreszenz- und Overlay-Aufnahmen abgebildet. Zur Veranschaulichung sind den Aufnahmen die im BRET-Assay (s. Abschnitt 3.4.2) ermittelten Schneideaktivitäten angefügt.

### 3.4.2 Messung der Schneideaktivität von Cas9 mit einem intrinsischen Guanin an Position 20 der Guide-Sequenz mit dem BRET-Assay

Zur Ermittlung der Schneideaktivität erfolgte die Untersuchung der extrahierten Proteine durch den BRET-Assay (s. Abschnitte 1.5 u. 2.5.2). Bei der Kotransfektion der Cas9-Plasmide mit dem BRET-Reporter-Plasmid, bei komplementärer Target- und Guide-Sequenz, zeigt sich für beide Cas9 eine Erniedrigung der BRET-Ratio. Die BRET-Ratios der Endonukleasen unterscheiden sich ebenfalls signifikant voneinander. Für WT-SpCas9 wird ein Frameshift von  $32,6 \pm 5,4\%$  ermittelt. Der Frameshift von

eSpCas9(1.1) liegt bei  $21,4 \pm 4,0$  %. Die Schneideaktivitäten der beiden Endonukleasen unterscheiden sich signifikant voneinander.

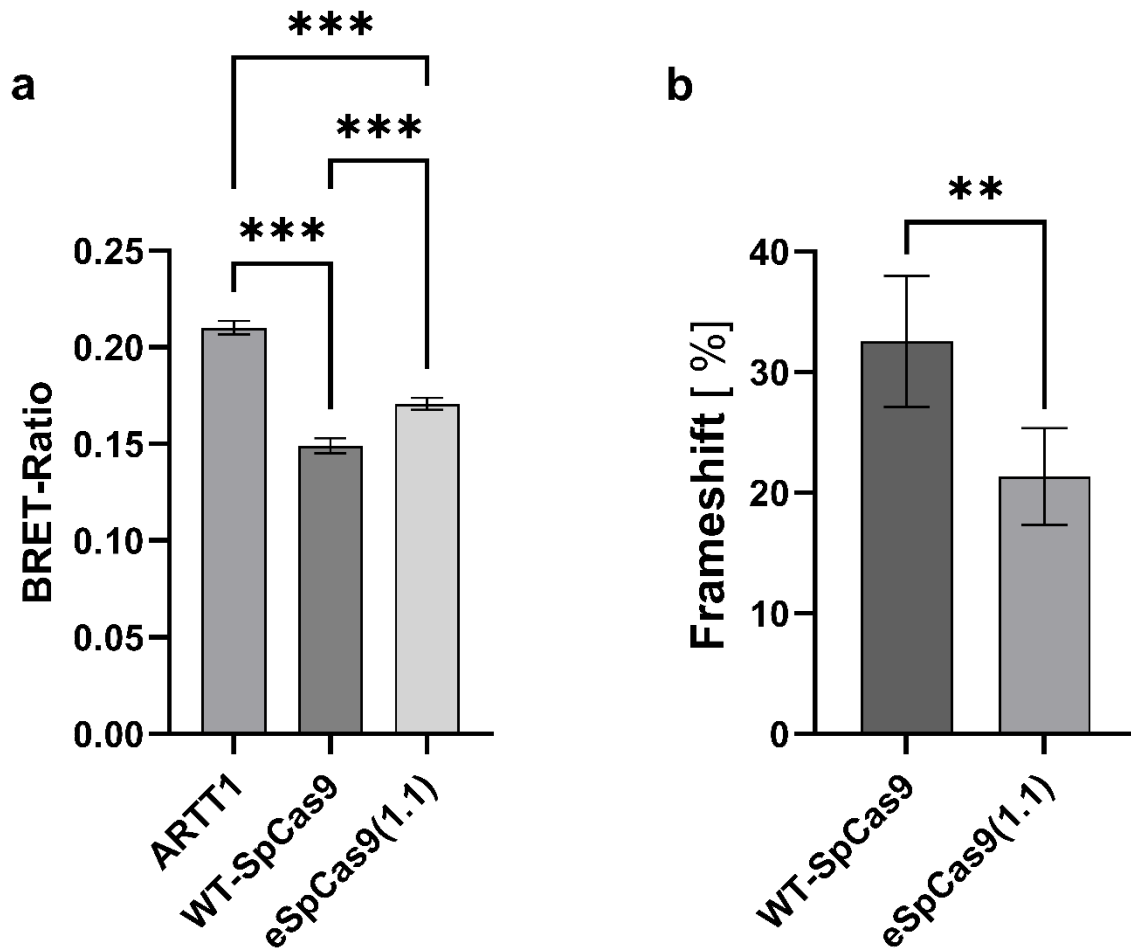


Abbildung 3.15: BRET-Ratio und Frameshift von WT-SpCas9(ARTG1) und eSpCas9(1.1)(ARTG1)

a: BRET-Ratios der Transfektion des BRET-Reporter-Plasmids mit der Target-Sequenz ARTT1 und der Kotransfektionen mit WT-SpCas9 sowie eSpCas9(1.1) mit der Guide-Sequenz ARTG1. \*\*\* $p < 0.001$  nach one-way ANOVA mit anschließender Auswertung mit der Dunnett Methode.

b: Ermittelter Frameshift [%] von WT-SpCas9 und eSpCas9(1.1). \*\* $p < 0.01$  nach ungepaartem t-Test.

## 4 Diskussion

### 4.1 Mismatch Analyse der WT-SpCas9

Die Schneideaktivität der WT-SpCas9-Endonuklease, welche auf dem Plasmid px459 gemeinsam mit der Guide-Sequenz In6G5 kodiert ist, wurde mithilfe des BRET-Reporter-Systems untersucht. Dabei wurden unterschiedliche Target-Sequenzen mit jeweils einer einzelnen Basenmutation im Vergleich zur WT-Sequenz verwendet. Der induzierte Frameshift, welcher auf die Mismatch-Schneideaktivität schließen lässt, unterscheidet sich dabei erheblich. Anhand einer Betrachtung der hervorgerufenen Mismatches zwischen dem Target-Strang der DNA und der Guide-RNA lassen sich Muster ableiten. Unterschiede sind in Hinblick auf die eingeführte Base, das resultierende Mismatch und dessen Position in der Sequenz erkennbar (s. Abschnitt 3.1.4).

Molekularbiologisch ist für die Katalyse eines DSB durch Cas9 eine ausreichend stabile Bindung zwischen Target-Strang der DNA und Guide-Sequenz der RNA notwendig (Jinek et al. 2012). Optimal für eine Bindung und die Ermöglichung einer Schneideaktivität ist somit eine vollständige Übereinstimmung beider Sequenzen im Sinne einer komplementären kanonischen Basenpaarung nach Watson und Crick (Gasiunas et al. 2012). Veränderungen der DNA- oder der RNA- Sequenz durch Insertionen, Deletionen oder den Austausch von Basen können in Konformationsänderungen der DNA oder RNA oder einem Basenmismatch resultieren (Fu et al. 2013; Lin et al. 2014). Mismatches können zu nicht-kanonischen Basenpaarungen führen, die die Bindung der beiden Sequenzen zueinander schwächen und so die Schneideaktivität der Endonuklease beeinflussen (Pacesa et al. 2022a). Die Bindung von Target-Strang und Guide-RNA scheint hierbei eine unterschiedliche Toleranz gegenüber den verschiedenen nicht-kanonischen Basenpaarungen zu besitzen, was auf unterschiedlich stabile Bindungen der Partner zueinander schließen lässt.

#### 4.1.1 Stabilität kanonischer Basenpaarungen

Unter kanonischen Basenpaaren versteht man die Paarung nach Watson und Crick von Guanin (G) und Cytosin (C), vermittelt durch drei Wasserstoffbrückenbindungen (WBB) sowie von Adenin (A) und Thymin (T) respektive Uracil (U) in der RNA mit einer Verbindung durch zwei WBB (Eun 1996). Im Basisexperiment führt die Unterbrechung einer G-C Paarung durch einen Mismatch mit einem durchschnittlichen Frameshift von

9,3 % zu einer geringfügig erhöhten Abnahme der Schneideaktivität als die Disruption einer A-T(U)-Paarung mit einem durchschnittlichen Frameshift von 13 % (s. Abschnitt 3.2.1). Eine erhöhte Streuung der Messwerte innerhalb der Gruppen impliziert eine vorsichtige Interpretation der Ergebnisse. Eine erhöhte Abnahme des Frameshifts würde die Hypothese nach der G-C-Paarungen mit drei WBB gegenüber A-T(U) Paarungen mit zwei WBB einen stärker stabilisierenden Effekt auf eine Bindung zwischen dem Target-DNA-Strang und dem Guide-RNA-Strang haben, unterstützen. (Sugimoto et al. 1995). Eine Unterbrechung von G-C-Paarungen führt demnach zu einer im Verhältnis stärkeren Destabilisierung des DNA-RNA-Komplexes und somit zu einer verringerten Cas9-Schneideaktivität. Eine Hypothese, die sich mithilfe der Tatsache einer ausgeprägten thermodynamischen Stabilität von G-C-Paarungen stützen lässt (Sugimoto et al. 1995; Fu et al. 2013).

#### **4.1.2 Nicht-kanonische Basenpaarungen**

Mismatches von DNA- und RNA-Sequenzen gleicher Länge begünstigen die Entstehung nicht-kanonischer Basenpaarungen (s. Abschnitt 1.2.2). Diese können in Homo-Purin-Mismatches (A-A, G-G), Hetero-Purin-Mismatches (A-G, G-A), Homo-Pyrimidin-Mismatches (T-T(U), C-C), Hetero-Pyrimidin-Mismatches (T-C, C-T) sowie verschiedene Wobble-Mismatches eingeteilt werden. Das prominenteste Wobble-Basenpaar ist G-T(U), welches durch einen Keto-Enol-Tautomerismus ermöglicht wird. Eine weniger häufig vorkommende Paarung liegt bei A-C vor, begünstigt durch einen Amino-Imino-Tautomerismus. Sehr selten liegt eine Wobble-C-T(U)-Paarung vor. Neben der Wobble-Basenpaarung spielt ebenfalls die Hoogsteen-Basenpaarung bei der Bildung von nicht-kanonischen Basenpaaren eine Rolle. (Eun 1996; Pacesa et al. 2022a)

Die Ergebnisse zeigen, dass der Einbau von T und G in die DNA-Sequenz des Target-Strangs, welcher zur Entstehung eines Basen-Mismatch führt, die Cas9-Schneideaktivität durchschnittlich weniger kompromittiert als eine Punktmutation der ursprünglichen Base zu A oder C hin (s. Abschnitt 3.2.2). Es lässt sich festhalten, dass es nach der Einbringung verschiedener Basen zu einer divergierenden Persistenz der Cas9-Schneideaktivität kommt. Man kann ableiten, dass ein Basenaustausch zu G oder T hin die Verbindung zwischen Target-Strang-DNA und dem Cas9-Guide-RNA-Komplex womöglich weniger destabilisiert und deswegen eine erhöhte Mismatch-Toleranz zulässt.

Genauso wie die Einbringung verschiedener Basen in die DNA des Targets lassen sich auch die unterschiedlichen Mismatches, welche durch die Punktmutationen des Target-Strangs zwischen DNA und RNA entstehen, in ihrem tolerierten Frameshift unterscheiden (s. Abschnitt 3.2.3). Das Wobble-Basenpaar G-T(U) scheint die Stabilität der Bindung von DNA und RNA am wenigsten zu beeinflussen. Mit einem durchschnittlichen Frameshift von 18,9 % zeigt es den geringsten Einfluss auf die Schneideaktivität von WT-SpCas9. T-T(U)-Mismatches und G-G- Mismatches scheinen die Souveränität des DNA-RNA-Komplexes ebenfalls weniger zu gefährden und bezogen auf die Schneideaktivität eine höhere Toleranz aufzuweisen. Auch C-T(U)-Mismatches lassen signifikante Schneideaktivität zu. A-G- und A-C-Mismatches reduzieren die Schneideaktivität an vielen Positionen höhergradig. Die untersuchten C-C-Mismatches zeigen keine signifikante Schneideaktivität. Alle Mismatch-Paarungen führten zu einer im Vergleich zur Kombination von WT-Target und WT-Guide-Sequenz ohne Mismatches signifikant reduzierten Schneideaktivität (s. Abschnitt 3.1.4). Die unterschiedliche Störung der Schneideaktivität und insbesondere deren erhebliche Toleranz bei G-T(U)-Mismatches sowie gravierendste Unterbrechung bei vorkommenden C-C-Mismatches deckt sich mit vergleichbaren Experimenten (Hsu et al. 2013; Doench et al. 2016).

Homologe Auswechslungen von Pyrimidin- und Purinbasen reduzieren die Cas9-Schneideaktivität geringfügiger als ein heterologer Austausch (s. Abschnitt 3.2.4). Hervorzuheben ist, dass bei einem homologen Pyrimidinbasentausch von C zu T regelhaft mit der unveränderten Base der Guide-RNA das vorteilhafte G-T-Wobble-Basenpaar als Mismatch entsteht. Diskutiert wird in der Forschung eine für die Cas-Schneideaktivität verträglichere Einbringung der kleineren Pyrimidinbasen (Jones et al. 2021).

Im Zusammenhang mit nicht-kanonischen-Basenpaarungen werden verschiedene Mechanismen und Wechselwirkungen diskutiert. Für Homo-Pyrimidin-Mismatches wurde zum Beispiel ermittelt, dass sie mit Verzerrungen des (Desoxy)-Ribose-Phosphat-Rückgrats einhergehen und so die Duplexbreite verringern (Pacesa et al. 2022a). Trotz erheblicher strukturellen Veränderungen des Duplexes aus DNA und RNA, die mit der Reaktion auf Mismatches einhergehen, erhält dieser bis auf spezielle Ausnahmen weitestgehend die Basenpaarstapelung bei, welche für seine Stabilität ausschlaggebend ist (Yakovchuk et al. 2006; Pacesa et al. 2022a). Außerdem kann Cas9 als Multidomänen-Protein lokale Verzerrungen in der Struktur des DNA-RNA-Duplexes ausgleichen, indem

es kompensatorische Umlagerungen der REC2-, REC3- und HNH-Domänen ermöglicht (Chen et al. 2017). So ist Cas9 in der Lage, fast alle atomaren Kontakte zum Guide-RNA-TS-DNA-Duplex zu erhalten (Pacesa et al. 2022a). Strukturelle Analysen deuten darauf hin, dass Cas9 die Passgenauigkeit von Target-Strang-DNA und Guide-RNA ausgenommen von der PAM-distalen-Region lediglich indirekt über die Heteroduplex-Weite determiniert (Pacesa et al. 2022a). Diese ergibt sich aus der Gesamtheit aller relevanten intermolekularer Kontakte sowie Wechselwirkungen. Insbesondere die Mismatch-Basenpaarungen üben einen Einfluss aus.

### **4.1.3 Positionsabhängige Mismatch-Toleranz**

Distal von der PAM-Sequenz an Position 20 und proximal der PAM-Sequenz an Position 1 zeigt WT-SpCas9 mit der Guide-Sequenz In6G5 die höchste Mismatch-Toleranz (s. Abschnitt 3.2.5). Zwischen diesen beiden Positionen liegt von Position 14-13 ein Bereich mit vollständigem Abfall des Frameshifts. Außerhalb dieser Bereiche scheint die spezifische Mismatch-Toleranz vor allem durch die verschiedenen Basenauswechslungen sowie die entstandenen Mismatches beeinflusst und weniger positionsbedingt zu sein.

In der Forschung wird die Bedeutung einer Seed-Sequenz diskutiert, welche sich je nach Quelle 8-12 bp proximal an der PAM-Sequenz befindet und eine besondere Wichtigkeit für die Spezifität des Bindungs- und Schneideverhaltens von Cas9 besitzt (Hsu et al. 2013; Jiang et al. 2013; Jinek et al. 2012; Le Cong et al. 2013). Die Seed-Sequenz hat unter anderem auch Einfluss auf die Ablesbarkeit der Chromatinstruktur (Wu et al. 2014). Weiterhin unterstützt sie die Assoziation der Guide-RNA mit Cas9, also die Bildung des RNP-Komplexes und damit die Überführung der Endonuklease in ihren funktionalen Zustand (Wang et al. 2014).

Mismatches innerhalb dieser Sequenz haben eine wichtige Bedeutung für die Bindung der Guide-RNA an die Target-Site sowie die Bildung einer R-Loop-Formation und können die Cas9-Schneideaktivität somit erheblich einschränken (Ivanov et al. 2020). Die höhere Sensitivität für Mismatches in der Seed-Sequenz könnte darauf zurückzuführen sein, dass hier eine Off-Target-Bindung lediglich mit einer Deformation des DNA-Target-Strangs und damit mit einem energetisch ungünstigeren Zustand zu vereinbaren ist (Pacesa et al. 2022a). Ebenfalls kann diese Deformation in einigen Fällen

zwar eine Bindung ermöglichen, jedoch eine Off-Target-Schneideaktivität durch eine Behinderung der HNH-Domäne limitieren (Dagdas et al. 2017).

Das Vorliegen einer solchen Seed-Region kann bei dieser spezifischen Sequenz nicht eindeutig bestätigt werden. Dies deckt sich mit dem aktuellen Konsens, nachdem in verschiedenen Sequenzen unterschiedliche, für Mismatches sensitive Positionen existieren (Hsu et al. 2013; Fu et al. 2013; Capon et al. 2017; Rabinowitz und Offen 2021). Verschiedene Guide- und Target-Sequenzen weisen eine erhebliche sequenzspezifische Varianz in ihrem Bindungsverhalten und der Toleranz von Mismatches an spezifischen Positionen auf. Ein striktes Prinzip zum Vorliegen einer stark Mismatch-sensitiven Seed-Sequenz ist daher nicht auf alle Sequenzen übertragbar (Rabinowitz und Offen 2021). Cas9 ist insbesondere bei Einzelmutationen nicht uneingeschränkt in der Lage, zwischen der proximalen Seed- und der distalen Non-Seed-Sequenz zu differenzieren (Cho et al. 2014). Dies legt eine sequenzabhängige Bedeutung der Seed-Region für verschiedene Guide-RNA und Target-Sites nahe (Capon et al. 2017). Bei der Target-Sequenz In6T5 lassen sich indirekte Merkmale erkennen, welche auf eine vorhandene, jedoch labile Seed-Region hinweisen können. In der Forschung kann innerhalb der Seed-Sequenz eine Subregion dargestellt werden, die sich von Position 2 zu 8 erstreckt und gegenüber den anderen Seed-Positionen eine größere Mismatchsensitivität aufweist (Rabinowitz und Offen 2021). Diese Ausprägung lässt sich in den Experimenten anhand eines stärker persistierenden Frameshifts an Position 10 und besonders an einer gegenüber der restlichen Seed-Sequenz erhöhten Cas9-Schneideaktivität an Position 1 wiedererkennen. Einen weiteren Anhalt für die Existenz einer Seed-Sequenz stellt die Betrachtung der Schneideaktivität bei Vorliegen des energetisch vorteilhaften Wobble-Basenpaar-Mismatches G-T(U) an verschiedenen Positionen dar. So behindert eine Wobble-Basenpaarung innerhalb der Seed-Sequenz von Position 1-10 die Cas9-Schneideaktivität deutlicher als außerhalb von dieser in der Non-Seed-Sequenz von Position 11-20. Besonders in der Seed-Subregion von Position 2-8 unterdrückt ein G-T(U)-Mismatch den ausgelösten Frameshift (s. Abschnitt 3.2.3). Die Rigidität der Seed-Sequenz und der PAM-Distalen-Region in Bezug auf Wobble-Basenpaarungen wurde bereits in verschiedenen Studien untersucht (Hsu et al. 2013; Doench et al. 2016; Jones et al. 2021).

PAM-Distale-Mismatches in der Non-Seed-Sequenz sind gegenüber Mismatches in der Seed-Sequenz durch eine höhere Toleranz bei der Bindung sowie Schneideaktivität an

Off-Target-Sites charakterisiert (Fu et al. 2013; Hsu et al. 2013; Pattanayak et al. 2013). Cas9 ist mit der Guide-RNA mitunter auch bei multiplen Mismatches in dieser Region in der Lage, stabil an die Off-Target-Site zu binden und einen DSB einzufügen (Kuscu et al. 2014).

Konformationsänderungen können häufig zu inaktiven katalytischen Komplexen führen und damit eine Schneideaktivität behindern (Dagdas et al. 2017; Ivanov et al. 2020). Bei der Prüfung der Integrität der distalen Bindung zwischen Guide-RNA und Target-Strang spielt die REC3-Domäne eine entscheidende Rolle. Sie reguliert außerdem die für die Erkennung und Bindung wichtige REC2-Domäne und die schneideaktive HNH-Domäne. Im Falle einer unzureichenden Hybridisierung des PAM-distalen-Abschnitts hält die REC3-Domäne Cas9 in einem inaktiven Zustand und inhibiert das Einfügen eines DSB (Chen et al. 2017). Mismatches am PAM-Distalen Ende der Sequenz sind dazu prädestiniert, eine Entkopplung des Heteroduplexes und eine unvollständige Formation des R-Loop zu provozieren. Dies kann zu einer Neupositionierung der REC3-Domäne führen und im Verlauf zu einem Konformationszustand, welcher die Schneideaktivität von Cas9 blockiert (Pacesa et al. 2022a).

An den Positionen 13 und 14 führt jeder Basenaustausch in der Target-Sequenz zu einem vollständigen Abfall der Schneideaktivität. Dies weist auf eine besondere Vulnerabilität dieser Positionen für Mismatches hin. Die beiden Positionen liegen außerhalb der Seed-Sequenz am PAM-proximalen-Ende der Non-Seed-Sequenz. Eine Lokalisation, für die in der Forschung im Gegensatz zu den angrenzenden Positionen keine Beziehung zur bereits beschriebenen REC3-Domäne nachgewiesen wurde, was entgegen der Ergebnisse üblicherweise eine erhöhte Mismatch-Toleranz bedeuten würde (Bravo et al. 2022; Zhang et al. 2023). In dieser spezifischen Sequenz jedoch stellen die beiden Positionen die wohl vulnerabelste Region der Basenabfolge dar.

Im Gesamtblick verdeutlichen die Ergebnisse, dass die Cas9-Spezifität für die Bindung und daraus folgende Schneideaktivität sowohl durch eine labile Seed-Region als auch durch die Non-Seed-Region determiniert ist. Unterschiede in der Schneideaktivität lassen sich teilweise eindrücklicher mit bestimmten Basenauswechslungen und Mismatches als mit spezifischen Positionen in Verbindung bringen. Einzelne Positionen wie die PAM-proximale Position 1 und die PAM-distale Position 20, welche durch eine erhöhte Mismatch-Toleranz charakterisiert sind, sowie die Positionen 13 und 14, die eine starke Vulnerabilität gegenüber eingefügten Mismatches aufweisen, heben sich durch

konsistente Ergebnisse bei allen möglichen Mismatches davon ab. Die aktuelle Datenlage ergibt, dass verschiedene Mismatches abhängig von ihrer Position im Guide-RNA-TS-DNA-Duplex zu Konformationsänderungen führen, welche in Wechselwirkung zu den benachbarten Basenpaaren stehen (Pacesa et al. 2022a). Die persistierende Problematik bleibt, dass Einzel-Basen-Mismatches weder in der üblichen Seed-Sequenz noch in der Non-Seed-Sequenz die Cas9-Schneideaktivität stark genug inhibieren.

## **4.2 eSpCas9(1.1) als modifizierte Endonuklease**

Die Verwendung von eSpCas9(1.1) mit der Guide-Sequenz In6G5 reduziert die Off-Target-Aktivität an allen Positionen (s. Abschnitt 3.3.2). An den Positionen 1 und 9 kommt es zu keiner signifikanten Schneideaktivität, was auf eine Fragilität der Seed-Sequenz bei der Verwendung der modifizierten Endonuklease hinweist. Dem gegenüberzustellen ist die nicht signifikante On-Target-Aktivität bei der Verwendung dieser spezifischen Guide-Sequenz, welche die Off-Target-Aktivität zweier Mismatch-Sequenzen unterschreitet (s. Abbildung 3.13). Die Verwendung der Guide-Sequenz ARTG1 mit der vollständig komplementären Target-Sequenz ARTT1 ermöglicht eSpCas9(1.1) die Auslösung eines gesteigerten Frameshifts an der designierten WT-Target-Sequenz (s. Abschnitt 3.4.2). Dies weist auf große sequenzspezifische Unterschiede in der Schneidefunktion hin und verdeutlicht den ausgeprägten Einfluss der Auswahl von Target- sowie Guide-Sequenz auf die On-Target-Schneideaktivität von eSpCas9(1.1). Die Unterschiede könnten einerseits auf die Auswahl der Target-Site zurückzuführen sein, da bekannt ist, dass modifizierte Endonucleasen nicht an allen Destinationen ihr volles Potenzial entfalten können, oder in Beziehung zur Auswahl der Guide-Sequenz stehen (Kim et al. 2017; Lee et al. 2018). Es ist möglich, dass eSpCas9(1.1) im Vergleich zu WT-SpCas9 anfälliger gegenüber dem Fehlen eines intrinsischen Guanins an Position 20 am 5'-Ende der Guide-Sequenz sein könnte, welches in Beziehung zur Expression der sgRNA durch den U6-Promoter steht (Kim et al. 2017; Mali et al. 2013; Zhang et al. 2017). Die fehlende On-Target-Aktivität bei der Verwendung der Guide-Sequenz In6G5 kann somit durch die Verwendung der Guide-Sequenz ARTG1 erfolgreich wiederhergestellt werden. Ausstehend bliebe jedoch die Ermittlung der Off-Target-Aktivität beim Einsatz von eSpCas9(1.1) mit der Guide-Sequenz ARTG1 unter der Verwendung verschiedener Off-Target-Sequenzen, um eine vorteilhafte Auswahl von Endonucleasen für unterschiedliche Target-Sites zu evaluieren. Interessant zu erforschen wäre es, ob die erhöhte Schneideaktivität an der On-Target-Site

bei Verwendung der Guide-Sequenz ARTG1 auch mit einer höheren Mismatch-Toleranz einhergeht und zu einer erhöhten Off-Target-Aktivität an Off-Target-Sites führt.

Das untersuchte eSpCas9(1.1) (s. Abschnitt 1.4.1) ist ein Vertreter der strukturell durch Protein Engineering auf molekularbiologischer Ebene modifizierten Cas9-Endonukleasen mit im Vergleich zu WT-SpCas9 verbesserten Spezifitätseigenschaften (Kulcsár et al. 2017; Slaymaker et al. 2016). Der Mechanismus einer erhöhten Spezifität könnte darauf zurückzuführen sein, dass modifizierte Endonukleasen eine erhöhte Anfälligkeit für Mismatches besitzen, was die Vermittlung eines dekondensierten entwundenen Zustands des DNA-Duplexes hemmt (Singh et al. 2018). Das Gleichgewicht kondensierter und dekondensierter DNA wird so zum gewundenen Duplex hin verschoben (Singh et al. 2018). Durch die Inhibition der Entwindung wie auch der Bindung an Sequenzen mit Mismatches in Kombination mit einer verlangsamten intrinsischen Schneideaktivität der synthetischen Endonukleasen verringert sich die Wahrscheinlichkeit zur Einfügung eines DSB an transient dekondensierten Off-Target-Sites (Lee et al. 2018; Singh et al. 2018).

Ein zielgerichtetes Protein Engineering anhand struktureller Erkenntnisse über Cas9, gewonnen aus gerichteten sowie ungerichteten Konstruktionsverfahren, aber natürlich auch aus Mismatch-Analysen, stellt eine Option zur Erhöhung der Spezifität der Cas9-Endonukleasen dar. Auf diese Weise kann es wesentlich zur Anwendung von CRISPR/Cas9 im Rahmen der Gentherapie am Menschen beitragen. Perspektivisch ist eine Erforschung weiterer Modifikationen unabdingbar, um womöglich aufsummiert und in Kombination mit anderen spezifitätsverbessernden Maßnahmen ein Werkzeug und Therapeutikum zu schaffen, das einen zielgerichteten Einsatz ermöglicht und den Adressaten primär nicht schädigt. Die Kreuzung der beiden modifizierten Varianten eSpCas9(1.1) und SpCas9-HF1 wurde bereits in der Vergangenheit versucht (Kulcsár et al. 2017). Obwohl bereits Verfahren mit hohem Durchsatz zur Evaluation der Spezifität verschiedener modifizierter Cas9-Varianten entwickelt wurden, ist der Vergleich unterschiedlicher artifizieller Cas-Endonukleasen nicht trivial. Wie auch in den beschriebenen Experimenten festgestellt, existiert eine große Diversität an On-Target-Sites mit unterschiedlichen Effekten auf Schneideaktivität und Spezifität (Lee et al. 2018; Schmid-Burgk et al. 2020). Der Gedanke liegt nahe, dass nicht eine generell überlegene modifizierte Endonuklease die Lösung der Off-Target-Problematik ist, sondern für spezifische On-Target-Sites und Aufgaben auch verschiedene CRISPR/Cas-Verfahren

benötigt werden könnten, um einen optimalen Effekt zu erzeugen (Kulcsár et al. 2017). Das Guide-Design, also die genaue Basenabfolge der RNA mit positionsspezifisch favorisierten und benachteiligten Basen, beeinflusst ebenfalls die On-Target-Aktivität und Spezifität der Endonukleasen (Wang et al. 2019). Ein Verfahren, welches aktuell in Konkurrenz zu modifizierten Cas9-Endonukleasen steht, ist der SNP-abgeleitete PAM-Verfahrensansatz (SNP-derived PAM approach). Dieser liefert akkurate Ergebnisse und kann womöglich auch in Kombination mit modifizierten Endonukleasen verwendet werden (György et al. 2019; Rabinowitz und Offen 2021). Auch eine funktionelle Zusammenstellung der synthetischen Cas9-Varianten mit anderen spezifitätserhöhenden Maßnahmen ist denkbar. Der Einsatz gekürzter, aber auch verlängerter sgRNAs oder eine Verbringung als vorgefertigter RNP-Komplex wurde bereits erprobt (Kulcsár et al. 2020; Lee et al. 2018; Vakulskas et al. 2018). Häufig sind jedoch im Gegensatz zum Einsatz bei WT-Cas9 spezielle Varianten oder weitere Modifikationen wie zum Beispiel die sogenannten Blackjack-Mutationen notwendig, um eine Kompatibilität zu schaffen, ohne die On-Target-Aktivität zu beeinträchtigen (Kulcsár et al. 2020; Vakulskas et al. 2018). Die kontinuierlich fortschreitende Erstellung und Erforschung weiterer Vertreter der in dieser Arbeit behandelten klassischen modifizierten Cas9 wie zum Beispiel im Falle von SpartaCas oder SuperFi-Cas9 verdeutlicht das noch ungenutzte Potenzial dieser synthetischen Varianten (Bravo et al. 2022; Cerchione et al. 2020). Die stetige Entwicklung führt insbesondere zu einer Erweiterung des Horizonts in Bezug auf die Off-Target-Aktivität sowie auf die Spezifität von Cas9.

### **4.3 Mismatch-Analyse mit dem BRET-Reporter-System**

Mit der vorliegenden Untersuchung konnte das BRET-Reporter-System erfolgreich mit dem Verfahren der Mismatch-Analyse zur Erforschung von CRISPR/Cas9 über Protein-Protein-Wechselwirkungen kombiniert werden. Die Methodik basiert auf der Einfügung artifiziell designter Target-Sequenzen, die jeweils einen Mismatch zur ansonsten komplementären Guide-RNA enthalten, in die Klonierungsbox des BRET-Reporter-Plasmids, welches die Grundlage für den BRET-Reporter-Assay bildet (s. Abschnitte 1.5 u. 2.5.2). Auswirkungen der einzelnen Mismatches auf die Interaktion des Cas9-RNP-Komplexes und verschiedener Target-Sequenzen konnten so mithilfe der durch zelluläre Reparaturmechanismen hervorgerufenen Indels, welche eine Reduktion der GFP2-Fluoreszenz bewirken, durch das BRET-Reportersystems quantifiziert werden (s. Abschnitt 3).

Alternative Methoden zur Untersuchung der CRISPR/Cas-Schneideaktivität mit unterschiedlichen Eigenschaften und Einschränkungen bieten der T7-Endonuklease-Assay, welcher eine schnelle Visualisierung von Indels durch Erkennung und Spaltung von nicht-übereinstimmenden re-hybridisierten PCR-Produkten ermöglicht, das Interference of CRISPR Edits-Verfahren (ICE), das Tracking of Indels by Decomposition (TIDE) beziehungsweise Tracking of Insertions, Deletions and Recombination Events (TIDER) oder das Indel Detection by Amplicon Analysis (IDAA) (Brinkman und van Steensel 2019; Conant et al. 2022; Lonowski et al. 2017; Qiu et al. 2004; Robb 2019; Wimmer et al. 2021). In dieser Arbeit werden die Ergebnisse des BRET-Assays mit der visuellen Überprüfung durch Fluoreszenzmikroskopie unterstützt.

Verschiedene vorteilhafte Attribute heben das BRET-Reportersystem hervor und unterstützen die Wahl des Verfahrens für die Durchführung der verschiedenen Mismatch-Analysen innerhalb der vorliegenden Arbeit. Zu den Besonderheiten des BRET-Reportersystems, welche es von anderen Framekorrektur- beziehungsweise Disruptionsreportersystemen unterscheidet, gehört der interne Standard einer ratiometrischen Messung, der konzentrations- und transfektionsbedingte Einflüsse bis zu einem gewissen Grad eliminieren kann (Wimmer et al. 2021). Auch die einfache Handhabung des BRET-Reporter-System und die Schnelligkeit des Verfahrens, mit der Untersuchungen mehrerer Experimente gleichzeitig innerhalb von 24 Stunden durchgeführt werden können, stellen vorteilhafte Charakteristika dar (Wimmer et al. 2021). Perspektivisch ist es außerdem günstig, dass der BRET-Reporter leicht als Plasmid, aber auch über virale oder nicht-virale Transfermethoden in lebende Zielzellen transportiert werden kann, wo das Reporter-System unter Einsatz eines nicht-toxischen Substrats ohne die Notwendigkeit einer exogenen Lichtquelle zur Anregung des Donors funktionsfähig ist (Wimmer et al. 2021).

Anzumerken ist, dass diese Arbeit einige Limitationen aufweist. Diese sind zum einen strukturell über die begrenzte Anzahl der Target- und Guide-Sequenzen, die Verwendung der Zelllinie HEK293-T sowie die Vereinfachung der Experimente in einem *in-vitro*-Setting zu definieren. Zum anderen ermöglicht der BRET-Assay keine Differenzierung zwischen Bindung und Schneideaktivität von Cas9. Dies stellt aufgrund der Tatsache, dass eine Bindung des Cas9 nicht mit einer Aktivierung der Nuklease-Domänen und einer daraus folgenden Schneideaktivität gleichzusetzen ist, einen toten Winkel vieler Verfahren dar, welcher jedoch für eine primäre Untersuchung der Off-Target-

Schneideaktivität zweitrangig ist (O'Geen et al. 2015). Erschwert ist die Analyse von Target-Sequenzen mit darin enthaltenen Stop-Codons, welche im Rahmen der Transkription zu einem Abbruch des Vorgangs führen und die Bildung eines funktionsfähigen BRET-Reporters inhibieren; eine Problematik, die adressiert werden kann, indem die zu untersuchende Target-Sequenz um wenige Basenpaare in 5' oder 3'-Richtung angepasst wird (Wimmer et al. 2021).

Eine erwünschte Eigenschaft der Verfahren zur Mismatch-Analyse ist die Verhinderung eines Vorkommens von Cas9 im Exzess. Die disproportionale Verteilung von Cas9-Proteinen im Vergleich zu Zielzellen kann das Risiko für Mismatches und eine Off-Target-Aktivität erhöhen (Hsu et al. 2013; Hsu et al. 2014; Kuscü et al. 2014; Pattanayak et al. 2013; Rabinowitz und Offen 2021). Statistisch betrachtet steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Cas9 während des Rangierens durch das Zielgenom primär fehlpaart oder sekundär Mismatches verursacht, wenn On-Target-Sites bereits durch andere Cas9-Proteine belegt sind (Sternberg et al. 2014). Dies kann zu einer erhöhten On-Target-Aktivität und noch entscheidender zu einer überproportional erhöhten Off-Target-Aktivität führen. Pattanayak et al. beschreiben ein Überangebot von Cas9 im Exzess ab einem Verhältnis von 5:1 Cas9-sgRNA zu Target-Sites und ein Verhältnis von 1:2 als Enzym-limitierend (Pattanayak et al. 2013). Eine Mismatch-Analyse mittels BRET-Assay bietet den Vorteil, dass die Problematik eines überproportionalen Missverhältnisses durch die Verwendung konstanter Konzentrationen unterhalb der Exzessgrenze, abgestimmter Transfektionszeiten und konsistenter Versuchsbedingungen zufriedenstellend angegangen werden kann.

Es ist entscheidend, dass künftige Forschungen dazu dienen, die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der beobachteten Effekte umfassend zu untersuchen. Dabei sollten sequenzspezifische Faktoren für Vulnerabilität und Mismatch-Toleranz identifiziert und die gewonnenen Ergebnisse umfassend validiert werden. Zukünftige Untersuchungen in zellulärer Umgebung unter *in-vivo*-Bedingungen, die mit dem BRET-Reportersystem umsetzbar sind, wären wünschenswert. Die Betrachtung der Resultate in einem genomischen Kontext und der Vergleich mit Erkenntnissen aus *in silico*-Tools könnte einen Rahmen für eine Bewertung der gesammelten Daten ermöglichen.

Für die Erforschung und Optimierung von CRISPR/Cas9 genauso wie anderer Genome Editing Strategien benötigt es ein verlässliches Analyseverfahren. Das BRET-Reporter-System hat sich dafür insgesamt als leistungsstarkes Werkzeug zur Untersuchung des

Frameshifts von Guide-RNA-Cas9-DNA-Komplexen im Rahmen einer Mismatch-Analyse erwiesen. Mithilfe der leicht zu modifizierenden Target-Sequenzen, der BRET-Ratio und einer einfachen Bedienung können Mismatches zügig und einfach untersucht werden. Dies ermöglicht Schlussfolgerungen zur Off-Target-Aktivität und Spezifität von Cas9.

#### **4.4 Evaluation und Perspektiven von CRISPR/Cas9**

Die Experimente dieser Arbeit zeigen, dass die Art des Basenaustauschs, die entstehenden Mismatches und deren Position die Off-Target-Schneideaktivität von Cas9 beeinflussen (s. Abschnitt 4.1). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass eine vollständige Komplementarität zwischen Guide-RNA und DNA für die Schneideaktivität optimal ist. Die Diskrimination von Einzelpunktmutationen gestaltet sich für Cas9 jedoch als schwierig und stellt vor dem Hintergrund der SNPs für die funktionelle Anwendbarkeit des CRISPR/Cas9-Systems eine Herausforderung dar (Rabinowitz und Offen 2021; Rees und Liu 2018). Viele Faktoren weisen auf große sequenzspezifische Unterschiede bei der Auswahl von Guide-RNAs und Target-Sites hin. Cas9 besitzt eine divergierende Toleranz gegenüber verschiedenen Mismatches. Spezifische Basenpaarungen wie die Wobble-Paarung G-T(U) scheinen dabei eine übergeordnete Rolle einzunehmen (s. Abschnitt 4.1.2). Die positionelle Promiskuität verschiedener Guide-RNAs und Target-Sites sowie die Bedeutung einer Seed-Region unterscheidet sich erheblich voneinander. Deswegen sind sequenzspezifische Analysen unausweichlich und der Heilige Gral eines Genome Editings ist wohl nicht in einem CRISPR-Allrounder, sondern vermutlich in verschiedenen sequenzspezifischen hochmodifizierten CRISPR-Verfahren zu finden (Hsu et al. 2013; Jones et al. 2021; Kulcsár et al. 2017; Rabinowitz und Offen 2021). Eine zentrale Hürde auf dem Weg zur klinischen Anwendung ist die Vermeidung von Mismatches sowie die damit einhergehende Verhinderung einer Off-Target-Aktivität (s. Abschnitt 1.2.2). Diese führt durch die Aktivierung der zellulären Reparaturmechanismen zu Mutationen, welche die Integrität eines Organismus gefährden (s. Abschnitt 1.3).

Im Vergleich zu eSpCas9(1.1) zeigt sich WT-SpCas9 robuster gegenüber der Limitation eines intrinsischen G an Position 20 am 5'-Ende der Guide-Sequenz, wenn diese durch den humanen U6-Promoter (hU6) transkribiert wird. Aktuelle Studien zeigen, dass der hU6-Promoter ebenfalls dazu in der Lage ist, RNA-Sequenzen effizient zu transkribieren,

die mit A am 5'-Ende beginnen (Gao et al. 2017; Wang et al. 2019). Die Ergebnisse dieser Arbeit und anderer Publikationen zeigen, dass eine abweichende Base die Effizienz der Transkription und Schneideaktivität reduziert, jedoch nicht vollständig einschränkt (Gao et al. 2017). Eine funktionale Transkription der Guide-RNA und eine daraus resultierende Cas9-Schneideaktivität ist somit, trotz der Bevorzugung einer Purin-Base auch mit einem C oder, wie in dieser Untersuchung gezeigt, mit einem T am 5'-Ende der Guide-RNA vereinbar (Ran et al. 2013b; Gao et al. 2017). Ein Mechanismus zur Toleranz einer Pyrimidin-Base an Position 20 ist die Verschiebung der Transkriptionsstartstelle durch die Polymerase III (Ma et al. 2014). WT-SpCas9 erweist sich gegenüber eSpCas9(1.1) insgesamt als widerstandsfähiger in Bezug auf die Auswahl der Guide-Sequenz und damit auf die Bestimmung der Target-Site. Lösungsansätze, welche die Effizienz der Auswahl von Target-Sequenzen verbessern könnten, beinhalten die Veränderung der Guide-RNA an Position 20 zu einem G hin, auch wenn dabei die Entstehung eines Mismatch gebilligt wird. (Wang et al. 2019). Die modifizierten Varianten wie auch eSpCas9(1.1) jedoch zeigen eine verminderte Toleranz gegenüber einem Mismatch zwischen Guide-RNA und Target-DNA am 5'-Ende (Zhang et al. 2017). Das Anhängen eines G als 21. Position oder die Verwendung eines Maus-U6-Promoters (mU6), welcher im Vergleich zum hU6-Promoter eine höhere Toleranz für ein A an Position 20 besitzt und außerdem eine Variabilität in seinem Transkriptionsstartpunkt aufweist, könnte potenziell Abhilfe schaffen (Ma et al. 2014; Wang et al. 2019).

Fortschritte der CRISPR/Cas-Systeme beinhalten die Erforschung alternativer orthologer Cas-Proteine, die Entwicklung neuer synthetischer Varianten mit verbesserten Eigenschaften (s. Abschnitt 1.4), die Analyse unterschiedlicher Guide-RNA-Designs sowie -Längen (s. Abschnitt 1.2.2), Guide-RNA-Modifikationen, den Einsatz CRISPR-Cas-gestützter Verfahren und Multikomponent-Systeme (s. Abschnitt 1.2.1) sowie die Form der Zustellung der funktionellen Einheit zum Beispiel als aufgereinigtes Cas9- RNP (Anzalone et al. 2019; Cho et al. 2014; Doench et al. 2016; Fu et al. 2014; Kim et al. 2014; Kocak et al. 2019; Komor et al. 2016; Kulcsár et al. 2020; Ran et al. 2013a; Ran et al. 2015; Ryan et al. 2018; Slaymaker et al. 2016; Tsai et al. 2014; Wang et al. 2019; Wang et al. 2020). Mit dem SNP-derived PAM approach wird versucht, durch modifizierte PAM-Sequenzen, welche ausschließlich neben der erwünschten Target-Site zu finden sind, eine höhere Spezifität zu schaffen (György et al. 2019; Rabinowitz und Offen 2021). Wechselwirkungen zwischen einer hohen Cas9-Protein-Konzentration und

einer hohen On-Target-Aktivität, aber auch einer gesteigerten Off-Target-Aktivität werden beforscht (Pattanayak et al. 2013). Spezifitätssteigernde Restriktionen von Cas9 umfassen die Verwendung von Inhibitoren oder den Einsatz von Cas9 in limitierter Anzahl (Rabinowitz und Offen 2021). Indem Anti-CRISPR-Gene (Acr), welche als Resistenzmechanismus in Bakteriophagen gefunden wurden, zur Inhibition von Cas9 verwendet werden, kommt es aufgrund der schnelleren Kinetik von On-Target-Bindungen im Verhältnis zu Off-Target-Bindungen zu einer kontrollierten Spezifitätssteigerung (Bondy-Denomy et al. 2013; Bondy-Denomy 2018). Auch die sogenannten small nucleic acid-based inhibitors (SNUBs) mit einem anti-guide-, anti-tracr- oder anti-PAM-Konzept und das KamiCas9-System, welches durch eine auf Cas9 zielgerichtete Guide-RNA die Selbstinaktivierung der Cas9-Aktivität auslöst, können dazu eingesetzt werden, die Off-Target-Schneideaktivität einzuschränken (Barkau et al. 2019; Merienne et al. 2017). Perspektivisch können gewonnenen Kenntnisse aufsummiert in der Zukunft dazu beitragen, eine medizinische Anwendung von CRISPR zu verbessern.

Voraussichtlich werden das Anwendungsspektrum und die Anzahl verschiedener CRISPR/Cas-Systeme weiterhin wachsen. Kontinuierlich arbeiten zahlreiche Forschungsgruppen weltweit daran, die Technologie zu optimieren und therapeutische Anwendungen zu ermöglichen (Doudna 2020; Makarova et al. 2020; Wilkinson et al. 2019). Aktuell stellt Cas9 hierbei noch aufgrund seiner überlegenen Kompatibilität mit verschiedenen Verfahren den Generalisten in der CRISPR-basierten Forschung dar (Rabinowitz und Offen 2021).

CRISPR/Cas9 hat einen erheblichen Einfluss auf die Art und Weise, wie weltweit molekularbiologisch an Genom, Genetik und Gentherapie geforscht wird. Trotz der zahlreichen Herausforderungen im Kontext von Mismatches und Off-Target-Aktivität verfügt es über die Möglichkeiten, die medizinische Forschung und die Therapie im Rahmen eines Genome Editings zu revolutionieren. Strukturelle Studien und Mismatch-Analysen wie diese bilden die Basis für ein Verständnis der Mechanismen, die zur Entstehung von Off-Target-Aktivität führen. Eine weitere Erforschung von CRISPR/Cas9 ist unumgänglich, um das Potenzial auszuschöpfen und das Risiko einer Anwendung zu minimieren.

## 5 Zusammenfassung

Gentherapie umfasst vielversprechende Behandlungsansätze für genetische Erkrankungen, insbesondere im Bereich der Augenheilkunde. Durch das Genome Editing können genetische Sequenzen gezielt ausgeschaltet, entfernt oder korrigiert werden, was innovative Therapiemöglichkeiten eröffnet. Ein Werkzeug ist das CRISPR/Cas-System, welches eingesetzt wird, um Genmodifikationen mithilfe von sequenzspezifischen Endonukleasen wie Cas9 zu erzielen. Zentrale Problematik von CRISPR/Cas9 liegt in der Induktion von Doppelstrangbrüchen (DSBs) an nicht beabsichtigten Positionen. Diese Off Target-Aktivität geht mit Mismatches zwischen der zielbestimmenden Guide-RNA und der DNA des Genoms einher. Die vorliegende explorative Studie zielt darauf ab, CRISPR/Cas9 für das gezielte Einsetzen von DSBs zu erforschen und die Auswirkungen von Mismatches auf die Off-Target-Aktivität zu untersuchen. Dies erfolgt anhand einer Mismatch-Analyse durch den Bioluminescence Resonance Energy Transfer-Assay mithilfe von Target-Sequenzen mit Einzelpunktmutationen. Unterstützt wird das Verfahren durch Fluoreszenzmikroskopie. Ergänzend wird eSpCas9(1.1) als modifizierte Cas-Endonuklease untersucht. Die Ergebnisse zeigen Muster in Bezug auf die eingeführte Base, das resultierende Mismatch und dessen Position. WT-SpCas9 mit der Guide-Sequenz CLN3 In6G5 weist eine hohe Mismatch-Toleranz auf, insbesondere distal von der PAM-Sequenz an Position 20 und proximal an Position 1, während die Positionen 13 und 14 eine starke Vulnerabilität zeigen. Eine Spezifität von Cas9 wird sowohl durch die Seed- als auch durch die Non-Seed-Region bestimmt. Die Wobble-Basenpaarung G-T(U) zeigt die geringste Beeinträchtigung der Schneideaktivität, während C-C-Mismatches die höchste Reduktion verursachen. Ein homologer Nukleotidbasentausch hat eine geringere Auswirkung als ein heterologer. Der Einbau von Thymin oder Guanin in den Target-Strang beeinträchtigt die Schneideaktivität durchschnittlich weniger als eine andere Mutation. Die Anwendung von eSpCas9(1.1) reduziert die Off-Target-Aktivität, ohne dabei eine signifikante On-Target-Aktivität zu zeigen. Der Einsatz einer Guide-Sequenz mit einem intrinsischen Guanin an Position 20 am 5'-Ende stellt die On-Target-Aktivität wieder her. Dies zeigt den Einfluss von Target- und Guide-Sequenzen auf verschiedene Endonukleasen. Die unterschiedliche Mismatch-Toleranz und die Bedeutung spezifischer Basenpaarungen betonen die Notwendigkeit weiterer sequenzspezifischer Mismatch-Analysen. Zukünftige Fortschritte in der CRISPR/Cas-Technologie wie modifizierte Cas9-Endonukleasen können die medizinische Anwendung erleichtern.

## 6 Summary

Gene therapy comprises promising treatment approaches for genetic diseases, particularly in the field of ophthalmology. Genome editing can be used to specifically switch off, remove or correct genetic sequences, which opens up innovative treatment options. One tool is the CRISPR/Cas system, which is used to achieve gene modifications using sequence-specific endonucleases such as Cas9. The central problem with CRISPR/Cas9 is the induction of double-strand breaks (DSBs) at unintended positions. This off-target activity is associated with mismatches between the target guide RNA and the DNA of the genome. This exploratory study aims to explore CRISPR/Cas9 for the targeted insertion of DSBs and to investigate the effects of mismatches on off-target activity. This is done by mismatch analysis using the bioluminescence resonance energy transfer assay using target sequences with single point mutations. The method is supported by fluorescence microscopy. In addition, eSpCas9(1.1) is analysed as a modified Cas endonuclease. The results show patterns in relation to the introduced base, the resulting mismatch and its position. WT-SpCas9 with the guide sequence CLN3 In6G5 shows a high mismatch tolerance, especially distal to the PAM sequence at position 20 and proximal at position 1, while positions 13 and 14 show increased vulnerability. The specificity of Cas9 is determined by both the seed and the non-seed region. The wobble base pairing G-T(U) shows the lowest impairment of cutting activity, while C-C mismatches cause the highest reduction. A homologous nucleotide base swap has a smaller effect than a heterologous one. The insertion of thymine or guanine into the target strand affects the cutting activity on average less than another mutation. The use of eSpCas9(1.1) reduces off-target activity without showing significant on-target activity. The use of a guide sequence with an intrinsic guanine at position 20 at the 5'-end restores on-target activity. This shows the influence of target and guide sequences on different endonucleases. The different mismatch tolerance and the importance of specific base pairings emphasise the need for further sequence-specific mismatch analyses. Future advances in CRISPR/Cas technology such as modified Cas9 endonucleases may facilitate medical applications.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AAV	Adeno-assoziierte Viren
A	Adenin
BH	Brückenhelix
bp	Basenpaar
BRET	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
C	Cytosin
Cas	CRISPR assoziiertes Protein
CBA	Chicken $\beta$ -actin
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats
crRNA	Short RNA
CHM	Chorioideremie
CLN3	Juvenile Neuronale Ceroid-Lipofuszinose
CMV	Cytomegalievirus
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DSB	Doppelstrangbruch
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMA	Europäischen Arzneimittel-Agentur
eSpCas9(1.1)	Enhanced specificity SpCas9
FokI	Restriktionsenzym aus <i>Flavobacterium okeanoikoites</i>
FKS	Fetales Kälberserum
G	Guanin
GFP2	Green fluorescent protein 2
HDR	Homology directed repair, Homologe Rekombination
HEK	Human Embryonic Kidney Cells
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HNH	Nuklease-Domäne benannt nach Histidin- und Asparaginresten

hU6	Humaner U6-Promoter
ICTRP	International Clinical Trials Registry Platform
Indel	Insertion oder Deletion
LB	Luria Broth
LCA	Lebersche kongenitaler Amaurose
MM	Mismatch
MMEJ	Microhomology-mediated end joining
N	Nukleotid
NCL	Neuronale Ceroid-Lipofuszinose
NHEJ	Non-homologous end joining
NUC	Nuclease Lobe
PAM	Protospacer-adjacent motif
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
pegRNA	Prime Editing Guide RNA
PEI	Polyethylenimin
PI	PAM-interagierende Domäne
REC	Recognition Lobe
RLU	<i>relative light units</i> , Relative Lichteinheiten
RLuc8	<i>Renilla</i> Luciferase 8
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RP	Retinitis pigmentosa
RPE65	Retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein
RNP	Ribonukleoprotein
RuvC	Nuclease-Domäne benannt nach einem <i>E. coli</i> -Protein
s.	siehe
sgRNA	Single guide RNA
Sp	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SpCas9-HF1	High-fidelity variant SpCas9
SSA	Single-strand annealing

ssDNA	Einzelstrang-DNA
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzel-Nukleotid-Polymorphismus
SOC	Super Optimal Broth mit Katabolitenrepression
T	Thymin
TALENs	Transcription activator-like effector nucleases
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
tracrRNA	Trans-acting RNA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Target-Strang
U	Uracil
WBB	Wasserstoffbrückenbindungen
WHO	World Health Organization
WT	Wildtyp
ZFN	Zinkfinger-Nuklease

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Modalitäten der Gentherapie.....	3
Abbildung 1.2: Bilobäre Struktur von CRISPR/Cas9.....	6
Abbildung 1.3: CRISPR/Cas9.....	8
Abbildung 1.4: Mismatchmechanismen.....	10
Abbildung 1.5: DNA-Reparaturmechanismen.....	13
Abbildung 1.6: Energietransfer durch spektrale Überlappung.....	19
Abbildung 2.1: Vektorkarte px459 (pU6-BbsI/BbsI-CBA-Cas9).....	32
Abbildung 2.2: Vektorkarte des BRET-Reporter-Plasmids.....	33
Abbildung 2.3: Vektorkarte eSpCas9(1.1).....	34
Abbildung 2.4: Vektorkarte pCMVRLuc8.....	35
Abbildung 2.5: Pipettierschema Transfektion.....	50
Abbildung 2.6: Erstellung von Fluoreszenz/Phasenkontrast-Overlay-Aufnahmen.....	51
Abbildung 2.7: BRET-Ratio.....	53
Abbildung 3.1: Konstruktion der Targets.....	56
Abbildung 3.2: Integration der Target-Sequenzen und Sanger Sequenzierung.....	57
Abbildung 3.3: Integration der Guide-Sequenz und Sequenzierung.....	58
Abbildung 3.4: Fluoreszenz/Phasenkontrast-Overlay-Aufnahmen der mit dem BRET-Reporter-System transfizierten Zellen.....	61
Abbildung 3.5: BRET-Ratios des Basisexperiments.....	63
Abbildung 3.6: Schneideaktivität der WT-SpCas9 in Abhängigkeit der Art und Position des Mismatches.....	64
Abbildung 3.7: Frameshift bei Unterbrechung von A-T(U)- und G-C-Basenpaarungen.....	67
Abbildung 3.8: Frameshift bei Punktmutationen unter Einbringung unterschiedlicher Basen.....	68
Abbildung 3.9: Frameshift verschiedener Mismatch-Basenpaarungen an verschiedenen Positionen.....	70

Abbildung 3.10: Frameshift Nukleinbasenaustausch.....	71
Abbildung 3.11: Durchschnittlicher Frameshift von WT-SpCas9 mit der Guide-Sequenz In6G5.....	72
Abbildung 3.12: Fluoreszenz/Phasenkontrast-Overlay-Aufnahmen der mit dem BRET-Reporter-System und eSpCas9(1.1) transfizierten Zellen.....	74
Abbildung 3.13: Schneideaktivität von eSpCas9(1.1) mit der Guide-Sequenz In6G5 ...	75
Abbildung 3.14: Fluoreszenzaufnahmen der Transfektionen des BRET-Reporter-Plasmids ARTT1 mit px459(ARTG1) und eSpCas9(ARTG1) .....	77
Abbildung 3.15: BRET-Ratio und Frameshift von WT-SpCas9(ARTG1) und eSpCas9(1.1)(ARTG1).....	78
Abbildung 11.1: BRET-Ratios eSpCas9(1.1)(In6G5) .....	125
Abbildung 11.2: Fluoreszenz/Phasenkontrast-Overlay-Aufnahme der WT-Target-Sequenz mit WT-SpCas9 .....	125
Abbildung 11.3: Fluoreszenz/Phasenkontrast-Overlay-Aufnahmen von WT-SpCas9.	129
Abbildung 11.4: Fluoreszenz/Phasenkontrast-Overlay-Aufnahmen von eSpCas9(1.1) .....	130

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte.....	21
Tabelle 2.2: Verwendete Kits.....	23
Tabelle 2.3: Verwendete Software .....	24
Tabelle 2.4: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	25
Tabelle 2.5: Verwendete Chemikalien .....	26
Tabelle 2.6: Puffer aus eigener Herstellung .....	27
Tabelle 2.7: Erworbene Puffer .....	28
Tabelle 2.8: Verwendete Antibiotika .....	28
Tabelle 2.9: Medien für Bakterien .....	29
Tabelle 2.10: Medium für Zellkulturen.....	29
Tabelle 2.11: Verwendete Restriktionsenzyme.....	30
Tabelle 2.12: Weitere Enzyme .....	31
Tabelle 2.13: Plasmide .....	31
Tabelle 2.14: Verwendete Oligonukleotide für Guide und Targets der In6G5/In6T5-Mismatch-Analyse .....	36
Tabelle 2.15: Oligonukleotide für Guide- und Target-Sequenz des erweiterten eSpCas9(1.1)-Experiments.....	41
Tabelle 2.16: Verwendete Sequenzierungsprimer .....	41
Tabelle 2.17: Restriktionsverdau pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 .....	42
Tabelle 2.18: Restriktionsverdau px459 und eSpCas(1.1).....	42
Tabelle 2.19: Kontrolle Gelelektrophorese .....	42
Tabelle 2.20: Primerhybridisierung.....	43
Tabelle 2.21: Ligation BRET-Reporter-Plasmid pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2 .....	44
Tabelle 2.22: Ligation von px459 (pU6-BbsI/BbsI-CBA-Cas9) oder eSpCas9(1.1) .....	44
Tabelle 2.23: Sequenzierung der BRET-Reporter-Plasmide .....	45

Tabelle 2.24: Sequenzierung der px459- und eSpCas9(1.1)-Plasmide.....	45
Tabelle 2.25: Transfektionsansätze .....	50
Tabelle 11.1: Schneideaktivität von px459(In6G5) bei den Mismatch-Target-Sequenzen .....	123
Tabelle 11.2: Schneideaktivität von eSpCas9(1.1)(In6G5) .....	124

## 10 Literaturverzeichnis

- Adachi, Noritaka; Suzuki, Hiromi; Iizumi, Susumu; Koyama, Hideki (2003): Hypersensitivity of nonhomologous DNA end-joining mutants to VP-16 and ICRF-193: implications for the repair of topoisomerase II-mediated DNA damage. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (38), S. 35897–35902. DOI: 10.1074/jbc.m306500200.
- Anders, Carolin; Niewoehner, Ole; Duerst, Alessia; Jinek, Martin (2014): Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. In: *Nature* 513 (7519), S. 569–573. DOI: 10.1038/nature13579.
- Anguela, Xavier M.; High, Katherine A. (2019): Entering the Modern Era of Gene Therapy. In: *Annual review of medicine* 70, S. 273–288. DOI: 10.1146/annurev-med-012017-043332.
- Anzalone, Andrew V.; Randolph, Peyton B.; Davis, Jessie R.; Sousa, Alexander A.; Koblan, Luke W.; Levy, Jonathan M. et al. (2019): Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. In: *Nature* 576 (7785), S. 149–157. DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4.
- Aparicio, Tomas; Baer, Richard; Gautier, Jean (2014): DNA double-strand break repair pathway choice and cancer. In: *DNA repair* 19, S. 169–175. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.03.014.
- Bae, Sangsu; Park, Jeongbin; Kim, Jin-Soo (2014): Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 30 (10), S. 1473–1475. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu048.
- Barkau, Christopher L.; O'Reilly, Daniel; Rohilla, Kushal J.; Damha, Masad J.; Gagnon, Keith T. (2019): Rationally Designed Anti-CRISPR Nucleic Acid Inhibitors of CRISPR-Cas9. In: *Nucleic acid therapeutics* 29 (3), S. 136–147. DOI: 10.1089/nat.2018.0758.
- Barrangou, Rodolphe; Fremaux, Christophe; Deveau, H el ene; Richards, Melissa; Boyaval, Patrick; Moineau, Sylvain et al. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. In: *Science (New York, N.Y.)* 315 (5819), S. 1709–1712. DOI: 10.1126/science.1138140.

- Barrangou, Rodolphe; Marraffini, Luciano A. (2014): CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. In: *Molecular cell* 54 (2), S. 234–244. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.011.
- Bhargava, Ragini; Onyango, David O.; Stark, Jeremy M. (2016): Regulation of Single-Strand Annealing and its Role in Genome Maintenance. In: *Trends in genetics : TIG* 32 (9), S. 566–575. DOI: 10.1016/j.tig.2016.06.007.
- Bondy-Denomy, Joe; Pawluk, April; Maxwell, Karen L.; Davidson, Alan R. (2013): Bacteriophage genes that inactivate the CRISPR/Cas bacterial immune system. In: *Nature* 493 (7432), S. 429–432. DOI: 10.1038/nature11723.
- Bondy-Denomy, Joseph (2018): Protein Inhibitors of CRISPR-Cas9. In: *ACS chemical biology* 13 (2), S. 417–423. DOI: 10.1021/acscchembio.7b00831.
- Bravo, Jack P. K.; Liu, Mu-Sen; Hibshman, Grace N.; Dangerfield, Tyler L.; Jung, Kyungseok; McCool, Ryan S. et al. (2022): Structural basis for mismatch surveillance by CRISPR-Cas9. In: *Nature* 603 (7900), S. 343–347. DOI: 10.1038/s41586-022-04470-1.
- Brinkman, Eva Karina; van Steensel, Bas (2019): Rapid Quantitative Evaluation of CRISPR Genome Editing by TIDE and TIDER. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1961, S. 29–44. DOI: 10.1007/978-1-4939-9170-9\_3.
- Buisson, Rémi; Niraj, Joshi; Pauty, Joris; Maity, Ranjan; Zhao, Weixing; Coulombe, Yan et al. (2014): Breast cancer proteins PALB2 and BRCA2 stimulate polymerase  $\eta$  in recombination-associated DNA synthesis at blocked replication forks. In: *Cell reports* 6 (3), S. 553–564. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.01.009.
- Capon, Samuel J.; Baillie, Gregory J.; Bower, Neil I.; da Silva, Jason A.; Paterson, Scott; Hogan, Benjamin M. et al. (2017): Utilising polymorphisms to achieve allele-specific genome editing in zebrafish. In: *Biology open* 6 (1), S. 125–131. DOI: 10.1242/bio.020974.
- Cárcel-Trullols, Jaime; Kovács, Attila D.; Pearce, David A. (2015): Cell biology of the NCL proteins: What they do and don't do. In: *Biochimica et biophysica acta* 1852 (10 Pt B), S. 2242–2255. DOI: 10.1016/j.bbadis.2015.04.027.
- Carroll, Dana (2017): Genome Editing: Past, Present, and Future. In: *The Yale Journal of Biology and Medicine* 90 (4), S. 653–659.

- Casini, Antonio; Olivieri, Michele; Petris, Gianluca; Montagna, Claudia; Reginato, Giordano; Maule, Giulia et al. (2018): A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast. In: *Nature biotechnology* 36 (3), S. 265–271. DOI: 10.1038/nbt.4066.
- Ceccaldi, Raphael; Rondinelli, Beatrice; D'Andrea, Alan D. (2016): Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. In: *Trends in cell biology* 26 (1), S. 52–64. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.07.009.
- Cerchione, Derek; Loveluck, Katherine; Tillotson, Eric L.; Harbinski, Fred; DaSilva, Jen; Kelley, Chase P. et al. (2020): SMOOT libraries and phage-induced directed evolution of Cas9 to engineer reduced off-target activity. In: *PloS one* 15 (4), e0231716. DOI: 10.1371/journal.pone.0231716.
- Chen, Janice S.; Dagdas, Yavuz S.; Kleinstiver, Benjamin P.; Welch, Moira M.; Sousa, Alexander A.; Harrington, Lucas B. et al. (2017): Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. In: *Nature* 550 (7676), S. 407–410. DOI: 10.1038/nature24268.
- Chen, Shengmiao; Yao, Yufeng; Zhang, Yanchun; Fan, Gaofeng (2020): CRISPR system: Discovery, development and off-target detection. In: *Cellular signalling* 70, S. 109577. DOI: 10.1016/j.cellsig.2020.109577.
- Cho, Seung Woo; Kim, Sojung; Kim, Yongsub; Kweon, Jiyeon; Kim, Heon Seok; Bae, Sangsu; Kim, Jin-Soo (2014): Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. In: *Genome research* 24 (1), S. 132–141. DOI: 10.1101/gr.162339.113.
- Choi, Elliot H.; Suh, Susie; Sears, Avery E.; Hołubowicz, Rafał; Kedhar, Sanjay R.; Browne, Andrew W.; Palczewski, Krzysztof (2023): Genome editing in the treatment of ocular diseases. In: *Experimental & Molecular Medicine* 55 (8), S. 1678–1690. DOI: 10.1038/s12276-023-01057-2.
- Chuai, Guohui; Ma, Hanhui; Yan, Jifang; Chen, Ming; Hong, Nanfang; Xue, Dongyu et al. (2018): DeepCRISPR: optimized CRISPR guide RNA design by deep learning. In: *Genome biology* 19 (1), S. 80. DOI: 10.1186/s13059-018-1459-4.

ClinicalTrials.gov. Search Results (2024). Online verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/search?cond=gene%20therapy>, zuletzt aktualisiert am 07.11.2024, zuletzt geprüft am 12.11.2024.

Conant, David; Hsiao, Tim; Rossi, Nicholas; Oki, Jennifer; Maures, Travis; Waite, Kelsey et al. (2022): Inference of CRISPR Edits from Sanger Trace Data. In: *The CRISPR journal* 5 (1), S. 123–130. DOI: 10.1089/crispr.2021.0113.

Dacres, Helen; Michie, Michelle; Wang, Jian; Pflieger, Kevin D. G.; Trowell, Stephen C. (2012): Effect of enhanced Renilla luciferase and fluorescent protein variants on the Förster distance of Bioluminescence resonance energy transfer (BRET). In: *Biochemical and biophysical research communications* 425 (3), S. 625–629. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.07.133.

Dagdas, Yavuz S.; Chen, Janice S.; Sternberg, Samuel H.; Doudna, Jennifer A.; Yildiz, Ahmet (2017): A conformational checkpoint between DNA binding and cleavage by CRISPR-Cas9. In: *Science Advances* 3 (8), eaao0027. DOI: 10.1126/sciadv.aao0027.

Deltcheva, Elitza; Chylinski, Krzysztof; Sharma, Cynthia M.; Gonzales, Karine; Chao, Yanjie; Pirzada, Zaid A. et al. (2011): CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. In: *Nature* 471 (7340), S. 602–607. DOI: 10.1038/nature09886.

Devkota, Sushil (2018): The road less traveled: strategies to enhance the frequency of homology-directed repair (HDR) for increased efficiency of CRISPR/Cas-mediated transgenesis. In: *BMB Rep.* 51 (9), S. 437–443. DOI: 10.5483/BMBRep.2018.51.9.187.

Doench, John G.; Fusi, Nicolo; Sullender, Meagan; Hegde, Mudra; Vaimberg, Emma W.; Donovan, Katherine F. et al. (2016): Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. In: *Nature biotechnology* 34 (2), S. 184–191. DOI: 10.1038/nbt.3437.

Doudna, Jennifer A. (2020): The promise and challenge of therapeutic genome editing. In: *Nature* 578 (7794), S. 229–236. DOI: 10.1038/s41586-020-1978-5.

Doudna, Jennifer A.; Charpentier, Emmanuelle (2014): Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. In: *Science (New York, N.Y.)* 346 (6213), S. 1258096. DOI: 10.1126/science.1258096.

Dragulescu-Andrasi, Anca; Chan, Carmel T.; De, Abhijit; Massoud, Tarik F.; Gambhir, Sanjiv S. (2011): Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) imaging of protein-protein interactions within deep tissues of living subjects. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (29), S. 12060–12065. DOI: 10.1073/pnas.1100923108.

Eun, Hyone-Myong (1996): Enzymes and Nucleic Acids. In: Hyone-Myong Eun (Hg.): *Enzymology primer for recombinant DNA technology*. San Diego: Academic Press, S. 1–108.

Ferraresi, Marta; Panzieri, Daniele Lello; Leoni, Simona; Cappellini, Maria Domenica; Kattamis, Antonis; Motta, Irene (2023): Therapeutic perspective for children and young adults living with thalassemia and sickle cell disease. In: *European journal of pediatrics* 182 (6), S. 2509–2519. DOI: 10.1007/s00431-023-04900-w.

Fichter, Katye M.; Setayesh, Tahereh; Malik, Punam (2023): Strategies for precise gene edits in mammalian cells. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 32, S. 536–552. DOI: 10.1016/j.omtn.2023.04.012.

Frangoul, Haydar; Altshuler, David; Cappellini, M. Domenica; Chen, Yi-Shan; Domm, Jennifer; Eustace, Brenda K. et al. (2021): CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and  $\beta$ -Thalassemia. In: *The New England journal of medicine* 384 (3), S. 252–260. DOI: 10.1056/NEJMoa2031054.

Frangoul, Haydar; Bobruff, Yael; Cappellini, Maria Domenica; Corbacioglu, Selim; Fernandez, Christine Marie; La Fuente, Josu de et al. (2020): Safety and Efficacy of CTX001 in Patients with Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia and Sickle Cell Disease: Early Results from the Climb THAL-111 and Climb SCD-121 Studies of Autologous CRISPR-CAS9-Modified CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. In: *Blood* 136 (Supplement 1), S. 3–4. DOI: 10.1182/blood-2020-139575.

Fu, Yanfang; Foden, Jennifer A.; Khayter, Cyd; Maeder, Morgan L.; Reyon, Deepak; Joung, J. Keith; Sander, Jeffrey D. (2013): High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. In: *Nature biotechnology* 31 (9), S. 822–826. DOI: 10.1038/nbt.2623.

Fu, Yanfang; Sander, Jeffrey D.; Reyon, Deepak; Cascio, Vincent M.; Joung, J. Keith (2014): Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. In: *Nature biotechnology* 32 (3), S. 279–284. DOI: 10.1038/nbt.2808.

Gao, Zongliang; Harwig, Alex; Berkhout, Ben; Herrera-Carrillo, Elena (2017): Mutation of nucleotides around the +1 position of type 3 polymerase III promoters: The effect on transcriptional activity and start site usage. In: *Transcription* 8 (5), S. 275–287. DOI: 10.1080/21541264.2017.1322170.

Garneau, Josiane E.; Dupuis, Marie-Ève; Villion, Manuela; Romero, Dennis A.; Barrangou, Rodolphe; Boyaval, Patrick et al. (2010): The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. In: *Nature* 468 (7320), S. 67–71. DOI: 10.1038/nature09523.

Gasiunas, Giedrius; Barrangou, Rodolphe; Horvath, Philippe; Siksnyš, Virginijus (2012): Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (39), E2579-86. DOI: 10.1073/pnas.1208507109.

Gehl, J. (2003): Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. In: *Acta physiologica Scandinavica* 177 (4), S. 437–447. DOI: 10.1046/j.1365-201X.2003.01093.x.

Gilbert, Luke A.; Horlbeck, Max A.; Adamson, Britt; Villalta, Jacqueline E.; Chen, Yuwen; Whitehead, Evan H. et al. (2014): Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. In: *Cell* 159 (3), S. 647–661. DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.029.

Goebel, Hans H.; Wisniewski, Krystyna E. (2004): Current state of clinical and morphological features in human NCL. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 14 (1), S. 61–69. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2004.tb00499.x.

Goetz, Julie Della-Maria; Motycka, Teresa A.; Han, Minguang; Jasin, Maria; Tomkinson, Alan E. (2005): Reduced repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination in a DNA ligase I-deficient human cell line. In: *DNA repair* 4 (6), S. 649–654. DOI: 10.1016/j.dnarep.2005.02.004.

Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. In: *The Journal of general virology* 36 (1), S. 59–74. DOI: 10.1099/0022-1317-36-1-59.

György, Bence; Nist-Lund, Carl; Pan, Bifeng; Asai, Yukako; Karavitaki, K. Domenica; Kleinstiver, Benjamin P. et al. (2019): Allele-specific gene editing prevents deafness in

a model of dominant progressive hearing loss. In: *Nature medicine* 25 (7), S. 1123–1130. DOI: 10.1038/s41591-019-0500-9.

Halat, Monika; Klimek-Chodacka, Magdalena; Orleanska, Jagoda; Baranska, Malgorzata; Baranski, Rafal (2021): Electronic Circular Dichroism of the Cas9 Protein and gRNA:Cas9 Ribonucleoprotein Complex. In: *International journal of molecular sciences* 22 (6). DOI: 10.3390/ijms22062937.

Han, Jinxiong; Zhang, Jun; Chen, Li; Shen, Bin; Zhou, Jiankui; Hu, Bian et al. (2014): Efficient in vivo deletion of a large imprinted lncRNA by CRISPR/Cas9. In: *RNA biology* 11 (7), S. 829–835. DOI: 10.4161/rna.29624.

Hsu, Patrick D.; Lander, Eric S.; Zhang, Feng (2014): Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. In: *Cell* 157 (6), S. 1262–1278. DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.010.

Hsu, Patrick D.; Scott, David A.; Weinstein, Joshua A.; Ran, F. Ann; Konermann, Silvana; Agarwala, Vineeta et al. (2013): DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. In: *Nature biotechnology* 31 (9), S. 827–832. DOI: 10.1038/nbt.2647.

ICTRP. Search Portal (2024). Online verfügbar unter <https://trialsearch.who.int/Default.aspx>, zuletzt aktualisiert am 12.11.2024, zuletzt geprüft am 12.11.2024.

Ishino, Y.; Shinagawa, H.; Makino, K.; Amemura, M.; Nakata, A. (1987): Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. In: *Journal of bacteriology* 169 (12), S. 5429–5433. DOI: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.

Ivanov, Ivan E.; Wright, Addison V.; Cofsky, Joshua C.; Aris, Kevin D. Palacio; Doudna, Jennifer A.; Bryant, Zev (2020): Cas9 interrogates DNA in discrete steps modulated by mismatches and supercoiling. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (11), S. 5853–5860. DOI: 10.1073/pnas.1913445117.

Jiang, Fuguo; Doudna, Jennifer A. (2017): CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. In: *Annual review of biophysics* 46, S. 505–529. DOI: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822.

Jiang, Fuguo; Taylor, David W.; Chen, Janice S.; Kornfeld, Jack E.; Zhou, Kaihong; Thompson, Aubri J. et al. (2016): Structures of a CRISPR-Cas9 R-loop complex primed for DNA cleavage. In: *Science (New York, N.Y.)* 351 (6275), S. 867–871. DOI: 10.1126/science.aad8282.

Jiang, Wenyan; Bikard, David; Cox, David; Zhang, Feng; Marraffini, Luciano A. (2013): RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. In: *Nature biotechnology* 31 (3), S. 233–239. DOI: 10.1038/nbt.2508.

Jinek, Martin; Chylinski, Krzysztof; Fonfara, Ines; Hauer, Michael; Doudna, Jennifer A.; Charpentier, Emmanuelle (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096), S. 816–821. DOI: 10.1126/science.1225829.

Jinek, Martin; Jiang, Fuguo; Taylor, David W.; Sternberg, Samuel H.; Kaya, Emine; Ma, Enbo et al. (2014): Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. In: *Science (New York, N.Y.)* 343 (6176), S. 1247997. DOI: 10.1126/science.1247997.

Jones, Stephen K.; Hawkins, John A.; Johnson, Nicole V.; Jung, Cheulhee; Hu, Kuang; Rybarski, James R. et al. (2021): Massively parallel kinetic profiling of natural and engineered CRISPR nucleases. In: *Nature biotechnology* 39 (1), S. 84–93. DOI: 10.1038/s41587-020-0646-5.

Joung, J. Keith; Sander, Jeffrey D. (2013): TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 14 (1), S. 49–55. DOI: 10.1038/nrm3486.

Keeler, Allison M.; Flotte, Terence R. (2019): Recombinant Adeno-Associated Virus Gene Therapy in Light of Luxturna (and Zolgensma and Glybera): Where Are We, and How Did We Get Here? In: *Annual review of virology* 6 (1), S. 601–621. DOI: 10.1146/annurev-virology-092818-015530.

Kim, Hye Joo; Lee, Hyung Joo; Kim, Hyojin; Cho, Seung Woo; Kim, Jin-Soo (2009): Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. In: *Genome research* 19 (7), S. 1279–1288. DOI: 10.1101/gr.089417.108.

- Kim, Sojung; Bae, Taegeun; Hwang, Jaewoong; Kim, Jin-Soo (2017): Rescue of high-specificity Cas9 variants using sgRNAs with matched 5' nucleotides. In: *Genome biology* 18 (1), S. 218. DOI: 10.1186/s13059-017-1355-3.
- Kim, Sojung; Kim, Daesik; Cho, Seung Woo; Kim, Jungeun; Kim, Jin-Soo (2014): Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. In: *Genome research* 24 (6), S. 1012–1019. DOI: 10.1101/gr.171322.113.
- Kim, Tae Kyung; Eberwine, James H. (2010): Mammalian cell transfection: the present and the future. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 397 (8), S. 3173–3178. DOI: 10.1007/s00216-010-3821-6.
- Kleinstiver, Benjamin P.; Pattanayak, Vikram; Prew, Michelle S.; Tsai, Shengdar Q.; Nguyen, Nhu T.; Zheng, Zongli; Joung, J. Keith (2016): High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. In: *Nature* 529 (7587), S. 490–495. DOI: 10.1038/nature16526.
- Kocak, D. Dewran; Josephs, Eric A.; Bhandarkar, Vidit; Adkar, Shaunak S.; Kwon, Jennifer B.; Gersbach, Charles A. (2019): Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures. In: *Nature biotechnology* 37 (6), S. 657–666. DOI: 10.1038/s41587-019-0095-1.
- Komor, Alexis C.; Kim, Yongjoo B.; Packer, Michael S.; Zuris, John A.; Liu, David R. (2016): Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. In: *Nature* 533 (7603), S. 420–424. DOI: 10.1038/nature17946.
- Kulcsár, Péter István; Tálas, András; Huszár, Krisztina; Ligeti, Zoltán; Tóth, Eszter; Weinhardt, Nóra et al. (2017): Crossing enhanced and high fidelity SpCas9 nucleases to optimize specificity and cleavage. In: *Genome biology* 18 (1), S. 190. DOI: 10.1186/s13059-017-1318-8.
- Kulcsár, Péter István; Tálas, András; Tóth, Eszter; Nyeste, Antal; Ligeti, Zoltán; Welker, Zsombor; Welker, Ervin (2020): Blackjack mutations improve the on-target activities of increased fidelity variants of SpCas9 with 5'G-extended sgRNAs. In: *Nature communications* 11 (1), S. 1223. DOI: 10.1038/s41467-020-15021-5.

Kuscu, Cem; Arslan, Sevki; Singh, Ritambhara; Thorpe, Jeremy; Adli, Mazhar (2014): Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. In: *Nature biotechnology* 32 (7), S. 677–683. DOI: 10.1038/nbt.2916.

Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M. C.; Baldwin, J. et al. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. In: *Nature* 409 (6822), S. 860–921. DOI: 10.1038/35057062.

Le Cong; Ran, F. Ann; Cox, David; Lin, Shuailiang; Barretto, Robert; Habib, Naomi et al. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121), S. 819–823. DOI: 10.1126/science.1231143.

Lee, Jungjoon K.; Jeong, Euihwan; Lee, Joonsun; Jung, Minhee; Shin, Eunji; Kim, Young-hoon et al. (2018): Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. In: *Nature communications* 9 (1), S. 3048. DOI: 10.1038/s41467-018-05477-x.

Lieber, Michael R. (2008): The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (1), S. 1–5. DOI: 10.1074/jbc.R700039200.

Lieber, Michael R. (2010): The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. In: *Annual review of biochemistry* 79, S. 181–211. DOI: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131.

Lin, Yanni; Cradick, Thomas J.; Brown, Matthew T.; Deshmukh, Harshavardhan; Ranjan, Piyush; Sarode, Neha et al. (2014): CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. In: *Nucleic acids research* 42 (11), S. 7473–7485. DOI: 10.1093/nar/gku402.

Listgarten, Jennifer; Weinstein, Michael; Kleinstiver, Benjamin P.; Sousa, Alexander A.; Joung, J. Keith; Crawford, Jake et al. (2018): Prediction of off-target activities for the end-to-end design of CRISPR guide RNAs. In: *Nature biomedical engineering* 2 (1), S. 38–47. DOI: 10.1038/s41551-017-0178-6.

Liu, Mingjie; Rehman, Saad; Tang, Xidian; Gu, Kui; Fan, Qinlei; Chen, Dekun; Ma, Wentao (2018): Methodologies for Improving HDR Efficiency. In: *Frontiers in genetics* 9, S. 691. DOI: 10.3389/fgene.2018.00691.

- Locatelli, Franco; Lang, Peter; Li, Amanda; Corbacioglu, Selim; La Fuente, Josu de; Wall, Donna A. et al. (2022): Efficacy and Safety of a Single Dose of Exagamglogene Autotemcel for Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia. In: *Blood* 140 (Supplement 1), S. 4899–4901. DOI: 10.1182/blood-2022-166881.
- Loening, Andreas Markus; Fenn, Timothy David; Wu, Anna M.; Gambhir, Sanjiv Sam (2006): Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. In: *Protein engineering, design & selection : PEDS* 19 (9), S. 391–400. DOI: 10.1093/protein/gzl023.
- Loening, Andreas Markus; Wu, Anna M.; Gambhir, Sanjiv Sam (2007): Red-shifted Renilla reniformis luciferase variants for imaging in living subjects. In: *Nat Methods* 4 (8), S. 641–643. DOI: 10.1038/nmeth1070.
- Lonowski, Lindsey A.; Narimatsu, Yoshiki; Riaz, Anjum; Delay, Catherine E.; Yang, Zhang; Niola, Francesco et al. (2017): Genome editing using FACS enrichment of nuclease-expressing cells and indel detection by amplicon analysis. In: *Nature protocols* 12 (3), S. 581–603. DOI: 10.1038/nprot.2016.165.
- Lu, Xinyue; Zhang, Miaomiao; Li, Ge; Zhang, Shixin; Zhang, Jingbo; Fu, Xiaoge; Sun, Fengying (2023): Applications and Research Advances in the Delivery of CRISPR/Cas9 Systems for the Treatment of Inherited Diseases. In: *International journal of molecular sciences* 24 (17). DOI: 10.3390/ijms241713202.
- Ma, Hongming; Wu, Yonggan; Dang, Ying; Choi, Jang-Gi; Zhang, Junli; Wu, Haoquan (2014): Pol III Promoters to Express Small RNAs: Delineation of Transcription Initiation. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 3 (5), e161. DOI: 10.1038/mtna.2014.12.
- Maguire, Albert M.; Simonelli, Francesca; Pierce, Eric A.; Pugh, Edward N.; Mingozzi, Federico; Bennicelli, Jeannette et al. (2008): Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. In: *The New England journal of medicine* 358 (21), S. 2240–2248. DOI: 10.1056/NEJMoa0802315.
- Makarova, Kira S.; Wolf, Yuri I.; Iranzo, Jaime; Shmakov, Sergey A.; Alkhnbashi, Omer S.; Brouns, Stan J. J. et al. (2020): Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. In: *Nature reviews. Microbiology* 18 (2), S. 67–83. DOI: 10.1038/s41579-019-0299-x.

- Mali, Prashant; Yang, Luhan; Esvelt, Kevin M.; Aach, John; Guell, Marc; DiCarlo, James E. et al. (2013): RNA-guided human genome engineering via Cas9. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121), S. 823–826. DOI: 10.1126/science.1232033.
- Marraffini, Luciano A.; Sontheimer, Erik J. (2010): Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. In: *Nature* 463 (7280), S. 568–571. DOI: 10.1038/nature08703.
- McVey, Mitch; Lee, Sang Eun (2008): MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. In: *Trends in genetics : TIG* 24 (11), S. 529–538. DOI: 10.1016/j.tig.2008.08.007.
- Merienne, Nicolas; Vachey, Gabriel; Longprez, Lucie de; Meunier, Cécile; Zimmer, Virginie; Perriard, Guillaume et al. (2017): The Self-Inactivating KamiCas9 System for the Editing of CNS Disease Genes. In: *Cell reports* 20 (12), S. 2980–2991. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.08.075.
- Mojica, F. J. M.; Díez-Villaseñor, C.; García-Martínez, J.; Almendros, C. (2009): Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. In: *Microbiology (Reading, England)* 155 (Pt 3), S. 733–740. DOI: 10.1099/mic.0.023960-0.
- Mole, Sara E.; Anderson, Glenn; Band, Heather A.; Berkovic, Samuel F.; Cooper, Jonathan D.; Kleine Holthaus, Sophia-Martha et al. (2019): Clinical challenges and future therapeutic approaches for neuronal ceroid lipofuscinosis. In: *The Lancet Neurology* 18 (1), S. 107–116. DOI: 10.1016/S1474-4422(18)30368-5.
- Mülhardt, Cornel (2013): Einige grundlegende Methoden. In: Mülhardt (Hg.): *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 21.
- Murnane, John P. (2006): Telomeres and chromosome instability. In: *DNA repair* 5 (9-10), S. 1082–1092. DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.05.030.
- Naeem, Muhammad; Majeed, Saman; Hoque, Mubasher Zahir; Ahmad, Irshad (2020): Latest Developed Strategies to Minimize the Off-Target Effects in CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing. In: *Cells* 9 (7). DOI: 10.3390/cells9071608.
- Nishimasu, Hiroshi; Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Konermann, Silvana; Shehata, Soraya I.; Dohmae, Naoshi et al. (2014): Crystal structure of Cas9 in complex with

guide RNA and target DNA. In: *Cell* 156 (5), S. 935–949. DOI: 10.1016/j.cell.2014.02.001.

O'Geen, Henriette; Henry, Isabelle M.; Bhakta, Mital S.; Meckler, Joshua F.; Segal, David J. (2015): A genome-wide analysis of Cas9 binding specificity using ChIP-seq and targeted sequence capture. In: *Nucleic acids research* 43 (6), S. 3389–3404. DOI: 10.1093/nar/gkv137.

Pacesa, Martin; Lin, Chun-Han; Cléry, Antoine; Saha, Aakash; Arantes, Pablo R.; Bargsten, Katja et al. (2022a): Structural basis for Cas9 off-target activity. In: *Cell* 185 (22), 4067-4081.e21. DOI: 10.1016/j.cell.2022.09.026.

Pacesa, Martin; Loeff, Luuk; Querques, Irma; Muckenfuss, Lena M.; Sawicka, Marta; Jinek, Martin (2022b): R-loop formation and conformational activation mechanisms of Cas9. In: *Nature* 609 (7925), S. 191–196. DOI: 10.1038/s41586-022-05114-0.

Pannunzio, Nicholas R.; Watanabe, Go; Lieber, Michael R. (2018): Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. In: *The Journal of biological chemistry* 293 (27), S. 10512–10523. DOI: 10.1074/jbc.tml117.000374.

Parums, Dinah V. (2024): Editorial: First Regulatory Approvals for CRISPR-Cas9 Therapeutic Gene Editing for Sickle Cell Disease and Transfusion-Dependent  $\beta$ -Thalassemia. In: *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 30, e944204. DOI: 10.12659/MSM.944204.

Pattanayak, Vikram; Lin, Steven; Guilinger, John P.; Ma, Enbo; Doudna, Jennifer A.; Liu, David R. (2013): High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. In: *Nature biotechnology* 31 (9), S. 839–843. DOI: 10.1038/nbt.2673.

Peddle, Caroline F.; MacLaren, Robert E. (2017): The Application of CRISPR/Cas9 for the Treatment of Retinal Diseases. In: *The Yale Journal of Biology and Medicine* 90 (4), S. 533–541.

Pulman, Juliette; Sahel, José-Alain; Dalkara, Deniz (2022): New Editing Tools for Gene Therapy in Inherited Retinal Dystrophies. In: *The CRISPR journal* 5 (3), S. 377–388. DOI: 10.1089/crispr.2021.0141.

Qi, Lei S.; Larson, Matthew H.; Gilbert, Luke A.; Doudna, Jennifer A.; Weissman, Jonathan S.; Arkin, Adam P.; Lim, Wendell A. (2013): Repurposing CRISPR as an

RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. In: *Cell* 152 (5), S. 1173–1183. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.022.

Qiu, Peter; Shandilya, Harini; D'Alessio, James M.; O'Connor, Kevin; Durocher, Jeffrey; Gerard, Gary F. (2004): Mutation detection using Surveyor nuclease. In: *BioTechniques* 36 (4), S. 702–707. DOI: 10.2144/04364PF01.

Rabinowitz, Roy; Offen, Daniel (2021): Single-Base Resolution: Increasing the Specificity of the CRISPR-Cas System in Gene Editing. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 29 (3), S. 937–948. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.11.009.

Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Lin, Chie-Yu; Gootenberg, Jonathan S.; Konermann, Silvana; Trevino, Alexandro E. et al. (2013a): Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. In: *Cell* 154 (6), S. 1380–1389. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.021.

Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Wright, Jason; Agarwala, Vineeta; Scott, David A.; Zhang, Feng (2013b): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. In: *Nature protocols* 8 (11), S. 2281–2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143.

Ran, F. Ann; Le Cong; Yan, Winston X.; Scott, David A.; Gootenberg, Jonathan S.; Kriz, Andrea J. et al. (2015): In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. In: *Nature* 520 (7546), S. 186–191. DOI: 10.1038/nature14299.

Rees, Holly A.; Liu, David R. (2018): Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells. In: *Nature reviews. Genetics* 19 (12), S. 770–788. DOI: 10.1038/s41576-018-0059-1.

Riballo, Enriqueta; Kühne, Martin; Rief, Nicole; Doherty, Aidan; Smith, Graeme C. M.; Recio, María-José et al. (2004): A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. In: *Molecular cell* 16 (5), S. 715–724. DOI: 10.1016/j.molcel.2004.10.029.

Robb, G. Brett (2019): Genome Editing with CRISPR-Cas: An Overview. In: *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 19 (1). DOI: 10.1002/cpet.36.

Rodrigues, Gerard A.; Shalaev, Evgenyi; Karami, Thomas K.; Cunningham, James; Slater, Nigel K. H.; Rivers, Hongwen M. (2018): Pharmaceutical Development of

AAV-Based Gene Therapy Products for the Eye. In: *Pharmaceutical research* 36 (2), S. 29. DOI: 10.1007/s11095-018-2554-7.

Russell, Stephen; Bennett, Jean; Wellman, Jennifer A.; Chung, Daniel C.; Yu, Zi-Fan; Tillman, Amy et al. (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. In: *Lancet (London, England)* 390 (10097), S. 849–860. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31868-8.

Ryan, Daniel E.; Taussig, David; Steinfeld, Israel; Phadnis, Smruti M.; Lunstad, Benjamin D.; Singh, Madhurima et al. (2018): Improving CRISPR-Cas specificity with chemical modifications in single-guide RNAs. In: *Nucleic acids research* 46 (2), S. 792–803. DOI: 10.1093/nar/gkx1199.

Sallmyr, Annahita; Rashid, Ishtiaque; Bhandari, Seema Khattri; Naila, Tasmin; Tomkinson, Alan E. (2020): Human DNA ligases in replication and repair. In: *DNA repair* 93, S. 102908. DOI: 10.1016/j.dnarep.2020.102908.

Schmid-Burgk, Jonathan L.; Gao, Linyi; Li, David; Gardner, Zachary; Strecker, Jonathan; Lash, Blake; Zhang, Feng (2020): Highly Parallel Profiling of Cas9 Variant Specificity. In: *Molecular cell* 78 (4), 794-800.e8. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.02.023.

Segurado, Oscar G.; Jiang, Ruhong; Pipe, Steven W. (2022): Challenges and opportunities when transitioning from in vivo gene replacement to in vivo CRISPR/Cas9 therapies - a spotlight on hemophilia. In: *Expert opinion on biological therapy* 22 (9), S. 1091–1098. DOI: 10.1080/14712598.2022.2090241.

Singh, Digvijay; Sternberg, Samuel H.; Fei, Jingyi; Doudna, Jennifer A.; Ha, Taekjip (2016): Real-time observation of DNA recognition and rejection by the RNA-guided endonuclease Cas9. In: *Nature communications* 7, S. 12778. DOI: 10.1038/ncomms12778.

Singh, Digvijay; Wang, Yanbo; Mallon, John; Yang, Olivia; Fei, Jingyi; Poddar, Anustup et al. (2018): Mechanisms of improved specificity of engineered Cas9s revealed by single-molecule FRET analysis. In: *Nature structural & molecular biology* 25 (4), S. 347–354. DOI: 10.1038/s41594-018-0051-7.

Slymaker, Ian M.; Gao, Linyi; Zetsche, Bernd; Scott, David A.; Yan, Winston X.; Zhang, Feng (2016): Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. In: *Science (New York, N.Y.)* 351 (6268), S. 84–88. DOI: 10.1126/science.aad5227.

Sonoda, Eiichiro; Hochegger, Helfrid; Saberi, Alihossein; Taniguchi, Yoshihito; Takeda, Shunichi (2006): Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. In: *DNA repair* 5 (9-10), S. 1021–1029. DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.05.022.

Sternberg, Samuel H.; LaFrance, Benjamin; Kaplan, Matias; Doudna, Jennifer A. (2015): Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9. In: *Nature* 527 (7576), S. 110–113. DOI: 10.1038/nature15544.

Sternberg, Samuel H.; Redding, Sy; Jinek, Martin; Greene, Eric C.; Doudna, Jennifer A. (2014): DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. In: *Nature* 507 (7490), S. 62–67. DOI: 10.1038/nature13011.

Stieger, Knut; Lorenz, Birgit (2010): Gene therapy for vision loss -- recent developments. In: *Discovery medicine* 10 (54), S. 425–433.

Sugimoto, N.; Nakano, S.; Katoh, M.; Matsumura, A.; Nakamuta, H.; Ohmichi, T. et al. (1995): Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes. In: *Biochemistry* 34 (35), S. 11211–11216. DOI: 10.1021/bi00035a029.

Symington, Lorraine S.; Gautier, Jean (2011): Double-strand break end resection and repair pathway choice. In: *Annual review of genetics* 45, S. 247–271. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132435.

Szczelkun, Mark D.; Tikhomirova, Maria S.; Sinkunas, Tomas; Gasiunas, Giedrius; Karvelis, Tautvydas; Pschera, Patrizia et al. (2014): Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (27), S. 9798–9803. DOI: 10.1073/pnas.1402597111.

Tang, Ran; Xu, Zhigang (2020): Gene therapy: a double-edged sword with great powers. In: *Molecular and cellular biochemistry* 474 (1-2), S. 73–81. DOI: 10.1007/s11010-020-03834-3.

Trapani, Ivana; Tornabene, Patrizia; Auricchio, Alberto (2021): Large gene delivery to the retina with AAV vectors: are we there yet? In: *Gene therapy* 28 (5), S. 220–222.

DOI: 10.1038/s41434-020-0174-4.

Truong, Lan N.; Li, Yongjiang; Shi, Linda Z.; Hwang, Patty Yi-Hwa; He, Jing; Wang, Hailong et al. (2013): Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (19), S. 7720–7725. DOI: 10.1073/pnas.1213431110.

Tsai, Shengdar Q.; Wyvekens, Nicolas; Khayter, Cyd; Foden, Jennifer A.; Thapar, Vishal; Reyon, Deepak et al. (2014): Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. In: *Nature biotechnology* 32 (6), S. 569–576. DOI: 10.1038/nbt.2908.

Tsai, Shengdar Q.; Zheng, Zongli; Nguyen, Nhu T.; Liebers, Matthew; Topkar, Ved V.; Thapar, Vishal et al. (2015): GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. In: *Nature biotechnology* 33 (2), S. 187–197. DOI: 10.1038/nbt.3117.

Urnov, Fyodor D.; Rebar, Edward J.; Holmes, Michael C.; Zhang, H. Steve; Gregory, Philip D. (2010): Genome editing with engineered zinc finger nucleases. In: *Nature reviews. Genetics* 11 (9), S. 636–646. DOI: 10.1038/nrg2842.

Vakulskas, Christopher A.; Dever, Daniel P.; Rettig, Garrett R.; Turk, Rolf; Jacobi, Ashley M.; Collingwood, Michael A. et al. (2018): A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. In: *Nature medicine* 24 (8), S. 1216–1224. DOI: 10.1038/s41591-018-0137-0.

van Haasteren, Joost; Li, Jie; Scheideler, Olivia J.; Murthy, Niren; Schaffer, David V. (2020): The delivery challenge: fulfilling the promise of therapeutic genome editing. In: *Nature biotechnology* 38 (7), S. 845–855. DOI: 10.1038/s41587-020-0565-5.

van Houte, Stineke; Ekroth, Alice K. E.; Broniewski, Jenny M.; Chabas, Hélène; Ashby, Ben; Bondy-Denomy, Joseph et al. (2016): The diversity-generating benefits of a prokaryotic adaptive immune system. In: *Nature* 532 (7599), S. 385–388. DOI: 10.1038/nature17436.

- Wang, Daqi; Zhang, Chengdong; Wang, Bei; Li, Bin; Wang, Qiang; Liu, Dong et al. (2019): Optimized CRISPR guide RNA design for two high-fidelity Cas9 variants by deep learning. In: *Nature communications* 10 (1), S. 4284. DOI: 10.1038/s41467-019-12281-8.
- Wang, Hailong; Xu, Xingzhi (2017): Microhomology-mediated end joining: new players join the team. In: *Cell & bioscience* 7, S. 6. DOI: 10.1186/s13578-017-0136-8.
- Wang, Tim; Wei, Jenny J.; Sabatini, David M.; Lander, Eric S. (2014): Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. In: *Science (New York, N.Y.)* 343 (6166), S. 80–84. DOI: 10.1126/science.1246981.
- Wang, Yao; Wang, Mingrui; Zheng, Ting; Hou, Yingzi; Zhang, Pingjing; Tang, Tao et al. (2020): Specificity profiling of CRISPR system reveals greatly enhanced off-target gene editing. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 2269. DOI: 10.1038/s41598-020-58627-x.
- Wiedenheft, Blake; Sternberg, Samuel H.; Doudna, Jennifer A. (2012): RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. In: *Nature* 482 (7385), S. 331–338. DOI: 10.1038/nature10886.
- Wilkinson, Royce A.; Martin, Coleman; Nemudryi, Artem A.; Wiedenheft, Blake (2019): CRISPR RNA-guided autonomous delivery of Cas9. In: *Nature structural & molecular biology* 26 (1), S. 14–24. DOI: 10.1038/s41594-018-0173-y.
- Wimmer, T.; Lorenz, B.; Stieger, K. (2016): Quantification of the vascular endothelial growth factor with a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) based single molecule biosensor. In: *Biosensors & bioelectronics* 86, S. 609–615. DOI: 10.1016/j.bios.2016.07.058.
- Wimmer, Tobias; Bonthu, Dileep; Moeschl, Vincent; Kleekamp, Philip; Thiel, Christian; Lytvynchuk, Lyubomyr et al. (2021): A Bioluminescence Resonance Energy Transfer-Based Reporter System: Characterization and Applications. In: *The CRISPR journal* 4 (6), S. 884–895. DOI: 10.1089/crispr.2021.0023.
- Wimmer, Tobias; Schroeter, Eva; Lorenz, Birgit; Stieger, Knut (2017): Detection of the Vascular Endothelial Growth Factor with a Novel Bioluminescence Resonance Energy Transfer Pair Using a Two-Component System. In: *Sensors (Basel, Switzerland)* 17 (1), S. 145. DOI: 10.3390/s17010145.

Wirth, Thomas; Parker, Nigel; Ylä-Herttuala, Seppo (2013): History of gene therapy. In: *Gene* 525 (2), S. 162–169. DOI: 10.1016/j.gene.2013.03.137.

Wu, Xuebing; Scott, David A.; Kriz, Andrea J.; Chiu, Anthony C.; Hsu, Patrick D.; Dadon, Daniel B. et al. (2014): Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. In: *Nature biotechnology* 32 (7), S. 670–676. DOI: 10.1038/nbt.2889.

Xu, Y.; Piston, D. W.; Johnson, C. H. (1999): A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1), S. 151–156. DOI: 10.1073/pnas.96.1.151.

Yakovchuk, Peter; Protozanova, Ekaterina; Frank-Kamenetskii, Maxim D. (2006): Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. In: *Nucleic acids research* 34 (2), S. 564–574. DOI: 10.1093/nar/gkj454.

Yang, Han; Ren, Shuling; Yu, Siyuan; Pan, Haifeng; Li, Tingdong; Ge, Shengxiang et al. (2020): Methods Favoring Homology-Directed Repair Choice in Response to CRISPR/Cas9 Induced-Double Strand Breaks. In: *International journal of molecular sciences* 21 (18). DOI: 10.3390/ijms21186461.

Yanik, Mert; Müller, Brigitte; Song, Fei; Gall, Jacqueline; Wagner, Franziska; Wende, Wolfgang et al. (2017): In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies. In: *Progress in retinal and eye research* 56, S. 1–18. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2016.09.001.

Yaung, Stephanie J.; Esvelt, Kevin M.; Church, George M. (2014): CRISPR/Cas9-mediated phage resistance is not impeded by the DNA modifications of phage T4. In: *PloS one* 9 (6), e98811. DOI: 10.1371/journal.pone.0098811.

Zhang, Dingbo; Zhang, Huawei; Li, Tingdong; Chen, Kunling; Qiu, Jin-Long; Gao, Caixia (2017): Perfectly matched 20-nucleotide guide RNA sequences enable robust genome editing using high-fidelity SpCas9 nucleases. In: *Genome biology* 18 (1), S. 191. DOI: 10.1186/s13059-017-1325-9.

Zhang, Liang; He, Wei; Fu, Rongjie; Xu, Han (2023): Guide-specific loss of efficiency and off-target reduction with Cas9 variants. In: *bioRxiv*. DOI: 10.1101/2023.03.16.532856.

Zhang, Liyang; Rube, H. Tomas; Vakulskas, Christopher A.; Behlke, Mark A.; Bussemaker, Harmen J.; Pufall, Miles A. (2020): Systematic in vitro profiling of off-target affinity, cleavage and efficiency for CRISPR enzymes. In: *Nucleic acids research* 48 (9), S. 5037–5053. DOI: 10.1093/nar/gkaa231.

Ziccardi, Lucia; Cordeddu, Viviana; Gaddini, Lucia; Matteucci, Andrea; Parravano, Mariacristina; Malchiodi-Albedi, Fiorella; Varano, Monica (2019): Gene Therapy in Retinal Dystrophies. In: *International journal of molecular sciences* 20 (22). DOI: 10.3390/ijms20225722.

Zickler, D.; Kleckner, N. (1999): Meiotic chromosomes: integrating structure and function. In: *Annual review of genetics* 33, S. 603–754. DOI: 10.1146/annurev.genet.33.1.603.

# 11 Anhang

## 11.1 Nutzungsgenehmigungen

### **Erläuterung zu Abbildung 1.1:**

Aus *Entering the Modern Era of Gene Therapy* (Anguela und High 2019).

Rechtsinhaber: Annual Reviews, Inc.

Lizenzvereinbarung durch Copyright Clearance Center, Inc. („CCC“) im Namen des Rechtsinhabers.

### **Erläuterung zu Abbildung 1.2:**

Aus *Electronic Circular Dichroism of the Cas9 Protein and gRNA:Cas9 Ribonucleoprotein Complex* (Halat et al. 2021).

Copyright © 2021 der Autoren.

Lizenznehmer MDPI, Basel, Schweiz. Dieser Artikel ist ein Open-Access-Artikel, der unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution (CC BY) Lizenz verbreitet wird (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Das Bild wurde aus RCSB-PDB-ID 4CMP (Jinek et al. 2014) mit der Software PyMOL (Schrödinger Inc., New York, USA) durch die Autoren erstellt.

### **Erläuterung zu Abbildung 1.5:**

Aus *In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies* (Yanik et al. 2017).

Herausgeber des lizenzierten Inhalts: Elsevier

Lizenzvereinbarung durch Elsevier und Copyright Clearance Center, Inc. („CCC“) im Namen des Rechtsinhabers.

### **Erläuterung zu Abbildung 1.6:**

Aus *Quantification of the vascular endothelial growth factor with a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) based single molecule biosensor* (Wimmer et al. 2016).

Herausgeber des lizenzierten Inhalts: Elsevier

Lizenzvereinbarung durch Elsevier und Copyright Clearance Center, Inc. („CCC“) im Namen des Rechtsinhabers.

## 11.2 Daten und Abbildungen

Tabelle 11.1: Schneideaktivität von px459(In6G5) bei den Mismatch-Target-Sequenzen

Target Nr.	Position und Basenaustausch	Frameshift in %	Standardabweichung
WT	-	54,2268	5,7340
1	Pos20 A-T	36,9775	5,2710
2	Pos20 A-C	36,9317	4,5588
3	Pos20 A-G	30,7303	3,6139
4	Pos19 C-A	3,9378	6,8431
5	Pos19 C-T	38,9317	5,6745
6	Pos19 C-G	11,9145	4,4558
7	Pos18 G-A	14,3832	5,2689
8	Pos18 G-T	9,6486	18,5070
9	Pos18 G-C	-3,1578 (nd)	2,2884
10	Pos17 A-T	-0,8812 (nd)	8,1638
11	Pos17 A-C	19,9365	15,7755
12	Pos17 A-G	15,4402	13,4125
13	Pos16 G-A	-0,7779 (nd)	8,5341
14	Pos16 G-T	16,1260	5,8920
15	Pos16 G-C	-5,2685	9,3102
16	Pos15 A-T	19,0514	5,4928
17	Pos15 A-C	-0,3103	6,0618
18	Pos15 A-G	32,6803	5,1132
19	Pos14 C-A	-0,9619 (nd)	7,8172
20	Pos14 C-T	-0,3120 (nd)	9,1297
21	Pos14 C-G	2,0943	7,1666
22	Pos13 T-A	-0,7614 (nd)	9,0477
23	Pos13 T-C	1,3602	4,0994
24	Pos13 T-G	-1,0761 (nd)	5,3179
25	Pos12 A-T	23,1668	5,6033
26	Pos12 A-C	9,3190	4,4894
27	Pos12 A-G	19,8461	3,9236
28	Pos11 C-A	2,0620	5,2991
29	Pos11 C-T	21,9029	5,1538
30	Pos11 C-G	11,0219	2,9095
31	Pos10 A-T	21,7470	5,1149
32	Pos10 A-C	6,0953	2,9492
33	Pos10 A-G	21,2617	7,5155
34	Pos9 C-A	10,4965	6,9170
35	Pos9 C-T	15,2698	11,6285
36	Pos9 C-G	4,7418	12,0381
37	Pos8 C-A	2,6458	6,5193
38	Pos8 C-T	5,1604	5,2645
39	Pos8 C-G	28,1600	5,9255
40	Pos7 A-T	12,8176	5,3282

41	Pos7 A-C	-0,7948 (nd)	3,9879
42	Pos7 A-G	0,8312	3,2078
43	Pos6 A-T	4,9581	4,0854
44	Pos6 A-C	2,1134	4,8448
45	Pos6 A-G	5,9143	27,8613
46	Pos5 G-A	6,5042	22,4971
47	Pos5 G-T	14,7784	18,0644
48	Pos5 G-C	4,4172	20,6689
49	Pos4 G-A	9,0530	9,2430
50	Pos4 G-T	6,1337	6,2414
51	Pos4 G-C	-4,7096 (nd)	8,3969
52	Pos3 A-T	12,2524	8,3696
53	Pos3 A-C	2,8342	2,9875
54	Pos3 A-G	19,3640	2,5309
55	Pos2 G-A	3,2060	3,5673
56	Pos2 G-T	4,1618	3,3196
57	Pos2 G-C	0,1928	4,7936
58	Pos1 C-A	23,4280	3,3257
59	Pos1 C-T	37,2989	4,9860
60	Pos1 C-G	14,6733	5,7773

Tabelle 11.2: Schneideaktivität von eSpCas9(1.1)(In6G5)

Target Nr.	Position und Basenaustausch	Frameshift in %	Standardabweichung
WT	-	5,6817	5,0849
1	Pos20 A-T	4,3503	5,9644
2	Pos20 A-C	8,3074	4,4653
3	Pos20 A-G	2,9885	3,2121
19	Pos14 C-A	10,5180	5,6737
20	Pos14 C-T	-0,8199 (nd)	5,5330
21	Pos14 C-G	1,4425	8,6871
34	Pos9 C-A	-2,4957 (nd)	9,1824
35	Pos9 C-T	1,4905	8,8652
36	Pos9 C-G	2,2402	20,4227
58	Pos1 C-A	4,5887	22,4203
59	Pos1 C-T	1,8483	24,6334
60	Pos1 C-G	3,2007	24,7444

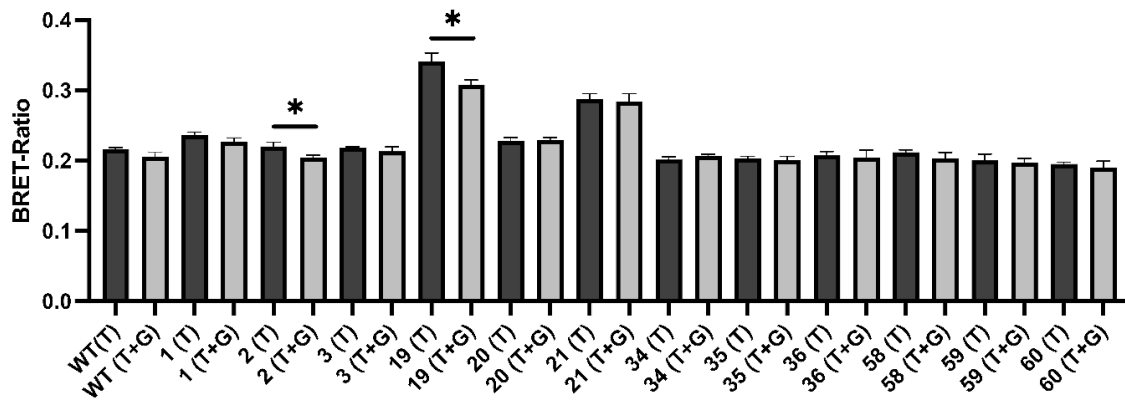


Abbildung 11.1: BRET-Ratios eSpCas9(1.1)(In6G5)

Abgebildet sind die BRET-Ratios der Transfektionen der BRET-Reporter-Plasmide und der Kotransfektionen mit eSpCas9(1.1) und der Guide-Sequenz In6G5, gemessen durch den BRET-Assay. \* $p < 0.05$  für eine signifikante Abnahme nach ungepaartem t-Test.

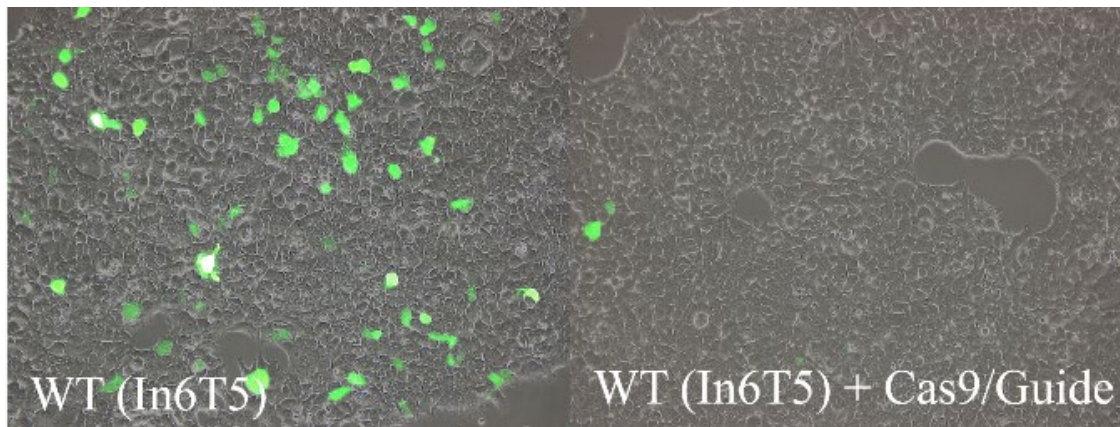
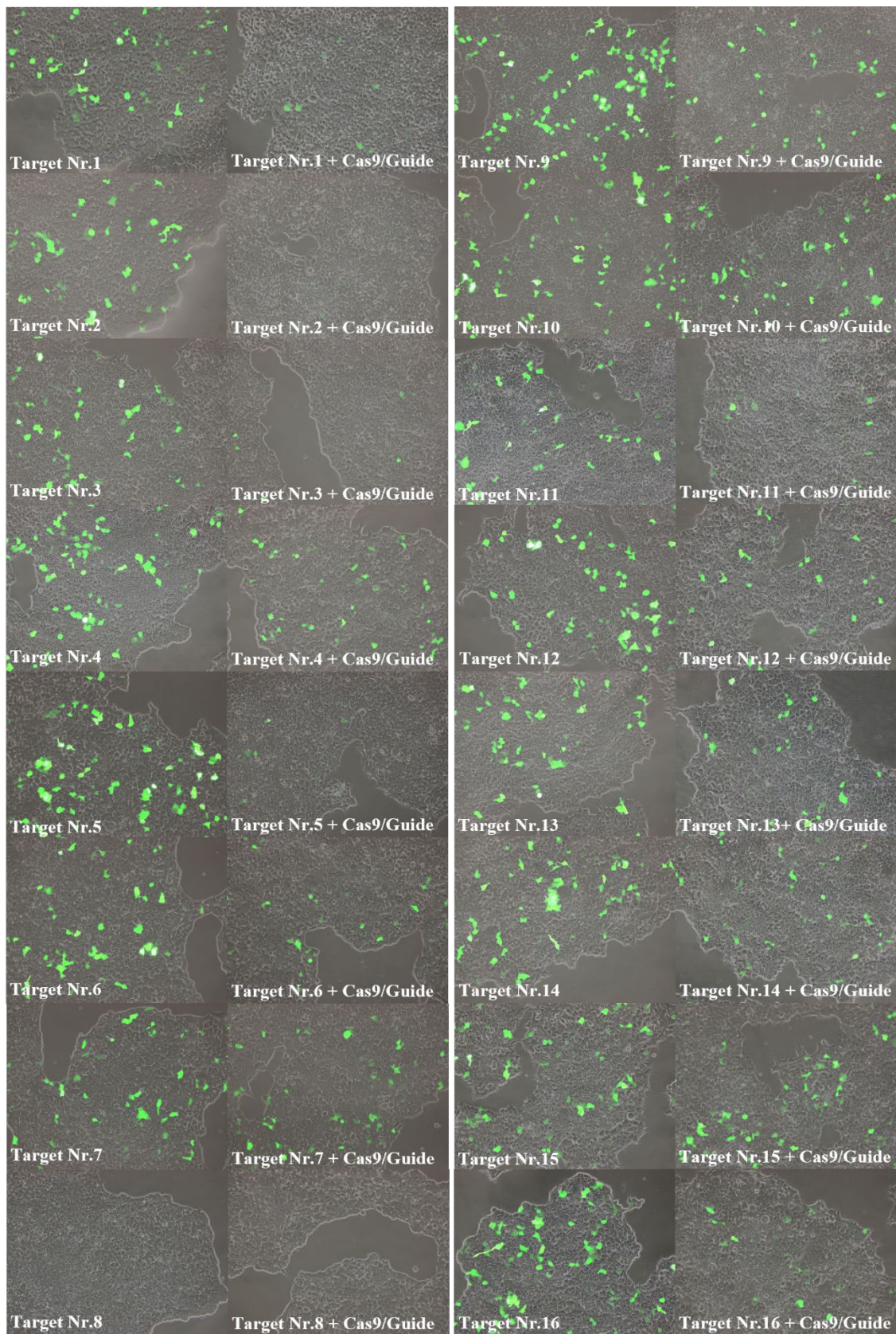
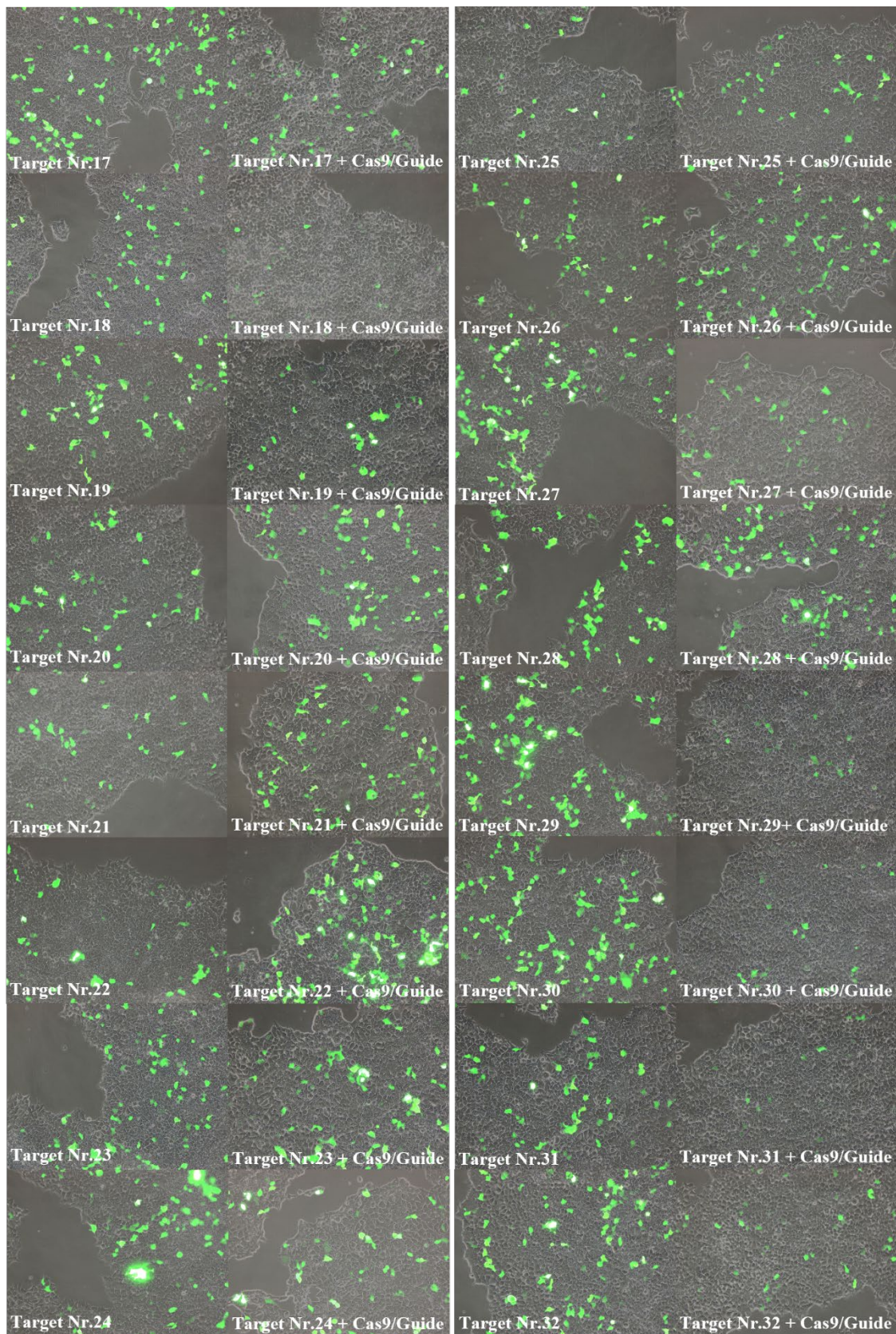
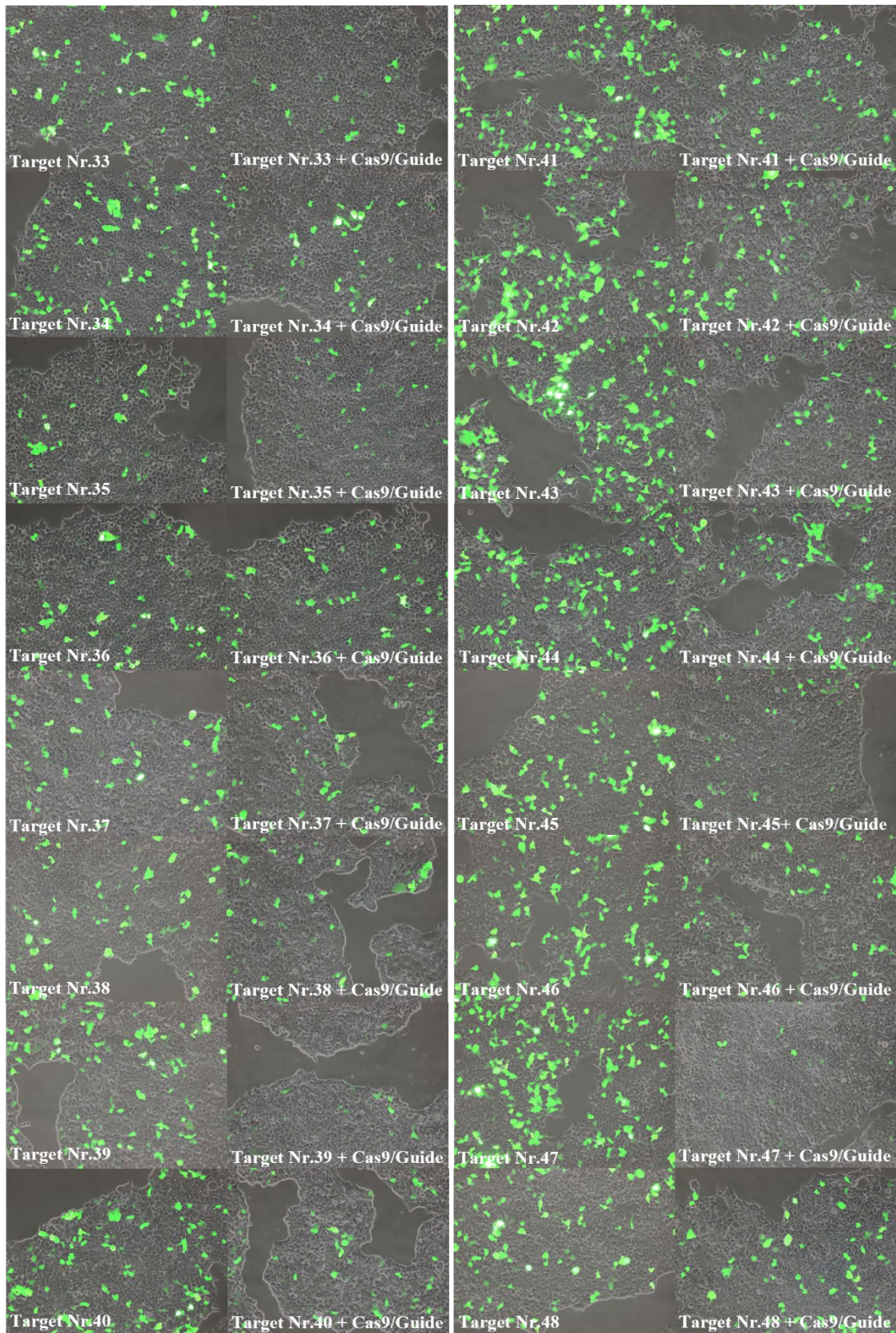


Abbildung 11.2: Fluoreszenz/Phasenkontrast-Overlay-Aufnahme der WT-Target-Sequenz mit WT-SpCas9  
 Dargestellt sind die Transfektion des BRET-Reporter-Plasmids mit der WT-Target-Sequenz In6T5 (links) sowie die Kotransfektion mit WT-SpCas9 und der WT-Guide-Sequenz In6G5 (rechts).







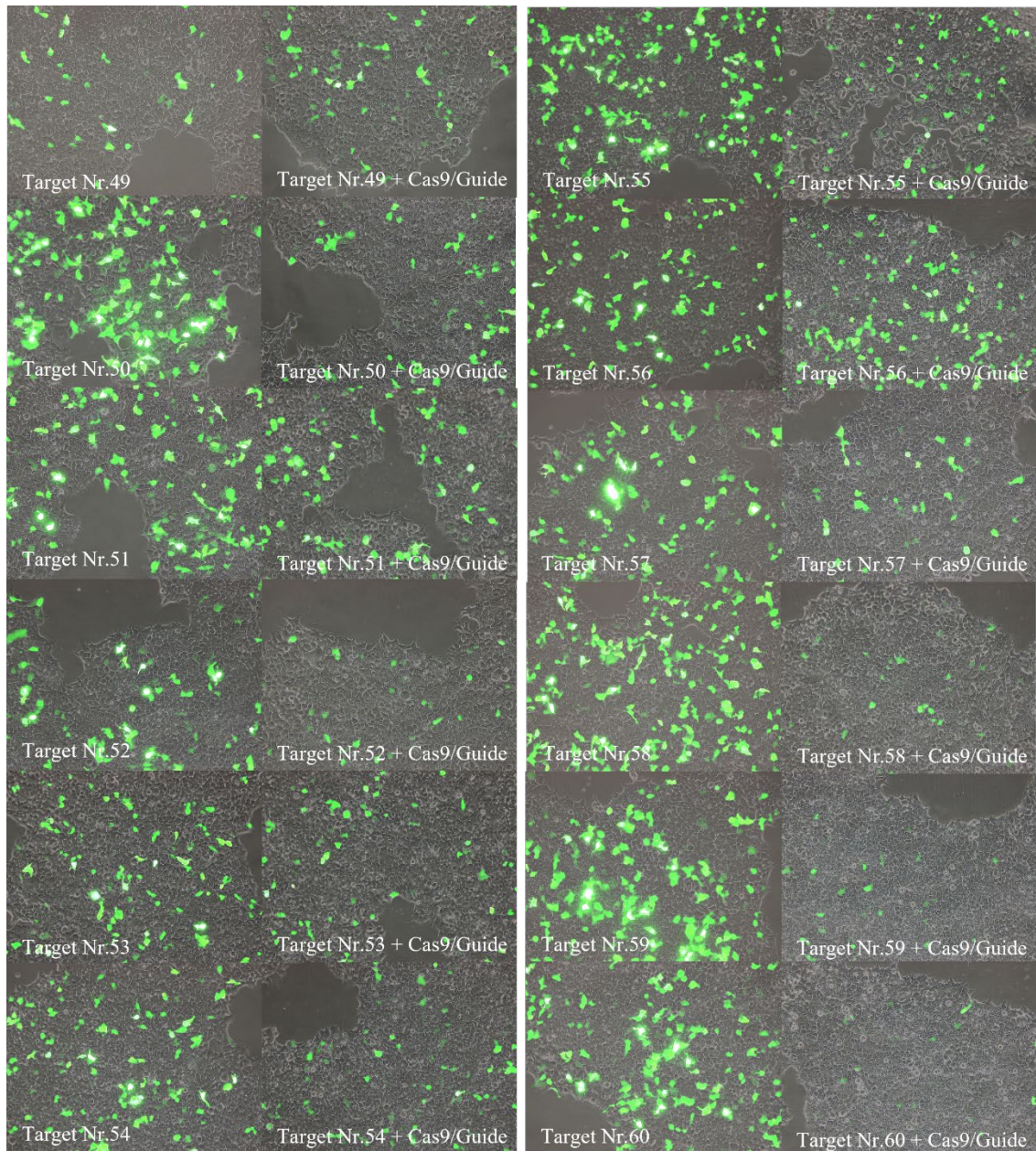


Abbildung 11.3: Fluoreszenz/Phasenkontrast-Overlay-Aufnahmen von WT-SpCas9

Dargestellt sind die BRET-Reporter-Plasmide der Mismatch-Target-Sequenzen nach Monotransfektion (links) und nach Kotretransfektion mit px459(In6G5) (rechts).

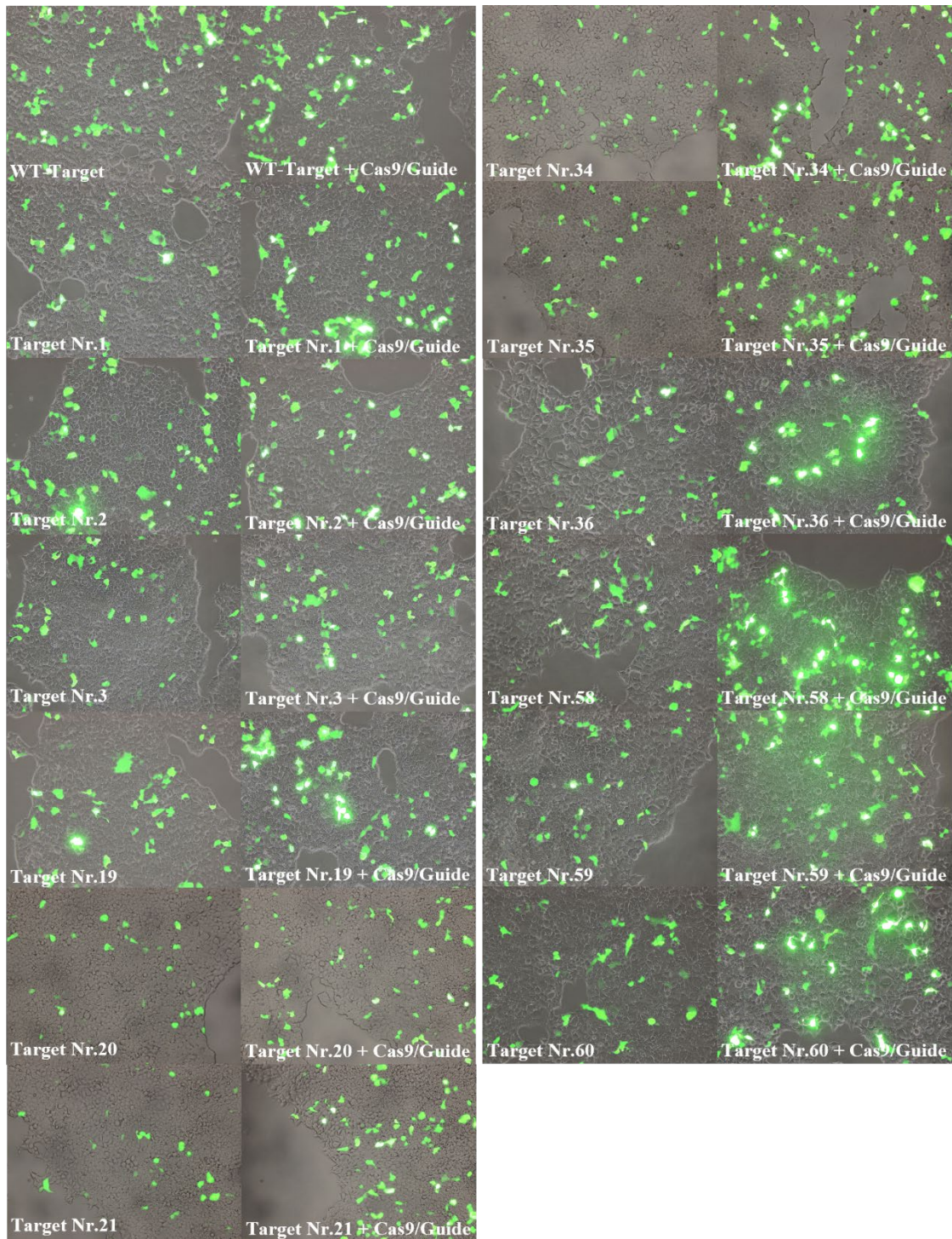


Abbildung 11.4: Fluoreszenz/Phasenkontrast-Overlay-Aufnahmen von eSpCas9(1.1)

Dargestellt sind die BRET-Reporter-Plasmide der ausgewählten Mismatch-Target-Sequenzen nach Monotransfektion (links) und nach Kotransfektion mit eSpCas9(1.1)(In6G5) (rechts).

## 12 Publikation

Wimmer, Tobias; Lorenz, Anthony; Hossfeld, Lars Thomas; Goud Ponnampalani, Surya Prakash; Lytvynchuk, Lyubomyr; Stieger, Knut (2025): Evaluation of CRISPR-Cas9 mismatch activity using a BRET-based reporter system. In: *Microchemical Journal* 208, S. 112256. DOI: 10.1016/j.microc.2024.112256.

## 13 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

## 14 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all jenen Menschen bedanken, die mich auf meinem Weg begleitet haben und deren Unterstützung entscheidend für die Entstehung dieser Dissertation war.

Ich möchte mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger bedanken, der mir das Thema zur Verfügung stellte und mir das Vertrauen schenkte, eine Promotion in seiner Forschungsgruppe durchzuführen. Ich bedanke mich außerdem für die großartige Betreuung, den wissenschaftlichen Austausch und das Korrekturlesen der Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Tobias Wimmer, der mich nicht nur in die Laborarbeit einführte, sondern mich auch während der gesamten Arbeit unermüdlich unterstützte. Seine konstruktive Kritik sowie Korrektur, sein umfassendes Fachwissen und seine herausragende Betreuung haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Ein herzlicher Dank geht an die gesamte AG Experimentelle Ophthalmologie der Augenklinik für ihre Einführung, Ansprechbarkeit, Unterstützung, den wissenschaftlichen Austausch und die positive Arbeitsatmosphäre.

Ich möchte auch Herrn Dr. Jörn Pons-Kühnemann für seine wertvolle statistische Beratung danken und Herrn Simon Schröer für das Korrekturlesen der Dissertation und seine motivierende Unterstützung bei statistischen Fragestellungen.

Ein spezieller Dank gebührt Frau Evelyne Brockhaus für ihre geduldige Unterstützung bei der Einarbeitung in die Erstellung der grafischen Abbildungen.

Frau Friederike Schmorleiz danke ich für das Korrekturlesen der Dissertation und besonders für den Rückhalt sowie die Unterstützung während der arbeitsintensiven Zeit.

Mein Dank gilt ebenso all meinen Freunden, die mich in den letzten Jahren unterstützt haben und meine Zeit in Gießen unvergesslich gemacht haben.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern, meinen Großeltern und meiner gesamten Familie von Herzen danken. Ihre bedingungslose Unterstützung hat mir die Kraft gegeben, meinen akademischen Weg zu gehen und diese Promotion abzuschließen. Ohne sie wäre dies nicht möglich gewesen.