

Entwicklung einer Strategie zur Korrektur von Abca4
Mutationen im murinen in vitro Model basierend auf
therapeutischer Genom Editierung

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Maximovici, Astrid Claudia

aus Heidelberg

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Gutachter: Prof. Dr. Dagmar Nolte

Tag der Disputation: 03.11.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das menschliche Auge.....	1
1.1.1	Aufbau des Auges.....	1
1.1.2	Die Retina, Photorezeptoren und das RPE	2
1.1.3	Der visuelle Zyklus	3
1.2	Erbliche Netzhautdystrophien.....	4
1.2.1	Morbus Stargardt	4
1.3	Gentherapie	5
1.3.1	Gentherapieverfahren	6
1.3.2	Genome Editing	6
1.3.3	Gentherapievektoren.....	7
1.3.4	Gentherapie im Auge	8
1.4	CRISPR-Cas9	9
1.5	DNA-Reparatur	11
1.5.1	NHEJ	11
1.5.2	MMEJ.....	12
1.5.3	HDR	13
1.6	Methoden zur Quantifizierung der Effizienz von Genom Editierung	14
1.6.1	Notwendigkeit von Reportersystemen	14
1.6.2	Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer (BRET-Assay)	14
1.6.3	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)	15
1.7	Zielsetzung.....	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Material	17
2.1.1	Geräte.....	17
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3	Chemikalien	18
2.1.4	Puffer und Lösungen.....	20

2.1.5	Kit-Systeme.....	21
2.1.6	Enzyme	21
2.1.7	Vektoren und Plasmide	23
2.1.8	Oligonukleotide und Primer	23
2.1.9	DNA-Größenstandards.....	25
2.1.10	Antibiotikakonzentrationen in Bakterien- und Zellkulturen	25
2.1.11	Organismen	26
2.1.12	Kulturmedien.....	27
2.1.13	Software.....	28
2.2	Methoden	29
2.2.1	Arbeiten mit RNA	29
2.2.1.1	Isolation von gesamt RNA aus tierischem Gewebe	29
2.2.1.2	Überprüfung der RNA Qualität	30
2.2.1.3	Umschreibung von mRNA aus gesamt RNA in cDNA	30
2.2.2	Arbeiten mit DNA	31
2.2.2.1	Hybridisierung	31
2.2.2.2	Restriktionsverdau	31
2.2.2.3	Ligation von DNA-Molekülen.....	32
2.2.2.4	Nachverdau.....	32
2.2.2.5	Restriktions-Klonierung von Guide- und Target-Sequenzen.....	33
2.2.2.6	Sequenzierung von Plasmidklonen	34
2.2.2.7	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	34
2.2.2.8	Polymerasekettenreaktion (PCR)	34
2.2.2.9	Agarosegelelektrophorese	36
2.2.2.10	DNA-Extraktion aus Agarosegel.....	36
2.2.2.11	Aufreinigen von DNA für die Transfektion.....	37
2.2.3	Arbeiten mit Bakterien	37
2.2.3.1	Kultivierung von <i>E. coli</i>	37
2.2.3.2	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i>	37

2.2.3.3	Transformation.....	38
2.2.3.4	Glycerolstock	38
2.2.3.5	Isolation von Plasmid DNA.....	39
2.2.4	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen.....	40
2.2.4.1	Kultivierung von HEK293-T und 3T3-NIH.....	40
2.2.4.2	Auszählung von Zellen	41
2.2.4.3	Transfektion	41
2.2.4.4	Transfektion für die FACS Analyse.....	43
2.2.4.5	Fluoreszenz Mikroskopie.....	44
2.2.4.6	BRET-Assay	44
2.2.4.7	Durchflusszytometrie (FACS).....	45
2.2.4.8	Isolation eukaryotischer DNA	46
2.2.4.9	Puromycinselektion	47
2.2.5	Statistische Auswertung	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Identifizierung und Klonierung der guideRNAs	49
3.1.1	Identifizierung der guideRNA Sequenzen.....	49
3.1.2	Klonierungen der gRNA/Cas9 Komplexe.....	50
3.1.3	Klonierungen der Target-Sequenzen.....	51
3.2	Überprüfung der Aktivität der gRNA/Cas9 Komplexe	52
3.3	Herstellung des Templates.....	55
3.3.1	Herstellung und Überprüfung der cDNA	55
3.3.2	Restriktions-Klonierung des CMV-Promotor	56
3.3.3	Klonierung in den TOPO-Vektor.....	57
3.3.4	Isolation des Templates	58
3.4	Herstellung des Reporters.....	59
3.5	Überprüfung der Reparatur durch den Reporter	61
3.5.1	Kontrolltransfektion	61
3.5.2	Integrationsprüfung	62

3.6	Überprüfung der Reparatur durch das Template	64
3.6.1	Puromycin Selektionskonzentration.....	64
3.6.2	Transfektion und Selektion der 3T3-NIH Zellen	65
3.6.3	Auswertung der genomischen DNA der transfizierten 3T3-NIH Zellen	67
4	Diskussion.....	70
4.1	Schnittstellen der guideRNA.....	70
4.2	Konstruktion des Templates und des Reporters	74
4.3	Reparatur durch Template und Reporter	76
4.4	Fazit und Ausblick	81
5	Zusammenfassung.....	82
6	Summary.....	83
7	Abkürzungsverzeichnis	84
8	Abbildungsverzeichnis.....	87
9	Tabellenverzeichnis	88
10	Literaturverzeichnis	89
11	Publikationsverzeichnis	98
12	Erklärung zur Dissertation	99
13	Danksagung.....	100

1 Einleitung

1.1 Das menschliche Auge

1.1.1 Aufbau des Auges

Der grundlegende Aufbau des Auges besteht aus dessen äußeren drei Schichten sowie dem Inhalt der einzelnen Augenkammern. Die Äußerste, bestehend aus der undurchsichtigen, festen Lederhaut (Sclera) und der durchsichtigen Hornhaut (Cornea), bildet die Hülle des Auges. Sie gewährleistet dem Auge Stabilität und durch die Cornea eine Lichtdurchlässigkeit und -brechung (Grehn 2019; Kirsch 2020). Die nachfolgende Gefäßhaut (Uvea) setzt sich aus der Regenbogenhaut (Iris), dem Ziliarkörper (Corpus ciliare) und der Aderhaut (Choroidea) zusammen. Letztere ist durch ihre große Anzahl an Blutgefäßen vor allem für die Versorgung der Retina und des Pigmentepithels mit Sauerstoff und Nährstoffen zuständig. Zusätzlich werden die inneren Schichten der Retina durch die Äste der Zentralarterie (A. centralis retinae) versorgt. Außerdem befindet sich zwischen Choroidea und Retina die sogenannte Bruch-Membran, die beide Schichten voneinander trennt und somit die Blut-Retina Schranke des Auges bildet (Lang und Lang 2019; Kirsch 2020). Die innerste und sensorische Schicht bildet die Netzhaut (Retina), die während der Embryonalentwicklung aus dem Diencephalon entsteht und somit eine Ausstülpung des Gehirns darstellt. Auch sie unterteilt sich wiederum in mehrere Unterschichten, in die der Photorezeptoren und anderer Signal weiterleitenden Zellen (Stratum nervosum retinae) und in die des retinalen Pigmentepithels (RPE, Stratum pigmentosum retinae) (Grehn 2019; Kirsch 2020).

Photorezeptoren lassen sich anhand ihrer Morphologie und Funktion in Stäbchen und Zapfen unterteilen. Sie stellen das 1. Neuron der Sehbahn dar und sind innerhalb der Retina unterschiedlich verteilt. Während in der Peripherie Stäbchen dominieren und die Anzahl der Zapfen von zentral nach peripher immer weiter abnimmt (Curcio et al. 1990), befindet sich im Zentrum der Retina der sogenannte gelbe Fleck (Macula lutea). Dieser beinhaltet wiederum die Fovea centralis, in welcher sich nur Zapfen befinden und somit den Punkt des schärfsten Sehens bildet (Grehn 2019; Kirsch 2020; Mense 2020). Das 2. Neuron der Sehbahn stellen die bipolaren Zellen dar. Sie bilden zusammen mit den Horizontalzellen und amakrinen Zellen die innere Körnerschicht. Weiter geleitet werden die Signale über das 3. Neuron, den Ganglienzellen, die sich in der Ganglienzellschicht befinden. Deren Axone verlassen das Auge über den Blinden Fleck und bilden den Sehnerv (Nervus opticus). Dessen Nervenfasern ziehen, nachdem sie sich

an der Sehnervenkreuzung (Chiasma opticum) aufteilen als Tractus opticus zum Corpus geniculatum laterale (CGL). Dort befindet sich das 4. Neuron der Sehbahn und es erfolgt eine weitere Verschaltung, bevor das Signal über die Sehstrahlung (Radiatio optica) in den primären visuellen Kortex gelangt und dort weiter verarbeitet wird (Kirsch 2020; Mense 2020).

1.1.2 Die Retina, Photorezeptoren und das RPE

Wie bereits zuvor beschrieben besteht die Retina aus mehreren Schichten, in denen sich verschiedene Zellarten mit unterschiedlicher Funktion und Morphologie befinden. Dabei ist der besondere Aufbau der Retina zu beachten der ausgehend vom vorderen Teil des Auges beschrieben wird. Die innerste Schicht bilden die Ganglienzellen mit ihren Axonen, gefolgt von den Zellen der inneren und äußeren Körnerschicht sowie deren synaptischen Verschaltungen. Die äußere Körnerschicht beinhaltet die Zellkörper der Photorezeptoren, deren inneren und äußeren Segmente bilden jeweils eigene Schichten. Das retinale Pigmentepithel bildet den Abschluss der Retina und ist durch die Bruchmembran von der Choroidea getrennt (Kolb 2005b; Mense 2020). Das einfallende Licht muss daher mehrere Zellschichten durchdringen bevor es die Photorezeptoren erreicht (Kolb 2005b).

Photorezeptoren lassen sich in zwei Arten unterteilen, die Stäbchen und die Zapfen. Dabei unterscheiden sie sich sowohl in ihrem Aufbau als auch in ihrer Funktion. Stäbchen sind viel lichtsensibler als Zapfen und sind für das skotopische Sehen (Nachtsehen) zuständig (Mense 2020). Allerdings besitzen sie nur ein geringes räumliches Auflösungsvermögen und somit nur eine geringe Sehschärfe (Mustafi et al. 2009). Das Außensegment (OS) besteht aus mehreren einzelnen membranösen Scheiben (Disks) ähnlicher Größe, die das Sehpigment enthalten und sich innerhalb der Zellmembran befinden. Zu dieser besitzen sie keine Verbindung mehr und sind von Cytoplasma umgeben (Kolb 2005a; Mense 2020). Zapfen dagegen sind auf das photopische Sehen (Tag- und Farbsehen) spezialisiert (Kirsch 2020). Sie sind im Vergleich zu den Stäbchen lichtunempfindlicher, benötigen somit eine größere Helligkeit, besitzen dafür aber eine höhere visuelle Schärfe. Innerhalb der Zapfen gibt es drei Unterarten, die sichtbares Licht im kurzen (415 – 430 nm), mittleren (530 – 537 nm) und langen (555 – 565 nm) Wellenlängenbereich wahrnehmen (Mustafi et al. 2009). Im Unterschied zu den Stäbchen haben die Disks der Zapfen weiterhin eine Verbindung zur Zellmembran und stellen viel mehr Invaginationen dar. Sie sind von Interstitialflüssigkeit umgeben und beinhalten ebenfalls das Sehpigment (Mustafi et al. 2009; Mense 2020).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Retina stellt das retinale Pigmentepithel (RPE) dar. Durch seine unmittelbare Nähe zur Schicht der Photorezeptoren übernimmt es mehrere essenziellen Aufgaben für diese. Eine der wichtigsten Funktionen des RPE ist die Umwandlung von *all-trans*-Retinal in *11-cis*-Retinal, einem essenziellen Bestandteil des visuellen Zyklus (siehe 1.1.3). Weitere Aufgaben des RPE sind unter anderem das Absorbieren von Streulicht sowie die Versorgung der Photorezeptoren mit Sauerstoff und Nährstoffen. Da Photorezeptoren sich nicht mehr teilen, sich aber anteilig erneuern können, ist das RPE zusätzlich für die Phagozytose von abgestoßenen Bestandteilen dieser zuständig (Strauss 2005).

1.1.3 Der visuelle Zyklus

Der visuelle Zyklus beschreibt den Ablauf mehrerer Reaktionen innerhalb der Photorezeptoren und des RPE. Ein wesentlicher Bestandteil dieser ist das Sehpigment, eine Kombination aus unterschiedlichen Formen des Retinal sowie einem Membranprotein, dem so genannten Opsin. Dieses bestimmt, wie ein Photorezeptor auf einfallendes Licht reagiert und dieses Signal weiterleitet. Opsine unterscheiden sich sowohl zwischen Stäbchen und Zapfen als auch innerhalb der Zapfen selbst. Sie bestimmen welche Wellenlänge des sichtbaren Lichtes wahrgenommen wird (Kiser et al. 2014). Das am besten erforschte und bekannteste Beispiel ist das Rhodopsin der Stäbchen.

Retinal liegt in den Photorezeptoren als *11-cis*-Retinal vor. Sobald auf diese Licht fällt, wird das *11-cis*-Retinal des Rhodopsins in *all-trans*-Retinal isomerisiert. Dadurch wird das Rhodopsin über unterschiedliche Zwischenstufen aktiviert und löst eine Signalkaskade aus (Strauss 2005; Palczewski 2014; Kiser et al. 2014).

Das anschließend inaktivierte Rhodopsin gibt *all-trans*-Retinal wieder frei, welches zu einem geringen Anteil die Disks durch Diffusion verlässt. Der überwiegende Anteil bindet über eine Schiff'sche Base an Phosphatidylethanolamine (PE), einem Membranlipid, und bildet so N-retinylidene-PE (Sparrow et al. 2010; Kiser et al. 2014). Dieses kann aus den Disks jedoch nur über einen ATP abhängigen Transporter, dem ABCA4 entfernt werden. Er fungiert als Flippase, in dem es N-retinylidene-PE von der Innenseite der Diskmembran auf dessen Außenseite klappt (Beharry et al. 2004; Tsybovsky et al. 2010; Quazi et al. 2012; Kiser et al. 2014). Mutationen in der genetischen Struktur des ABCA4 können zu schweren Erkrankungen der Retina führen (siehe 1.2.1).

Das *all-trans*-Retinal wird im Cytoplasma durch eine Dehydrogenase in einen Alkohol umgewandelt und gelangt durch Diffusion in das RPE. In diesem wird das *all-trans*-Retinol über mehrere enzymatische Schritte zurück in *11-cis*-Retinal umgewandelt (Baehr et al. 2003; Kiser et al. 2014). Von dort gelangt es während einer Dunkelphase

unter anderem durch Bindungsproteine in die Photorezeptoren und steht für einen neuen Durchlauf des visuellen Zyklus zur Verfügung (Kiser et al. 2014).

1.2 Erbliche Netzhautdystrophien

Die Gruppe der erblichen Retina- und Makuladystrophien umfasst ein breit gestreutes Feld unterschiedlicher Erkrankungen und Ausprägungen. Der überwiegende Teil dieser Dystrophien manifestiert sich bereits im frühen Kindesalter, einige werden jedoch mit Erkrankungen des höheren Lebensalters assoziiert. Unterteilen lassen sich diese Erkrankungen z.B. anhand der zuerst betroffenen Photorezeptoren in die Stäbchen-Zapfen-Dystrophien (Retinopathia pigmentosa) und die Zapfen-Stäbchen-Dystrophien, allerdings sind auch isolierte Zapfendystrophien bekannt. Viele dieser Erkrankungen können durch Mutationen in unterschiedlichen Genen ausgelöst werden und können sowohl die Photorezeptoren direkt als auch das RPE betreffen (Nash et al. 2015). Eine kausale Therapie für die unterschiedlichen erblichen Netzhautdystrophien existiert nach heutigem Stand nicht. Einzig und allein für Erkrankungen, die durch eine Mutation im *RPE65* Gen verursacht werden und es zu einem Mangel des entsprechenden Proteins kommt, existiert eine zugelassene Gentherapie (siehe 1.3) in Form des Medikaments LUXTURNA® (Novartis 2019; Uhrmann et al. 2020). Sie stellt einen ersten großen Erfolg zur Etablierung gentherapeutischer Verfahren dar.

1.2.1 Morbus Stargardt

Der Morbus Stargardt (STGD1) ist eine autosomal rezessive Erberkrankung, der eine Mutation im *ABCA4* Gen zu Grunde liegt. Sie manifestiert sich meistens in den ersten beiden Lebensdekaden der Patienten, allerdings sind auch spätere Manifestationen beschrieben, die zumeist milder verlaufen (Tsybovsky et al. 2010; Tanna et al. 2017). Des Weiteren existieren stargardtartige Erkrankungen (STGD3 und STGD4), welche auf autosomal dominant vererbten Mutationen im *PROM1* und *ELOVL4* Gen basieren (Donoso et al. 2001; Imani et al. 2018), hier aber nicht weiter erläutert werden.

Die STGD1 Erkrankung geht mit einem progredienten zentralen Visusverlust in beiden Augen, einer verzögerten Dunkeladaption sowie der Ansammlung von Lipofuszin auf Ebene des RPE einher. Da in erster Linie der Bereich der Makula betroffen ist, stellt sich diese in der ophthalmologischen Untersuchung atrophiert dar, zusätzlich lassen sich meist gelblich-weißliche Fundusflecken erkennen (Conley et al. 2012; Fujinami et al.

2015). Allerdings ist das phänotypische Erscheinungsbild sehr variabel, ebenso wie die Progredienz der Erkrankung, die von Patient zu Patient variiert.

Das *ABCA4* Gen, welches mit dem STGD1 assoziiert ist, besteht aus 50 Exonen, die zusammen eine Länge von fast 7000 bp erreichen und für 2273 Aminosäuren kodieren (Azarian et al. 1998). Bisher sind fast 1000 Mutationen bekannt, die das Krankheitsbild des Morbus Stargardt verursachen (Tanna et al. 2017) und bereits früh konnte gezeigt werden, dass erkrankte Allele sowohl homozygot als auch compound heterozygot vorliegen können (Rivera et al. 2000; Briggs et al. 2001; Kitiratschky et al. 2008). Kommt es zu einer Mutation innerhalb des *ABCA4* Gens, wird dieses fehlerhaft exprimiert und die Funktionsfähigkeit des Transporters nimmt ab. Dies hat zur Folge, dass sich all-*trans*-Retinal (siehe 1.1.3) in den Photorezeptoren vermehrt anlagert, mit Phosphatidylethanolamine (PE) konjugiert, und so unter anderem N-retinylidene-N-retinylethanolamine (A2E) entsteht (Tsybovsky et al. 2010; Palczewski 2014). Bei letzterem handelt es sich um einen zytotoxischen Stoff, der bei der Phagozytose abgestoßener Bestandteile der Photorezeptoren auch vom RPE aufgenommen wird. Infolgedessen sterben die RPE Zellen ab, die Versorgung der Photorezeptoren kann nicht mehr aufrecht erhalten werden und sie degenerieren (Strauss 2005; Conley et al. 2012).

Eine medikamentöse Therapie zur Behebung der Ursache ist bis heute nicht im klinischen Alltag vorhanden, sodass Patienten auf unterstützende Sehhilfen angewiesen sind und angehalten werden Vitamin A zu vermeiden (Tanna et al. 2017). Die Gentherapie stellt daher eine vielversprechende Möglichkeit dar, genetische Erkrankungen wie den Morbus Stargardt behandeln zu können (siehe 1.3). Allerdings unterliegt sie diversen Limitationen, wie z.B. durch die Größe des gesamten Gens (~ 7 kbp) und der Größenlimitation der vorhandenen viralen Vektoren (siehe 1.3.3) (Auricchio et al. 2015).

1.3 Gentherapie

Die Gentherapie stellt eine neuartige Methode dar, verschiedene Erkrankungen durch das Einbringen von DNA oder RNA sowie durch die Veränderung der zelleigenen DNA zu therapieren. Allen voran ist sie für genetische Erkrankungen ein interessanter Ansatz, da sich völlig neue Möglichkeiten ergeben, diese zu behandeln und ggf. sogar vollständig zu heilen. Dabei werden sowohl dominante als auch rezessive Erbkrankheiten genauer beleuchtet und überprüft, in welcher Form sich diese durch ein gentherapeutisches Verfahren behandeln lassen könnten.

1.3.1 Gentherapieverfahren

Es existieren mehrere unterschiedliche Ansätze innerhalb der Gentherapie, um Krankheiten oder genetische Veränderungen zu behandeln. Einige davon befinden sich noch in einer frühen experimentellen Phase, andere wiederum werden schon in Studien am Patienten getestet. Unterteilt werden die bisherigen Verfahren in „gene silencing“, „gene replacement“, „gene addition“ und „genome editing“.

Vor allem um Erkrankungen mit dominantem Erbgang behandeln zu können wird das „gene silencing“ verwendet. Bei diesem Verfahren wird die Herstellung des fehlerhaften und krankmachenden Proteins auf Ebene der RNA verhindert. Dies geschieht z.B. während der Translation der mRNA, indem diese auf unterschiedliche Art und Weise inhibiert wird. Auch eine post-transkriptionelle Translationsunterdrückung mit Abbau der mRNA oder eine gezielte Spaltung dieser durch kleinerer RNA Stücke (Burnett und Rossi 2012) ist möglich um die Expression eines Proteins zu unterdrücken. Dabei wird lediglich das betroffene, dominante Gen blockiert, wodurch das nicht betroffene Allel die physiologische Funktion übernimmt und das Protein daraufhin wieder korrekt exprimiert werden kann (Tessitore et al. 2006; Burnett und Rossi 2012).

Das Verfahren des „gene replacement“ dagegen verfolgt einen anderen Ansatz. Hier handelt es sich meist um rezessive Erkrankungen, in denen ein Gen seine eigentliche Funktion verloren hat („loss of function“). Um dieses Defizit auszugleichen, wird eine DNA mit der korrekten Information für das entsprechende Gen in die Zelle geschleust (Peddle und MacLaren 2017). Dies geschieht meist mit Hilfe eines Vektors, wie z.B. dem Adeno assoziiertes Virus (AAV), welcher für viele gentherapeutische Verfahren eine essenzielle Rolle spielt (Smith et al. 2003; Deng et al. 2012) (siehe 1.3.3).

Auch bei der „gene addition“ wird mittels eines Vektors DNA in die Zellen eingebracht, um z.B. die Herstellung von bestimmten Proteinen innerhalb der Zelle zu beeinflussen oder zu forcieren. So kann z.B. ein eingeschleustes Gen durch einen modifizierten Herpes Simplex Virus Vektor die Ausschüttung von Zytokinen in Krebszellen und somit die Tumorlyse fördern oder in einem anderen Fall mittels einer forcierten Calcium-Hochregulierung zur Verbesserung der Herzfunktion führen (Wang und Gao 2014).

1.3.2 Genome Editing

Das „genome editing“ (Genom Editierung) dagegen wählt einen anderen Ansatz. Hier geht es nicht darum in die Abläufe der Zelle durch die Kopie eines korrekten Gens oder durch Blockierung auf RNA Ebene einzugreifen. Bei diesem Verfahren soll direkt die genomische DNA der Zelle verändert werden und die jeweilige Mutation im Optimalfall

durch eine einmalige Injektion des Medikaments behoben werden. Vor allem für monogenetische Erkrankungen soll auf diesem Weg der Wildtyp wiederhergestellt werden (Cox et al. 2015). Um dies zu erreichen wird sich zweier wesentlicher Mechanismen bedient. Zum einen die Möglichkeit gezielt einen Doppelstrangbruch mit Hilfe von Endonukleasen (siehe 1.4) in einen DNA Strang zu setzen, zum anderen die Fähigkeit der Zelle diesen durch verschiedene Reparaturmechanismen (siehe 1.5) zu schließen (Yanik et al. 2017). Durch unterschiedliche Faktoren, wie z.B. die Zellzyklusphase, in der sich die Zelle befindet oder die Anwesenheit einer DNA die zum Vergleich dienen kann, wird einer dieser Wege ausgelöst, wobei jeder dieser Wege Vor- und Nachteile besitzt (Yanik et al. 2017). Dennoch bilden diese Grundvoraussetzungen die Basis, um mittels Genom Editierung die DNA innerhalb der Zelle zu verändern.

Für Versuche *in vitro* und zur Herstellung von Krankheitsmodellen in Tierversuchen wird diese Methode bereits erfolgreich genutzt. Auch existieren therapeutische Ansätze zur Verwendung von Genom Editierung *in vivo*, jedoch spielen viele unterschiedliche Faktoren und deren Interaktion untereinander eine entscheidende Rolle, um eine erfolgreiche Editierung zu erreichen (Peddle und MacLaren 2017). Dennoch ist dieses Verfahren eine vielversprechende Methode, da ein festgelegter Bereich innerhalb der DNA sehr genau anvisiert werden kann und im Vergleich zu den anderen Therapieformen nur eine geringe Menge an DNA notwendig ist.

1.3.3 Gentherapievektoren

Die meisten Verfahren der Gentherapie haben mit der Problematik zu kämpfen, dass große Mengen an DNA in Zellen eingebracht werden müssen. Anders als beim „gene silencing“, bei der z.B. eine small interfering RNA mit Hilfe eines Transportproteins in die Zelle eingeschleust werden kann (Burnett und Rossi 2012), ist dies mit einer größeren Menge an DNA nicht möglich. Zwar existieren *in vitro* genügend Transfektionsverfahren, um DNA in eukaryotische Zellen einzubringen, allerdings sind diese nicht auf *in vivo* Versuche übertragbar. Dies liegt zumeist an der Verwendung von stark zytotoxischen Chemikalien und der Limitation physikalischer Verfahren, die *in vivo* letal verlaufen würden. Daher wird sich in der Gentherapie viraler Vektoren bedient, um DNA mittels Transduktion in Zellen einzuschleusen.

Als potenziell verwendbare Vektoren für einen Gentransfer können unterschiedliche Viren in Betracht gezogen werden, allen voran Adeno-assoziierte Viren (AAV) und Lentiviren. Der aktuell geläufigste Vektor ist der AAV Vektor, der in seiner rekombinanten Form (rAAV) verwendet wird. Diese ist in der Lage, DNA in Zellen zu transportieren,

ohne dabei das eigene Genom in diese zu integrieren und stattdessen als Episom vorliegt (Naso et al. 2017). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der AAV Vektor allein durch seine Anwesenheit in der Zelle einen positiven Einfluss auf bestimmte Reparaturwege in vivo ausübt (Yanik et al. 2017). Dieser Effekt ist sowohl in sich teilenden als auch in postmitotischen Zellen (Nishiyama et al. 2017) zu beobachten. Dennoch gibt es einen limitierenden Faktor, da seine Kapazität ca. ~ 4,7 kbp beträgt und diese nur bedingt überschritten werden kann (Dong et al. 1996). Dies ist entscheidend, da sie die Größe der einzuschleusenden DNA bestimmt, sei es die DNA-Sequenz für einen gRNA/Cas9 Komplex (siehe 1.4) oder die zwingend notwendige Template-DNA für die Reparatur eines Doppelstrangbruchs (siehe 1.5).

Lentiviren besitzen zwar eine hohe Kapazität (~ 8 kbp), jedoch integrieren sie ihr eigenes Genom zufällig in das der infizierten Zelle (Trapani et al. 2014; Yanik et al. 2017). Dadurch kann zwar eine längere Expression des eingeschleusten Gens erreicht werden, allerdings scheinen sie einen Tropismus für das RPE zu besitzen (Yanik et al. 2017) und Photorezeptorzellen im Vergleich zu AAV nur geringfügig zu transduzieren (Puppo et al. 2014; Trapani et al. 2014; Yanik et al. 2017).

Problematisch ist, dass die meisten Gene weitaus größer sind als die bekannten und nutzbaren Vektoren. Zwar könnte ein langes Gen mosaikartig auf mehrere Vektoren aufgeteilt werden (Wu et al. 2010), inwieweit dieses zu einer effizienten Übertragung eines Gens führen kann, muss noch gezeigt werden (Chamberlain et al. 2016). Es ist von entscheidender Bedeutung, die Kapazität eines Vektors nicht zu überschreiten, da andernfalls Teile der einzuschleusenden DNA verloren gehen (Wu et al. 2010) oder diese durch fehlerhafte Verpackung in den Vektor beschädigt werden könnte (Dong et al. 1996). Da in Zukunft durch Genom Editierung direkt in die genomische DNA eines Patienten eingegriffen werden würde, müssen potenzielle Risikofaktoren nach bestem Wissen und Gewissen entfernt werden. Andernfalls könnte es zu gefährlichen Nebenwirkungen mit gravierenden Konsequenzen für den Patienten kommen.

1.3.4 Gentherapie im Auge

Das Auge nimmt im Bereich der Gentherapie einen besonderen Stellenwert ein, welchen es aufgrund mehrerer spezieller Eigenschaften besitzt. So ist das Auge ein immunprivilegiertes Organ, da es sich durch das RPE und die dort vorhandene Blut-Retina-Schranke vom restlichen System abgrenzt. Das RPE stellt zum einen eine mechanische Barriere dar, zum andern ist es in der Lage Immunreaktionen innerhalb des Auges durch Sekretion von Immunmodulationsfaktoren zu modulieren (Strauss 2011). Zusätzlich sind

andere Systeme im Auge vorhanden, um die inflammatorische Reaktion auf eindringende Antigene abzuschwächen (Benhar et al. 2012).

Ein weiterer Vorteil stellt die gute Erreichbarkeit des Auges und seiner einzelnen Bestandteile dar. Für invasive Behandlungen reicht zumeist eine lokale Betäubung aus und ein Medikament kann durch unterschiedliche Injektionsverfahren gezielt positioniert werden (Chan et al. 2017; Kansara et al. 2020). Ein Beispiel für ein bereits klinisch verwendetes Gentherapeutikum, das subretinal verabreicht wird, stellt LUXTURNA® dar (Novartis 2019; Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG) et al. 2019).

Bei vielen der bekannten genetischen Erkrankungen im Auge handelt es sich um monogenetische Erkrankungen deren Loci bereits bestimmt werden konnten. Dies erleichtert zum einen die Entwicklung eines gentherapeutischen Verfahrens als solches, zum anderen existieren bereits viele Tiermodelle, um eine Therapie in vivo beurteilen zu können (Trapani et al. 2015a; Chan et al. 2017).

1.4 CRISPR-Cas9

Damit Genom Editierung überhaupt stattfinden kann, wird ein Doppelstrangbruch innerhalb des jeweiligen Bereiches in der DNA benötigt. Um solch einen Schnitt zu setzen, werden Endonukleasen verwendet, wie z.B. Zinkfinger-Nukleasen, Transcription Activator-like Effector Nuclease (TALEN) oder das Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) CRISPR-associated (Cas) System. Das mittlerweile am häufigsten verwendete System zur Genom Editierung ist das CRISPR/Cas-System, wobei sich in den meisten Fällen der Endonuklease Cas9 des *Streptococcus pyogenes* bedient wird (Ran et al. 2013; Jiang und Doudna 2017).

Beim CRISPR/Cas System handelt es sich um ein adaptives, bakterielles Immunsystem zur Abwehr von Bakteriophagen. Dazu schleust das Bakterium einzelne Bestandteile der Phagen DNA in seine eigene DNA in der CRISPR Region ein, sobald sie diese als Fremd-DNA identifiziert hat. Die Fremd-DNA wird durch die Cas9 in mehrere ca. 20 bp lange Abschnitte zerschnitten und in das eigene Genom als Protospacer zwischen Short Palindromic Repeats aufgenommen (Horvath und Barrangou 2010; Yanik et al. 2017). Dank dieser kleinen DNA Abschnitte kann das Bakterium eine Phage bei erneuter Infektion erkennen und bekämpfen. Dazu werden diese Abschnitte, bestehend aus einem Spacer am 5' Ende und einem Repeat am 3' Ende transkribiert, welche dann als CRISPR RNA (crRNA) bezeichnet wird. Mit Hilfe der trans-activating crRNA (tracrRNA)

wird die crRNA wiederum mit der Cas9 verknüpft und kann diese an die entsprechende Stelle in der zu schneidenden DNA leiten (Yanik et al. 2017; Jiang und Doudna 2017; Lone et al. 2018). Um zu verhindern, dass das CRISPR/Cas9 System aus Versehen die bakterielle DNA schneidet, ist das Vorhandensein einer PAM-Sequenz (Protospacer Adjacent Motif) in der zu schneidenden DNA zwingend notwendig. Nur wenn sich solch eine PAM Sequenz am 3' Ende des Targetbereichs befindet kann die aktivierte Cas9 diese als Fremd-DNA erkennen und die zur crRNA komplementäre DNA-Sequenz schneiden (Yanik et al. 2017; Lone et al. 2018). Die Phagen DNA wird dadurch zerstört und virale Proteine können nicht mehr exprimiert werden.

Dank dieses Systems ist es möglich auch, innerhalb von eukaryotischen Zellen einen gezielten Doppelstrangbruch zu setzen. Indem es gelang, die crRNA und die tracrRNA zu einer einzigen guideRNA zusammenzufassen, konnte die Programmierung des CRISPR/Cas Systems um ein Vielfaches vereinfacht werden. Durch die Veränderung der zu bindenden Sequenz der guideRNA können unterschiedliche Loci innerhalb eines Genoms anvisiert werden (Jinek et al. 2012). Problematisch dabei ist die Gefahr der Off-Targets, zusätzliche entstandene Doppelstrangbrüche, die an anderer ungewollter Stelle entstehen können. Da das Genom von eukaryotischen und somit auch humanen Zellen weitaus größer ist als das eines Bakteriums oder einer Phage, besteht hier eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, zusätzliche Schnittstellen zu verursachen. Da diese zu ungewollten Mutationen (Fu et al. 2013) führen können, müssen diese so gering wie möglich gehalten werden. Zur Verringerung solcher Ereignisse wird versucht, Off-Targets zu vermeiden, indem die guideRNA und das CRISPR/Cas System so gut wie möglich angepasst werden (Zhang et al. 2015) oder durch Überprüfung durch Sequenzierung in vitro (Slaymaker et al. 2016; Jiang und Doudna 2017). Es besteht bereits die Möglichkeit im Vorfeld mit Hilfe von Computerprogrammen die Effektivität und die Wahrscheinlichkeit der Off-Targets von guideRNAs in silico zu bestimmen (Ran et al. 2013; Liu et al. 2020), dennoch ist auch hier nicht hundertprozentig auszuschließen, dass es zu ungewollten Schnittstellen kommen kann. Somit stellt dies eine der größten Herausforderungen dar, um das CRISPR/Cas System sicher und effektiv verwenden zu können. Trotz dieser Risiken handelt es sich um ein einfach zu programmierendes System zur Herstellung von Doppelstrangbrüchen. Erst dadurch ist es möglich, die Reparaturmechanismen einer Zelle auszulösen und somit genomische DNA durch Genom Editierung gezielt zu verändern.

1.5 DNA-Reparatur

Wird die DNA einer Zelle beschädigt, stehen ihr unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung, um diese zu reparieren. Schäden, die sich nur auf einzelne Basen oder auf einen einzelnen Strang der DNA beziehen, können dabei leichter als fehlerhaft erkannt und korrigiert werden. Anders ist die Situation bei Doppelstrangbrüchen (DSB), die durch Umwelteinflüsse (Lieber 2010) oder gezielt durch CRISPR/Cas9 entstehen. Durch diese ist die Integrität des gesamten Genoms gefährdet was zu schwerwiegenden Folgen für die Zelle und den gesamten Organismus führen kann (Heyer et al. 2010; Aparicio et al. 2014). Um dies zu verhindern und einen Doppelstrangbruch zu korrigieren, stehen der Zelle mehrere Reparaturmechanismen zur Verfügung: Non-Homologous End Joining (NHEJ), Microhomology-Mediated End Joining (MMEJ) und Homology-Directed Repair (HDR). Diese sind an unterschiedliche Bedingungen geknüpft, z.B. in welcher Phase des Zellzyklus sich die Zelle befindet und ob eine korrekte DNA-Kopie des geschädigten Bereiches in Form eines Chromatids oder einer Template-DNA vorhanden ist. NHEJ ist während aller Phasen des Zellzyklus aktiv, MMEJ überwiegend in der G1 und frühen S Phase (Taleei und Nikjoo 2013; Yanik et al. 2018), HDR dagegen in der S und G2 Phase (Lieber 2010). Wann genau welcher Mechanismus ausgelöst wird ist Bestandteil aktueller Forschungen. Zusätzlich zeigen neuere Ergebnisse, dass selbst in postmitotischen Zellen HDR und MMEJ bis zu einem gewissen Grad und unter bestimmten Voraussetzungen ausgelöst werden können (Nishiyama et al. 2017; Nishiguchi et al. 2020).

1.5.1 NHEJ

Der Non-Homologous End Joining (NHEJ) Reparaturweg ist der schnellste aber auch der fehleranfälligste Reparaturweg der Zelle. Da es hier gehäuft zu Deletion und Insertion kommt (Lieber 2008), können Fehler innerhalb des Genoms z.B. durch die Verschiebung des Leserasters (Frameshift) entstehen. Diese werden allerdings in Kauf genommen da ein Verlust von mehreren hundert Basen oder eines ganzen Chromosomenarms die Alternative wäre (Lieber 2008). Somit bietet NHEJ der Zelle einen schnellen und einfachen Weg einen Doppelstrangbruch zu reparieren. Zusätzlich ist NHEJ zu jedem Zeitpunkt des Zellzyklus verfügbar und ist nicht an das Vorhandensein einer Template-DNA gebunden (Lieber 2008; Chang et al. 2017).

Detektiert die Zelle einen Doppelstrangbruch, wird eine Proteinkaskade ausgelöst und der Proteinkomplex Ku70/80 lagert sich an die Bruchstelle an. Dieser wiederum rekrutiert weitere Proteine und Enzyme zur Bruchstelle, u.a. DNA-PKcs (DNA-dependent protein

kinase catalytic subunit) und Artemis, welche die DNA-Enden des Bruchs prozessieren (Yanik et al. 2017; Chang et al. 2017). Es erfolgt eine Angleichung der beiden Enden durch kleinste Mikrohomologien von bis zu 4 Nukleotiden (McVey und Lee 2008; Chang et al. 2017). Fehlende Nukleotide werden durch die DNA Polymerasen λ und μ aufgefüllt und schlussendlich beide Stränge durch einen Komplex aus DNA Ligase IV, XRCC4 (X-ray repair complementing defective repair in Chinesehamster cells 4) und XLF (Nonhomologous end-joining factor 1) miteinander verknüpft (Yanik et al. 2017).

1.5.2 MMEJ

Eine weitere Methode beschreibt das Microhomology-Mediated End Joining, das auch als alternatives NHEJ (a-NHEJ) bekannt ist, bei dem ein DNA-Template bei vorhandener Homologie in die Zelle eingebaut werden kann. Allerdings kann es auch in diesem Reparaturweg zu Deletionen und Insertionen kommen (McVey und Lee 2008).

MMEJ findet während der G1 und frühen S Phase statt (Taleei und Nikjoo 2013; Yanik et al. 2018) und benötigt kurze homologe Sequenzen an beiden Seiten des Doppelstrangbruchs und, falls vorhanden, an der Template-DNA. Diese homologen Bereiche weisen zumeist eine Länge von ca. 5 – 25 bp auf, wobei auch längere Homologien theoretisch möglich sind (Yanik et al. 2018).

Zunächst werden die 5' Enden des Doppelstrangbruchs durch den MRN-Komplex (Mre11-Rad50-Nbs1) und CtIP (C-terminal binding protein (CtBP)-interacting protein) angepasst und die entsprechenden Homologien freigelegt (Sfeir und Symington 2015). Durch diese Prozessierung kann es allerdings auch hier zu Deletionen kommen (Deng et al. 2014; Yanik et al. 2017). Über einen noch nicht vollends geklärten Mechanismus lagern sich anschließend die homologen Bereiche aneinander und fehlende Nukleotide werden durch die Polymerase Theta ($Pol\theta$) aufgefüllt. (Sfeir und Symington 2015; Seol et al. 2018). Ist an diesem Punkt eine Template-DNA vorhanden, kann diese anhand der entsprechenden Homologie in das Genom eingebracht werden (Sakuma et al. 2016). In einem letzten Schritt werden durch einen strukturspezifischen Nukleasekomplex die überhängenden nicht homologen 3' Enden gekappt und die reparierte DNA durch die DNA-Ligase III (Lig 3) ligiert (Seol et al. 2018).

1.5.3 HDR

Der am wenigsten fehleranfällige, aber aufwändigste Weg, einen Doppelstrangbruch zu reparieren, ist die Homologie vermittelte Rekombination (HDR). Bei diesem Reparaturmechanismus wird ein Doppelstrangbruch mit Hilfe einer korrekten Kopie wiederhergestellt (Li und Heyer 2008). Dabei kann es sich entweder um ein Chromatid handeln oder um eine künstlich hergestellte Template-DNA. Durch Letztere ist es möglich, gezielt Gene innerhalb eines Organismus einzusetzen, zu entfernen oder präzise zu modifizieren (He et al. 2016). Gewährleistet wird diese genaue Editierung sowohl durch das Template selbst als auch durch sehr lange homologe Sequenzen. Je nach Größe der einzubringenden DNA-Sequenz können diese eine Länge von ca. 0,5 – 3 kbp erreichen (Sakuma et al. 2016; Xiao et al. 2018). Zwar konnte gezeigt werden, dass auch kürzere homologe Sequenzen (> 50 bp) zu einer Editierung durch HDR führen, jedoch steigt diese erheblich mit zunehmender Länge (Li et al. 2014; Song und Stieger 2017).

Durch den Doppelstrangbruch wird auch hier die Proteinkaskade ausgelöst und es kommt zur Aktivierung des MRN-Komplex und des CtIP, sowie der Exonuklease 1 (EXO1) und der DNA replication helicase/nuclease 2 (DNA2). Dadurch werden die 5' Enden der DNA prozessiert und es entsteht ein 3' Überhang. An diesem Punkt überschneiden sich HDR und MMEJ, da beide durch dieselben Abläufe einen einzelsträngigen DNA-Abschnitt produzieren, der zur Anlagerung an das Template verwendet wird. Allerdings ist die Anwesenheit von EXO1 und DNA2 für MMEJ nicht zwingend erforderlich und scheint diese sogar zu Inhibieren (Yanik et al. 2017; Seol et al. 2018). Anders als bei MMEJ werden die langen Einzelstränge durch das Replication Protein A (RPA) gebunden und stabilisiert. Dieses wird im Anschluss durch RAD51 verdrängt, welches den homologen Überhang des Templates mit der entsprechenden Sequenz der zu reparierenden DNA zusammen führt. Dieser Ablauf wird durch mehrere Proteine, z.B. BRCA2, reguliert und schlussendlich die beiden Stränge durch verschiedene Polymerasen (überwiegend δ oder ϵ) und die DNA Ligase I miteinander verbunden (Li und Heyer 2008; Holthausen et al. 2010; Yanik et al. 2017; Ranjha et al. 2018).

Es ist noch nicht vollends geklärt, anhand welcher Kriterien entweder MMEJ oder HDR in der Zelle ausgelöst wird. Beide Reparaturwege können in der S Phase der Zelle stattfinden, folgen bis zu einem gewissen Punkt derselben Proteinkaskade und verwenden dieselben Komplexe (Yanik et al. 2017). Ihre Interaktion untereinander ist Bestandteil aktueller Forschungen. Nachteile des HDR Reparaturwegs bleiben des Weiteren die Notwendigkeit von sehr langen homologen Bereichen und die Beschränkung auf die S und G2 Phase des Zellzyklus (Lieber 2008). Dennoch ist dieser das bisher sicherste bekannte Verfahren, um gezielt DNA in Zellen einzubringen.

1.6 Methoden zur Quantifizierung der Effizienz von Genom Editierung

1.6.1 Notwendigkeit von Reportergensystemen

Neben der Herstellung eines Templates zur Behandlung genetischer Erkrankungen ist es zusätzlich notwendig, sogenannte Reportergensysteme herzustellen. Der Gedankengang dahinter folgt zweierlei Überlegungen: Zum einen muss es möglich sein, den Erfolg einer Genom Editierung *in vitro* auch an lebendigen, unbeschädigten Zellen überprüfen zu können, wie z.B. durch die FACS-Analyse (siehe 1.6.3). Zum anderen muss der Verlauf einer späteren Therapie am Patienten überprüft werden, ohne diesem zu schaden und invasive Behandlungen zu vermeiden. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von Biosensoren, die mit in das therapeutische Template eingebaut werden, ohne dieses in seiner Wirkweise zu beeinträchtigen. Es existieren bereits Ansätze für einen GFP2 abhängigen Biosensor zur Überprüfung der Behandlungen von altersbedingter Makuladegeneration und diabetischer Retinopathie am Auge. Dieser kann durch Licht spezieller Wellenlänge von außen angeregt werden und könnte somit die Anzahl an invasiver Verfahren vermindern (Wimmer et al. 2016; Stumpf et al. 2020).

1.6.2 Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer (BRET-Assay)

Beim Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer (BRET) handelt es sich um ein Verfahren, mit dem es möglich ist, Interaktionen zwischen Proteinen sichtbar zu machen und analysieren zu können. Anders als beim Förster Resonanz Energie Transfer (FRET) ist hier keine Anregung von außen notwendig (Pfleger und Eidne 2006). Das System besteht aus einem Energiedonor und einem Akzeptor, welcher in der Lage ist, Biolumineszenz in einer bestimmten Wellenlänge zu erzeugen. Für das hier verwendete BRET-Assay wurde als Energiedonor eine Luciferase, die *Renilla reniformis* Luciferase 8 (RLuc8) verwendet, da diese in der Lage ist, durch Spaltung von Coelenterazine Licht zu emittieren. Durch dieses wird das hier verwendete Fluorophor GFP2, das als Akzeptor fungiert, angeregt (De et al. 2007; Wimmer 2018). Sowohl die RLuc8 als auch das angeregte GFP2 emittieren jeweils Licht einer definierten Wellenlänge und können somit im BRET-Assay erfasst und deren BRET-Ratio im Anschluss berechnet werden (Dragulescu-Andrasi et al. 2011). Durch die Interaktion dieser beiden Bestandteile ist es möglich, die Aktivität von guideRNA eines CRISPR/Cas9 Komplexes bestimmen zu können. Dazu wurde eine in der Arbeitsgruppe etablierte und validierte Methodik verwendet (Wimmer et al. 2020 in Revision). Ein eigens dafür in der Arbeitsgruppe erstelltes Plasmid, das pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2-pA (NHEJ-Sensor), beinhaltet sowohl

die Sequenz der Luciferase RLuc8 als auch die des GFP2. Zwischen diesen befindet sich eine Target-Sequenz, die als spezifischer Ort der Schnittstelle für jede einzelne guideRNA im Vorfeld in das Plasmid kloniert wird (siehe Abbildung 1A). Bindet die entsprechende guideRNA an die vorhandene Target-Sequenz, kommt es durch den CRISPR/Cas9 Komplex zu einem Doppelstrangbruch. Dieser wird überwiegend durch NHEJ repariert, wodurch es zu einer Verschiebung des Leserasters kommt (siehe 1.5.1). Infolgedessen kann GFP2 nicht mehr erfolgreich exprimiert werden und die Fluoreszenz nimmt ab (siehe Abbildung 1B). Durch den Vergleich der im BRET-Assay gemessenen Emissionen des ungeschnittenen und geschnittenen Plasmids ist es möglich einzuschätzen, wie effektiv eine guideRNA ist (Wimmer et al. 2020 in Revision).

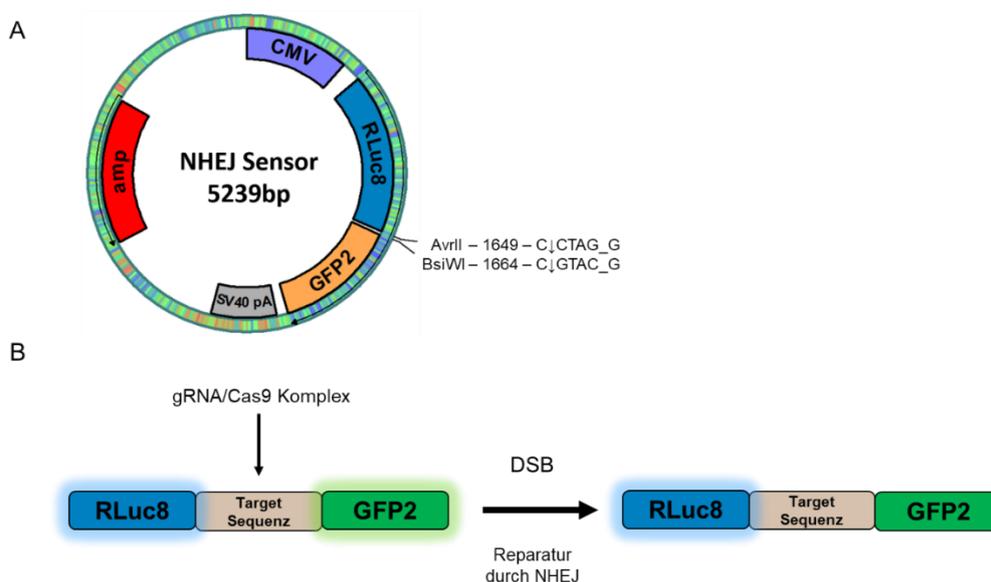


Abbildung 1: Funktionsweise des NHEJ-Sensors

Zur Überprüfung der Aktivität wurde in der Arbeitsgruppe ein eigenes Verfahren und das dazugehörige Plasmid entwickelt. A) Zeigt das Plasmid des NHEJ-Sensors (pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2-pA). Zwischen RLuc8 und GFP2 befinden sich Schnittstellen für die Enzyme AvrII und BsiWI, um dort die benötigte Target-Sequenz einbauen zu können. B) Zu erkennen ist der Teil des NHEJ-Sensors der die RLuc8 (blau), die Target-Sequenz (braun) und GFP2 (grün) enthält. Kommt es zu einem Doppelstrangbruch (DSB) durch den gRNA/Cas9 Komplex, erfolgt die Reparatur via NHEJ. Durch den Frameshift wird GFP2 nicht mehr korrekt exprimiert und die Fluoreszenz nimmt ab (Wimmer et al. 2020 in Revision).

1.6.3 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Das Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS), auch Durchflusszytometrie genannt, ist ein Verfahren um Zellen analysieren und sortieren zu können. Entscheidend dabei ist, dass die Zellen einzeln betrachtet werden, ohne diese zu zerstören. Durch einen Laserstrahl in entsprechender Wellenlänge werden Zellen einzeln bestrahlt und anhand von Vorwärtstreuung (FSC) und Seitenstreuung (SSC) deren Eigenschaften bestimmt.

So entsteht ein spezifisches Signal, welches von den chemischen, physikalischen und optischen Eigenschaften der Zelle abhängt (Gross et al. 2015). Des Weiteren lassen sich mit diesem System auch Emissionen von Fluoreszenz in definierten Wellenlängen erfassen wie z.B. von GFP. Dadurch ist es möglich, GFP positive Zellen von GFP negativen Zellen zu unterscheiden. Diese können dann zueinander in Relation gesetzt werden, um z.B. darzustellen, wie erfolgreich eine Genom Editierung durch einen gRNA/Cas9 Komplex in Verbindung mit einem Template war.

1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Strategie zu entwickeln, um im N-terminalen Bereich des *Abca4* Gens der *Mus Musculus* große DNA Bereiche mittels HDR auszutauschen und dieses in vitro zu überprüfen. Es sollen sowohl ein therapeutisches Template (Template) als auch ein Reportertemplate (Reporter) hergestellt werden und spezifische Schnittstellen für das CRISPR/Cas9-System identifiziert werden. Dabei soll die hier entwickelte Strategie es später ermöglichen, gezielt krankheitsauslösende Mutationen innerhalb dieses Gens zu behandeln und dient als Vorarbeit für potenzielle in vivo Versuche in einem zukünftigen Tiermodell. Zur Entwicklung dieser Strategie wurde als Zielbereich eine Mutation in Form einer Deletion im Promotor und Exon 1 des *Abca4* Gen der *Mus Musculus* gewählt, wie sie in der *Abca4* Knockout Maus (Weng et al. 1999) vorhanden ist. Die Reparatur soll auf unterschiedlichen Ebenen in vitro nachgewiesen werden. Neben der Herstellung eines geeigneten Templates und eines Reporters wird zusätzlich ein gezielter Doppelstrangbruch im zu reparierenden Bereiches benötigt. Dieser soll hier durch einen gRNA/Cas9 Komplex verursacht werden. Dazu sollen mögliche Schnittstellen im Bereich vor dem Promotor und im Intron 1 überprüft werden, um so eine bzw. zwei aktive Schnittstellen zu erhalten. Die so hergestellten gRNA/Cas9 Komplexe sollen zunächst einzeln auf ihre Aktivität überprüft werden, um im Anschluss in vitro in Kombination mit dem Template und dem Reporter getestet zu werden. Das Template soll dabei so entwickelt und hergestellt werden, dass es eine möglichst geringe Anzahl an Basenpaaren beinhaltet, um eine spätere in vivo Transduktion per AAV zu ermöglichen. Des Weiteren muss gewährleistet werden, dass durch die Wahl eines entsprechenden Promotors die eingebaute Template-DNA exprimiert wird. Ebenso soll mit dem Reporter verfahren werden, der auf Basis des Templates hergestellt werden soll. In diesen soll zusätzlich zu den bereits genannten Bestandteilen eine zusätzliche DNA-Sequenz für GFP eingebaut werden und durch dieses die erfolgte Reparatur in vitalen, unbeschädigten Zellen auf Proteinebene nachgewiesen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Geräteliste

Gerät	Hersteller
Autoklav DX-65	Syntec, Linden (DE)
BioPhotometer	Eppendorf, Wesslingen-Berzdorf (DE)
Destillationsanlage H2O Anlage Arium 611DI	Sartorius, Göttingen (DE)
Eismaschine AF80	Scotsman, Berlin (DE)
Elektroporationsküvette	BioRad, München (DE) Eppendorf, Köln (DE)
FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Fluoreszenz Mikroskop Biozero	Keyence, Neu- Isenburg (DE)
Gasbrenner Fireboy	Integra Biosciences, Zizers (CH)
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr-International, Biberach an der Riß (DE)
Gefrierschrank (-80 °C)	Thermo Elektron LED, Lamgesbold (DE)
Gelkammer für Agarosegele Compact XS/S und M	Biometra, Göttingen (DE)
Heizblock TB2	Biometra, Göttingen (DE)
Homogenisator Precellys®24	Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux (FR)
Inkubatoren	Binder, Tuttlingen (DE)
Kühlschrank (+4 °C)	VWR International, Darmstadt (DE); Bosch, Gerlingen (DE); Liebherr, Biberach an der Riß (DE)
Laminar Flow Sterilbank	Thermo Fischer Scientific, Schwerte (DE)
Magnetrührer RTC classic	IKA®-Werke, Staufen (DE)
Mikroskop	VWR International, Darmstadt (DE)
Mikrowelle	Siemens, München (DE)
Minizentrifuge	VWR International, Darmstadt (DE)
Multimode Platerader Infinite M1000Pro	Tecan, Gröding (AT)

Multiporator für Transfektionen	Eppendorf, Wesslingen-Berzdorf (DE)
PCR Thermocycler T-Professional/T-Personal	Biometra, Göttingen (DE)
pH-Meter	Mettler Toledo, Gießen (DE)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg (DE); Brand, Wertheim (DE)
Pipettierhilfe	Integra Biosciences, Zizers (CH)
Power Supply für Elektrophorese PS305T	Biometra, Göttingen (DE)
QIAxcel Advanced System	Qiagen, Hilden (DE)
Schüttler	Sartorius, Göttingen (DE)
Spülmaschine	Miele Professional, Gütersloh (DE)
Stickstofftonne (-196°C) Locator Plus 6	Thermolyne, Pfullingen (DE)
Trockenschrank	Binder, Tuttlingen (DE)
UV-Transilluminator	Biometra, Göttingen (DE)
Vortexer	VWR International, Darmstadt (DE)
Waage	Ohaus, Nänikon (CH)
Wasserbad	Julabo, Seelbach (DE)
Zentrifuge 1-15PK, 4K15	Sigma, Osterode im Harz (DE)
Zentrifuge Micro200	Hettich Lab Technologie, Tuttlingen (DE)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial wurde von den Firmen Biozym Scientific (Hessisches Oldendorf), Sarstedt (Nümbrecht), Greiner Bio-One (Frickenhausen), TPP AG (Trasadingen; CH), Roth (Karlsruhe), Braun (Melsungen), LVL Technologies (Crailsheim), Corning (Kaiserslautern), Brand (Wertheim), Bemis Europe (Braine L'Alleud; BE); Bertin Technologies (Montigny-le-Bretonneux; FR) und Nerbe plus (Winsen/Luhe) bezogen.

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Accutase	Anprotec, Bruckberg (DE)
Agarose	Genaxxon bioscience, Ulm (DE)
Ampicillin	Roth, Karlsruhe (DE)

Borsäure	Roth, Karlsruhe (DE)
Coelenterazine 400a	NanoLight Technologies, Pinetop (USA)
dATP	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (DE)
Dimethylsulfoxid	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (DE)
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe (DE)
DNA Stain Clear G	Serva Electrophoresis, Heidelberg (DE)
dNTP's	NEB, Frankfurt a. M. (DE)
EDTA	Roth, Karlsruhe (DE)
Ethanol	Roth, Karlsruhe (DE)
FKS (fetales Kälber Serum)	Anprotec, Bruckberg (DE)
Glycerin	Roth, Karlsruhe (DE)
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe (DE)
HEPES	Roth, Karlsruhe (DE)
Isopropanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe (DE)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt (DE)
L-Glutamin	Anprotec, Bruckberg (DE)
Luria Broth Base	Invitrogene/ Thermo Fischer, Darmstadt (DE)
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe (DE)
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt (DE)
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe (DE)
PEI (Polyethylenimin)	Polysciences Europe, Hirschberg an der Bergstrasse (DE)
Penicillin/Streptomycin 100x	Anprotec, Bruckberg (DE)
Puromycin	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg (DE)
Select Agar	Invitrogene/ Thermo Fischer, Darmstadt (DE)
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Stickstoff (flüssig)	Linde, Pullach (DE)
Tetracyclin	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim (DE)
Tris-NH ₃	Roth, Karlsruhe (DE)
Trypton	Roth, Karlsruhe (DE)

2.1.4 Puffer und Lösungen

10x Phosphatpuffer (PBS)

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

10x TBE Puffer

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

PEI-Mix

PEI (MW = 25,000)	0,1 g/l
NaCl	150 mM

RLT-Puffer

RLT	1,0 ml
β-Mercaptoethanol	10 µl

Andere verwendete Puffer sind unter Angaben des Herstellers in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Weitere verwendete Puffer

Puffer	Hersteller
5x Phusion HF-Puffer	Life Technologies/Thermo Fisher, Darmstadt (DE)
6x DNA Loading Dye	Life Technologies/Thermo Fisher, Darmstadt (DE)
10x Cut Smart Puffer	NEB, Frankfurt a. M. (DE)
NE-Buffer 2:1	NEB, Frankfurt a. M. (DE)
S1-Resuspensions-Puffer	Macherey-Nagel, Dürren (DE)
S2-Lysis-Puffer	Macherey-Nagel, Dürren (DE)
S3-Neutralisierungs-Puffer	Macherey-Nagel, Dürren (DE)
T4 DNA Ligase Reaction Buffer	NEB, Frankfurt a. M. (DE)

2.1.5 Kit-Systeme

Tabelle 4: Verwendete Kit-Systeme

Kit-System	Hersteller
DNA Clean & Concentrator™-25	Zymo Research Europe, Freiburg (DE)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Dürren (DE)
NucleoSpin®Plasmid	Macherey-Nagel, Dürren (DE)
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden (DE)
PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit	Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye (F)
PureLink™ Genomic DNA Mini Kit	Life Technologies/Thermo Fisher Darmstadt (DE)
QIAxcel RNA QC Kit v2.0 (1200)	QIAGEN, Hilden (DE)
RNase-Free DNase Set	QIAGEN, Hilden (DE)
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden (DE)
TOPO™ TA Cloning™ Kit	Life Technologies/Thermo Fisher Darmstadt (DE)

2.1.6 Enzyme

Bei den in Tabelle 5 aufgeführten Enzymen handelt es sich um Restriktionsenzyme, die alle von der Firma NEB (New England Biolabs, Frankfurt am Main, DE) bezogen wurden. Die Schnittstellen sind jeweils mit ↑ und ↓ gekennzeichnet. In Tabelle 6 werden alle weiteren Enzyme mit deren jeweiligen Herstellern aufgeführt. Alle Enzyme wurden nach Herstellerangaben und unter Verwendung des mitgelieferten Puffers verwendet.

Tabelle 5: Verwendete Restriktionsenzyme

Enzym	Erkennungssequenz
AvaI	5'...C↓YCGRG...3' 3'...GRGCY↑C...5'
AvrII	5'...C↓CTAGG...3' 3'...GGATC↑G...5'
BamHI-HF	5'...G↓GATCC...3' 3'...CCTAG↑G...5'
BbsI	5'...GAAGAC(N) ₂ ↓...3'
BbsI-HF	3'...CTTCTG(N) ₆ ↑...5'

BsiWI-HF	5'...C↓GTACG...3' 3'...GCATG↑C...5'
EagI-HF	5'...C↓GGCCG...3' 3'...GCCGG↑C...5'
EcoRV-HF	5'...GAT↓ATC...3' 3'...CTA↑TAG...5'
KpnI-HF	5'...GGTAC↓C...3' 3'...C↑CATGG...5'
NcoI-HF	5'...C↓CATGG...3' 3'...GGTAC↑C...5'
NheI-HF	5'...G↓CTAGC...3' 3'...CGATC↑G...5'
NotI-HF	5'...GC↓GGCCGC...3' 3'...CGCCGG↑CG...5'
PmeI	5'...GTTT↓AAAC...3' 3'...CAA↑TTTG...5'
SnaBI	5'...TAC↓GTA...3' 3'...ATG↑CAT...5'
XmnI	5'...GAANN↓NNTTC...3' 3'...CTTNN↑NNAAG...5'

Tabelle 6: Andere verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase I, RNase-Free (lyophilized)	QIAGEN, Hilden (DE)
GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase	Promega, Mannheim (DE)
Phusion® High-Fidelity Polymerase	Life Technologies/Thermo Fisher, Darmstadt (DE)
PrimeScript™ Reverse Transkriptase	Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye (F)
T4 DNA-Ligase	NEB, Frankfurt a.M. (DE)

2.1.7 Vektoren und Plasmide

Tabelle 7: Verwendete Plasmide

Plasmid	Hersteller
pcDNA3.1(+)/CAT	Invitrogene/ Thermo Fischer, Darmstadt (DE)
pcDNA-RLuc8	Sanji Sam Gambhir, MD, PhD; Stanford University (USA)
pCR™2.1 TOPO® TA	Invitrogene/ Thermo Fischer, Darmstadt (DE)
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0	Addgene Headquarters; Watertown (USA)
pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2-pA (NHEJ-Sensor)	Dr. Tobias Wimmer; Justus-Liebig Universität Gießen (DE)
pTagGFP2-N	Evrogen Joint Stock Company (RU); BioCat; Heidelberg (DE)
peGFPN1	Clontech / Takara Bio Europe SAS, Saint-Germain-en-Laye (F)

2.1.8 Oligonukleotide und Primer

Die verwendeten Oligonukleotide und Primer wurden, falls nicht anders gekennzeichnet, alle von der Firma Metabion (Planegg/Steinkirchen, DE) bezogen. Oligonukleotide, die zur Herstellung der Target- und Guide-Sequenzen verwendet wurden, sind in Tabelle 8 aufgeführt. Primer, die zur Sequenzierung oder für PCRs verwendet wurden, sind in Tabelle 9 aufgeführt. Alle Sequenzen werden jeweils in ihrer 5'→3' Richtung angegeben.

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide für Target- und Guide-Sequenzen

Name	Sequenz (5'→3')	Interne Nr.
Abca4InT1f	CTA GGT CTC TGC CTT CCC GCC GTG CAG G	#4555
Abca4InT1r	GTA CCC TGC ACG GCG GGA AGG CAG AGA C	#4556
Abca4InT2f	CTA GGG GCC AGG TTT GAG TCG CGT CTG G	#4557
Abca4InT2r	GTA CCC AGA CGC GAC TCA AAC CTG GCC C	#4558
Abca4InT3f	CTA GGA CTG AGC CTT TCG CTC GAA TTG G	#4559
Abca4InT3r	GTA CCC AAT TCG AGC GAA AGG CTC AGT C	#4560
Abca4InT4f	CTA GGC TCT GCC TTC CCG CCG TGC AGG G	#4561
Abca4InT4r	GTA CCC CTG CAC GGC GGG AAG GCA GAG C	#4562
Abca4InT5f	CTA GGT CGA GAG CGG CCT CAT TCG CAG G	#4563

Abca4InT5r	GTA CCC TGC GAA TGA GGC CGC TCT CGA C	#4564
Abca4InG1f	CAC CTC TCT GCC TTC CCG CCG TGC	#4565
Abca4InG1r	AAA CGC ACG GCG GGA AGG CAG AGA	#4566
Abca4InG2f	CAC CGG CCA GGT TTG AGT CGC GTC	#4567
Abca4InG2r	AAA CGA CGC GAC TCA AAC CTG GCC	#4568
Abca4InG3f	CAC CAC TGA GCC TTT CGC TCG AAT	#4569
Abca4InG3r	AAA CAT TCG AGC GAA AGG CTC AGT	#4570
Abca4InG4f	CAC CCT CTG CCT TCC CGC CGT GCA	#4571
Abca4InG4r	AAA CTG CAC GGC GGG AAG GCA GAG	#4572
Abca4InG5f	CAC CTC GAG AGC GGC CTC ATT CGC	#4572
Abca4InG5r	AAA CGC GAA TGA GGC CGC TCT CGA	#4574
Abca4PrT1f	CTA GGT TGG AAA GCG TGC GAG GTT ATG G	#4575
Abca4PrT1r	GTA CCC ATA ACC TCG CAC GCT TTC CAA C	#4576
Abca4PrT2f	CTA GGT CCC TCA TCG TTG CCT GGT GAG G	#4577
Abca4PrT2r	GTA CCC TCA CCA GGC AAC GAT GAG GGA C	#4578
Abca4PrT3f	CTA GGT CCA CAA ATT GCG CCT GGT GTG G	#4579
Abca4PrT3r	GTA CCC ACA CCA GGC GCA ATT TGT GGA C	#4580
Abca4PrT4f	CTA GGT TTT TTC CCT CAT CGT TGC CTG G	#4581
Abca4PrT4r	GTA CCC AGG CAA CGA TGA GGG AAA AAA C	#4582
Abca4PrT5f	CTA GGC TCC AGG GTC TCC CGC CCA TTG G	#4583
Abca4PrT5r	GTA CCC AAT GGG CGG GAG ACC CTG GAG C	#4584
Abca4PrG1f	CAC CTT GGA AAG CGT GCG AGG TTA	#4585
Abca4PrG1r	AAA CTA ACC TCG CAC GCT TTC CAA	#4586
Abca4PrG2f	CAC CTC CCT CAT CGT TGC CTG GTG	#4587
Abca4PrG2r	AAA CCA CCA GGC AAC GAT GAG GGA	#4588
Abca4PrG3f	CAC CTC CAC AAA TTG CGC CTG GTG	#4589
Abca4PrG3r	AAA CCA CCA GGC GCA ATT TGT GGA	#4590
Abca4PrG4f	CAC CTT TTT TCC CTC ATC GTT GCC	#4591
Abca4PrG4r	AAA CGG CAA CGA TGA GGG AAA AAA	#4592
Abca4PrG5f	CAC CCT CCA GGG TCT CCC GCC CAT	#4593
Abca4PrG5r	AAA CAT GGG CGG GAG ACC CTG GAG	#4594

Tabelle 9: Sequenzier- und PCR-Primer

Name	Sequenz (5'→3')	Interne Nr.
Abca4f1	GCT GGA CGT GGT CCT AGC GGC	#4656
Abca4r1	GAA TTC ATG GAG TTG TTA TAG TTT GAG ACA GTT CC	#4657
Abca4In2r1	GAA CAA GTT CCT CCC TGT AGG TTG GAC TTA C	#4696
Abca4In2r2	CAC AAG TTC CTC CCT GTA GGT TGG ACT TAC	#4789
Abca4In2r3	CCC ACA TGG GAG GGG AAC AGA AGG	#4790
Abca4In2r4	CGC CCC CAT TCT GCA GAG GGT	#4791
CMVEcoRif1	GAA TTC AGA TAT ACG CGT TGA CAT TGA TTA TTG AC	#4658
CMV1 for	GTT GAC ATT GAT TAT TGA CTA GTT ATT	#2414
GFP2f	AAG GTA CCA TGA GCG GGG GCG AGG	#4682
GFP2r	AAG GTA CCC CTG TAC AGC TCG TCC ATG C	#4683
M13for (-20)	GTA AAA CGA CGG CCA G	Thermo Fischer
M13rev	CAG GAA ACA GCT ATG AC	Thermo Fischer
SeqKas	AGC CCG ACG TCG TCC AGA TTG	#4041
Wolle610	GAC TAT CAT ATG CTT ACC GT	#3056

2.1.9 DNA-Größenstandards

Als DNA-Größenstandard für die Gelelektrophorese der PCR-Produkte und Restriktions-verdaue wurde der Gene Ruler 100 bp, 100 bp plus und 1 kbp der Firma Life Technologies / Thermo Fischer Scientific verwendet.

2.1.10 Antibiotikakonzentrationen in Bakterien- und Zellkulturen

<u>Antibiotika</u>	<u>Stockkonzentration</u>	<u>Endkonzentration</u>
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Penicillin/Streptomycin	100x	100 µg/ml
Puromycin	10 µg/µl	2 µg/ml
Tetracyclin	12,5 µg/µl	12,5 µg/ml

2.1.11 Organismen

Prokaryonten:

Zur Klonierung sind folgende *E. coli* Stämme verwendet worden. Die XL-1-Blue wurden im eigenen Labor elektrokompotent gemacht, die TOP10F' wurden gebrauchsfertig von der Firma Thermo Fischer Scientific bezogen.

XL-1-Blue: recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]

TOP10F': F' [lacIq, Tn10(TetR)] mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(StrR) endA1 nupG

Eukaryonten

Für die Transfektionen wurden nachfolgende Zelllinien verwendet. Diese wurden von ATTC (American Type Culture Collection) bezogen bzw. deren Distributor LGC Standards.

3T3-NIH (ATCC: CRL-1658)

Murine embryonale Fibroblasten

HEK293-T (ATCC: CRL-3216)

Humane embryonale Nierenzelllinie

Tierisches Gewebe

Zur Herstellung des Template und des Reporter wurden Retinae der *Mus Musculus* verwendet. Dabei handelte es sich um vier Retinae zweier Tiere des Stammes C57BL/6J.

Genehmigt durch das Regierungspräsidium Gießen

Geschäftszeichen: V 54 - 19 c 20 15 h 01 GI 20/16

Nr. G 94/2014

2.1.12 Kulturmedien

Für die Herstellung der Kulturmedien der Bakterienkulturen wurden Fertigmischungen verwendet und diese anschließend autoklaviert. Die eigentliche Anzucht erfolgte entweder in LB-Flüssigmedium (Luria Broth) oder auf LB-Agar. Nach der Transformation wurde steriles SOC (Super Optimal Broth mit Katabolitrepression durch Glukose) verwendet.

LB-Medium

Luria Broth Base	25 g
	ad 1000 ml ddH ₂ O

LB-Agar

Luria Broth Base	12,5 g
Select Agar	7,5 g
Ampicillin	500 µl
	ad 500 ml ddH ₂ O

SOC-Medium

Trypton	2 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
D-Glucose	20 mM
	ad 1000 ml ddH ₂ O, pH 7,0 mit NaOH

Sowohl die HEK293-T als auch die 3T3NIH Zelllinie wurden in supplementiertem DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) kultiviert.

DMEM+++

DMEM---

FKS	10 %
L-Glutamin (200 mM)	4 mM
Penicillin/Streptomycin	1 %

2.1.13 Software

Tabelle 10: Verwendete Software

Name	Hersteller
BZ-8100 Observation Application v.1.10 (BZ Viewer)	Keyence, Neu-Isenburg (DE)
Biozero (BZ Analyzer) v.3.60	Keyence, Neu-Isenburg (DE)
BioDocAnalyze v.2.67.3.0	Biometra, Göttingen (DE)
Chromas light v.2.1	Technelysium, Brisbane, Australien
Citavi 6.4 für Windows	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil (CH)
CRISPR gRNA Design tool	ATUM, Newark (USA)
FACSDiva (Version 6.1.3)	BD Biosciences, San Jose (USA)
i-control v.1.11	Tecan Group, Männendorf (CH)
Microsoft Excel für Office 356 32Bit v. 2001	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Microsoft PowerPoint für Office 356 32Bit v. 2001	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Microsoft Word für Office 356 32Bit v. 2001	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
QIAxcel ScreenGel Software v. 1.1.0	Qiagen, Hilden (DE)
SigmaPlot (Version 12.0)	Systat Software GmbH, Erkrath (DE)

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit RNA

In dieser Doktorarbeit wurde messenger RNA benötigt, um ein fusioniertes Gen zu erhalten. Die sogenannte mRNA beinhaltet ausschließlich die zu codierenden Bereiche unseres Genoms, die Exons. Die nicht codierenden Bereiche, die Introns, sind hier bereits entfernt. Diese Besonderheit ist notwendig zur Herstellung des Templates.

2.2.1.1 Isolation von gesamt RNA aus tierischem Gewebe

Zur Isolation der gesamt RNA wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen (siehe 2.1.5) verwendet. Dazu mussten jedoch zunächst die hierfür benötigten Mäuseretinae (siehe 2.1.11) aufgearbeitet werden, welches mit Hilfe des Homogenisators (Precellys® 24) geschah. Es wurden jeweils zwei Precellys-Röhrchen CK14 für weiches Gewebe mit 600 µl RLT Puffer gefüllt (siehe 2.1.4) und gewogen. Anschließend wurden pro Röhrchen 2 Mäuseretinae hinzugegeben, das Ganze erneut gewogen und in den Homogenisator für 30 s bei 5500 rpm gestellt. Die Lösung wurde dann 3 min bei 17968 x g RT zentrifugiert und der flüssige Überstand in ein neues Tube überführt. Diesem wurden 600 µl 70 % Ethanol hinzugegeben und so lange vorsichtig auf und ab pipettiert und invertiert, bis sich beide Phasen gut miteinander vermischt hatten. Jeweils 700 µl der Probe wurden auf eine RNeasy spin Säule gegeben und 30 s bei 8000 x g RT zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Bei größeren Probenmengen wurde die Säule mehrfach beladen. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, wurde zusätzlich ein DNase Verdau durchgeführt. Hierfür wurden 350 µl des RW1 Puffers auf die Säule gegeben, 30 s bei 8000 x g RT zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. 10 µl der benötigten DNase I Stocklösung wurde mit 70 µl RDD Puffer gemischt, invertiert und kurz abzentrifugiert und anschließend komplett auf die Membran der RNeasy spin Säule gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurden erneut 350 µl RW1 Puffer hinzugegeben und bei 8000 x g 30 s zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit je 500 µl RPE Puffer und anschließender Zentrifugation bei 8000 x g für zunächst 30 s und dann für 2 min. Die Säule wurde in ein neues Tube überführt, 1 min bei 17968 x g RT getrocknet und erneut in ein neues Tube gegeben. Zuletzt wurden 35 µl RNase freies Wasser verwendet, um die RNA von der Membran zu lösen und das ganze 1 min bei 8000 x g RT eluiert. Um eine höhere Konzentration zu erhalten, wurde dieser letzte Schritt mehrfach wiederholt, jedoch wurde dabei immer wieder dieselbe Lösung zur Elution verwendet. Die so entstandene RNA wurde zur Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.1.2 Überprüfung der RNA Qualität

Um zu überprüfen, wie gut die Qualität der isolierten RNA war, erfolgte eine Qualitätskontrolle mit Hilfe des das QIAxcel® Advanced Systems und dem QIAxcel RNA QC Kit v2.0. Hierfür wurde nach Herstellerangaben dasselbe Volumen RNA mit dem QX RNA Ladepuffer vermischt und auf 10 µl mit QX RNA Dilutionspuffer aufgefüllt. Die Proben wurden für 2 min bei 70 °C erhitzt, dann 1 min auf Eis gekühlt und kurz zentrifugiert. Durch vorsichtiges auf und ab pipettieren wurden die Proben vermischt und anschließend sofort mit dem QIAxcel® Advanced System und der ScreenGel Software Version 1.1.0 analysiert und ausgewertet. Die Software ermittelte die Qualität und Integrität der RNA durch Bestimmung der 28S/18S Ration. Dazu wurden alle RNA Bestandteile der Probe ausgewertet und diejenigen miteinander in Relation gesetzt, welche sich im Bereich des 18S bzw. der 28S Einheit befanden. Hierbei wurde eine Abweichung von 3 – 4 % mit einbezogen.

2.2.1.3 Umschreibung von mRNA aus gesamt RNA in cDNA

Damit die in 2.2.1.1 erhaltene RNA für die weiteren Versuche verwendet werden konnte, musste diese in cDNA umgeschrieben werden. Dies geschah mit Hilfe des PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit der Firma Takara 2.1.5. Es wurden 8 µl der isolierten gesamt RNA zusammen mit 1 µl dNTP Mixtur (10 mM) und 1 µl Oligo dTPrimern vermischt, 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. In einem neuem Tube wurden dann 10 µl der vorher angefertigten Template-RNA Primer Mixtur mit 4 µl 5x PrimeScript Puffer, 0,5 µl RNase Inhibitor (40 U/µl), 1 µl PrimeScript Reverse Transkriptase und RNase freies Wasser ad 20 µl zusammen pipettiert und durch Invertieren vermischt. Die Lösung wurde 60 min bei 42 °C inkubiert, anschließend 5 min bei 95 °C hitzeinaktiviert und danach sofort auf Eis gekühlt. Die entstandene cDNA konnte direkt weiterverwendet oder bei -20 °C aufbewahrt werden.

2.2.2 Arbeiten mit DNA

2.2.2.1 Hybridisierung

Zur Hybridisierung wurden die in 2.1.8 genannten Guide und Target-Sequenzen als forward und reverse Oligonukleotide synthetisiert. Dafür wurden jeweils 8 µl des forward und 8 µl des reverse Oligonukleotides mit 4 µl ddH₂O gemischt und für 10 min bei 90 °C im Heizblock denaturiert. Anschließend erfolgte die Abkühlung bei RT für 30 min, die eine Anlagerung der komplementären Sequenzen bewirkte. Die längerfristige Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Tabelle 11: Pipettierschema der Hybridisierung

Forward Oligonukleotid	8 µl
Reverse Oligonukleotid	8 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

2.2.2.2 Restriktionsverdau

Restriktionsverdau wurden sowohl dazu verwendet Plasmide zu hydrolysieren, um später hybridisierte Primer-Sequenzen und amplifizierte DNA-Sequenzen zu integrieren, als auch um Plasmide analysieren zu können. Zusätzlich wurde diese Methode verwendet, um das spätere Template und den Reporter aus dem Plasmid ausschneiden zu können. Hierzu wurden die Plasmide (siehe 2.1.7) mit Hilfe verschiedener Enzyme (siehe 2.1.6) verdaut. Eine fest gelegte Menge an Plasmid wurde mit den benötigten Enzymen und dem entsprechenden 10x Puffer vermischt und der ganze Ansatz auf 20 µl mit ddH₂O aufgefüllt (siehe Tabelle 12). Der Ansatz wurde gevortext und für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend mussten die meisten Enzyme bei 65 °C oder 80 °C für jeweils 20 min hitzeinaktiviert werden. Zur Herstellung des Templates wurden jedoch größere Mengen an DNA verwendet.

Tabelle 12: Pipettierschema der Restriktionsverdau

	Einfachverdau	Doppelverdau	Template/Reporter
Plasmid	1 µg	1 µg	25 µg
10x Puffer	2 µl	2 µl	3 µl
Enzym 1	1,5 µl	1,5 µl	2,5 µl
Enzym 2		1,5µl	2,5µl
ddH ₂ O	ad 20µl	ad 20µl	ad 30µl

2.2.2.3 Ligation von DNA-Molekülen

Zur enzymatischen Verknüpfung der geschnittenen Plasmide mit den hybridisierten Oligonukleotiden (Insert) wurde die T4 DNA Ligase (siehe 2.1.6) verwendet. Diese katalysiert die Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'Phosphat- und dem 3'Hydroxyl-Ende der DNA-Stränge. Pro Ansatz wurden 100 ng des bereits verdauten Plasmids mit 5 µl des Inserts sowie mit 2 µl 10x Ligasepuffer, 1 µl T4 DNA Ligase und 10 µl ddH₂O zusammen pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Tabelle 13: Pipettierschema Ligation

Plasmid	100 ng
Insert	5 µl
10x T4 DNA Ligasepuffer	2 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

2.2.2.4 Nachverdau

Um religierte Plasmide vor der Transformation (siehe 2.2.3.3) zu eliminieren, wurde ein Nachverdau des Ligationsansatzes durchgeführt. Durch diesen wurden Plasmide linearisiert, bei denen eine Integration des Inserts nicht stattgefunden hatte.

Dies geschah sowohl mit dem ligierten pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2-pA Vektor als auch mit dem ligierten pcDNA3.1(+)/CAT Vektor und dem bereits bearbeiteten pcR2.1TOPO Vektor.

Der Vektor pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2-pA wurde mit den Enzymen AvrII und BsiWI-HF verdaut und anschließend mit einer der Target-Sequenzen ligiert. Der Nachverdau wurde dann mit BsiWI-HF allein durchgeführt.

Der mit EcoRV-HF verdaute pcDNA3.1(+)/CAT Vektor wurde mit dem PCR-Produkt des fusionierten Exon 1/2 ligiert (siehe 3.3.2) und anschließend erneut mit EcoRV-HF verdaut.

Zur Herstellung des Reporters wurde der pcR2.1TOPO Vektor verwendet, in den bereits erfolgreich das Template integriert worden war (pCR2.1-TOPO mit CMV-Ex1/2Abca4, siehe 3.3.3 und 3.4). Um die für den Reporter notwendige GFP-Sequenz einbauen zu können, wurde dieser mit PmeI verdaut und anschließend ligiert. Der Nachverdau wurde erneut mit PmeI durchgeführt.

2.2.2.5 Restriktions-Klonierung von Guide- und Target-Sequenzen

Guide RNA-Klonierung in pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0

Mit Hilfe der Restriktions-Klonierung wurden die benötigten hybridisierten DNA-Sequenzen der guideRNA (gRNA) für die intrinsischen Bereiche vor dem Abca4 Promotor und zwischen Exon 1 und 2 in den Shuttle-Vektor kloniert. Dafür verwendet wurden die in Tabelle 8 aufgeführten DNA-Sequenzen. Sie wurden jeweils als PrG1 - 5 und InG1 - 5 benannt und anschließend in den pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 Vektor kloniert. Diese so hergestellten gRNA/Cas9 Komplexe wurden im weiteren Verlauf im BRET-Assay auf ihre Aktivität getestet (siehe 2.2.4.6).

Target-Sequenz-Klonierung in pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2-pA

Ebenfalls mit dieser Methode wurden die hybridisierten Target-DNA-Sequenzen kloniert. Hier wurden die Sequenzen aus Tabelle 8, die mit PrT1 – 5 und InT1 – 5 benannt sind, in den Shuttle-Vektor pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2-pA (NHEJ-Sensor) kloniert.

Weitere Klonierungen

Die Klonierungen, die zur Herstellung des DNA-Templates nötig waren, wurden sowohl mit Hilfe des pcDNA3.1(+)/CAT Vektor, als auch mit dem pCR2.1-TOPO Vektor und den jeweiligen PCR Produkten (siehe 3.3.2 & 3.3.3) durchgeführt. Dazu wurde der pCR2.1-TOPO Vektor mittels dem TOPO™ TA Cloning™ Kit (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt) nach Herstellerangaben verwendet.

Ähnlich wurde bei der Herstellung des Reporters vorgegangen. Hier wurde jedoch der pCR2.1-TOPO Vektor mit dem bereits integrierten Template zur Weiterverarbeitung verwendet (siehe 3.4) um den Reporter herzustellen.

2.2.2.6 Sequenzierung von Plasmidklonen

Zur Überprüfung der erfolgreichen Integration des Inserts in ein Plasmid wurden die Proben zur Sequenzierung an die Firma SeqLab (Göttingen) geschickt.

Tabelle 14: Zusammensetzung des Sequenzierungsansatzes

Plasmid DNA	6-12 µl (1200 ng)
Primer (10pmol/µl)	3 µl
ddH ₂ O	ad 15 µl

2.2.2.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Um unbekannte DNA-Konzentrationen zu bestimmen, wurde das Photometer verwendet. Die zu messenden Proben wurden im Verhältnis 1:10 bis 1:100 mit ddH₂O verdünnt und bei einer Wellenlänge von 230 nm gemessen.

2.2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur exponentiellen Amplifizierung von spezifischen DNA-Sequenzen und besteht aus mehreren aufeinanderfolgenden Schritten. Nach einer initialen Denaturierung bei 98 °C werden folgende 3 Schritte mehrfach wiederholt: Die Denaturierung der doppelsträngigen Matrizen-DNA bei 98 °C in ihre Einzelstränge, die anschließende Hybridisierung der einzelsträngigen DNA mit den beiden Primer und schlussendlich die Elongation bei 72 °C. Das Temperatur-optimum der Hybridisierung (Annealing) ist von der sogenannten Schmelztemperatur der beiden Primer abhängig. Diese kann in silico berechnet oder mittels einer Gradienten-PCR bestimmt werden. Die Elongation, also die Bildung des Zweitstranges mit komplementären Nukleotiden, erfolgt ausgehend vom 3' Ende der Primer.

In dieser Arbeit wurden mehrere verschiedene Abläufe einer PCR sowie die Gradienten-PCR zur Versuchsoptimierung durchgeführt, um aus unterschiedlicher Doppelstrang-DNA einzelne Sequenzen zu amplifizieren. Zum einen war die PCR bei der Herstellung des Templates und des Reporters notwendig, um spezifische Inserts zu produzieren, deren 5' Enden homolog zu den beiden Enden der geschnittenen Klonierungsvektoren waren. Zum anderen zur Überprüfung und Analyse der Integration der Template-DNA in die genomische DNA der 3T3-NIH Zellen (siehe 3.6.3). Die PCR wurden ausschließlich mit der Phusion® Polymerase durchgeführt und zu je 20 µl Ansätzen wie folgt pipettiert. Verwendet wurden jeweils die der Phusion® Polymerase mitgelieferten Chemikalien und Puffer nach Herstellerangaben.

Ansatz zu je 20µl

cDNA	5,0 µl	Plasmid DNA (~5 ng)	1,0 µl
Primer I (10 pmol/µl)	1,0 µl	Primer I (10 pmol/µl)	1,0 µl
Primer II (10 pmol/µl)	1,0 µl	Primer II (10 pmol/µl)	1,0 µl
5x HF Puffer	4,0 µl	5x HF Puffer	4,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,4 µl	dNTPs (10 mM)	0,4 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,3 µl	MgCl ₂ (50 mM)	0,3 µl
Polymerase (2 U/µl)	0,2 µl	Polymerase (2 U/µl)	0,2 µl
ddH ₂ O	8,1 µl	ddH ₂ O	12,1 µl

DNA aus Isolation	100-200 ng
Primer I (10 pmol/µl)	1,0 µl
Primer II (10 pmol/µl)	1,0 µl
5x HF Puffer	4,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,3 µl
Polymerase (2 U/µl)	0,2 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl

PCR-Programme

3-Step Programm cDNA

98 °C	30 s	}	x34
98 °C	7 s		
68 °C	20 s		
72 °C	20 s		
72 °C	600 s		
10 °C	600 s		

3-Step Programm Plasmid DNA

98 °C	30 s	}	x34
98 °C	7 s		
68 °C	60 s		
72 °C	20 s		
72 °C	600 s		
10 °C	600 s		

2-Step Programm Plasmid DNA

98 °C	30 s	}	x34
98 °C	7 s		
72 °C	30 s		
72 °C	600 s		
10 °C	600 s		

3-Step Programm DNA Isolation

98 °C	30 s	}	x34
98 °C	7 s		
72 °C	10 s		
72 °C	50 s		
72 °C	600 s		
10 °C	600 s		

2.2.2.9 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese wurde angewandt, um die Größe von DNA-Fragmenten zu bestimmen. Es wurden 1 % und 1,5 % Gele gegossen bestehend aus 60 ml 1x TBE Puffer und 0,6 g bzw. 0,9 g Agarose, die aufgekocht und anschließend mit 4 – 6 µl DNA Stain Clear G versetzt wurden. Nach dem Auspolymerisieren wurden sie in die Gelelektrophoresekammer in 1x TBE gelegt und sowohl Proben als auch Marker aufgetragen. Zuvor wurden die Proben mit 6x Ladepuffer LD versetzt. Als Größenstandards wurden je nach erwarteter Fragmentgröße 1 kbp, 100 bp plus oder ein 100 bp DNA-Marker (siehe 2.1.9) verwendet. Die DNA wurde bei 100 V für 60 min aufgetrennt und anschließend optisch mit Hilfe eines UV-Transilluminators ausgewertet.

2.2.2.10 DNA-Extraktion aus Agarosegel

Nachdem die DNA in der Gelelektrophorese aufgetrennt und ausgewertet wurde, konnte diese für weitere Versuche verwendet werden. Dazu musste die DNA aus dem Gel extrahiert werden, wofür das NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit verwendet wurde. Mit Hilfe des UV-Transilluminators wurden die benötigten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und jeweils einzeln in ein leeres, tariertes Tube überführt. Anschließend wurde erneut gewogen und pro 100 mg Agarosegel 200 µl NTI Puffer hinzugegeben. Das Ganze wurde nun 10 min bei 50 °C erwärmt und alle 2 min gevortext, damit sich das Gel komplett auflösen konnte. Von dieser Lösung wurden nun 700 µl auf die im Kit beiliegenden Säulen gegeben, 50 s bei 11000 x g RT zentrifugiert und der Überstand danach verworfen. War ein größeres Volumen der Probe vorhanden, konnten die Säulen mehrfach beladen werden. Die Säulen wurden nun je 2x mit 700 µl NT3 Puffer gewaschen und 50 s bei 11000 x g zentrifugiert. Danach erfolgte der Trocknungsprozess bestehend aus einer Zentrifugation für 1 min 20 s bei 11000 x g und darauffolgend 2 min bei 70 °C auf dem Heizblock. Zuletzt wurden die Säulen in ein neues Tube überführt und 30 µl ddH₂O auf die Membran gegeben. Eine Ausnahme bestand jedoch bei der Isolation des Template und des Reporters. Hier wurde der dem Kit enthaltene Elutionspuffer NE verwendet. Dies war notwendig, da mit sehr geringen Konzentrationen gearbeitet wurde und die DNA im Anschluss für die Transfektion zusätzlich noch aufgereinigt werden musste. Nach Inkubation von 1 min bei RT wurde ein letztes Mal für 1 min 20 s bei 11000 x g zentrifugiert. Zur Erhöhung der DNA-Konzentration wurde die Säule mehrfach mit derselben Lösung durchgespült und zentrifugiert.

2.2.2.11 Aufreinigen von DNA für die Transfektion

Für Transfektionen (siehe 2.2.4.3 & 2.2.4.4) war es sehr wichtig, Verunreinigungen so gering wie möglich zu halten. Daher wurde die aus dem Agarosegel isolierte DNA des Templates und des Reporters zusätzlich aufgereinigt. Hierfür wurde das DNA Clean and Concentrator -25 Kit verwendet (siehe 2.1.5). Den Herstellerangaben entsprechend wurden die Proben 5:1 mit DNA Binding Puffer aufgefüllt (30 µl DNA : 150 µl Puffer). Durch kurzes auf und ab pipettieren wurde die Lösung gemischt, anschließend auf die im Kit vorhandenen Säulen gegeben und 50 s bei 14000 x g zentrifugiert. Die Säulen wurden 2 x gewaschen in dem je 200 µl DNA Waschpuffer auf diese gegeben und das Ganze erneut 50 s bei 14000 x g zentrifugiert wurde. Zum Lösen der DNA wurde die Säule in ein neues Tube überführt und 52 µl ddH₂O direkt auf die Membran gegeben. Nach einer Minute bei RT wurde ein letztes Mal 50 s bei 14000 x g zentrifugiert. Um auch hier eine höhere Konzentration zu erhalten, konnte die Säule mehrfach mit der entstandenen Lösung durchgespült werden.

2.2.3 Arbeiten mit Bakterien

2.2.3.1 Kultivierung von *E. coli*

Für die Vermehrung von *E. coli* Bakterien nach erfolgter Transformation wurden selektive Medien (siehe 2.1.12) verwendet. Hierzu wurde sowohl dem LB-Flüssigmedium als auch dem LB-Selektivagar vor dem Gießen in die Petrischalen entweder Ampicillin oder Kanamycin zugesetzt.

2.2.3.2 Herstellung elektrokompenter *E. coli*

Zur Herstellung der elektrokompenten *E. coli* musste zunächst eine Übernachtskultur aus 5 ml LB-Medium, 5 µl XL1-Blue Glycerolstock und 5 µl Tetracyclin (Endkonzentration: 12,5 µg/ml, Stockkonzentration 12,5 µg/µl) angefertigt werden. Diese wurde für ca. 16 h bei 37 °C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden aus dieser Übernachtskultur 2 Hauptkulturen angeimpft, bestehend aus 100 ml LB-Medium, 5 ml der Übernachtskultur und 100 µl Tetracyclin (Endkonzentration: 12,5 µg/ml, Stockkonzentration 12,5 µg/µl), die wiederum bei 37 °C und 180 rpm für 3 – 4 h inkubierten. Ob sich die Bakterien genügend vermehrt hatten wurde mittels der optischen Dichte bestimmt (OD₆₀₀), die zwischen 0,6-0,8 liegen musste. War dies der Fall, wurde die Zellsuspension auf 50ml Falcons verteilt, 30 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 5525 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in kaltem 50 ml 1 mM HEPES resuspendiert um anschließend erneut 10 min bei

5525 x g und 4 °C zentrifugiert zu werden. Erneut wurde der Überstand verworfen und das Pellet in kaltem 25 ml 1 mM HEPES gelöst und 10 min bei 5525 x g und 4 °C zentrifugiert. Nun erfolgten die Waschschrirte mit kaltem 10% Glycerin. Hierbei verwendete man zuerst 10 ml, anschließend 5 ml zur Resuspension. Dazwischen erfolgte jeweils eine Zentrifugation, jeweils 5 min bei 5525 x g und 4 °C und dem Verwerfen des Überstandes. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml kaltem Glycerin gelöst. Diese Suspension konnte direkt zur Transformation verwendet werden. War dies nicht der Fall, so wurde die Suspension zu je 55 µl in 1,5 ml Tubes aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.3 Transformation

Mit Hilfe der Transformation gelang es die hergestellten Plasmide in zuvor kompetent gemachte Bakterien einzubringen und diese zu vervielfältigen. Dazu wurden 2 – 4 µl des Ligationsansatzes in 55 µl XL1 *E. coli* Suspension gegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz in eine eisgekühlte Kuvette ohne Luftblasen pipettiert und in einem Elektroporator einem Stromschlag von 2000 V für 5 ms ausgesetzt. Danach wurden sofort 1 ml SOC Medium dazugegeben und alles in ein 1,5 ml Eppi überführt. Dieses wurde für ca. 1 h bei 37 °C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert damit die benötigte Antibiotikaresistenz ausgebildet werden konnte. Um den Ansatz zu konzentrieren wurde dieser 5 min bei 17968 x g RT zentrifugiert. Danach wurden 800 µl des klaren Überstandes verworfen, der Rest erneut resuspendiert. Von diesem Ansatz wurden nun 50 µl auf vorgewärmte Selektivagar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.3.4 Glycerolstock

Zur Aufbewahrung der Bakterien mit den korrekt ligierten Plasmiden wurden Glycerolstocks angefertigt. Dazu wurden 100 µl Glycerin mit 200 µl der Übernacktkultur vermischt, gut gemischt und anschließend bei -80 °C eingefroren.

2.2.3.5 Isolation von Plasmid DNA

Mini-Präparation mittels Puffermethode

Zur Isolation von Plasmiden bediente man sich dem Prinzip der alkalischen Lyse. Durch diese konnten die Plasmide von den restlichen Zellbestandteilen der Bakterien getrennt und aufgereinigt werden. Hierfür wurden am Vortag einzelne Bakterienkolonien von den Selektivagar-Platten mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in jeweils 5ml LB-Flüssigmedium versetzt mit 5 µl Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag konnten 2 ml dieser Suspension in ein Tube überführt und 5 min bei 2292 x g zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl S1-Puffer resuspendiert. Nun wurden zunächst 100 µl S2-Puffer hinzugegeben und anschließend invertiert, danach kamen 100 µl S3-Puffer hinzu und es wurde erneut invertiert. Die so entstandenen Zelltrümmer wurden 10 min bei 9168 x g abzentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde vorsichtig in ein neues Tube überführt, in welchem sich 700 µl eiskaltes 100 % Ethanol befanden und für 30 min bei 17968 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, 200 µl 70 % Ethanol (RT) hinzugegeben und erneut 5 min bei 17968 x g und 4 °C zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Pellet im Heizblock bei 50 °C an der Luft getrocknet. Zum erneuten Lösen wurden 50 µl ddH₂O verwendet.

Mini-Präparation mittels Kit

Alternativ zu der Puffermethode wurde auch das unter 2.1.5 genannte kommerziell erhältliche Kit zur sauberen Gewinnung von Plasmid DNA verwendet. Dies wurde nach Herstellerangaben und mit den mitgelieferten Puffern und Säulen durchgeführt. Für die hier durchgeführten Mini-Präparationen wurden 5 ml Übernachtkultur angesetzt, lediglich anstelle des im Kit verwendeten AE-Puffers wurde dasselbe Volumen ddH₂O verwendet.

Maxi-Präparation

Die Maxipräparation wurde mit einem kommerziell erworbenen Kit (siehe 2.1.5) und nach Herstellerangaben durchgeführt. Auch hier wurde das Prinzip der alkalischen Lyse genutzt. Am Vortag wurden hierzu 100 ml LB-Flüssigmedium mit 100 µl Bakterienkultur (Glycerolstock) und 100 µl Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) beimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Diese Kulturen wurden auf 50 ml Falcons aufgeteilt und 10 min bei 5525 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand

wurde verworfen und anschließend der Resuspensionspuffer (P1) zum Lösen der Pellets verwendet. Diesem Puffer wurden im Vorfeld 150 µl des im Kit bei liegenden Indikators LyseBlue® hinzugegeben. Dieser sorgte je nach Veränderung des pH-Wertes innerhalb der Proben für einen Farbumschlag zu blau, um Fehler im Ablauf zu minimieren. Pro Falcon wurden jeweils 5 ml des Resuspensionspuffer (P1) hinzugegeben, durch auf und ab pipettieren das Pellet gelöst und die identischen Ansätze in ein einziges Falcon überführt. Daraufhin folgten 10 ml des Lysepuffer (P2) und anschließend invertieren, so dass es zu einem kompletten Farbumschlag zu blau kam. Die Probe inkubierte 5 min bei RT, um danach den Neutralisationspuffer (P3) hinzu zu geben und so lange zu invertieren, bis sich die Probe wieder komplett entfärbt hatte. Nun wurde die Probe 20 min auf Eis inkubiert und anschließend 40 min bei 11627 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde danach in ein neues 50 ml Falcon überführt und erneut 15 min bei 11627 x g und 4 °C zentrifugiert. Währenddessen wurden 10 ml Equilibrierungspuffer (QBT) auf die im Kit enthaltenen Durchlaufsäulen gegeben und der Durchlauf wieder verworfen. Der Überstand aus den zentrifugierten Falcons wurde anschließend auf die Säulen gegeben. Sobald die Proben vollständig durchgelaufen waren, wurden die Säulen 2 x mit je 30 ml Waschpuffer (QC) gewaschen. Zuletzt wurden die Säulen in neue 50 ml Falcons übertragen und die DNA mit 15 ml Elutionspuffer (QF) gelöst. Zu den Proben wurden nun 10,5 ml 100 % Isopropanol hinzugefügt, das ganze invertiert und erneut 40 min bei 11627 x g und 4 °C zentrifugiert. Danach erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 70 % Ethanol und einer Zentrifugation für 10 min bei 11627 x g und 4 °C. Zuletzt wurde der Überstand verworfen, das Pellet an der Luft getrocknet und anschließend in 300 µl ddH₂O gelöst.

2.2.4 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.2.4.1 Kultivierung von HEK293-T und 3T3-NIH

In dieser Arbeit wurden für einige Versuche eukaryotische Zellen (HEK293-T und 3T3-NIH) verwendet und diese in supplementierten DMEM+++ (siehe 2.1.12) bei konstanten 37 °C, 5 % CO₂, gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert. Die zunächst im Stickstoff gelagerten Zellen (Gesamtvolumen 1 ml) wurden mit 9 ml des Kulturmediums verdünnt und in eine 10 cm Zellkulturschale überführt. Nach 24 h wurde das Kulturmedium gewechselt, um das DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen. Bei Konfluenz konnten die Zellen auch direkt geteilt werden. Standardgemäß wurden beide Zellarten ca. alle 3 – 4 Tage geteilt. Das alte Kulturmedium wurde entfernt, die 3T3-NIH Zellen zusätzlich mit 10 ml sterilem PBS gewaschen, und 1 ml Accutase hinzugegeben. Nach einer kurzen Inkubationszeit von ca. 5 – 10 min bei 37°C, um die adhärennten Zellen

von der Schale zu lösen, wurden die Zellen mit 9 ml DMEM+++ resuspendiert. 1 ml dieser Suspension wurden in eine neue Zellkulturschale überführt und mit 9 ml DMEM+++ aufgefüllt, sodass die Zellen in einem Verhältnis von 1:10 geteilt worden waren. Alle Zellen wurden maximal bis zur 25. Passage verwendet.

2.2.4.2 Auszählung von Zellen

Um die Zellzahl in Flüssigkeiten pro Volumen zu erfassen, wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Dazu wurden die Zellen wie bei der Teilung aufgearbeitet und gut suspendiert. Die Neubauer Zählkammer besteht aus 4 Großquadraten mit einer Kantenlänge von 1 mm x 1 mm und einem Volumen von 0,1 µl. Diese bestehen wiederum aus 16 Kleinquadraten. Nachdem die Kammer mit Ethanol gereinigt und mit einem Glasdeckplättchen bedeckt worden war, wurden 20 µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert und die Zellen in den 4 Großquadraten unter dem Mikroskop ausgezählt. Daraus wurde der Mittelwert berechnet und das Ganze auf 1 ml hochgerechnet. Zur Berechnung wurde folgende Formel verwendet:

$$[(GQ1+GQ2+GQ3+GQ4) : 4] * Vf * 10^4 = \text{Zellzahl / ml}$$

GQ = Großquadrat , Vf = Verdünnungsfaktor

Der Verdünnungsfaktor wurde nur verwendet, wenn bei erwarteter hoher Zellzahl die Suspension vorher verdünnt wurde.

2.2.4.3 Transfektion

Mit Hilfe der Transfektion war es möglich, Plasmide in eukaryotische Zellen einzuschleusen. In dieser Arbeit wurde die PEI-Transfektion verwendet, um sowohl HEK293-T als auch 3T3-NIH Zellen zu transfizieren. Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen einer konfluenten Zellkulturschale in eine 6-Well-Platte überführt, bestehend aus jeweils 1 ml der Zellsuspension pro Well (siehe 2.2.4.1), die mit 2 ml DMEM+++ aufgefüllt wurden. Am nächsten Tag wurde vor der Transfektion das alte Medium verworfen und durch 2 ml DMEM+++ ersetzt. Der Transfektionsansatz wurde wie folgt pipettiert (siehe Tabelle 15 & Tabelle 16): Die zu transfizierende DNA wurde in 100 µl NaCl gelöst, gut gevortext und mit 200 µl PEI-Mix aufgefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min RT wurde der Ansatz vorsichtig tropfenweise auf die Zellen im entsprechenden Well gegeben und für 4 – 6 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank darauf belassen. Da der PEI-Mix eine zelltoxische Wirkung hat, musste das Medium nach Ablauf der Zeit ein letztes Mal gewechselt und durch 2 ml DMEM+++

erneuert werden. Die Zellen wurden bis zum nächsten Tag im Brutschrank belassen, um sie dann unter dem Fluoreszenzmikroskop zu betrachten oder für ein BRET-Assay zu verwenden.

Tabelle 15: Transfektion HEK293-T

	Einfach Transfektion	Co-Transfektion
NaCl	100 µl	100 µl
Plasmid-DNA NHEJ-Sensor mit Target-Sequenz	2500 ng	2500 ng
Plasmid DNA gRNA/Cas9	-	2500 ng
PEI-MIX	200 µl	200 µl

Tabelle 16: Transfektion 3T3-NIH

	Einfach Transfektion	Co-Transfektion	Triple-Transfektion
NaCl	100 µl	100 µl	100 µl
Template	600 ng	600 ng	600 ng
Plasmid DNA gRNA/Cas9	-	1200 ng	1200 ng
Plasmid DNA gRNA/Cas9	-	-	1200 ng
PEI-Mix	200 µl	200 µl	200 µl

	Negativkontrolle	GFP-Kontrolle
NaCl	100 µl	100 µl
Template	600 ng	-
Plasmid-DNA pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0	1200 ng	-
GFP	-	25000 ng
PEI-Mix	200 µl	200 µl

	Eigenfluoreszenzkontrolle
NaCl	100 µl
Reporter	600 ng
PEI-Mix	200 µ

2.2.4.4 Transfektion für die FACS Analyse

Für die Transfektion zur Vorbereitung einer FACS-Analyse wurden am Vortag der Transfektion die 3T3-NIH Zellen einer konfluenten Zellkulturschale gelöst und suspendiert. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer wurden die Zellen gezählt (siehe 2.2.4.2) und anschließend in einer 24-Well-Platte ausplattiert. Pro Well wurden jeweils 200.000 Zellen überführt und mit DMEM+++ auf 500 µl aufgefüllt. Am folgenden Tag wurde das alte Kulturmedium durch 500 µl frisches DMEM+++ ersetzt.

Die Volumina und Mengen für den Transfektionsansatz wurden wie folgt angepasst: In 30 µl NaCl wurde die zu transfizierende DNA gelöst, gevortext und anschließend 40 µl PEI-Mix dazu gegeben. Nach zehnmütiger Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben und für 4 – 6 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank belassen. Anschließend wurde das Medium ein letztes Mal durch 500 µl frisches Kulturmedium ersetzt und die Zellen über Nacht im Brutschrank aufbewahrt.

Tabelle 17: Transfektion der 3T3-NIH Zellen für die FACS-Analyse

	Co- Transfektion	Triple- Transfektion	Negativ- kontrolle 1	Negativ- kontrolle 2	GFP- Kontrolle
NaCl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl	30 µl
Reporter	600 ng	600 ng	600 ng	-	-
Plasmid-DNA gRNA/Cas9 Komplex	1200 ng	1200 ng	-	-	-
Plasmid-DNA gRNA/Cas9 Komplex	-	1200 ng	-	-	-
Plasmid-DNA pSpCas9(BB)-2A- Puro (PX459) V2.0	-	-	1200 ng -	-	-
GFP				-	600 ng
PEI-Mix	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl

2.2.4.5 Fluoreszenz Mikroskopie

Der Erfolg einer Transfektion, sei es die des Reporters, des Templates, der gRNA/Cas9 Komplexe, der NHEJ-Sensoren mit den Target-Sequenzen oder der GFP-Transfektionskontrolle selbst, wurden mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie überprüft. Dazu wurde sowohl ein Objektiv mit 4 x optischen und 2 – 4 x digitalem Zoom als auch ein Objektiv mit 20 x optischem und 10 – 20 x digitalem Zoom verwendet. Je nachdem, ob die Zellen weiter kultiviert werden sollten oder nicht, wurden sie entsprechend für die Mikroskopie vorbereitet. Wurden sie jedoch im Anschluss für ein BRET-Assay, eine FACS-Analyse oder zur Isolation eukaryotischer DNA verwendet, wurde das alte Medium verworfen, das Well mit 1 ml PBS gewaschen und ohne Flüssigkeit mikroskopiert, um die Eigenfluoreszenz des Mediums zu minimieren.

2.2.4.6 BRET-Assay

Um die Aktivität der gRNA/Cas9 Komplexe zu überprüfen wurde das auf BRET basierenden NHEJ-Sensor System verwendet. Hierzu wurden HEK 293-T Zellen mit den hergestellten gRNA/Cas9 Komplexen sowie deren dazugehörigen NHEJ-Sensoren (PrT 1 – 5; InT 1 – 5) transfiziert (siehe 2.2.2.5 & 2.2.4.3). Die alleinige Transfektion des jeweiligen NHEJ-Sensors wurde als Positivkontrolle für die einzelnen Ansätze verwendet.

Um nun die Aktivität messen zu können mussten 24 h nach Transfektion die Zellen für das BRET-Assay aufbereitet werden. Dazu wurde das Medium verworfen und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Dieses wurde ebenfalls verworfen und anschließend 100 µl PBS auf das Well gegeben. Die Zellen wurden nun mit einem Zellschaber gelöst und mit einer Pipette gründlich durch auf und ab pipettieren gemischt. Anschließend wurde die Suspension in ein Tube überführt und sofort auf Eis gekühlt. Das Tube wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei RT aufgetaut und gut gevortext, um die Zellen zu zerstören. Der Vorgang wurde 2 x durchgeführt und die Tubes anschließend 10 min bei 17968 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Tube überführt. Anschließend wurde das Substrat für die Luciferase-Reaktion vorbereitet. Da dieses lichtempfindlich ist, mussten dafür alle verwendeten Tubes in Alufolie gewickelt werden, um es vor Lichteinstrahlung zu schützen. Für die spätere Messung wurde eine weiße 96-Well-Platte verwendet und pro Well wurden 100 µl PBS versetzt mit 1 µl Coelenterazine 400a benötigt. Die Gesamtmenge an Substrat errechnete sich somit aus der Anzahl der zu messenden Well x 100 µl + 1,5 ml zum primen der Zuleitungen. Jede Probe wurde vierfachbestimmt und somit jeweils 4 Wells der 96-Well-Platte mit 5 µl des Überstandes befüllt. Die Messung erfolgte am Tecan Infinite M1000Pro durch Messung

der Dual-Lumineszenz mit den Transmissionsfiltern Blue (370 - 450 nm) und Green (510 - 540 nm). Somit konnten sowohl die Emissionen der Luciferase als auch die des GFPs getrennt voneinander bestimmt werden.

Die gemessenen Werte wurden mit Excel ausgewertet und mit SigmaPlot dargestellt. Um für die unterschiedlichen Durchläufe des BRET-Assays vergleichbare Werte zu erhalten, wurde die BRET-Ratio bestimmt. Dazu wurde das GFP Signal, welches mit dem Transmissionsfilter Green gemessen wurde, durch das Signal der Luciferase geteilt, welches mit dem Transmissionsfilter Blue gemessen wurde. Um die Werte der Aktivität zu normieren, wurde die BRET-Ratio der Luciferase (pcDNA-RLuc8) zusätzlich als Korrekturfaktor bestimmt und vom vorher beschriebenen Quotienten abgezogen. Anschließend wurde für jedes einzelne zu vergleichende Paar der Wert des NHEJ-Sensors mit 100 % gleichgesetzt. Die zugehörige Kombination aus NHEJ-Sensor und gRNA/Cas9 wurde in Relation zu diesem ebenfalls in Prozent berechnet. Schlussendlich wurde die Differenz der zu vergleichenden Proben als Aktivität der guideRNA in Prozent angegeben.

$$BRET\ Ratio = \frac{Biosensor\ (Green\ Filter)}{Biosensor\ (Blue\ Filter)}$$

2.2.4.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Mit der FACS-Analyse war es möglich, fluoreszierende Zellen zu zählen und somit deren Anzahl in einer Zellpopulation zu bestimmen (siehe 1.6.3). Um dies für bestimmte Konstrukte messen zu können, wurde im Vorfeld eine Transfektion durchgeführt (siehe 2.2.4.4). Für die eigentliche Durchführung wurde von den transfizierten Zellen das Medium abgenommen und jedes Well mit 500 µl PBS gewaschen und mikroskopiert. Anschließend wurden 200 µl Accutase zum Lösen der Zellen verwendet, die dann mit 500 µl PBS aus den Well gelöst und in ein Tube überführt wurden. Dieses wiederum wurde sofort auf Eis gekühlt, bis alle Proben bearbeitet waren um dann 10 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde abpipettiert und die Zellen erneut in 500 µl PBS vorsichtig durch vortexen resuspendiert und bis zur Analyse im FACS erneut auf Eis gelagert. Die Proben wurden dem Herstellerprotokoll entsprechend gemessen und die Werte in der Software FACSDiva Version 6.1.3 verarbeitet.

Die weitere Bearbeitung der erhobenen Werte erfolgte auch hier mit Excel sowie die Darstellung mit SigmaPlot. Zur Ermittlung der Transfektionseffizienz wurden zunächst die Mittelwerte derselben Ansätze berechnet und die Anzahl der positiven Events durch die Anzahl aller gemessener Events geteilt. Um die Editierungsrate zu erhalten, wurde

jeweils der Mittelwert der positiv gezählten Zellen eines Ansatzes durch den Mittelwert der GFP-Positivkontrolle geteilt und x 100 in Prozent angegeben.

$$\text{Editierungsrate in \%} = \frac{\text{Mittelwert der positiv gezählten Zellen eines Ansatzes}}{\text{Mittelwert der GFP positiven Zellen der Kontrolle}} \times 100$$

2.2.4.8 Isolation eukaryotischer DNA

Die Isolation von DNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mittels des PureLink Genomic DNA Kit (siehe 2.1.5). Verwendet wurden hierfür die mit den gRNA/Cas9 Komplexen und dem Template transfizierten und selektierten 3T3-NIH Zellen, nachdem sie in 10 cm Zellkulturschalen überführt wurden und fast vollständig bewachsen waren (siehe Tabelle 16 & 2.2.4.9). Das alte Medium wurde entfernt, die Zellen mit 10ml PBS gewaschen und 1 ml Accutase zum Lösen verwendet. Die Zellen wurden dann mit 9 ml DMEM+++ suspendiert. Da sich schon beim Waschen mit PBS Zellen lösten und verloren gingen, wurden je nach verbleibender Menge 5 – 10 ml in ein Falcon überführt. Zum Waschen der Zellen wurden die Falcons 5 min bei 280 x g und 4 °C zentrifugiert, das Medium anschließend verworfen und die Zellen in 5 ml PBS durch vortexen resuspendiert. Die Zentrifugation wurde ein weiteres mal wiederholt und das PBS verworfen. Zu jeder Probe wurden anschließend 200 µl PBS hinzugegeben, das Ganze gevortext und in ein neues Tube überführt. Es wurden 20 µl Proteinase K und 20 µl RNase A hinzugegeben, vorsichtig gevortext und 2 min bei RT inkubiert. Nach Hinzugabe von 200 µl Genomic Lysin/Binding Puffer und erneutem vortexen, wurden die Proben 10 min bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Ethanol abs. dazu gegeben, 5 s gevortext und das Lysat anschließend auf die mitgelieferten Säulen des Kits gegeben. Diese wurden nun 1 min 20 s bei 10000 x g RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgten zwei Waschschritte: Zunächst mit 500 µl Waschpuffer 1 und einer Zentrifugation von 1 min 20 s bei 10000 x g RT, danach mit 500 µl Waschpuffer 2 und einer Zentrifugation für 3 min bei 17968 x g RT. Der Durchfluss wurde verworfen und im letzten Schritt 52 µl ddH₂O zur Elution der DNA auf die Säule gegeben. Nach einer Inkubation von 1 min bei RT wurde die Säule ein letztes Mal 1 min 20 s bei 17968 x g zentrifugiert und die eluierte DNA direkt für die PCR verwendet oder bei -20 °C gelagert.

2.2.4.9 Puromycinselektion

Bestimmung der Puromycinkonzentration

Damit eine Selektion erfolgreich durchgeführt werden konnte, musste zunächst die Konzentration an Puromycin bestimmt werden, bei der native 3T3-NIH Zellen vollständig absterben. Dazu wurde am Vortag eine 6-Well-Platte vorbereitet indem eine 10 cm konfluente Kulturschale geerntet wurde und die Zellen in insgesamt 10 ml Flüssigkeit (1 ml Accutase, 9 ml DMEM+++) suspendiert wurden. Jeweils 1 ml wurde pro Well überführt, das Ganze mit 2 ml DMEM+++ bedeckt und über Nacht bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium verworfen und durch frisches, puromycinhaltiges Kulturmedium mit einer Puromycinkonzentration von 1 – 5 µg/ml ersetzt. Die Zellen wurden eine Woche lang im Abstand von 24 h mikroskopiert und dokumentiert, dabei wurde das puromycinhaltige Medium nur einmal nach 3 Tagen gewechselt. Dadurch konnte die Konzentration und die Zeit bestimmt werden, um im weiteren Verlauf die erfolgreich transfizierten 3T3-NIH Zellen mit dem Puromycinresistenzgen tragenden Plasmidvektor von den nicht transfizierten zu selektieren.

Puromycinselektion der transfizierten 3T3-NIH Zellen

Zur Selektion der transfizierten Zellen wurde 24 h nach Transfektion mit der Puromycinselektion begonnen. Dazu wurde das alte Medium aus den 6-Well-Platten verworfen und durch 2 ml DMEM+++ mit jeweils 2 µg/ml Puromycin ersetzt. Nach Inkubation von 72 h bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit im Brutschrank, wurde dieses wiederum entfernt und durch normales Kulturmedium ersetzt. Die Zellen wurden so lange in den 6-Well-Platten belassen bis fast eine vollständige Konfluenz erreicht war, damit sie in 10 cm Kulturschalen überführt werden konnten. Auch in diesen wurden sie bis zu einer fast vollständigen Konfluenz herangezogen, um genügend Material für die Isolation eukaryotischer DNA zu erhalten (siehe 2.2.4.8).

2.2.5 Statistische Auswertung

Um qualifizierte Aussagen treffen zu können, wurden die Daten der einzelnen Versuche in mehreren unabhängigen Experimenten bestimmt. Diese wurden, falls nicht anders beschrieben, mindestens dreimal durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel sowie der Darstellung mittels SigmaPlot. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen angegeben und verschiedene Gruppen wurden mit Hilfe des t-Tests miteinander verglichen. Als statistisch signifikant wurde ein P-Wert von $<0,05$ erachtet, als statistisch hoch signifikant ein P-Wert von $<0,001$.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, eine Strategie zu entwickeln, um im Bereich des *Abca4* Gens im Mausgenom große DNA Bereiche mittels HDR auszutauschen. Dazu wurden passende Schnittstellen für das CRISPR-Cas9 System identifiziert, die entsprechenden gRNA/Cas9 Komplexe hergestellt und diese auf Funktionalität und Effektivität getestet. Des Weiteren wurden ein therapeutisches Template und ein Reporter-template entwickelt und hergestellt. Diese wurden spezifisch für die Reparatur einer Deletion im Promotor und Exon 1 Bereich des *Abca4* Gens konzipiert. Die Überprüfung der Reparatur durch die gRNA/cas9 Komplexe in Kombination mit dem Template sowie dem Reporter erfolgte in vitro auf unterschiedlichen Ebenen.

3.1 Identifizierung und Klonierung der guideRNAs

3.1.1 Identifizierung der guideRNA Sequenzen

Um das Genom einer Zelle erfolgreich mit der CRISPR-Cas9 Endonuklease schneiden zu können, werden spezifische Schnittstellen benötigt. Identifiziert werden diese durch die sogenannte guideRNA, welche die Cas9 an eine spezifische Stelle des Genoms führt und dort einen Doppelstrangbruch verursacht (siehe 1.4). Diese Stellen wurden mit Hilfe des „CRISPR gRNA Design Tool“ der Firma ATUM herausgesucht. Entscheidend dabei war, dass die gefundenen Sequenzen möglichst einzigartig innerhalb des Genom sein sollten und eine PAM-Sequenz aufwiesen. Es wurden insgesamt 10 Sequenzen gefunden, die zur Überprüfung verwendet wurden (Abbildung 2).

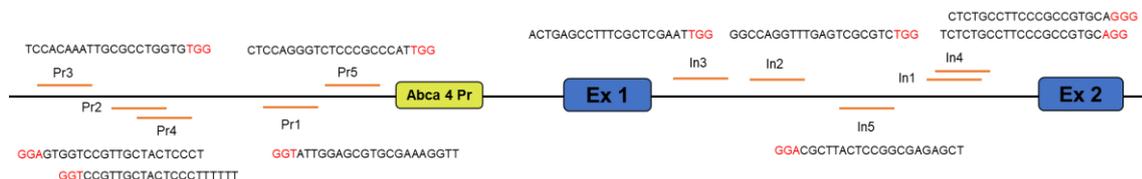


Abbildung 2: Positionen der guideRNA Schnittstellen im Genom der *Mus musculus*

Dargestellt sind die in silico erkannten potenziell geeigneten Schnittstellen mit der jeweiligen PAM-Sequenz. Die orangenen Markierungen oberhalb der schwarzen Linie stellen Positionen auf dem Leitstrang dar, unterhalb auf dem Folgestrang. Längenverhältnisse aufgrund von Darstellungsgründen nicht maßstabsgetreu. Pr = Promotor; In = Intron; Ex = Exon

3.1.2 Klonierungen der gRNA/Cas9 Komplexe

Die in 3.1.1 gefundenen Sequenzen wurden als Oligonukleotide (siehe Tabelle 8) bei der Firma Metabion (Planegg/Steinkirchen; DE) bestellt. Um die Sequenzen verwenden zu können, wurden die Einzelstränge zu Doppelsträngen hybridisiert (siehe 2.2.2.1). Damit diese in das Plasmid integriert werden konnten, wurde das Plasmid pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 mit dem Enzym BbsI verdaut. Dieses Enzym sorgte für einen DNA-Doppelstrangbruch mit „sticky ends“ an beiden Seiten der Schnittstelle. Mit Hilfe der T4 DNA-Ligase konnten dann die hybridisierten guideRNA-Sequenzen passend an diese Stelle eingebaut werden, da auch diese mit denselben „sticky ends“ hergestellt worden waren.

Die so entstandenen Plasmide wurden in XL1 *E. coli* transformiert und auf Selektivmedien mit Ampicillin ausplattiert. Da nur die Bakterien überlebten, die erfolgreich das Plasmid aufgenommen und dadurch eine Ampicillin-Resistenz entwickelt hatten, konnte eine erste Selektion erfolgen. Es wurden einzelne Kolonien gepickt und in Selektiv-Flüssigmedium weiter kultiviert. Die so vermehrten Plasmide wurden im kleinen Maßstab aufgereinigt und mit dem Primer #3056 zur Sequenzierung und Analyse zur Firma Microsynth SeqLab (Göttingen; DE) geschickt. Ließ sich in der Auswertung nachweisen, dass ein Klon die richtige Basenpaarabfolge enthielt (siehe Abbildung 3), so wurde dieser im großen Maßstab vermehrt und aufgereinigt. Zusätzlich wurde von der positiven Bakterienkultur ein Glycerolstock für die spätere Verwendung hergestellt und bei -80°C gelagert. Die entsprechenden Plasmide wurden jeweils mit dem Zusatz InG 1 – 5 bzw. PrG 1 – 5 bezeichnet.

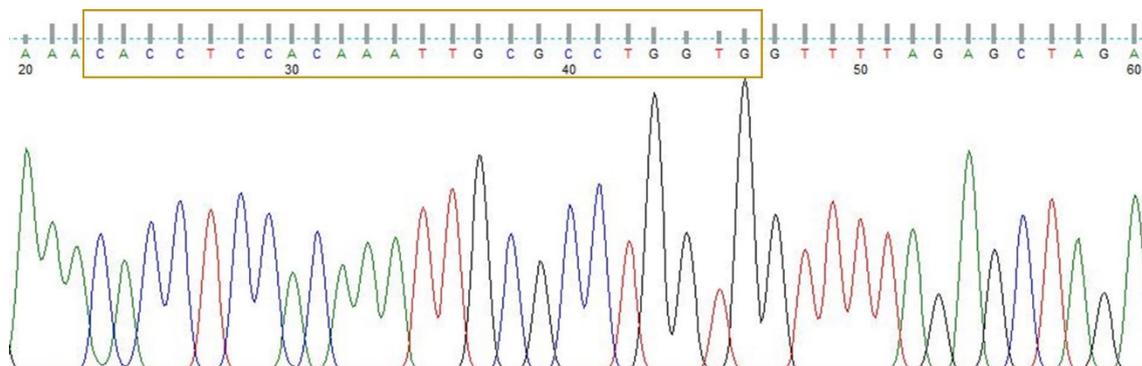


Abbildung 3: Chromatogramm des gRNA/Cas9 Komplexes PrG3

Dargestellt ist beispielhaft die korrekt eingebaute Sequenz der Guide-Sequenz für PrG3 (gelbe Umrandung) in das Plasmid pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0. Die Sequenzierung wurde mit dem Primer #3056 durch die Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt

3.1.3 Klonierungen der Target-Sequenzen

Damit im späteren BRET-Assay eine mögliche Aktivität der gRNA/Cas9 Komplexe gemessen werden konnte, mussten die Sequenzen der Targets komplementär zu denen der guideRNA hergestellt und in den Vektor pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2-pA (NHEJ-Sensor) kloniert werden. Dadurch konnte die Aktivität der 10 ausgewählten guideRNAs erfasst und ausgewertet werden.

Wie bereits bei der Herstellung der guideRNA Sequenzen dargestellt, verlief auch die Herstellung der Plasmide für die Target-Sequenzen ab: Nachdem die jeweiligen Oligonukleotide hybridisiert und das Plasmid pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2-pA mit Hilfe der beiden Enzyme BsiWI-HF und AvrII geschnitten wurde, erfolgte die Ligation erneut mit der T4 DNA-Ligase.

Damit falsch ligierte Plasmide aussortiert werden konnten, wurde ein Nachverdau mit BsiWI-HF durchgeführt. Die Plasmide, in denen die hybridisierten Oligonukleotide (Insert) richtig eingebaut wurden, konnten von diesem Enzym nicht mehr geschnitten werden. Das Leseraster hatte sich durch den Einbau verschoben. Somit wurden nur die Plasmide linearisiert, die sich wieder in ihrer ursprünglichen Form befanden und das Insert nicht enthielten. Auch hier wurde im Anschluss eine Transformation in XL1 *E. coli* durchgeführt und die Plasmide nach der Selektion mit Ampicillin in kleinem Maßstab aufgereinigt. Zur Sequenzierung wurden diese mit dem Primer #4041 weggeschickt. Wurde hier ein positiver Klon mit der richtigen Basenpaarabfolge entdeckt (siehe Abbildung 4), so wurde auch dieser im großen Stil vermehrt und aufgereinigt. Auch hier wurde aus der Bakterienkultur ein Glycerolstock angelegt und dieser für eine spätere Verwendung bei -80°C gelagert. Die entsprechenden Plasmide wurden jeweils mit dem Zusatz InT 1 – 5 bzw. PrT 1 – 5 bezeichnet.

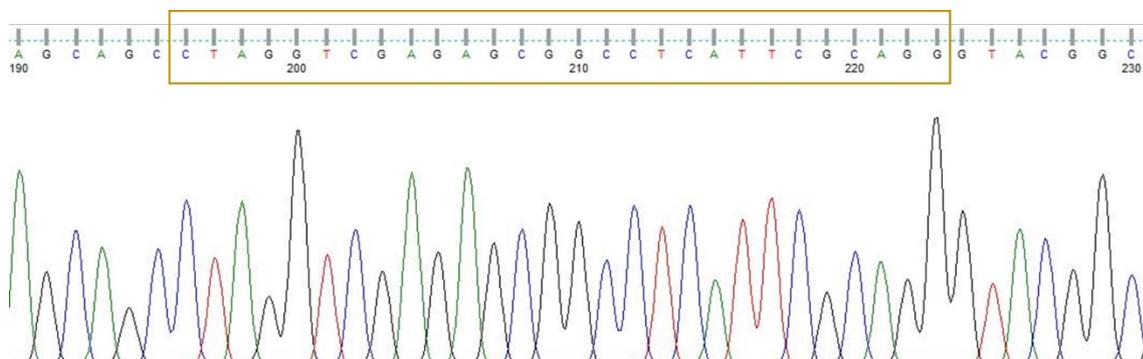


Abbildung 4: Chromatogramm des NHEJ-Sensors InT5

Dargestellt ist beispielhaft die korrekt eingebaute Sequenz der Target-Sequenz für InT5 (gelbe Umrandung) in das Plasmid des NHEJ-Sensors (pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2-pA). Die Sequenzierung wurde mit dem Primer #4041 durch die Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

3.2 Überprüfung der Aktivität der gRNA/Cas9 Komplexe

Die eigentliche Überprüfung der Aktivität der gRNA/Cas9 Komplexe geschah durch die Transfektion in HEK293-T Zellen und der anschließenden Analyse im BRET-Assay. Hierfür wurden zum einen der passende NHEJ-Sensor (pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2-pA mit PrT 1 – 5 bzw. InT 1 – 5) allein, zum anderen die gRNA/Cas9 Komplexe mit dem dazugehörigen NHEJ-Sensor zusammen transfiziert.

Für die Transfektionen wurden jeweils 2,5 µg des jeweiligen Plasmids des gRNA/Cas9 Komplexes und des NHEJ-Sensors verwendet (siehe 2.2.4.3). Diese Konzentration wurde zuvor in der Arbeitsgruppe überprüft und übernommen. Ebenso wurde mit der Negativkontrolle verfahren, welches die alleinige Transfektion des pcDNA-RLuc8 Plasmides war (2000 ng). Als Positivkontrolle für jeden einzelnen Ansatz galt die alleinige Transfektion des jeweiligen NHEJ-Sensors mit der entsprechenden Target-DNA. Sie stand im direkten Vergleich zur Co-Transfektion der gRNA/Cas9 Komplexe mit dem NHEJ-Sensor (siehe Tabelle 15). Der Versuch wurde 24 h nach der Transfektion und insgesamt dreimal zu jeweils vier Messungen pro Probe durchgeführt (siehe 2.2.4.6). Da sich für die einzelnen Ansätze eine unterschiedliche Anzahl an verwertbaren Durchläufen ergab und zum Teil wiederholt werden mussten, betrug $n = 8 - 16$ Messungen (siehe Abbildung 5A). Die Lumineszenz wurde anhand von verschiedenen Wellenlängen und Filtern gemessen (Blue: 370 - 450 nm; Green: 510 - 540 nm).

Ansätze, bei denen die Werte zu hoch waren, um sie mit dem Tecan Multimode Platereader Infinite M1000Pro zu erfassen, wurden in einer 1 : 20 Verdünnung wiederholt und erneut gemessen. Bei der Auswertung wurden entweder nur unverdünnte oder verdünnte Werte in sich geschlossen betrachtet und ausgewertet. Erst nach Normierung durch die Werte der pcDNA-RLuc8 wurde die Aktivität der einzelnen gRNA/Cas9 Komplexe bestimmt. Dabei stellten PrG2 und InG2 Sonderfälle dar, da es hier zu einer Zunahme anstatt einer Abnahme der BRET-Ratio kam (siehe 4.1). Auch die Aktivität wurde für jedes Konstrukt in sich geschlossen bestimmt und nicht anhand eines gemeinsamen Vergleichswertes (siehe 2.2.4.6). Die in Abbildung 5B dargestellten Aktivitäten sind daher für jedes Konstrukt einzeln zu betrachten.

In der Positivkontrolle, welches die vollständige Sequenz für das Green Fluorescent Protein (GFP) enthielt, war bei erfolgreicher Transfektion eine hohe BRET-Ratio zu erkennen. Verglichen wurde diese mit den Werten der Zellen der Co-Transfektion. Dort verursachte der gRNA/Cas9 Komplex einen Doppelstrangbruch im pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2-pA Plasmid. Diesen schließt die Zelle durch den NHEJ Reparaturweg, wodurch

es durch Insertion und Deletion zu einer Verschiebung des Leserasters kommt. Die Folge ist ein STOP-Codon innerhalb des GFP, wodurch dieses nicht mehr exprimiert wird (Abbildung 1). In den Zellen ist daher weniger funktionierendes GFP vorhanden was eine Abnahme der Emission und somit der BRET-Ratio nach sich zieht. Anhand dieses Unterschieds ließ sich die Effektivität einer guideRNA bestimmen. Je größer die Differenz der BRET-Ratio zwischen Positivkontrolle und Co-Transfektion war, umso effizienter schnitt die verwendete guideRNA.

In Abbildung 5 sind sowohl die zusammengefassten Ergebnisse mit Standardabweichungen als auch die normierte Aktivität der einzelnen gRNA/Cas9 Komplexe verzeichnet. Dabei fallen vor allem die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den Schnittstellen der Promotor- und der Intron-Region auf. So wurden für die BRET-Ratio, gemessen in mBU, im Bereich der Promotor-Region bis auf eine Ausnahme (Pr2) für die unterschiedlichen Ansätze ähnlich hohe Werte gemessen. Auch unterschieden sich Positivkontrolle und Co-Transfektion nur in geringem Maße voneinander. Für die Intron-Region zeigte sich dagegen ein weitaus variables Bild, sowohl zwischen den einzelnen Ansätzen als auch im Vergleich von Positivkontrolle und Co-Transfektion. Das hervorstechendste Beispiel stellt das Konstrukt InT4 dar. Dieses erreichte ohne den gRNA/Cas9 Komplex InG4 einen Wert von $337,4 \pm 3,3$ mBU, in Kombination mit InG4 wurde einen Wert von $134,7 \pm 2,5$ mBU gemessen. Die Messung der RLuc8 allein ergab eine BRET-Ration von $25,7 \pm 0,2$ mBU.

Als statistisch signifikant ($p < 0,05$) wurden mit Hilfe des t-Test die Unterschiede zwischen den Werten der BRET-Ratio der NHEJ-Sensoren und deren Kombinationen mit den gRNA/Cas9 Komplexen der Ansätze Pr2, Pr3, Pr 4 und In2, sowie als statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$) die Ansätze In1, In4 und In5 erkannt (siehe Abbildung 5A).

Um die Aktivität der einzelnen gRNA/Cas9 Komplexe normiert und vergleichbar darzustellen, wurde die BRET-Ratio der Negativkontrolle von den Werten der einzelnen Ansätze abgezogen, mit Ausnahme von PrG2 und InG2 (siehe 4.1). Anschließend wurden die Werte in Relation zueinander in Prozent umgerechnet und die Differenz zwischen den Werten der Einfach- und der Co-Transfektion ebenfalls in Prozent angegeben (siehe 2.2.4.6). Die höchste Endonukleaseaktivität zeigte sich für InG4 mit $65,0 \pm 1,3$ %, gefolgt von InG5 mit $19,7 \pm 2,1$ %. Alle anderen Proben erreichten lediglich eine Aktivität unter 16 % und zeigten zum Teil sehr hohen Standartabweichungen (siehe Abbildung 5B). Für die weitere Analyse im FACS (siehe 3.5.2) wurden alle statistisch signifikanten und hoch signifikanten Proben verwendet. Dies beinhaltete auch den PrG2 und das InG2, welche eine Zunahme statt einer Abnahme der BRET-Ratio aufwiesen (siehe 4.1), sowie den PrG5.

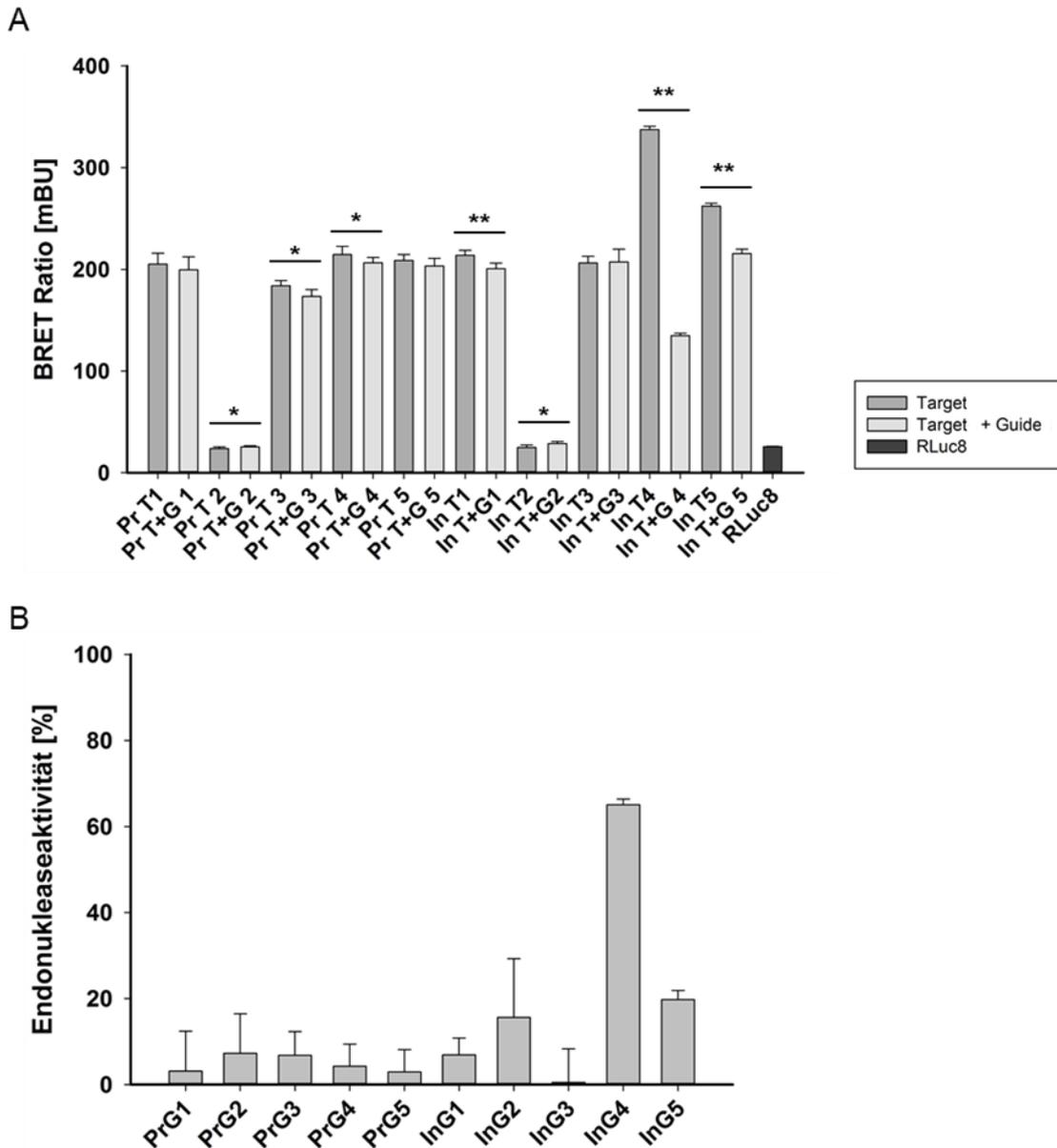


Abbildung 5: Ergebnisse des BRET-Assays

A) Mittelwerte mit Standardabweichungen in mBU. Auf der x-Achse sind die einzelnen Ansätze jeweils in Einzel- (dunkelgrau) und in Co-Transfektion (hellgrau) dargestellt. In schwarz ist die Negativkontrolle mit RLuc8 dargestellt. Die y-Achse zeigt die BRET-Ratio in mBU. * steht für statistisch signifikant ($p < 0,05$), ** steht für statistisch hoch signifikant ($p < 0,001$).

Zu beachten ist, dass die Messwerte für InT4 und InT + G4, sowie InT5 und InT + G5 in einer 1:20 Verdünnung gemessen wurden. Außerdem ist jeweils für beide Ansätze für Pr5, In1, In3, In 4, In 5 $n = 8$; für Pr3 und Pr4 $n = 9$, für Pr1 und Pr 2 $n = 12$, sowie für In2 $n = 16$.

B) Aktivität der Cas 9 Komplexe. Nach Normierung der Werte durch Abzug der BRET-Ratio der Negativkontrolle wurden diese in Relation zueinander in % umgerechnet. Die Differenz zwischen den einzelnen Werten wird hier als Aktivität der Endonuklease in % dargestellt. PrT2 und InT2 sowie deren Co-Transfektionen stellen einen Sonderfall dar, da es zu einer Zunahme der BRET-Ratio kam und diese nahezu identisch mit denen der RLuc8 waren. Daher wurde hier als einziger Unterschied die BRET-Ratio der RLuc8 nicht abgezogen.

3.3 Herstellung des Templates

3.3.1 Herstellung und Überprüfung der cDNA

Da die Basis des späteren Templates auf einem fusionierten Gen basieren sollte, welches aus messenger RNA hergestellt wurde, war es notwendig, die Qualität dieser zu überprüfen. Dazu wurde die isolierte gesamt RNA mittels des QIAxcel® Advanced Systems und der dazugehörigen ScreenGel Software Version 1.1.0 überprüft und ausgewertet.

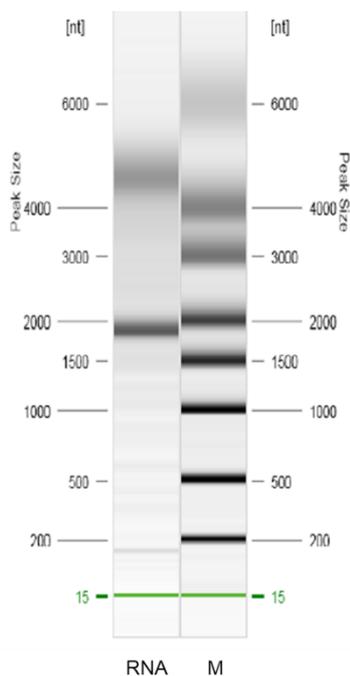


Abbildung 6: Gelelektrophorese der isolierten Maus RNA

Zu erkennen sind unter RNA die Banden der analysierten Probe von 2 µl der isolierten gesamt RNA mit einer Bande bei ca. 4500 nt und ca. 1900 nt; M stellt die Banden des Markers da.

Da mRNA aber nur 1 – 3 % der gesamt RNA ausmacht, wurde zur Qualitätskontrolle die ribosomale RNA, welche mehr als 80 % ausmacht, verwendet. Die zu erwartenden Längen der Nukleotide befanden sich bei RNA der *Mus musculus* für die 18 S Einheit bei 1870 nt, für die 28 S Einheit bei 4730 nt. Die Toleranz für eine Abweichung dieser Längen betrug für die 18 S Einheit 3 %, für die der 28 S Einheit 4 %. Nachgewiesen wurden sowohl eine Bande bei ca. 4500 nt als auch bei ca. 1900 nt. Diese ließen sich als Banden in der Gelelektrophorese (Abbildung 6) und auch als entsprechende Peaks im Elektropherogramm (nicht gezeigt) darstellen. Zur Bestimmung der Qualität wurde

die 28 S / 18 S Ratio berechnet. Die Ratio der isolierten RNA wies einen Wert von 1.50 auf.

Diese gesamt RNA wurde verwendet, um die cDNA herzustellen, welche in ein Plasmid zur Vermehrung und weiteren Bearbeitung integriert werden konnte. Dazu wurde das PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit der Firma Takara verwendet, welches eine Reverse Transkriptase enthält und die RNA in cDNA umschrieb.

Die Überprüfung der cDNA erfolgte durch eine Phusion PCR und einer anschließenden Gelelektrophorese. Die verwendeten Primer #4656 und #4657 wurden so entworfen, dass sie lediglich am Beginn des Exon 1 und am Ende des Exon 2 banden und somit nur das fusionierte Exon 1/2 einrahmten. Die Länge dieses fusionierten Exons betrug 400 bp, welche sich auch in der späteren Gelelektrophorese dort wiederfand (Abbildung 7). Im Anschluss wurde diese Bande aus dem Gel isoliert, deren Konzentration bestimmt (10 ng/µl) und für die Herstellung des Templates weiterverwendet.

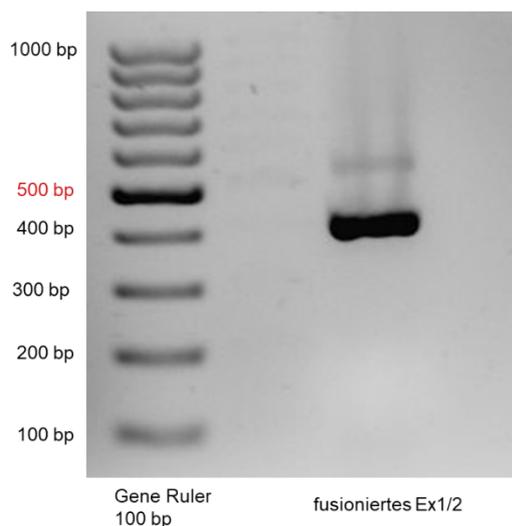


Abbildung 7: Gelelektrophorese des fusionierten Exon1/2

Zu erkennen ist eine Bande bei 400 bp als Produkt der Phusion-PCR mit den Primern #4656 und #4657 aus der cDNA. Es handelt sich um die fusionierten Exons 1 und 2 (Ex1/2).

3.3.2 Restriktions-Klonierung des CMV-Promotor

Damit sowohl das spätere Template als auch der Reporter alle benötigten Bestandteile enthielt, die für eine erfolgreiche Expression notwendig waren, mussten mehrere Klonierungsschritte durchgeführt werden. Solch ein Bestandteil ist der CMV-Promotor, welcher zwingend notwendig ist, da andernfalls das *Abca4*-Gen in der 3T3-NIH Zelle nicht exprimiert wird.

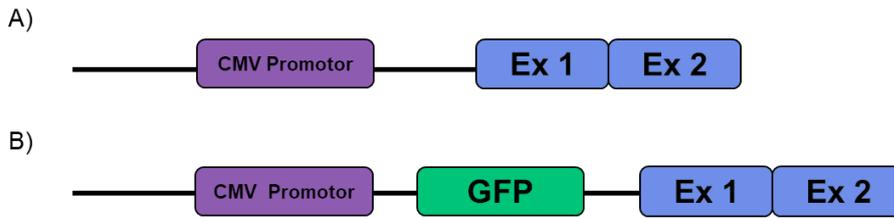


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Templates und des Reporters

A) Dargestellt ist das fusionierte Exon1/2 mit dem vorangehenden CMV Promotor

B) Dargestellt ist der Reporter in den zur Verwendung in der FACS-Analyse zwischen den CMV Promotor und das fusionierte Exon1/2 die Sequenz für GFP eingefügt wurde.

Zunächst wurde hierfür das Plasmid pcDNA3.1(+)/CAT mit EcoRV-HF verdaut und anschließend mit dem 400 bp langem PCR Produkt aus der cDNA der Mäuseretinae mittels der T4 DNA-Ligase ligiert. Am nächsten Tag wurde die Ligation erneut mit EcoRV-HF nachverdaut, wodurch nur die Plasmide geschnitten wurden, die das PCR Produkt nicht aufgenommen hatten. Dies war möglich, da hier mit einer „blunt end“ Restriktions-Klonierung gearbeitet wurde und sich das Leseraster nach dem Einbau verschoben hatte. Somit existierte für das Enzym nicht mehr seine benötigte Schnittstelle.

Die „blunt end“ Klonierung brachte jedoch die Problematik mit sich, dass das Insert auf zwei verschiedene Arten eingebaut werden konnte. So blieb zwar die Sequenz innerhalb des Insert immer gleich, jedoch konnte sich das Gesamtkonstrukt um 180° drehen und es somit immer noch zu einer falschen Abfolge der Basenpaare kommen. Zur Überprüfung des Plasmides wurde dieses in XL1-Blue *E. coli* kloniert und im kleinen Maßstab aufgereinigt. Die Plasmide wurden analytisch mit Aval und SnaBI verdaut und anschließend eine Gelelektrophorese durchgeführt. Klone, die eine Bande bei ca. 426 bp und 6180 bp aufwiesen, wurden zur Sequenzierung mit dem Primer #2414 zur weiteren Überprüfung weggeschickt. Klon Nr. 4 wies unter anderem die richtige Sequenz auf, es wurde ein Glycerolstock angelegt und das Plasmid, welches pcDNA3.1/CAT-EcoRV+Maus benannt wurde, im großen Stil vervielfältigt.

3.3.3 Klonierung in den TOPO-Vektor

Durch die Klonierung in den pcDNA3.1(+)/CAT gelang es den CMV-Promotor in das Template zu integrieren, die eigentliche Vermehrung musste in einem andern Vektor stattfinden. Grund dafür war eine Poly-A-Sequenz innerhalb des pcDNA3.1(+)/CAT, die sich direkt hinter der Sequenz der Template-DNA befand.

Daher wurde eine PCR mit den Primern #4658 und #4657 durchgeführt, die den CMV-Promotor und das fusionierte Exon 1/2 einrahmten. Dieses PCR Produkt wurde ebenfalls durch eine Gelelektrophorese überprüft und die entsprechende Bande bei etwa 1000 bp ausgeschnitten und aufgereinigt (Abbildung 9). Im Anschluss wurde diese DNA-Sequenz in den pCR2.1 TOPO Vektor kloniert (siehe 2.2.2.5) und ebenfalls in XL1-Blue *E. coli* transformiert, sowie selektiert und aufgereinigt. Das entstandene Plasmid wurde zur Überprüfung sowohl mit dem Primer M13rev als auch dem M13for (-20) zur Sequenzierung weggeschickt. Erneut wurde von einem richtigen Klon ein Glycerolstock angefertigt und das Plasmid, welches pCR2.1-TOPO mit CMV-Ex1/2Abca4 benannt wurde, im großen Umfang vermehrt.

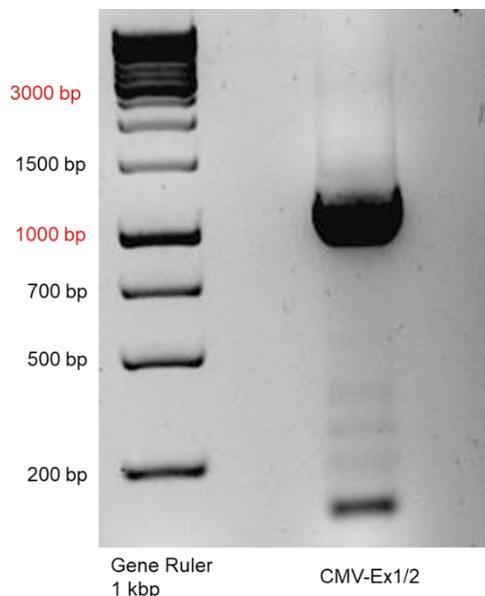


Abbildung 9: Gelelektrophorese des fusionierten Exon1/2 mit CMV Promotor

Zu erkennen ist eine breite Bande auf Höhe von 1000 bp als Produkt der Phusion-PCR mit den Primern #4658 und #4657 aus dem pcDNA3.1/CAT-EcoRV+Maus Plasmid. Es handelt sich dabei um den CMV-Promotor mit dem fusionierten Exon1/2.

3.3.4 Isolation des Templates

Um ein möglichst lineares und kurzes Template zu erhalten, wurde dieses aus dem pCR2.1-TOPO mit CMV-Ex1/2Abca4 Plasmid isoliert (siehe Abbildung 10). Dies geschah durch einen Restriktionsverdau mit den beiden Enzymen EagI-HF und NotI-HF. Die geschnittene DNA wurde erneut durch eine Gelelektrophorese überprüft und die Bande bei etwa 1100 bp ausgeschnitten. Diese wurde im Anschluss aus dem Gel isoliert, zusätzlich aufgereinigt und konzentriert (siehe 2.2.2.10 & 2.2.2.11). Final wurde das

Template in ddH₂O gelöst, da dieses weniger Einfluss auf den Ausgang der anschließenden Transfektion ausübte. So konnten Konzentrationen von 100 – 200 ng/μl für das isolierte Template erreicht werden.

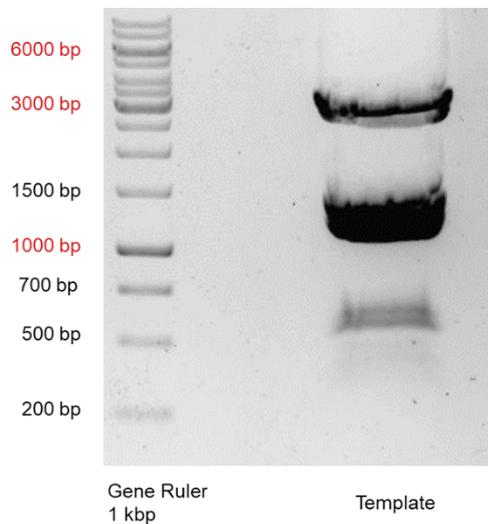


Abbildung 10: Gelelektrophorese des Templates

Zu erkennen ist u.a. eine breite Bande an DNA im Bereich von etwa 1100 bis 1400 bp. Aus dieser wurde der untere Anteil bei 1100 bp ausgeschnitten, um das vollständige Template zu erhalten.

3.4 Herstellung des Reporters

Die Herstellung eines zusätzlichen Reporters war notwendig, um den Einbau der Template-DNA auf einer weiteren Ebene nachweisen zu können (siehe Abbildung 11). Mittels diesem konnte das Template auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie (siehe 1.6.3 und 3.5.2) analysiert werden.

Für die Herstellung des Reporters wurde das pCR2.1TOPO mit CMV-Ex1/2Abca4 Plasmid verwendet. Dieses wurde mit PmeI verdaut, sodass eine Schnittstelle zwischen dem CMV-Promotor und dem fusionierten Ex 1/2 entstand. In dieses Plasmid wurde ein Insert aus folgender PCR ligiert: Aus dem pTagGFP2 Plasmid wurde mit Hilfe des Primerpaares #4682 und #4683 die Sequenz für GFP amplifiziert und diese mittels einer Gelelektrophorese überprüft. Die Bande auf Höhe von 750 bp wurde ausgeschnitten, aufgereinigt und durch die T4 DNA-Ligase in den geschnittenen pCR2.1TOPO mit CMV-Ex1/2Abca4 ligiert. Am folgenden Tag wurde dieses wiederum noch einmal mit PmeI nachverdaut, um eine höhere Erfolgsrate bei der anschließenden Transformation zu erhalten.

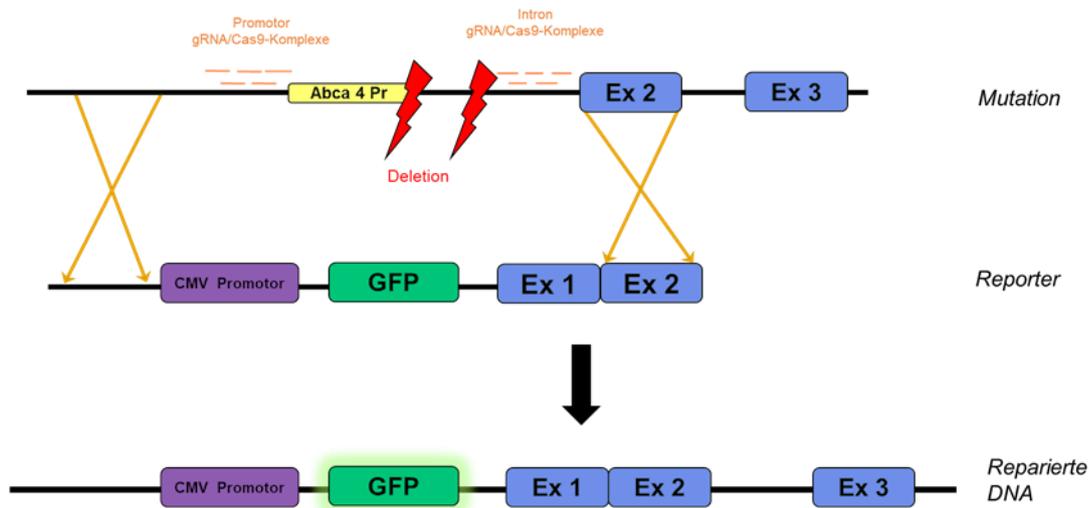


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Einbaus des Reportertemplates

Die durch den gRNA/Cas9-Komplex verursachte Schnittstellen ermöglichen die Reparatur des Genoms mit dem Reporter. Gekennzeichnet sind sowohl die Schnittstellen im Promotor- als auch im Intron 1-Bereich. Zum Einbau wurde sowohl der „non-targeted“ Bereich vor dem CMV Promotor als auch der „targeted“ Bereich des Exon 2 verwendet. Bei erfolgreichem Einbau ist eine Fluoreszenz des GFP zu erwarten.

Nach erfolgter Transformation in One Shot Top 10 *E. coli* wurden die Plasmide aufgereinigt und mit den Enzymen NotI-HF und NheI-HF zwecks Analyse verdaut. In der darauffolgenden Gelelektrophorese wurden die Klone ausgewählt, welche eine Bande bei ca. 426 bp und 6180 bp aufwiesen. Diese wurden mit dem Primer #2414 zur Sequenzierung geschickt und aus einem richtig klonierten Vektor ein Glycerolstock und eine Plasmidisolierung im großen Stil durchgeführt. Das Plasmid mit dem Reporter wurde als pCR2.1TOPO mit CMV-Ex1/2Abca4+LigRepo4 bezeichnet.

Um ebenfalls ein lineares, kurzes Reportertemplate für eine Transfektion verwenden zu können, musste auch hier die DNA Sequenz mit Hilfe von Enzymen ausgeschnitten werden. Dies geschah durch EagI-HF und NotI-HF. Auch hier wurde die Richtigkeit mit Hilfe einer Gelelektrophorese überprüft. Die Bande bei etwa 1900 bp wurde als treffende bezeichnet (siehe Abbildung 12). Der Reporter wurde ebenfalls aus dem Gel isoliert, aufgereinigt und konzentriert, um schlussendlich in ddH₂O gelöst zu werden (siehe 2.2.2.10 & 2.2.2.11). So konnten auch für den Reporter Konzentrationen von 100 – 150 ng/µl erreicht werden.

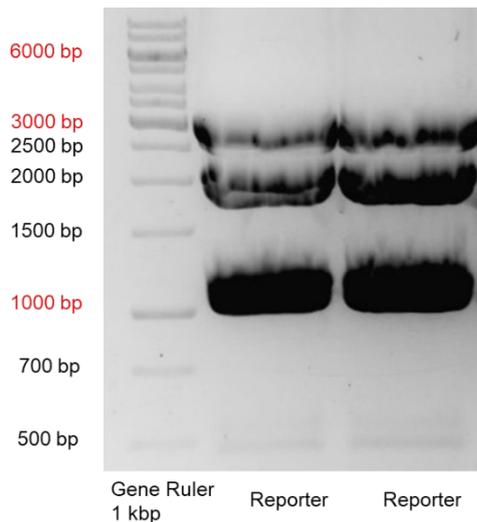


Abbildung 12: Gelelektrophorese des Reporters

Zu erkennen sind jeweils zwei Durchläufe der verdauten Reporter-DNA. Es sind mehrere Banden DNA zu erkennen u.a. im Bereich von 1700 bis 2000 bp. Aus dieser wurde die Bande auf Höhe von 1900 bp ausgeschnitten, um den vollständigen Reporter zu erhalten.

3.5 Überprüfung der Reparatur durch den Reporter

3.5.1 Kontrolltransfektion

Der Reporter wurde hergestellt, um den Einbau des Templates auf der Ebene der Proteine mit Hilfe der FACS-Analyse darstellen zu können. Zusätzlich konnte mit dieser Methode eine erste Einschätzung erfolgen, welche der gRNA/Cas9 Komplexe, bzw. welche Kombinationen aus diesen die größte Effektivität *in vitro* darstellten. Da hierbei die Fluoreszenz der in den Zellen entstandenen Proteine gemessen wurde, musste sichergestellt werden, dass der Reporter keine Eigenfluoreszenz besitzt. Dazu wurde eine Kontrolltransfektion mit dem Reporter allein in den 3T3-NIH Zellen durchgeführt (siehe 2.2.4.3 & Tabelle 16). Hier zeigte sich keinerlei Eigenfluoreszenz der Zellen, die nur mit dem Reporter transfiziert wurden (Abbildung 13 C). So konnte sichergestellt werden, dass die im FACS gemessene Fluoreszenz durch die Reparatur entstand und somit auf dem translatierten GFP beruht, nicht auf dem Reporter selbst.

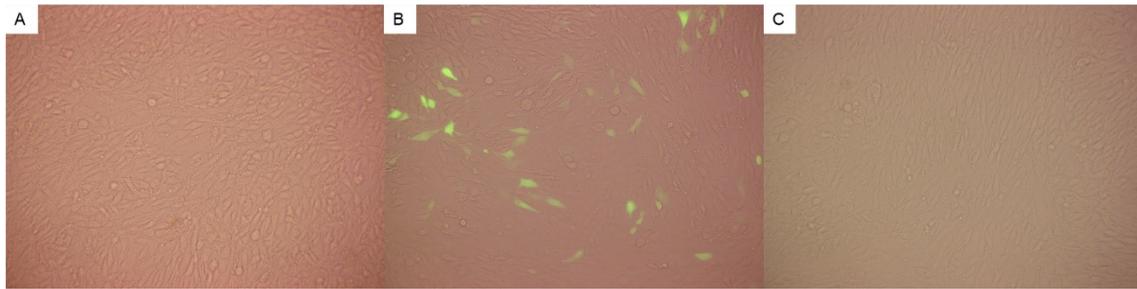


Abbildung 13: Kontrolltransfektion des Reporters in 3T3-NIH Zellen

Dargestellt sind Overlays zusammengesetzt aus dem Bild unter Durchlicht und unter Verwendung des Filters für grüne Fluoreszenz in 20 x 10facher Auflösung.

A) Overlay der 3T3-NIH Negativkontrolle

B) Overlay der GFP Positivkontrolle

C) Overlay des Reporter

3.5.2 Integrationsprüfung

Die Transfektion des Reporters mit den unterschiedlichen gRNA/Cas9 Komplexen erfolgte in 3T3-NIH Zellen und wurde als Co- und Triple-Transfektion durchgeführt (siehe 2.2.4.4). Verwendet wurden alle im BRET-Assay als statistisch signifikant und hoch signifikant erfassten gRNA/Cas9 Komplexe, sowie zusätzlich der PrG5. Als Negativkontrolle wurde die Transfektion des Reporters mit dem unveränderten px459 Plasmid verwendet sowie die Transfektion von PEI und NaCl allein. Die Zellen wurden 24 h nach erfolgter Transfektion mikroskopiert und für die FACS-Analyse aufbereitet (siehe 2.2.4.7).

Mittels der Fluoreszenzmikroskopie ließ sich jedoch nur bedingt eine Aussage treffen, wie gut der Reporter integriert worden war. Die Signale des exprimierten GFP waren zu gering, um sie optisch mit dem Mikroskop zu erfassen. Daher erfolgte die eigentliche Auswertung mittels der Durchflusszytometrie. Wie in Abbildung 11 dargestellt und in 3.4 beschrieben, wurde in den Reporter zusätzlich GFP eingebaut, welches bei erfolgreicher Reparatur der genomischen DNA in den 3T3-NIH Zellen exprimiert werden sollte. Durch dieses gelang es, Zellen einzeln im FACS Canto II zu erfassen und die Editierungsrate der gRNA/Cas9 Komplexe zu bestimmen.

Die Triple-Transfektionen der gRNA/Cas9 Komplexe erfolgten in einer Kombination aus einer guideRNA im Bereich des Promotor und einer im Bereich des Intron sowie dem Reporter. Zusätzlich wurden die Komplexe InG1, InG4 und InG5 einzeln in einer Co-Transfektion mit dem Reporter überprüft, da diese statistisch hoch signifikant waren. Jeder Ansatz wurde jeweils zweimal transfiziert und mit dem FACS Canto II gemessen. Pro Ansatz wurden 50.000 Events gezählt. Anschließend wurden die Mittelwerte der

GFP positiv gezählten Zellen berechnet und durch den Mittelwert der GFP-Positivkontrolle geteilt. Dadurch konnte die Editierungsrate bestimmt werden. Die Ergebnisse wurden in Excel ausgewertet und mittels SigmaPlot dargestellt.

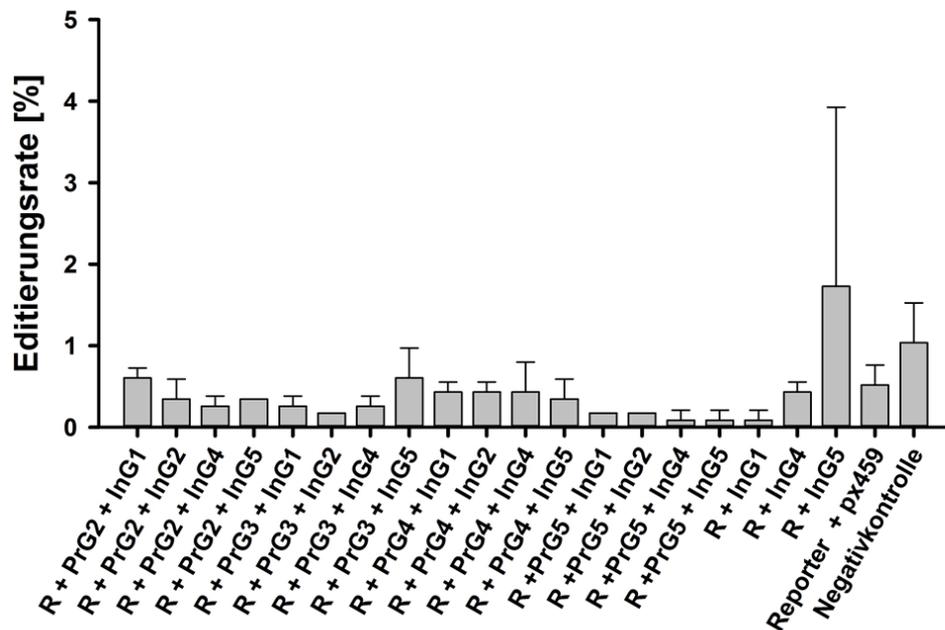


Abbildung 14: Editierungsraten nach FACS Analyse

Erfasst wurden sowohl GFP negative als auch GFP positive 3T3-NIH Zellen. Auf der x-Achse sind die Kombinationen aus dem Reporter mit den jeweiligen gRNA/Cas9 Komplexen dargestellt. Die y-Achse gibt die Editierungsrate in % an = $(\text{Mittelwert der GFP positiv gezählten Zellen eines Ansatzes}) / (\text{Mittelwert der GFP-Positivkontrolle}) \times 100$. Überprüft wurden alle im BRET-Assay als statistisch signifikant und statistisch hoch signifikant erkannten Konstrukte. Überprüft wurden diese als Triple-Transfektion, die Konstrukte InG1, InG4 und InG5 wurden zusätzlich als Co-Transfektion durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde sowohl der Reporter mit dem unveränderten px459 Plasmid transfiziert als auch die Transfektionsreagenzien (PEI und NaCl). n = 2; R = Reporter

Für alle Kombinationen ergaben sich generell sehr niedrige Werte für die Editierungsrate. So erreichte keine der aufgeführten Kombinationen aus dem Reporter und jeweils einer bzw. zweier Schnittstellen eine Editierungsrate über 1 %. Einzig und allein bei der Transfektion des Reporters mit dem gRNA/Cas9 Komplex InG5 zeigte sich eine erhöhte Editierungsrate von 1,73 %.

3.6 Überprüfung der Reparatur durch das Template

3.6.1 Puromycin Selektionskonzentration

Da eine Transfektion nie eine hundertprozentige Erfolgsquote hat und somit immer native Zellen vorhanden sind, musste für nachfolgende Versuche eine Selektion mit Puromycin durchgeführt werden. Möglich war dies dadurch, dass sich die Resistenz gegen Puromycin auf dem Plasmid der gRNA/Cas9 Komplexe befand und somit nur die Zellen überlebten, welche es erfolgreich aufgenommen hatten.

Um die benötigte Konzentration zu ermitteln, bei der native 3T3-NIH Zellen durch Puromycin absterben, wurden die Zellen zunächst in eine 6-Well-Platte überführt. Am Tag nach der Überführung wurden sie mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antibiotikum behandelt und über 7 Tage hinweg täglich mikroskopiert und dokumentiert. In der nachfolgenden Abbildung 15 sind native 3T3-NIH Zellen nach 3 Tagen Selektion zu erkennen. Die Konzentrationen in den Wells betrug jeweils 0 µg/ml, 1 µg/ml und 2 µg/ml. Bei höheren Konzentrationen, 3 µg/ml, 4 µg/ml und 5 µg/ml waren bereits zu einem viel zu frühen Zeitpunkt alle Zellen abgestorben. Zu erkennen ist, dass nach 3 Tagen bei 1 µg/ml vereinzelt Zellen noch überlebt hatten und sogar im Zellverband bestehen blieben. Bei 2 µg/ml dagegen waren alle Zellen abgestorben. Da es in der nachfolgenden Versuchsreihe wichtig war, dass nur die erfolgreich transfizierten Zellen weiter bestehen, wurde die Selektionskonzentration auf 2 µg/ml festgelegt (siehe 3.6.3).

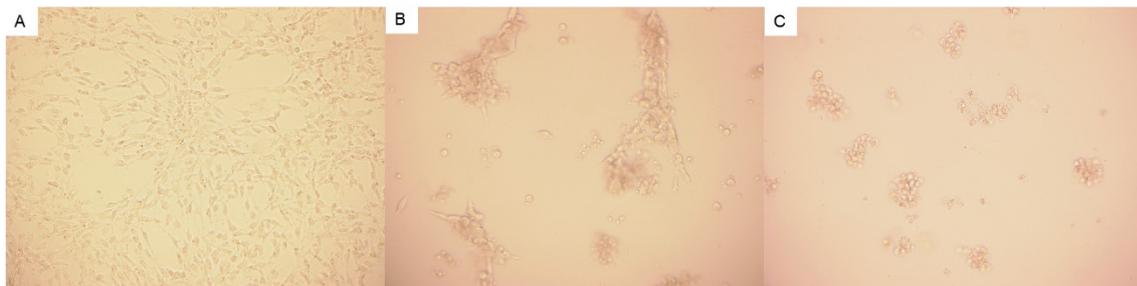


Abbildung 15: Puromycin Selektionskonzentration

Das Selektivmedium wurde 3 Tage lang auf den Zellen belassen und im Abstand von 24h mikroskopiert. Zu sehen sind die Zellen bei einer 20 x 10facher Auflösung.

- A) 3T3-NIH Zellen Negativkontrolle ohne Puromycin
- B) 3T3 NIH-Zellen mit 1 µg/ml Puromycin
- C) 3T3 NIH-Zellen mit 2 µg/ml Puromycin

3.6.2 Transfektion und Selektion der 3T3-NIH Zellen

Die Transfektion des Templates mit den unterschiedlichen gRNA/Cas9 Komplexen erfolgte in 3T3-NIH Zellen. Dies geschah sowohl als Einfach-, Co- und Triple-Transfektion (siehe 2.2.4.3). Überprüft wurden alle Kombinationen aus Template und gRNA/Cas9 Komplexen, die auch in der FACS-Analyse verwendet worden waren. Zusätzlich wurde das Template in der Negativkontrolle mit dem nativen, unveränderten pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 Plasmid co-transfiziert (siehe Tabelle 16), um auch hier eine Selektion durchführen zu können. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit einer Puromycinkonzentration von 2 µg/ml behandelt und alle 24 – 72 h mikroskopiert und dokumentiert.

Eine Fluoreszenz wurde nur in der Positivkontrolle erwartet in der GFP transfiziert wurde. Diese konnte dort nachgewiesen werden (Abbildung 16 A/ A'), in den restlichen Proben, welche das Template und die gRNA/Cas9 Komplexe enthielten, nicht. Abbildung 16 B/ B' – D/ D' zeigt beispielhaft den Verlauf der Selektion der transfizierten 3T3-NIH Zellen mit den guideRNAs PrG 4 und InG 2 und dem Template. Die Zellen wurden 3 Tage mit puromycinhaltigem Medium behandelt und anschließend mit DMEM+++, bis sich die Zellen erholt hatten. Dabei viel auf, dass sich die einzelnen Zellkulturen unterschiedlich schnell regenerierten. Zum Teil wurden 7 – 14 Tage benötigt, bis sich die Zellen ausreichend erholt hatten, damit genügend Material vorhanden war, um weitere Versuche durchführen zu können.

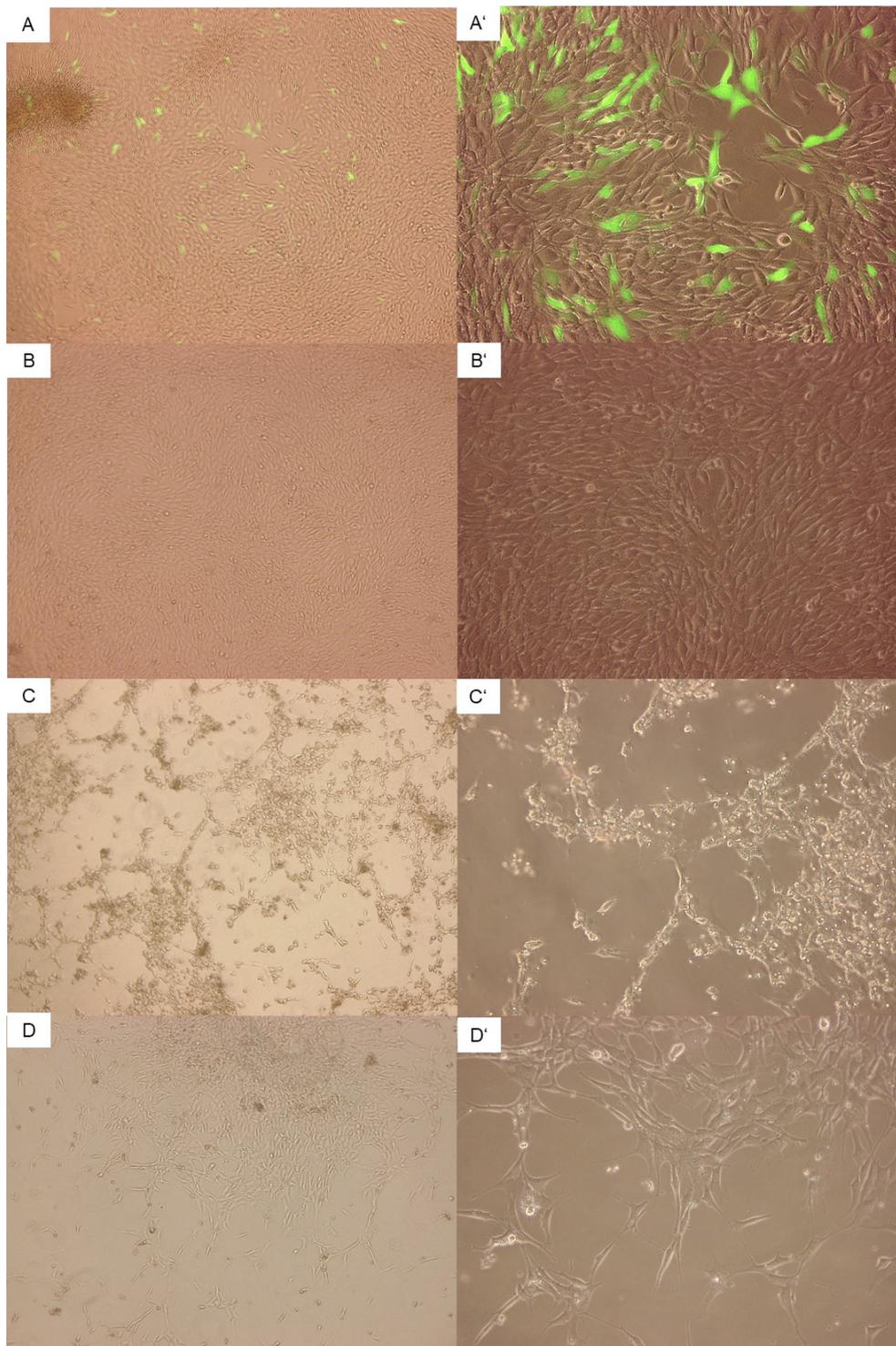


Abbildung 16: Verlauf der Puromycinselektion der transfizierten 3T3-NIH Zellen

Exemplarisch dargestellt sind transfizierte 3T3-NIH Zellen von A – D in einer 4 x4 fachen,
in A' – D' in einer 20 x 10 fachen Vergrößerung

A / A') Overlay bestehend aus Durchlicht und grüner Fluoreszenz der GFP Positivkontrolle

B / B') 3T3-NIH Zellen 24 h nach Transfektion mit Template + PrG 4 + InG 2 im Durchlicht

C / C') transfizierte 3T3-NIH Zellen 3 Tage nach Puromycinselektion im Durchlicht

D / D') Regeneration der 3T3-NIH Zellen nach 3 Tagen in DMEM+++ nach erfolgter Puromycinselektion

3.6.3 Auswertung der genomischen DNA der transfizierten 3T3-NIH Zellen

Um den Einbau des Templates auch auf DNA-Ebene nachzuweisen, musste genomische DNA isoliert werden. Durch die Puromycinselektion (siehe 3.6.1) konnten diejenigen Zellen selektiert und vermehrt werden, die erfolgreich transfiziert wurden. Durch die Anpassung des verwendeten Volumens bei der Isolation der genomischen DNA aus den Zellen (siehe 2.2.4.8) gelang es, Konzentrationen bis zu ca. 300 ng/ μ l zu erreichen. Diese wurden dann für die weiteren PCR Versuche verwendet.

Mittels PCR und Gelelektrophorese wurde die isolierte genomische DNA darauf überprüft, ob es mit Hilfe des Templates zu einer erfolgreichen Reparatur gekommen war. Dazu wurden die benötigten Primer der PCR so entwickelt, dass sie sich nur an die reparierte DNA anlagern konnten. Gewählt wurden daher Primer, die sich an den Beginn des CMV-Promotors und des fusionierten Exon 1/2 sowie an den intrinsischen Bereich zwischen Exon 2 und 3 anlagerten (siehe Abbildung 17).

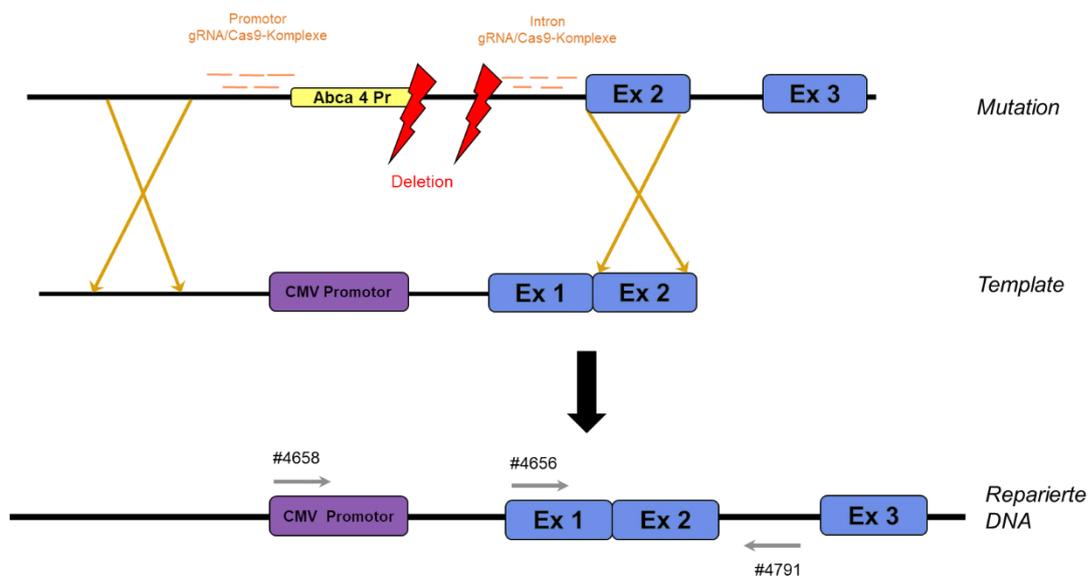


Abbildung 17: Schematischer Einbau des Templates

Die durch den gRNA/Cas9-Komplex verursachte Schnittstellen ermöglichen die Reparatur des Genoms mit dem Reporter. Gekennzeichnet sind sowohl die Schnittstellen im Promotor- als auch im Intron 1-Bereich. Zum Einbau wurde sowohl der „non-targeted“ Bereich vor dem CMV Promotor als auch der „targeted“ Bereich des Exon 2 verwendet. Markiert sind in der reparierten DNA die final verwendeten Primer, die für den PCR Nachweis der einzelnen DNA-Abschnitte verwendet wurden.

Als erste Überprüfung, ob es zu einer erfolgreichen Reparatur durch das Template gekommen war, wurden die Proben zunächst auf das gesamte Template überprüft. Dies beinhaltete den Beginn des CMV-Promotors bis hin zum intrinsischen Bereich zwischen

Exon 2 und 3 (Abbildung 17). Dazu wurde die PCR mit dem Primerpaar #4658 + #4791 durchgeführt und unter anderem die optimale Temperatur mittels einer Gradienten-PCR bestimmt. In dieser ließ sich zwar eine Bande bei ca. 1100 bp für InG5 nachweisen, jedoch war diese nur sehr schwach ausgeprägt (Abbildung 18). Auch nach mehrmaliger Anpassung waren die Ergebnisse nicht zufriedenstellend und nur bedingt reproduzierbar. Infolgedessen wurden die PCR überarbeitet, um einen besseren Nachweis des eingebauten Template zu erhalten. Daher wurde daraufhin das Primerpaar #4656 + #4791 verwendet, welches sich zu Beginn des fusionierten Ex1/2 anlagerte sowie an den intrinsischen Bereich zwischen Exon 2 und 3 (Abbildung 17).

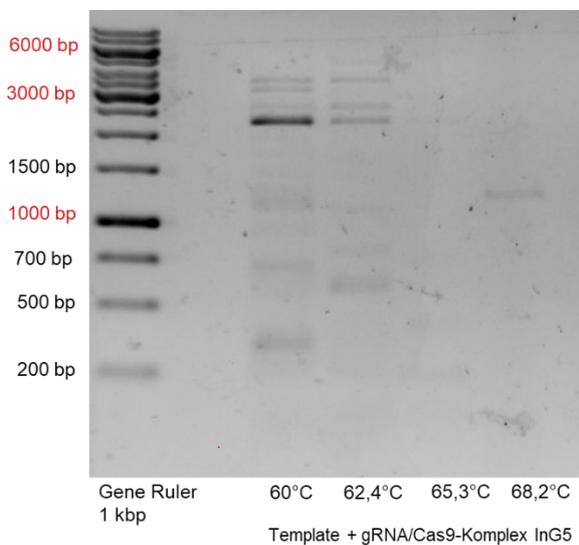


Abbildung 18: Gelelektrophorese der Gradienten-PCR zur Primeroptimierung

Dargestellt ist die Gelelektrophorese der Gradienten-PCR für die Co-Transfektion des gRNA/Cas9 Komplexes InG5 mit dem Template und dem Primerpaar #4658 + #4791. Lediglich bei 68,2°C ließ sich eindeutig eine schwache Bande bei ca. 1100 bp erkennen.

Überprüft wurde mit diesem Primerpaar die Reparatur durch das Template mit allen Kombinationen der gRNA/Cas9 Komplexe, die auch in der FACS-Analyse verwendet worden waren. Die in der FACS-Analyse verwendeten Kombinationen zeigten unterschiedliche Editierungsraten und sollten durch die PCR bestätigt werden. Dabei wurde besondere Aufmerksamkeit auf das InG5 gelegt, da dieses die höchste Editierungsrate gezeigt hatte. Die PCR wurde mehrfach mit genomischer DNA aus jeweils voneinander unabhängigen Transfektionsdurchgängen durchgeführt und überprüft.

Erwartet wurde eine Bande bei ca. 500 bp. Diese Fragmentgröße konnte in den meisten Proben jedoch gar nicht bis äußerst schwach dargestellt werden. Einzig und allein die Co-Transfektion des Templates mit dem gRNA/Cas9 Komplex InG5 zeigte eine eindeutige Bande bei 500 bp (Abbildung 19). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass das Template ohne das Vorhandensein eines gRNA/Cas9 Komplexes nicht eingebaut wurde. Hier zeigte sich bei Verwendung der Primer #4656 + #4791 keine Bande bei 500 bp. Diese Ergebnisse ließen sich in mehreren voneinander unabhängigen Transfektionsdurchgängen reproduzieren und nachweisen. Somit konnte für einen möglichen gentherapeutischen Ansatz eine Schnittstelle im Genom der *Mus musculus* gefunden und die Reparatur durch ein Template nachgewiesen werden.

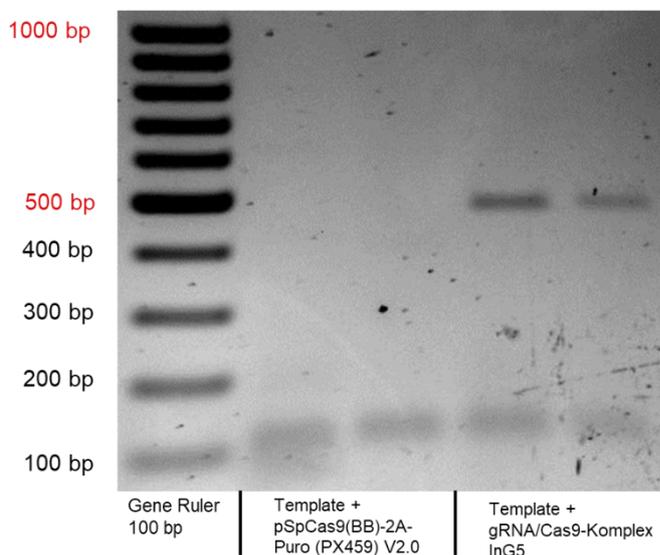


Abbildung 19: Gelelektrophorese des fusionierten Exon1/2 aus genomischer DNA

Dargestellt sind pro Kombination jeweils zwei voneinander unabhängige Durchgänge der Transfektion in 3T3-NIH Zellen. Eine eindeutige Bande für das eingebaute Template innerhalb der genomischen DNA konnte nur bei Anwesenheit des gRNA/Cas9 Komplexes InG5 nachgewiesen werden. Wurde das Template allein transfiziert, konnte kein Einbau der Template-DNA in das Genom nachgewiesen werden.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden zum einen unterschiedliche guideRNAs hergestellt und auf ihre Aktivität getestet. Es konnten mehrere gRNA/Cas9 Komplexe identifiziert werden, die eine hohe Aktivität aufwiesen und in Kombination mit dem Template und dem Reporter getestet wurden. Zum anderen konnten sowohl ein Template als auch ein Reporter zur Korrektur einer Mutation im *Abca4* Gen der *Mus musculus* hergestellt werden. Konstruiert wurde das Template unter der Prämisse, es später potenziell als therapeutisches Template in einem in vivo Versuch verwenden zu können. Dieses sollte dabei den Ansprüchen für eine Genom Editierung gerecht werden, durch das die genetische Erbinformation innerhalb eines lebenden Organismus dauerhaft verändert werden könnte. Es konnte eine Kombination aus einem gRNA/Cas9 Komplex und dem Template bzw. dem Reporter identifiziert werden, die zu einer erfolgreichen Reparatur der DNA führte. Der Einbau dieser beiden großen DNA Bereiche konnte in vitro durch verschiedene Analyseverfahren auf DNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden. Somit gelang es eine Strategie zu entwickeln, mit der gezielt eine Mutation durch eine korrekte DNA-Sequenz ersetzt werden könnte.

4.1 Schnittstellen der guideRNA

Neben der Herstellung eines geeigneten Templates (siehe 4.2), um die Reparatur der genomischen DNA durch die bekannten Reparaturmechanismen zu ermöglichen (siehe 1.1.5), musste zunächst ein Schnitt mittels CRISPR/Cas9 System (siehe 1.4) in diese gesetzt werden. Ausgewählt wurden hierfür diejenigen guideRNA Sequenzen, die in silico einen hohen Score aufwiesen. Ein hoher Score stand für eine guideRNA Sequenz mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit außerhalb des gesuchten Bereiches zu schneiden (ATUM 2020). Die Wahrscheinlichkeit von Off-Targets, unerwünschten Schnittstellen außerhalb der festgelegten Sequenz, sollte dadurch verringert werden. Diese stellen nämlich eine der größten Gefahrenquellen der Genom Editierung dar: Doppelstrangbrüche durch Off-Targets können zu ungewollten Mutationen führen (Fu et al. 2013), welche für gentherapeutische Verfahren in vivo gravierende Folgen haben kann. Im Optimalfall sollen diese durch unterschiedliche Anpassungen des CRISPR/Cas9 Systems verhindert werden (Zhang et al. 2015). Hier stellen die gRNA/Cas9 Komplexe PrG1 und InG1 die guideRNA Sequenzen mit dem höchsten, PrG5 und InG5 die mit dem niedrigsten Score dar.

Um die Aktivität der guideRNA zu überprüfen, also wie gut diese ihre einprogrammierte Schnittstelle (On-Target) findet und schneidet, wurde das BRET-Assay verwendet, welches sich dem Prinzip der Protein-Protein Interaktion bedient (siehe 1.6.2) (Pfleger et al. 2006). Zusätzlich ist es durch dieses möglich, die Aktivität unterschiedlicher guideRNA miteinander zu vergleichen (Wimmer et al. 2020 in Revision). Andere Systeme, wie z.B. das T7 Endonuklease 1 Assay, sind dazu nur bedingt in der Lage und können die Aktivität von guideRNA sogar unterschätzen (Sentmanat et al. 2018). Außerdem sind sie in ihrer Durchführung aufwändiger, da erst eine Umwandlung von Protein- auf DNA-Ebene erfolgt (Sentmanat et al. 2018).

Mittels des BRET-Assays wurde die BRET-Ratio des jeweils ungeschnittenen NHEJ-Sensors mit der BRET-Ratio des entsprechenden geschnittenen NHEJ-Sensors (Target + Guide) verglichen (siehe Abbildung 5). Ermöglicht wurde dies durch den Einbau der Target-Sequenz zwischen die Sequenz der RLuc8 und des GFP sowie einem gemeinsamen Promotor für beide Proteine (siehe Abbildung 1A). Wird durch den gRNA/Cas9 Komplex ein Schnitt in der Target-Sequenz und somit ein Doppelstrangbruch zwischen diesen beiden Bestandteilen verursacht, wird weniger GFP exprimiert (siehe Abbildung 1B). Dies liegt daran, dass die Zelle diesen Bruch durch den NHEJ Reparaturweg korrigiert und es dadurch zu Insertion und Deletion kommen kann (siehe 1.5.1). Werden 1 – 2 Basen dabei entfernt oder hinzugefügt, hat dies eine Verschiebung des Leserasters der DNA zur Folge. Durch diese setzen sich die Basentriplets anders zusammen, sodass u.a. ein STOP-Codon in der Sequenz des GFP entsteht. Dadurch ist weniger korrekt exprimiertes und fluoreszierendes GFP2 vorhanden, was eine verminderte BRET-Ratio zur Folge hat (Wimmer 2018; Wimmer et al. 2020 in Revision).

Bei den Schnittstellen des PrG2 und InG2 handelt es sich um Sonderfälle. Hier befanden sich innerhalb der Target-Sequenzen die Basenabfolge für ein STOP-Codon (siehe 2.1.8). Tatsächlich wurde die Target-Sequenz zufällig so in den NHEJ-Sensor eingebaut, dass dieses Basentriplet auch als STOP übersetzt wurde. Daher konnte der ungeschnittene NHEJ-Sensor kein GFP exprimieren. Die Erhöhung der Werte für die Kombination aus NHEJ-Sensor plus gRNA/Cas9 Komplex lässt sich wie folgt erklären: Durch den Doppelstrangbruch kommt es auch hier zur Reparatur durch den NHEJ-Weg und zu einer Verschiebung des Leserasters. Jedoch wird hier die DNA richtig korrigiert, wodurch das vorhandene STOP-Codon entfernt wird. Das nachfolgende GFP kann somit wieder exprimiert werden. Da sich die Werte der BRET-Ratio in diesen Fällen kaum von denen der Negativkontrolle unterschieden, konnte angenommen werden, dass lediglich die RLuc8 in den Zellen exprimiert wurde. Zur Normierung dieser beiden Probenpaare wurden die Werte wie in 2.2.4.6 beschrieben zueinander in Bezug gesetzt, allerdings

ohne die vorherige Subtraktion der Luciferase. Die alleinige Transfektion der RLuc8 diente als Negativkontrolle und wurde für alle anderen Probenpaare verwendet, um die Aktivität der gRNA/Cas9 Komplexe zu normieren. Dies war essenziell, um die spektrale Überlappung zwischen Donator und Akzeptor berücksichtigen zu können (Dragulescu-Andrasi et al. 2011).

Die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen im BRET-Assay hat lediglich einen geringen Einfluss auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander. Die BRET-Ratio ist definiert als Quotient der Emission des Akzeptors durch die des Donators (siehe 2.2.4.6). In Studien konnte gezeigt werden, dass die Verdünnung der Proben zwar zu einer Veränderung der gemessenen Emissionswerte der einzelnen Bestandteile führt, die Werte der errechneten BRET-Ratio als Quotient dieser jedoch relativ konstant blieben (Dragulescu-Andrasi et al. 2011; Wimmer 2018). Außerdem wurden die Werte der Aktivität nur innerhalb der einzelnen Konstrukte bestimmt und nicht anhand einer einzelnen Positivkontrolle, wodurch die Werte in sich geschlossen blieben. Dennoch konnte durch die Normierung mit RLuc8 eine Vergleichbarkeit der Aktivität der einzelnen Komplexe erreicht werden.

Bei der Auswertung der unterschiedlichen gRNA/Cas9 Komplexe zeigte sich ein sehr weit gestreutes Feld in Bezug auf die Aktivitäten dieser. Die starke Variabilität in der Aktivität von gRNA/Cas9 Komplexen ist bis heute Thema aktueller Forschungen und ist immer noch nicht vollständig geklärt. Jedoch scheint sowohl die Anzahl an Guanin und Cytosin (Fu et al. 2013; Ren et al. 2014; Wang et al. 2014) sowie die Position bestimmter Basen innerhalb der guideRNA als auch die angrenzende PAM Sequenz eine entscheidende Rolle zu spielen (Zhang et al. 2015; Collias et al. 2020). Auch die Stabilität und die räumliche Sekundärstruktur der guideRNA sowie ein Zusammenspiel unterschiedlicher Proteine innerhalb der Zelle werden als mögliche Faktoren zur Verbesserung der Aktivität und Spezifität diskutiert (Zhang et al. 2015; Kocak et al. 2019). Ein Teil dieser Faktoren, wie z.B. die Verwendung der effektiveren PAM-Sequenz „NGG“ und einer Mindestlänge von 20 bp (Ran et al. 2013; Zhang et al. 2015), wurden bei der Herstellung der hier verwendeten guideRNA beachtet.

Getestet wurden sowohl Schnittstellen im Bereich des Promotors als auch im Bereich des Introns zwischen Exon 1 und Exon 2 (siehe Abbildung 2), wodurch die Mutation eingerahmt wurde. Der Hintergedanke hierbei war, dass durch zwei Schnittstellen die fehlerhafte DNA als ganzes Stück herausgeschnitten werden konnte. Allerdings konnte bisher nicht nachgewiesen werden, dass es dadurch zu einer deutlich höheren On-Target-Effizienz kommt und die Verwendung zweier guideRNAs die Wahrscheinlichkeit für Off-Targets sogar steigern könnte (Li et al. 2014). Außerdem reicht bereits ein

einzelner Doppelstrangbruch aus, um die Reparaturmechanismen der Zelle zu aktivieren (siehe 1.5). Interessanterweise wiesen alle Schnittstellen im Bereich des Promotors eher eine geringe Aktivität auf. Im Bereich des ersten Introns dagegen zeigte sich ein sehr variables Bild mit zum Teil sehr hoher Aktivität. Dabei stach der gRNA/Cas9 Komplex InG4 als aktivster hervor gefolgt von InG2 und InG5. Für die weiteren Versuche wurde infolgedessen sowohl die Kombination aus einer Promotor und einer Intron Schnittstelle überprüft als auch die Schnittstellen im Intron allein (siehe 3.5.2 & 3.6.2).

Allerdings fallen bei genauerer Betrachtung der Ergebnisse des BRET-Assays verglichen mit denen der FACS-Analyse und dem Nachweis auf DNA Ebene einige deutliche Unterschiede auf. Im BRET-Assay zeichnete sich ab, dass der gRNA/Cas9 Komplex InG4 statistisch hoch signifikant war und die höchste Aktivität aufwies. Weder auf Protein- noch auch DNA-Ebene konnte gezeigt werden, dass es hier zu einer starken Editierung kommt, viel mehr traf der gegenteilige Fall zu.

Die verwendeten Schnittstellen für die gRNA/Cas9 Komplexe wurden *in silico* gesucht und zeigten eine unterschiedliche Ratio für Off-Targets an. Eine nur geringe Wahrscheinlichkeit für Off-Targets wies der gRNA/Cas9 Komplex InG1 auf. Dieser stellte sich im BRET-Assay als hoch signifikant mit einer geringen Aktivität dar. In den darauffolgenden Versuchen konnte durch diesen Komplex keine zufriedenstellende Editierung erreicht werden. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass die Schnittstellen InG1 und InG4 sich lediglich in einer Base unterscheiden (siehe Abbildung 2). So ist die gesamte Sequenz des InG4 um eine Base im Vergleich zu InG1 nach hinten verschoben und die PAM Sequenzen beider Komplexe überschneiden sich (5'...GCAGGGAT..3'). Da sich beide Sequenzen sehr ähnlich sind, kann es hier zur fehlerhaften Anlagerung der gRNA/Cas9 Komplexe kommen. Da solch ein Mismatch am 3' Ende der gRNA schlechter toleriert wird als am 5' Ende (Fu et al. 2013; Zhang et al. 2015), könnte dies eine mögliche Erklärung für die geringe Editierungsrate des gRNA/Cas9 Komplexes InG4 darstellen.

In dem anderem hervorstechenden Fall, nämlich dem InG5, zeigte sich dagegen ein anderes Bild. Hier wurde im BRET-Assay ebenfalls eine hohe Aktivität gemessen und es zeigte sich in den späteren Versuchen, dass nur an dieser Schnittstelle die Template-DNA erfolgreich eingebaut wurde. Im Vergleich zu den andern Schnittstellen handelt es sich bei InG5 um eine Schnittstelle mit einer geringen Spezifität, die Wahrscheinlichkeit für Off-Targets ist also höher. Wie bereits beschrieben ist für die Effektivität einer guideRNA u.a. der Guanin und Cytosin Anteil von Bedeutung. So scheint sowohl ein zu hoher als auch zu niedriger Anteil dieser beiden Basen kontraproduktiv zu sein (Wang et al. 2014; Zhang et al. 2015). Ebenfalls beeinflusst der Anteil dieser beiden Basen

innerhalb der ersten sechs der PAM-Sequenz angrenzenden Basen die Effektivität und scheint ab einem Anteil von 50 % einen positiven Einfluss auszuüben (Ren et al. 2014; Wang et al. 2014). Des Weiteren scheint die Position der anvisierten Schnittstelle auf dem codogenen oder dem Folgestrang der DNA ebenfalls von Bedeutung zu sein. Allerdings ist die Datenlage hier uneins. So wurden in einer Studie 73000 guideRNAs einer Datenbank miteinander verglichen, was zur Annahme führte, dass guideRNAs, deren Schnittstelle sich auf dem Folgestrang befanden, im Vergleich zu guideRNAs, die den codogen Strang anvisierten, effektiver seien (Wang et al. 2014). Andere Studien dagegen zeigten, dass die generelle Reparaturaktivität nach einem Doppelstrangbruch im transkribierten Strang im Vergleich zum nicht transkribierten erhöht ist (Song und Stieger 2017). Allerdings zeigte sich eine höhere Aktivität für eine Reparatur durch NHEJ durch Schnittstellen im transkribierten Strang, HDR dagegen wurde beim Schnitt im nicht transkribierten Bereich begünstigt (Song und Stieger 2017).

Es lässt sich nicht vollends klären, warum gerade die Schnittstelle InG5 in Kombination mit dem Template und dem Reporter eine erfolgreiche Reparatur verursachte. Zwar sind einige mögliche Aspekte für die Aktivität einer guideRNA bekannt, ein vollends geklärt kausaler Zusammenhang existiert allerdings noch nicht. Es bedarf diesbezüglich weiterer Forschung, die sich u.a. mit der Analyse der Sekundärstruktur der guideRNA und dem gRNA/Cas9 Komplex als Ganzem auseinandersetzt, stellt allerdings keinen Bestandteil mehr dieser Doktorarbeit dar.

4.2 Konstruktion des Templates und des Reporters

Um gezielt eine einzelne Mutation innerhalb des *Abca4* Gens anvisieren und reparieren zu können, musste die Template-DNA entsprechend konstruiert werden. Da in der hier entwickelten Strategie nur ein Teil des Gens ersetzt werden sollte und nicht eine ganze Genkassette, musste das Template dementsprechend angepasst werden. Dabei spielten mehrere Faktoren eine entscheidende Rolle: Zum einen sollte das Template klein genug sein, um es später potenziell in einem in vivo Versuch mittels eines Vektors wie z.B. AAV in Zellen transduzieren zu können. Zum anderen musste bewerkstelligt werden, dass die entsprechenden Reparaturmechanismen der Zelle durch die Template-DNA ausgelöst werden konnten (Yanik et al. 2017; Yanik et al. 2018). Hierzu wurden zwei homologe Bereiche hergestellt, die unterschiedliche Besonderheiten aufwiesen. Die homologe Sequenz des hinteren Teil des Template wurde durch das komplette Exon 2 des *Abca4* Gens gebildet. Es entsprach also einem genau definierten

Bereich innerhalb der genomischen DNA und wurde daher als „targeted site“ bezeichnet. Durch diesen relativ langen homologen Abschnitt sollte die Homologie vermittelte Rekombination begünstigt werden, da eine längere Sequenz mit einer besseren Editierung hervorgeht (Li et al. 2014; Song und Stieger 2017). Der vordere Bereich des Templates musste anders konzipiert werden, da es hier nicht möglich war, solch eine lange homologe Sequenz einzufügen. Durch die Verwendung des Restriktionsenzym *EagI*-HF bei der Isolation des Templates aus dem TOPO-Vektor, sollte durch dessen Schnittstelle (5'...C↓GGCCG...3') eine Basensequenz entstehen, die potenziell als Homologie dienen könnte. Dieser homologe Bereich des Templates wurde daher als „non-targeted site“ bezeichnet. Durch eine solche kurze homologe Region ist es theoretisch möglich den MMEJ Reparaturweg auszulösen, da für diesen 5 bp bereits ausreichend sind (Yanik et al. 2018).

Notwendig war diese Art der Konstruktion aufgrund zweier wesentlicher Faktoren. Zum einen befindet sich die zu korrigierende Mutation direkt im Promotor und Exon 1 des *Abca4* Gens der *Mus Musculus*. Durch diese Lage befindet sich kein anderer als korrekt gesicherter Bereich in unmittelbarer Nähe zur Mutation. Befände sich diese an anderer Stelle, z.B. in Exon 4, so könnten die umliegenden Exons (3 und 5) als homologe Sequenzen verwendet werden. Die Verwendung eines Exon des davor liegende Gens könnten sich als zu riskant und fehleranfällig erweisen.

Der zweite Grund ist die Größenlimitation durch vorhandene Transportvektoren (siehe 1.3.3) wie z.B. des AAV. Da in vivo sowohl die DNA-Sequenz der gRNA/Cas9 Komplexe als auch die des Templates durch solch einen Vektor eingeschleust werden müssen, muss die Template-DNA möglichst klein gehalten werden. Wird die Kapazität eines Vektors überschritten, kann es zu Verlusten der DNA-Sequenz (Wu et al. 2010) oder zu einer fehlerhaften Verpackung dieser kommen (Dong et al. 1996). Es besteht theoretisch die Möglichkeit, beide Bestandteile oder sogar das vollständige *Abca4* Gen gesplittet in mehreren getrennten Vektoren zu verabreichen mittels der Dualen Vektor Strategie. Allerdings besteht hier die Gefahr unerwünschter Nebenprodukte durch fehlerhaftes Zusammenfügen der einzelnen DNA-Abschnitte (Trapani et al. 2015b; McClements et al. 2019). Daher musste das Template für die hier durchgeführten in vitro Versuche so konstruiert werden, um klein genug für einen Vektor eines potenziellen in vivo Versuchs zu sein und dabei gleichzeitig ausreichend lange homologe Sequenzen zu besitzen.

Zusätzlich wurde durch den Einbau des CMV-Promotor sichergestellt, dass das reparierte *Abca4* Gen auch in 3T3-NIH Zellen exprimiert wurde. Da es sich bei diesem Genprodukt um ein spezifisches Protein der Retina und ihrer Photorezeptoren handelt (Maugeri et al. 1999; Quazi et al. 2012), würden andere Zellarten dieses ignorieren und

nicht exprimieren. Der CMV-Promotor besitzt die Eigenschaft, die Expression von nachfolgenden Genen in jeglicher Art von Zellen zu fördern (Boshart et al. 1985), was eine hohe Transkription und somit eine hohe Proteinkonzentration innerhalb der Zelle verursacht. Durch die Verwendung von Mäuseretinae zur Herstellung der DNA-Sequenz des Templates konnte sich ein Zwischenprodukt der Genexpression zunutze gemacht werden, die mRNA. Da sich in dieser lediglich die für die Translation benötigten Exons befinden, die direkt korrekt aneinander fusioniert sind, konnte eine kurze DNA-Sequenz zur Herstellung des Template verwendet werden. Des Weiteren wurde die Template-DNA aus dem pcDNA3.1(+)/CAT Vektor in den TOPO-Vektor kloniert, um die Poly-A-Sequenz an deren Ende entfernen zu können. Diese hätte die Anzahl der Basenpaare des Templates unnötig vergrößert und dessen Isolation zusätzlich erschwert.

Durch Auswahl dieser einzelnen Bestandteile sollte ein möglichst effektives und sicheres Template hergestellt werden. Da es nicht möglich war, zwei lange homologe Bereiche für die Reparatur der DNA mittels HDR herzustellen, musste ein anderer Weg gefunden werden, um eine Reparatur durch eine Template-DNA zu gewährleisten. Durch welchen Mechanismus das Template als Ganzes eingebaut wurde, lässt sich im Nachhinein nicht festlegen (siehe 4.3). Inwieweit dies Auswirkungen auf die Expression des *Abca4* Gen haben könnte, ist noch ungeklärt und bedarf weiterer Forschung.

4.3 Reparatur durch Template und Reporter

Die Überprüfung der Reparatur durch das Template bzw. durch den Reporter erfolgte sowohl auf Ebene der Proteine als auch auf Ebene der genomischen DNA. Im ersten Schritt, der Überprüfung auf Proteinebene, konnten durch das eingebaute GFP des Reporters die Zellen im FACS Canto II erkannt werden: Wurde der Reporter erfolgreich nach dem Schnitt durch den gRNA/Cas9 Komplex in die Zellen eingebaut, so entstand GFP, welches das Gerät erfassen konnte (siehe Abbildung 11). Getestet wurden hier sowohl die Kombination aus einer Schnittstelle im Promotor und im Intron als auch einer einzelnen Schnittstelle im Bereich des Introns (siehe 3.5.2).

Für alle Kombinationen der gRNA/Cas9 Komplexe mit dem Reporter ließen sich GFP positive Zellen messen. Jedoch war deren Anzahl meist nur sehr gering, wodurch auch die später errechneten Editierungsraten (siehe Abbildung 14) eher niedrig blieben. Bis auf ein Konstrukt überschritt keine Kombination eine Editierungsrate von 1 %. Einzig bei der alleinigen Verwendung des gRNA/Cas9 Komplexes InG5 mit dem Reporter konnte

eine leicht erhöhte Editierungsrate von 1,73 % gemessen werden. Dieses Ergebnis war interessant, da InG5 im Vergleich zum InG4 eine weitaus niedrigere Aktivität zeigte (siehe Abbildung 5, vgl. 4.1).

Außerdem wurde bei der Erfassung der Proben u.a. auch in beiden Negativkontrollen eine gewisse Anzahl an fluoreszierenden Zellen gemessen. Gerade in der Negativkontrolle, die nur die Transfektionschemikalien (NaCl und PEI) enthielt, ließ sich eine erhöhte Anzahl messen. Grund dafür ist die Autofluoreszenz der Zellen. Diese wird durch bestimmte Bestandteile der Zelle verursacht (Billinton und Knight 2001) und kann sich bei Stress oder beim Absterben der Zelle erhöhen (Surre et al. 2018). Da sich die Wellenlänge des GFP mit der Wellenlänge der Autofluoreszenz zum Teil überschneidet (Billinton und Knight 2001), können auch tote Zellen fälschlicherweise als GFP-positiv gewertet werden. Ungeachtet dessen, lag der Wert der Editierungsrate der Kombination aus Reporter und InG5 oberhalb des Wertes der Negativkontrolle mit NaCl und PEI. Des Weiteren konnte durch die alleinige Transfektion des Reporters (siehe 3.5.1) eine Eigenfluoreszenz desselbigen im Vorfeld ausgeschlossen werden. Zusätzlich zeigte sich in der Co-Transfektion aus dem Reporter mit dem reinen pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 Plasmid kein erhöhter Wert in der FACS-Analyse im Vergleich zu den anderen Proben (siehe Abbildung 14).

Niedrige Editierungswerte innerhalb der FACS-Analyse zeigten sich in andern Studien meistens bei Verwendung des HDR Reparaturwegs, der sich im Vergleich zum NHEJ Weg als ineffektiver darstellt (He et al. 2016). Es existieren unterschiedliche Ansätze, um die Editierungsrate des HDR zu steigern, wie z.B. die Anpassung der homologen Sequenzen des Templates oder die Position der anvisierten Schnittstellen der guideRNA (Li et al. 2014; Song und Stieger 2017). Neben den bereits genannten Möglichkeiten zur Verbesserung der Editierungsrate der HDR konnten neue Ansätze zeigen, dass eine Modifizierung der Cas9 zu einer erhöhten Editierung führen können. So konnten sowohl Eingriffe in die Chromatinstruktur (Janssen et al. 2019), die Inhibierung von pro-NHEJ Proteinen (Jayavaradhan et al. 2019) oder die direkte Verknüpfung der Cas9 mit dem Template (Savic et al. 2018) eine Steigerung der HDR Rate zeigen.

Der ausschlaggebende Faktor dabei bleibt, dass sich all diese Ansätze auf teilungsfähige Zellen beziehen, die sich weitaus umfangreicher der jeweiligen Reparaturmechanismen bedienen können als teilungsunfähige Zellen. So kann NHEJ in diesen zu jeder Phase des Zellzyklus durchgeführt werden, im Gegensatz zu HDR und MMEJ die auf bestimmte Phasen beschränkt sind (Yanik et al. 2017) (siehe 1.5).

Für in vitro Versuche oder Versuchstiermodelle mag der NHEJ-Weg ausreichend sein, für eine therapeutische Anwendung im Auge ist dieser allerdings nicht sicher genug. Da hier nicht ganze Genkassetten, sondern einzelne Mutationen korrigiert werden sollen, ist eine hohe Spezifität zwingend notwendig, um eine sichere Behandlung gewährleisten zu können. Der NHEJ-Weg ist immer noch der fehleranfälligste Reparaturweg und könnte daher ungeahnte Nebenwirkungen und Problematiken verursachen (siehe 1.5.1). Neben der Gefahr, dass es durch einen kompletten Einbau durch NHEJ zu einem Frameshift kommen kann, besteht die Gefahr der ungerichteten Integration. Ohne eine richtungsweisende Homologie könnte das Template auch um 180° gedreht in die genomische DNA eingebaut werden, da NHEJ ungerichtet ist und nicht selektiert (He et al. 2016). Für in vitro Versuche hat dies keine weitreichende Folgen, da hier Zellen mit einfachen Mitteln selektiert werden können. Für eine Therapie in vivo am Menschen und dazu in nicht mehr teilungsfähigen Zellen würde solch eine Inversion jedoch ein zu großes Risiko beinhalten. Bekannt ist, dass Inversionen im codierenden Bereich eines Gens oder in dessen Regulationszentren zu schwerwiegenden Erkrankungen führen können (Puig et al. 2015). Da in diesem Fall zwei fusionierte Exons gedreht werden, würde sich der codierende Bereich des Gens zwingend verändern, wodurch es zu nicht vorhersehbaren Konsequenzen kommen könnte. Daher ist die Verwendung eines Templates mit entsprechenden homologen Armen essenziell (vgl. 4.2), um eine korrekte Reparatur der Mutation gewährleisten zu können.

Die Verwendung eines Templates zur Reparatur von Mutationen wird auch im MMEJ Reparaturweg verwendet und stellt ebenfalls eine Möglichkeit dar, um eine Template-DNA in Zellen zielgerichtet einzubringen (Sakuma et al. 2016). Bei diesem werden kleine homologe Sequenzen von 5 – 25 bp benötigt, um einen Einbau auszulösen. Es können sogar homologe Sequenzen bis zu einer Länge von 50 bp verwendet werden, wodurch jedoch die Reparaturaktivität des MMEJ sinkt (Yanik et al. 2018). Die niedrigen Editierungsraten ließen sich hypothetisch auch so erklären lassen, dass die Reparatur durch MMEJ erfolgte, es jedoch durch den zu langen hinteren homologen Arm nur zu einer schlechten Reparaturaktivität kam. Außerdem ist MMEJ ebenfalls nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus vorhanden und kann wie NHEJ ebenfalls zu Deletionen und Insertionen führen (siehe 1.5.2). Dennoch gibt es auch für diesen Reparaturmechanismus unterschiedliche Ansätze, um dessen Editierungsrate zu steigern. So konnte MMEJ z.B. gezielter angesprochen werden durch die Verwendung von angepassten AAVs, die das Template als Einfachstrang-DNA beinhalten und transduzierten (Xiao et al. 2018).

Für das hier verwendete Template und den Reporter lässt sich nicht genau klären, welcher der genannten Reparaturmechanismen hauptsächlich an der Korrektur beteiligt war. Dies liegt u.a. an der besonderen Konstruktion der beiden homologen Bereiche des hergestellten Templates und Reporters (siehe 4.2). Fest steht, dass durch die unterschiedlichen homologen Regionen potenziell sowohl MMEJ als auch HDR ausgelöst werden konnten. Beachtet werden muss hierbei, dass die hier durchgeführten *in vitro* Versuche in teilungsfähigen Zellen durchgeführt wurden. Sie sind in einem andern Ausmaß fähig sich der unterschiedlichen Reparaturmechanismen zu bedienen als postmitotische Zellen, wie z.B. den Photorezeptoren. Diese teilen sich nicht mehr, nachdem sie ausdifferenziert sind, allerdings sind sie in der Lage, sich anteilig zu erneuern (siehe 1.1.2). Zwar ist auch für teilungsfähige Zellen noch nicht vollends geklärt, unter welchen Bedingungen der jeweilige Reparaturmechanismus ausgelöst wird, jedoch spielen die Zellzyklusphasen und das Vorhandensein eines Templates eine entscheidende Rolle (Yanik et al. 2017). Die Übertragung auf einen *in vivo* Versuch bedarf neben der Verwendung eines Vektors auch einer weiteren Modifizierung des Templates und der gRNA/Cas9 Komplexe, um eine höhere Editierung erhalten zu können. Zusätzlich muss das Zusammenspiel aus gRNA/Cas9 Komplex, dem Reparaturmechanismus und dem Vektor beachtet werden. Diese Faktoren üben Einfluss auf eine erfolgreiche Genom Editierung aus, allen voran AAV, der allein durch seine Anwesenheit in der Zelle diese beeinflussen kann (Yanik et al. 2017). So ist dieser u.a. in der Lage, selbst in postmitotischen Zellen eine vermehrte Editierung via HDR zu verursachen (Nishiyama et al. 2017). Auf Grundlage dessen versuchen aktuelle Studien mittels einer AAV vermittelten Transduktion eine Editierung in Photorezeptoren sowohl durch HDR (Cai et al. 2019) als auch durch MMEJ (Nishiguchi et al. 2020) *in vivo* zu erreichen.

Ungeachtet davon, welcher Reparaturweg ausgelöst wurde, gelang es in dieser Arbeit einen weiteren Nachweis für die erfolgreiche Reparatur zu erbringen. Mittels PCR der genomischen DNA nach Transfektion der gRNA/Cas9 Komplexe und dem Template, konnte auf DNA-Ebene nachgewiesen werden, dass es zu einem erfolgreichen Einbau des Templates gekommen war. Durch die Wahl einer hohen Puromycinkonzentration zur Selektion der transfizierten 3T3-NIH Zellen (siehe 3.6.1) konnte gewährleistet werden, dass überwiegend Zellen mit erfolgreich veränderter DNA analysiert wurden. Somit konnte bei der späteren PCR davon ausgegangen werden, dass die dargestellten Banden überwiegend aus genetisch veränderten Zellen stammten und nicht aus nativen 3T3-NIH Zellen. In der FACS-Analyse wurde diese Methode mit Absicht nicht angewandt, da hier die Anzahl der erfolgreich transfizierten Zellen in Relation zu den

nicht transfizierten ausgewertet werden sollte. Zusätzlich hätte die Puromycinselektion eine zu große Auswirkung auf die Zellzahl der Proben, wodurch sie in der FACS-Analyse untereinander nicht mehr vergleichbar wären.

Für die eigentliche PCR wurden die Primer so konzipiert, dass sie lediglich an die reparierte genomische DNA banden und nicht an das ggf. noch frei in der Zelle vorhandene Template. Erreicht wurde dies in dem ein Primer den Beginn des CMV-Promotors, bzw. des Exon 1 darstellte, der zweite sich im intrinsischen Bereich zwischen Exon 2 und 3 befand (siehe Abbildung 17). Da dieses Intron kein Teil des Templates war, konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei einem positiven Nachweis um reparierte DNA handelte. Bereits in anderen Studien wurde dieses Konzept verwendet, um einen eindeutigen Nachweis für den Einbau eines Templates zu erhalten (He et al. 2016; Nishiyama et al. 2017). Mit dieser Methode wurden alle Kombinationen von gRNA/Cas9 Komplexen und dem Template überprüft, die zuvor in der FACS-Analyse getestet worden waren. Die FACS-Analyse stellte hier somit einen Indikator dafür dar, bei welchen Kombinationen es zu einer hohen Anzahl an Reparaturen gekommen war und somit auch auf genomischer Ebene ein positives Ergebnis zu erwarten war.

Es konnte sowohl ein schwacher Nachweis für den Einbau des gesamten Templates (Beginn CMV-Promotor bis Intron), als auch ein eindeutiger Nachweis für den Einbau des fusionierten Exon 1/2 erbracht werden. Letzteres konnte in mehreren voneinander unabhängigen Transfektionsdurchgängen des Templates mit dem gRNA/Cas9 Komplex InG5 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19). Zwar ließ sich der CMV-Promotor in der PCR nur bedingt nachweisen, jedoch bestätigen die Ergebnisse der FACS-Analyse, dass alle Bestandteile in die Zelle integriert worden waren. Da der Reporter auf Basis des Templates hergestellt wurde und das *Abca4* Gen ohne den CMV-Promotor nicht exprimiert werden würde (siehe 4.2), konnte durch den Nachweis von GFP positiven Zellen in Kombination mit den Ergebnissen der PCR sowohl der Einbau als auch die daraus folgende Expression gezeigt werden. Dadurch konnte sowohl auf DNA- als auch auf Protein-Ebene nachgewiesen werden, dass es zu einer erfolgreichen Integration gekommen war.

4.4 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine kurze Template-DNA, welche aus miteinander fusionierten Exonen besteht, in Kombination mit einem gRNA/Cas9 Komplex erfolgreich in genomische DNA eingebaut werden konnte. Die Reparatur der genomischen DNA durch dieses Template konnte sowohl auf Protein-Ebene als auch auf DNA-Ebene nachgewiesen werden. Die hier entwickelte Strategie stellt allerdings nur den Beginn der eigentlichen Herstellung eines therapeutisch wirksamen Templates dar. Ob die Verwendung der Kombination aus dem gRNA/Cas9 Komplex InG5 mit dem hier hergestellten Template auch in vivo zu einer erfolgreichen Editierung führt, ist Teil weiterer Forschung und stellt den nächsten experimentellen Schritt dar. Besonderes Augenmerk muss dabei auf die Größenlimitation der Vektoren gelegt werden und wie weit es z.B. mit Hilfe eines AAV Vektors gelingt, Photorezeptoren zu transduzieren um eine Reparatur zu ermöglichen. Da in dieser Arbeit 3T3-NIH Zellen verwendet wurden, die weiterhin teilungsfähig sind und keine teilungsunfähigen Photorezeptoren mit der entsprechenden Mutation, bleibt abzuwarten, ob die Editierung in Letzteren ähnlich hohe Werte erreicht. Dennoch gibt es bereits Hinweise darauf, dass eine Reparatur durch ein Template in Kombination mit einem AAV Vektor selbst in postmitotischen Zellen möglich ist (Yanik et al. 2017; Nishiyama et al. 2017; Cai et al. 2019; Nishiguchi et al. 2020).

Bis es durch ein therapeutisch wirksames Template zu einer Verbesserung der Sicht oder sogar zur Heilung von STGD1 betroffenen Patienten kommen kann ohne erhebliche Nebenwirkungen auszulösen, ist es noch ein weiter Weg. Allerdings zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine mögliche Strategie zur Entwicklung einer Therapie des STGD1 durch Genom Editierung. Dadurch könnte eine Therapie ermöglicht werden, die ggf. nur einer einmaligen intravitrealen Injektion bedarf, wodurch Risiken wie Netzhautblutungen und -ablösungen verringert werden könnten.

5 Zusammenfassung

Die Gruppe der erblichen Retina- und Makuladystrophien umfasst eine erhebliche Anzahl an Erkrankungen, die durch Mutationen in unterschiedlichen Genen ausgelöst werden und für die, bis auf einige wenige Ausnahmen, keine kausale Therapie existiert. Eine dieser Erkrankungen ist der Morbus Stargardt (STGD1), der sich in den ersten beiden Lebensdekaden manifestiert und mit dem *ABCA4* Gen assoziiert ist. Die Genom Editierung, bei der mit Hilfe des CRISPR/Cas Systems ein gezielter Doppelstrangbruch im Bereich der krankheitsauslösenden Mutation gesetzt wird und dadurch die zell-eigenen Reparaturmechanismen ausgelöst werden, stellt einen möglichen therapeutischen Ansatz dar.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand einer Mutation im murinen *Abca4* Gen eine Strategie *in vitro* zu entwickeln, um mittels Genom Editierung große DNA Bereiche durch HDR austauschen zu können. Dazu wurden sowohl für das CRISPR/Cas System unterschiedliche guideRNAs hergestellt und getestet als auch ein Template und ein Reporter entwickelt und erstellt. Diese beiden enthielten u.a. die korrekte DNA-Sequenz für den mutierten Bereich des *Abca4* Gens und sollten zusätzlich in die Zelle eingebracht werden. Die Sequenzen der jeweiligen guideRNA wurde in einen Cas9 enthaltendes Plasmid kloniert und die entsprechende Target-Sequenzen in einen NHEJ-Sensor. Dadurch konnte mittels einem BRET-Assay die Aktivität der einzelnen gRNA/Cas9 Komplexe erfasst werden. Bei der Erstellung des Templates bzw. des Reporters wurde eine möglichst geringe Anzahl an Basenpaaren verwendet, damit diese später potenziell in einem *in vivo* Versuch mittels Transduktion verwendet werden könnten. Die eigentliche Überprüfung der Reparatur durch den Einbau der korrekten DNA-Sequenz erfolgte durch die Transfektion der gRNA/Cas9 Komplexe mit dem Template bzw. Reporter in 3T3-NIH Zellen und wurde mittels FACS-Analyse und PCR mit anschließender Gelelektrophorese ausgewertet.

Es konnten mehrere aktive guideRNAs identifiziert werden, von denen ein gRNA/Cas9 Komplex sowohl in Kombination mit dem Template als auch mit dem Reporter zu einer erfolgreichen Reparatur der genomischen DNA führte. Dies konnte sowohl auf Protein-Ebene in der FACS-Analyse als auch auf DNA-Ebene in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch ein möglichst klein gehaltenes Template sowie durch einen aktiven gRNA/Cas9 Komplex eine Reparatur *in vitro* möglich ist. Durch die besondere Konstruktion der einzelnen Bestandteile stellt dies einen ersten erfolgreichen Schritt für weitere potenzielle *in vivo* Versuche und der Entwicklung einer möglichen Therapie des STGD1 dar.

6 Summary

The group of hereditary retinal and macular dystrophies comprises a considerable number of diseases caused by mutations in different genes and for which, with a few exceptions, no causal therapy exists. One of these diseases is Stargardt disease (STGD1), which manifests in the first two decades of life and is associated with the *ABCA4* gene. Genome editing where the CRISPR/Cas System is used to set a targeted double-strand break in the region of the disease-causing mutation and, thereby, trigger the cells own repair mechanisms, represents a possible therapeutic approach.

The aim of this work was to develop an in vitro strategy to exchange large DNA regions via HDR through genome editing by using a mutation in the murine *abca4* gene. For this purpose, different guideRNAs were produced and tested for the CRISPR/Cas System and a template and reporter were developed and created. These two contained, among other things, the correct DNA sequence for the mutated region of the *abca4* gene and should also be additionally inserted into the cell. The sequences of the respective guideRNA were cloned in a Cas9 containing plasmid and the corresponding target sequences in a NHEJ sensor. This allowed the activity of the individual guideRNA to be recorded by BRET assay. When creating the template or the reporter, the lowest number of base pairs were used so that they could potentially be used later in an in vivo experiment by using transduction. The actual check of the repair by installation of the correct DNA sequence was carried out by transfection of the gRNA/Cas9 complexes with the template or the reporter in 3T3-NIH cells and evaluated by FACS analysis and PCR with subsequent gel electrophoresis.

Several active guideRNAs could be identified of which one gRNA/Cas9 complex in combination with both the template and the reporter led to a successful repair of the genomic DNA. This could be proven at the protein level in FACS analysis as well as at the DNA level in gel electrophoresis. In this work it could be shown that a repair in vitro is possible by using a template that is kept as small as possible and an active gRNA/Cas9 complex. Due to the special design of the individual components, this represents a first successful step for further potential in vivo experiments and the development of a possible therapy for STGD1.

7 Abkürzungsverzeichnis

↑ und ↓	Schnittstellen der Enzyme
°C	Grad Celsius
3'	Position der OH – Gruppe
5'	Position des Phosphatrests
3T3-NIH	Murine embryonale Fibroblasten
A	Adenin
AAV	Adeno Assoziiertes Virus
abs.	absolut
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BRCA2	Breast Cancer 2
BRET	Biolumineszenz Resonanz Energie Transfer
BU	BRET Unit
C	Cytosin
ca.	circa
Cas9	CRISPR associated protein 9
cDNA	complementary DNA / komplementäre DNA
CMV	Cytomegalovirus
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
E.coli	Escherichia coli
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting

FSC	Forward Scatter
G	Guanin
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein / Grün Fluoreszierendes Protein
gRNA	guide RNA
h	Stunde
HDR	Homology-Directed Repair
HEK	Human Embryonic Kidney
kbp	Kilo – Basenpaare
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
ms	Millisekunde
MMEJ	Microhomology-Mediated End Joining
mRNA	messenger RNA
N	Adenin oder Cytosin oder Guanin oder Thymin
ng	Nanogramm
NHEJ	Non-Homologous End Joining
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
pmol	Picomol

R	Adenin oder Guanin als mögliche Base
RLuc8	Renilla reniformis Luciferase 8
RNA	Ribonukleinsäure
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm	Rounds per minute / Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SSC	Side Scatter
STGD1	Morbus Stargardt
T	Thymin
u.a.	unter anderem
V	Volt
x g	mal Erdbeschleunigung
Y	Cytosin oder Thymin als mögliche Base
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionsweise des NHEJ-Sensors	15
Abbildung 2: Positionen der guideRNA Schnittstellen im Genom der Mus musculus..	49
Abbildung 3: Chromatogramm des gRNA/Cas9 Komplexes PrG3.....	50
Abbildung 4: Chromatogramm des NHEJ-Sensors InT5.....	51
Abbildung 5: Ergebnisse des BRET-Assays	54
Abbildung 6: Gelelektrophorese der isolierten Maus RNA	55
Abbildung 7: Gelelektrophorese des fusionierten Exon1/2.....	56
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Templates und des Reporters	57
Abbildung 9: Gelelektrophorese des fusionierten Exon1/2 mit CMV Promotor.....	58
Abbildung 10: Gelelektrophorese des Templates	59
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Einbaus des Reportertemplates	60
Abbildung 12: Gelelektrophorese des Reporters	61
Abbildung 13: Kontrolltransfektion des Reporters in 3T3-NIH Zellen	62
Abbildung 14: Editierungsraten nach FACS Analyse	63
Abbildung 15: Puromycin Selektionskonzentration	64
Abbildung 16: Verlauf der Puromycinselektion der transfizierten 3T3-NIH Zellen	66
Abbildung 17: Schematischer Einbau des Templates.....	67
Abbildung 18: Gelelektrophorese der Gradienten-PCR zur Primeroptimierung.....	68
Abbildung 19: Gelelektrophorese des fusionierten Exon1/2 aus genomischer DNA ...	69

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräteliste	17
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	18
Tabelle 3: Weitere verwendete Puffer.....	20
Tabelle 4: Verwendete Kit-Systeme.....	21
Tabelle 5: Verwendete Restriktionsenzyme.....	21
Tabelle 6: Andere verwendete Enzyme	22
Tabelle 7: Verwendete Plasmide	23
Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide für Target- und Guide-Sequenzen.....	23
Tabelle 9: Sequenzier- und PCR-Primer	25
Tabelle 10: Verwendete Software.....	28
Tabelle 11: Pipettierschema der Hybridisierung	31
Tabelle 12: Pipettierschema der Restriktionsverdau.....	31
Tabelle 13: Pipettierschema Ligation.....	32
Tabelle 14: Zusammensetzung des Sequenzierungsansatzes	34
Tabelle 15: Transfektion HEK293-T.....	42
Tabelle 16: Transfektion 3T3-NIH.....	42
Tabelle 17: Transfektion der 3T3-NIH Zellen für die FACS-Analyse	43

10 Literaturverzeichnis

- 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.
- ATUM (2020): gRNA Design. ATUM. Newark (CA). Online verfügbar unter <https://www.atum.bio/catalog/vectors/grna-design>, zuletzt geprüft am 23.06.2020.
- Auricchio, Alberto; Trapani, Ivana; Allikmets, Rando (2015): Gene Therapy of ABCA4-Associated Diseases. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 5 (5), a017301. DOI: 10.1101/cshperspect.a017301.
- Azarian, Sassan M.; Megarity, Christine F.; Weng, Jian; Horvath, David H.; Travis, G. H. (1998): The human photoreceptor rim protein gene (ABCR): genomic structure and primer set information for mutation analysis. In: *Human Genetics* 102 (6), S. 699–705. DOI: 10.1007/s004390050765.
- Baehr, Wolfgang; Wu, Samuel M.; Bird, Alan C.; Palczewski, Krzysztof (2003): The retinoid cycle and retina disease. In: *Vision Research* 43 (28), S. 2957–2958. DOI: 10.1016/j.visres.2003.10.001.
- Beharry, Seelochan; Zhong, Ming; Molday, Robert S. (2004): N-retinylidene-phosphatidylethanolamine is the preferred retinoid substrate for the photoreceptor-specific ABC transporter ABCA4 (ABCR). In: *The Journal of biological chemistry* 279 (52), S. 53972–53979. DOI: 10.1074/jbc.M405216200.
- Benhar, Inbal; London, Anat; Schwartz, Michal (2012): The privileged immunity of immune privileged organs: the case of the eye. In: *Frontiers in immunology* 3, S. 296. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00296.
- Billinton, N.; Knight, A. W. (2001): Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. In: *Analytical biochemistry* 291 (2), S. 175–197. DOI: 10.1006/abio.2000.5006.
- Boshart, Michael; Weber, Frank; Jahn, Gerhard; Dorsch-Hiisler, Karoline; Fleckenstein, Bernhard; Schaffner, Walter (1985): A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. In: *Cell* 41 (2), S. 521–530. DOI: 10.1016/S0092-8674(85)80025-8.
- Briggs, Christine E.; Rucinski, David; Rosenfeld, Philip J.; Hirose, Tatsuo; Berson, Eliot L.; Dryja, Thaddeus P. (2001): Mutations in ABCR (ABCA4) in Patients with Stargardt Macular Degeneration or Cone-Rod Degeneration. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42 (10), S. 2229–2236.
- Burnett, John C.; Rossi, John J. (2012): RNA-based therapeutics: current progress and future prospects. In: *Chemistry & biology* 19 (1), S. 60–71. DOI: 10.1016/j.chembiol.2011.12.008.
- Cai, Yuan; Cheng, Tianlin; Yao, Yichuan; Li, Xiao; Ma, Yuqian; Li, Lingyun et al. (2019): In vivo genome editing rescues photoreceptor degeneration via a Cas9/RecA-mediated homology-directed repair pathway. In: *Science advances* 5 (4), eaav3335. DOI: 10.1126/sciadv.aav3335.

- Chamberlain, Kyle; Riyad, Jalish Mahmud; Weber, Thomas (2016): Expressing Transgenes That Exceed the Packaging Capacity of Adeno-Associated Virus Capsids. In: *Human gene therapy methods* 27 (1), S. 1–12. DOI: 10.1089/hgtb.2015.140.
- Chan, Lawrence; Mahajan, Vinit B.; Tsang, Stephen H. (2017): Genome Surgery and Gene Therapy in Retinal Disorders. In: *The Yale Journal of Biology and Medicine* 90 (4), S. 523–532.
- Chang, Howard H. Y.; Pannunzio, Nicholas R.; Adachi, Noritaka; Lieber, Michael R. (2017): Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 18 (8), S. 495–506. DOI: 10.1038/nrm.2017.48.
- Collias, D.; Leenay, R. T.; Slotkowski, R. A.; Zuo, Z.; Collins, S. P.; McGirr, B. A. et al. (2020): A positive, growth-based PAM screen identifies noncanonical motifs recognized by the *S. pyogenes* Cas9. In: *Science advances* 6 (29), eabb4054. DOI: 10.1126/sciadv.abb4054.
- Conley, Shannon M.; Cai, Xue; Makkia, Rasha; Wu, Yalin; Sparrow, Janet R.; Naash, Muna I. (2012): Increased cone sensitivity to ABCA4 deficiency provides insight into macular vision loss in Stargardt's dystrophy. In: *Biochimica et biophysica acta* 1822 (7), S. 1169–1179. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.10.007.
- Cox, David Benjamin Turitz; Platt, Randall Jeffrey; Zhang, Feng (2015): Therapeutic genome editing: prospects and challenges. In: *Nature medicine* 21 (2), S. 121–131. DOI: 10.1038/nm.3793.
- Curcio, C. A.; Sloan, K. R.; Kalina, R. E.; Hendrickson, A. E. (1990): Human photoreceptor topography. In: *The Journal of comparative neurology* 292 (4), S. 497–523. DOI: 10.1002/cne.902920402.
- De, Abhijit; Loening, Andreas Markus; Gambhir, Sanjiv Sam (2007): An improved bioluminescence resonance energy transfer strategy for imaging intracellular events in single cells and living subjects. In: *Cancer research* 67 (15), S. 7175–7183. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4623.
- Deng, Sarah K.; Gibb, Bryan; Almeida, Mariana Justino de; Greene, Eric C.; Symington, Lorraine S. (2014): RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks. In: *Nature structural & molecular biology* 21 (4), S. 405–412. DOI: 10.1038/nsmb.2786.
- Deng, Wen-Tao; Dinculescu, Astra; Li, Qihong; Boye, Sanford L.; Li, Jie; Gorbatyuk, Marina S. et al. (2012): Tyrosine-mutant AAV8 delivery of human MERTK provides long-term retinal preservation in RCS rats. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53 (4), S. 1895–1904. DOI: 10.1167/iovs.11-8831.
- Deutsche Ophthalmologische Gesellschaft (DOG); Berufsverband der Augenärzte Deutschlands e. V. (BVA); Retinologische Gesellschaft e. V. (RG) (2019): Stellungnahme von DOG, RG und BVA zur therapeutischen Anwendung von voretigene neparvovec (Luxturna™) in der Augenheilkunde. In: *Der Ophthalmologe* 116 (6), S. 524–533. DOI: 10.1007/s00347-019-0885-3.
- Dong, J. Y.; Fan, P. D.; Frizzell, R. A. (1996): Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. In: *Human gene therapy* 7 (17), S. 2101–2112. DOI: 10.1089/hum.1996.7.17-2101.

Donoso, Larry A.; Edwards, Albert O.; Frost, Arcilee; Vrabec, Tamara; Stone, Edwin M.; Hageman, Gregory S.; Perski, Thomas (2001): Autosomal Dominant Stargardt-Like Macular Dystrophy. In: *Survey of Ophthalmology* 46 (2), S. 149–163. DOI: 10.1016/S0039-6257(01)00251-X.

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.

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.

Fujinami, Kaoru; Zernant, Jana; Chana, Ravinder K.; Wright, Genevieve A.; Tsunoda, Kazushige; Ozawa, Yoko et al. (2015): Clinical and molecular characteristics of childhood-onset Stargardt disease. In: *Ophthalmology* 122 (2), S. 326–334. DOI: 10.1016/j.ophtha.2014.08.012.

Grehn, Franz (2019): *Augenheilkunde*. 32nd ed. 2019. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Gross, Andre; Schoendube, Jonas; Zimmermann, Stefan; Steeb, Maximilian; Zengerle, Roland; Koltay, Peter (2015): Technologies for Single-Cell Isolation. In: *International journal of molecular sciences* 16 (8), S. 16897–16919. DOI: 10.3390/ijms160816897.

He, Xiangjun; Tan, Chunlai; Wang, Feng; Wang, Yaofeng; Zhou, Rui; Cui, Dexuan et al. (2016): Knock-in of large reporter genes in human cells via CRISPR/Cas9-induced homology-dependent and independent DNA repair. In: *Nucleic acids research* 44 (9), e85. DOI: 10.1093/nar/gkw064.

Heyer, Wolf-Dietrich; Ehmsen, Kirk T.; Liu, Jie (2010): Regulation of homologous recombination in eukaryotes. In: *Annual review of genetics* 44, S. 113–139. DOI: 10.1146/annurev-genet-051710-150955.

Holthausen, J. Thomas; Wyman, Claire; Kanaar, Roland (2010): Regulation of DNA strand exchange in homologous recombination. In: *DNA repair* 9 (12), S. 1264–1272. DOI: 10.1016/j.dnarep.2010.09.014.

Horvath, Philippe; Barrangou, Rodolphe (2010): CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. In: *Science (New York, N.Y.)* 327 (5962), S. 167–170. DOI: 10.1126/science.1179555.

Imani, Saber; Cheng, Jingliang; Shasaltaneh, Marzieh Dehghan; Wei, Chunli; Yang, Lisha; Fu, Shangyi et al. (2018): Genetic identification and molecular modeling characterization reveal a novel PROM1 mutation in Stargardt4-like macular dystrophy. In: *Oncotarget* 9 (1), S. 122–141. DOI: 10.18632/oncotarget.22343.

Janssen, Josephine M.; Chen, Xiaoyu; Liu, Jin; Gonçalves, Manuel A. F. V. (2019): The Chromatin Structure of CRISPR-Cas9 Target DNA Controls the Balance between Mutagenic and Homology-Directed Gene-Editing Events. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 16, S. 141–154. DOI: 10.1016/j.omtn.2019.02.009.

Jayavaradhan, Rajeswari; Pillis, Devin M.; Goodman, Michael; Zhang, Fan; Zhang, Yue; Andreassen, Paul R.; Malik, Punam (2019): CRISPR-Cas9 fusion to dominant-negative 53BP1 enhances HDR and inhibits NHEJ specifically at Cas9 target sites. In: *Nature communications* 10 (1), S. 2866. DOI: 10.1038/s41467-019-10735-7.

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.

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.

Kansara, Viral; Muya, Leroy; Wan, Chen-Rei; Ciulla, Thomas A. (2020): Suprachoroidal Delivery of Viral and Nonviral Gene Therapy for Retinal Diseases. In: *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics* 36 (6), S. 384-392. DOI: 10.1089/jop.2019.0126.

Kirsch, Joachim (2020): Auge – Sehorgan. In: Gerhard Aumüller, Gabriela Aust, Arne Conrad, Jürgen Engele, Joachim Kirsch, Giovanni Maio et al. (Hg.): *Duale Reihe Anatomie. 5., korrigierte Auflage*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S. 1049–1073. Online verfügbar unter https://eref.thieme.de/ebooks/cs_11350838#/ebook_cs_11350838_cs16744, zuletzt geprüft am 03.06.2020.

Kiser, Philip D.; Golczak, Marcin; Palczewski, Krzysztof (2014): Chemistry of the retinoid (visual) cycle. In: *Chemical reviews* 114 (1), S. 194–232. DOI: 10.1021/cr400107q.

Kitiratschky, Veronique B. D.; Grau, Tanja; Bernd, Antje; Zrenner, Eberhart; Jägle, Herbert; Renner, Agnes B. et al. (2008): ABCA4 gene analysis in patients with autosomal recessive cone and cone rod dystrophies. In: *European Journal of Human Genetics* 16 (7), S. 812–819. DOI: 10.1038/ejhg.2008.23.

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.

Kolb, Helga (2005a): *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* [Internet]. Photoreceptors. Hg. v. Helga Kolb, Eduardo Fernandez und Ralph Nelson. University of Utah Health Sciences Center. Salt Lake City (UT). Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11522/>, zuletzt aktualisiert am 28.02.2012., zuletzt geprüft am 03.06.2020.

Kolb, Helga (2005b): *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* [Internet]. Simple Anatomy of the Retina. Hg. v. Helga Kolb, Eduardo Fernandez und Ralph Nelson. University of Utah Health Sciences Center. Salt Lake City (UT). Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11533/>, zuletzt aktualisiert am 31.01.2012., zuletzt geprüft am 03.06.2020.

Lang, Gabriele E.; Lang, Gerhard K. (2019): *Netzhaut (Retina)*. In: Gerhard K. Lang (Hg.): *Augenheilkunde. 6., überarbeitete Auflage*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S. 224–270. Online verfügbar unter https://eref.thieme.de/ebooks/2465423#/ebook_2465423_SL91979757, zuletzt geprüft am 03.06.2020.

- Li, Kai; Wang, Gang; Andersen, Troels; Zhou, Pingzhu; Pu, William T. (2014): Optimization of genome engineering approaches with the CRISPR/Cas9 system. In: *PloS one* 9 (8), e105779. DOI: 10.1371/journal.pone.0105779.
- Li, Xuan; Heyer, Wolf-Dietrich (2008): Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. In: *Cell research* 18 (1), S. 99–113. DOI: 10.1038/cr.2008.1.
- 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.
- Liu, Guanqing; Zhang, Yong; Zhang, Tao (2020): Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. In: *Computational and structural biotechnology journal* 18, S. 35–44. DOI: 10.1016/j.csbj.2019.11.006.
- Lone, Bilal Ahmad; Karna, Shibendra Kumar Lal; Ahmad, Faiz; Shahi, Nerina; Pokharel, Yuba Raj (2018): CRISPR/Cas9 System: A Bacterial Tailor for Genomic Engineering. In: *Genetics research international* 2018, S. 1–17. DOI: 10.1155/2018/3797214.
- Maugeri, A.; van Driel, M. A.; van de Pol, D. J.; Klevering, B. J.; van Haren, F. J.; Tijmes, N. et al. (1999): The 2588G→C mutation in the ABCR gene is a mild frequent founder mutation in the Western European population and allows the classification of ABCR mutations in patients with Stargardt disease. In: *American journal of human genetics* 64 (4), S. 1024–1035. DOI: 10.1086/302323.
- McClements, Michelle E.; Barnard, Alun R.; Singh, Mandeep S.; Charbel Issa, Peter; Jiang, Zhichun; Radu, Roxana A.; MacLaren, Robert E. (2019): An AAV Dual Vector Strategy Ameliorates the Stargardt Phenotype in Adult *Abca4*^{-/-} Mice. In: *Human gene therapy* 30 (5), S. 590–600. DOI: 10.1089/hum.2018.156.
- 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.
- Mense, Siegfried (2020): Visuelles System. In: Gerhard Aumüller, Gabriela Aust, Arne Conrad, Jürgen Engele, Joachim Kirsch, Giovanni Maio et al. (Hg.): *Duale Reihe Anatomie. 5., korrigierte Auflage*: Georg Thieme Verlag, S. 1181–1262. Online verfügbar unter https://eref.thieme.de/ebooks/cs_11350838#/ebook_cs_11350838_cs19340, zuletzt geprüft am 03.06.2020.
- Mustafi, Debarshi; Engel, Andreas H.; Palczewski, Krzysztof (2009): Structure of cone photoreceptors. In: *Progress in retinal and eye research* 28 (4), S. 289–302. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2009.05.003.
- Nash, Benjamin M.; Wright, Dale C.; Grigg, John R.; Bennetts, Bruce; Jamieson, Robyn V. (2015): Retinal dystrophies, genomic applications in diagnosis and prospects for therapy. In: *Translational pediatrics* 4 (2), S. 139–163. DOI: 10.3978/j.issn.2224-4336.2015.04.03.
- Naso, Michael F.; Tomkowicz, Brian; Perry, William L.; Strohl, William R. (2017): Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. In: *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 31 (4), S. 317–334. DOI: 10.1007/s40259-017-0234-5.

- Nishiguchi, Koji M.; Fujita, Kosuke; Miya, Fuyuki; Katayama, Shota; Nakazawa, Toru (2020): Single AAV-mediated mutation replacement genome editing in limited number of photoreceptors restores vision in mice. In: *Nature communications* 11 (1), S. 482. DOI: 10.1038/s41467-019-14181-3.
- Nishiyama, Jun; Mikuni, Takayasu; Yasuda, Ryohei (2017): Virus-Mediated Genome Editing via Homology-Directed Repair in Mitotic and Postmitotic Cells in Mammalian Brain. In: *Neuron* 96 (4), 755-768.e5. DOI: 10.1016/j.neuron.2017.10.004.
- Novartis (2019): Fachinformationen: Luxturna® 5 × 10¹² Vektorgenome/ml Konzentrat und Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektionslösung. Novartis Pharma GmbH. Nürnberg. Online verfügbar unter <https://klinischeforschung.novartis.de/dokumente/fachinformationen-luxturna-5-x-1012-vektorgenome-ml-konzentrat-und-loesungsmittel-zur-herstellung-einer-injektionsloesung/>, zuletzt aktualisiert am 12.2019, zuletzt geprüft am 20.10.2020.
- Palczewski, Krzysztof (2014): Chemistry and biology of the initial steps in vision: the Friedenwald lecture. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 55 (10), S. 6651–6672. DOI: 10.1167/iovs.14-15502.
- Pedde, 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.
- Pfleger, Kevin D. G.; Eidne, Karin A. (2006): Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). In: *Nature methods* 3 (3), S. 165–174. DOI: 10.1038/nmeth841.
- Pfleger, Kevin D. G.; Seeber, Ruth M.; Eidne, Karin A. (2006): Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the real-time detection of protein-protein interactions. In: *Nature protocols* 1 (1), S. 337–345. DOI: 10.1038/nprot.2006.52.
- Puig, Marta; Casillas, Sònia; Villatoro, Sergi; Cáceres, Mario (2015): Human inversions and their functional consequences. In: *Brief Funct Genomics* 14 (5), S. 369–379. DOI: 10.1093/bfpg/elv020.
- Puppo, A.; Cesi, G.; Marrocco, E.; Piccolo, P.; Jacca, S.; Shayakhmetov, D. M. et al. (2014): Retinal transduction profiles by high-capacity viral vectors. In: *Gene Ther* 21 (10), S. 855–865. DOI: 10.1038/gt.2014.57.
- Quazi, Faraz; Lenevich, Stepan; Molday, Robert S. (2012): ABCA4 is an N-retinylidene-phosphatidylethanolamine and phosphatidylethanolamine importer. In: *Nature communications* 3, S. 925. DOI: 10.1038/ncomms1927.
- Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Wright, Jason; Agarwala, Vineeta; Scott, David A.; Zhang, Feng (2013): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. In: *Nature protocols* 8 (11), S. 2281–2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143.
- Ranjha, Lepakshi; Howard, Sean M.; Cejka, Petr (2018): Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. In: *Chromosoma* 127 (2), S. 187–214. DOI: 10.1007/s00412-017-0658-1.
- Ren, Xingjie; Yang, Zhihao; Xu, Jiang; Sun, Jin; Mao, Decai; Hu, Yanhui et al. (2014): Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA parameters in *Drosophila*. In: *Cell reports* 9 (3), S. 1151–1162. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.09.044.

- Rivera, A.; White, K.; Stöhr, H.; Steiner, K.; Hemmrich, N.; Grimm, T. et al. (2000): A comprehensive survey of sequence variation in the ABCA4 (ABCR) gene in Stargardt disease and age-related macular degeneration. In: *American journal of human genetics* 67 (4), S. 800–813. DOI: 10.1086/303090.
- Sakuma, Tetsushi; Nakade, Shota; Sakane, Yuto; Suzuki, Ken-Ichi T.; Yamamoto, Takashi (2016): MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. In: *Nature protocols* 11 (1), S. 118–133. DOI: 10.1038/nprot.2015.140.
- Savic, Natasa; Ringnalda, Femke Cas; Lindsay, Helen; Berk, Christian; Bargsten, Katja; Li, Yizhou et al. (2018): Covalent linkage of the DNA repair template to the CRISPR-Cas9 nuclease enhances homology-directed repair. In: *eLife* 7, e33761. DOI: 10.7554/eLife.33761.
- Sentmanat, Monica F.; Peters, Samuel T.; Florian, Colin P.; Connelly, Jon P.; Pruett-Miller, Shondra M. (2018): A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 888. DOI: 10.1038/s41598-018-19441-8.
- Seol, Ja-Hwan; Shim, Eun Yong; Lee, Sang Eun (2018): Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. In: *Mutation research* 809, S. 81–87. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2017.07.002.
- Sfeir, Agnel; Symington, Lorraine S. (2015): Microhomology-Mediated End Joining: A Back-up Survival Mechanism or Dedicated Pathway? In: *Trends in biochemical sciences* 40 (11), S. 701–714. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.08.006.
- Slaymaker, 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.
- Smith, Alexander J.; Schlichtenbrede, Frank C.; Tschernutter, Marion; Bainbridge, James W.; Thrasher, Adrian J.; Ali, Robin R. (2003): AAV-Mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 8 (2), S. 188–195. DOI: 10.1016/S1525-0016(03)00144-8.
- Song, Fei; Stieger, Knut (2017): Optimizing the DNA Donor Template for Homology-Directed Repair of Double-Strand Breaks. Vol 7. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 7, S. 53–60. DOI: 10.1016/j.omtn.2017.02.006.
- Sparrow, Janet R.; Wu, Yalin; Kim, Chul Y.; Zhou, Jilin (2010): Phospholipid meets all-trans-retinal: the making of RPE bisretinoids. In: *Journal of lipid research* 51 (2), S. 247–261. DOI: 10.1194/jlr.R000687.
- Strauss, Olaf (2005): The retinal pigment epithelium in visual function. In: *Physiological reviews* 85 (3), S. 845–881. DOI: 10.1152/physrev.00021.2004.
- Strauss, Olaf (2011): Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]. The Retinal Pigment Epithelium. Hg. v. Helga Kolb, Eduardo Fernandez und Ralph Nelson. University of Utah Health Sciences Center. Salt Lake City (UT). Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54392/>, zuletzt geprüft am 03.06.2020.
- Stumpf, Constanze; Wimmer, Tobias; Lorenz, Birgit; Stieger, Knut (2020): Creation of different bioluminescence resonance energy transfer based biosensors with high affinity to VEGF. In: *PLoS one* 15 (3), e0230344. DOI: 10.1371/journal.pone.0230344.

- Surre, Jérémy; Saint-Ruf, Claude; Collin, Valérie; Orenga, Sylvain; Ramjeet, Mahendrasingh; Matic, Ivan (2018): Strong increase in the autofluorescence of cells signals struggle for survival. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 12088. DOI: 10.1038/s41598-018-30623-2.
- Taleei, Reza; Nikjoo, Hooshang (2013): Biochemical DSB-repair model for mammalian cells in G1 and early S phases of the cell cycle. In: *Mutation research* 756 (1-2), S. 206–212. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.06.004.
- Tanna, Preena; Strauss, Rupert W.; Fujinami, Kaoru; Michaelides, Michel (2017): Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. In: *The British journal of ophthalmology* 101 (1), S. 25–30. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2016-308823.
- Tessitore, Alessandra; Parisi, Fabiana; Denti, Michela Alessandra; Allocca, Mariacarmela; Di Vicino, Umberto; Domenici, Luciano et al. (2006): Preferential silencing of a common dominant rhodopsin mutation does not inhibit retinal degeneration in a transgenic model. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 14 (5), S. 692–699. DOI: 10.1016/j.ymthe.2006.07.008.
- Trapani, Ivana; Banfi, Sandro; Simonelli, Francesca; Surace, Enrico M.; Auricchio, Alberto (2015a): Gene therapy of inherited retinal degenerations: prospects and challenges. In: *Human gene therapy* 26 (4), S. 193–200. DOI: 10.1089/hum.2015.030.
- Trapani, Ivana; Puppo, Agostina; Auricchio, Alberto (2014): Vector platforms for gene therapy of inherited retinopathies. In: *Progress in retinal and eye research* 43, S. 108–128. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2014.08.001.
- Trapani, Ivana; Toriello, Elisabetta; Simone, Sonia de; Colella, Pasqualina; Iodice, Carolina; Polishchuk, Elena V. et al. (2015b): Improved dual AAV vectors with reduced expression of truncated proteins are safe and effective in the retina of a mouse model of Stargardt disease. In: *Human molecular genetics* 24 (23), S. 6811–6825. DOI: 10.1093/hmg/ddv386.
- Tsybovsky, Yaroslav; Molday, Robert S.; Palczewski, Krzysztof (2010): The ATP-binding cassette transporter ABCA4: structural and functional properties and role in retinal disease. In: *Advances in experimental medicine and biology* 703, S. 105–125. DOI: 10.1007/978-1-4419-5635-4_8.
- Uhrmann, Matthias Fritz; Lorenz, Birgit; Gissel, Christian (2020): Cost Effectiveness of Voretigene Neparvovec for RPE65-Mediated Inherited Retinal Degeneration in Germany. In: *Translational Vision Science & Technology* 9 (9), 17. DOI: 10.1167/tvst.9.9.17.
- Wang, Dan; Gao, Guangping (2014): State-of-the-art human gene therapy: part II. Gene therapy strategies and clinical applications. In: *Discovery medicine* 18 (98), S. 151–161.
- 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.
- Weng, Jian; Mata, Nathan L.; Azarian, Sassan M.; Tzekov, Radouil T.; Birch, David G.; Travis, Gabriel H. (1999): Insights into the Function of Rim Protein in Photoreceptors and Etiology of Stargardt's Disease from the Phenotype in *abcr* Knockout Mice. In: *Cell* 98 (1), S. 13–23. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80602-9.

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 (2018): Entwicklung eines Systems zur Kontrolle des „Vascular Endothelial Growth Factor“ Spiegels im Auge. Dissertation. Justus-Liebig-Universität, Gießen. Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde, Labor für experimentelle Ophthalmologie. Online verfügbar unter <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2019/13957/>, zuletzt geprüft am 15.04.2020.

Wimmer, Tobias; Bonthu, Dileep; Moeschl, Vincent; Stumpf, Constanze; Klekamp, Philip; Thiel, Christian et al. (2020 in Revision): A Bioluminescence Resonance Energy Transfer based Reporter for the precise determination of non-homologous end joining DNA repair events. Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde; Justus-Liebig-Universität Gießen.

Wu, Zhijian; Yang, Hongyan; Colosi, Peter (2010): Effect of genome size on AAV vector packaging. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (1), S. 80–86. DOI: 10.1038/mt.2009.255.

Xiao, Qing; Min, Taishan; Ma, Shuangping; Hu, Lingna; Chen, Hongyan; Lu, Daru (2018): Intracellular generation of single-strand template increases the knock-in efficiency by combining CRISPR/Cas9 with AAV. In: *Molecular genetics and genomics : MGG* 293 (4), S. 1051–1060. DOI: 10.1007/s00438-018-1437-2.

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.

Yanik, Mert; Ponnam, Surya Prakash Goud; Wimmer, Tobias; Trimborn, Lennart; Müller, Carina; Gambert, Isabel et al. (2018): Development of a Reporter System to Explore MMEJ in the Context of Replacing Large Genomic Fragments. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 11, S. 407–415. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.03.010.

Zhang, Xiao-Hui; Tee, Louis Y.; Wang, Xiao-Gang; Huang, Qun-Shan; Yang, Shi-Hua (2015): Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 4 (11), e264. DOI: 10.1038/mtna.2015.37.

11 Publikationsverzeichnis

Posterpräsentationen

Stieger K. , Maximovici A. , Wimmer T.: “Therapeutic Genome Editing Approach to Replace Large DNA Sequences in the Murine Abca4 Gene”
23rd Annual Meeting of the American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT),
12. – 15.05.2020, Virtual Meeting

Abstract

Stieger K. , Maximovici A. , Wimmer T.: “Therapeutic Genome Editing Approach to Replace Large DNA Sequences in the Murine Abca4 Gene”
2020 ASGCT Annual Meeting Abstracts
Volume 28, ISSUE 4, SUPPLEMENT 1, 1 – 592, April 28, 2020

12 Erklärung zur Dissertation

„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 nachstehendspezifiziert. 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

13 Danksagung

Zuerst möchte ich mich vor allem bei Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger bedanken, für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit, die fachliche Unterstützung und die hervorragende Betreuung.

Ein großer Dank geht an Herrn Dr. Tobias Wimmer, für die Einarbeitung in die Laborarbeit, ein ständig offenes Ohr bei Fragen jeder Art und der wissenschaftlichen Betreuung dieser Arbeit.

Frau Prof. em. Dr. Birgit Lorenz und Herrn Lyubomyr Lytvynchuk MD, PhD danke ich für die Bereitstellung der Labor- und Büroräume.

Weiterhin möchte ich Frau Annabella Janise-Libawski danken für die Hilfestellung bei jeglichen Fragen und Problemen, die im Labor oder bei den Versuchen aufkamen, sowie für die vielen Anregungen und interessanten Gespräche.

Bei Herrn PD Dr. Markus Preising, Frau Dr. Brigitte Müller, Frau Constanze Stumpf und Frau Maria Weller bedanke ich mich für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und die Beantwortung vieler Fragen.

Des Weiteren geht mein Dank an alle Mitarbeiter*innen der AG Experimentelle Ophthalmologie. Durch die angenehme Atmosphäre, einem ständigen angeregten wissenschaftlichen Austausch sowie die Hilfsbereitschaft und Unterstützung im Team hat die Arbeit im Labor und Büro sehr viel Freude gemacht.

Schließlich möchte ich meinen Eltern und meinem Freund für die Unterstützung und die vielen aufbauenden Worte während dieser gesamten Zeit danken und die mich in stressigen Phasen immer wieder aufgefangen haben.