

**Analyse der DNA-Reparaturmechanismen
nach therapeutischer Genomeditierung
mittels induzierbarer Cas9 Endonuklease in vitro**

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

vorgelegt von **Türk, Franziska Maria**
aus Starnberg

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Gutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann

Tag der Disputation: 06.10.2025

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Aufbau des menschlichen Auges.....	1
1.2 Erbllich bedingte Netzhautdegenerationen.....	2
1.3 Therapeutische Optionen bei erblich bedingten Netzhauterkrankungen.....	3
1.4 Therapeutisches <i>Genome Editing</i>	4
1.5 Endonukleasen.....	5
1.5.1 Zinkfinger-Nukleasen und TALENs	5
1.5.2 CRISPR/Cas	6
1.6 DNA-Reparaturmechanismen	8
1.6.1 NHEJ	9
1.6.2 MMEJ.....	10
1.6.3 HDR	10
1.7 Reportersystem BRET.....	11
1.8 iPSCs als intermediäres System	13
1.9 <i>Inducible neurogenin</i> (iNGN) Zelllinie.....	16
1.10 Induzierbares Cas-System	16
1.11 Zielsetzung.....	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Geräteliste.....	19
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3 Chemikalien	22
2.1.4 Puffer und Lösungen	23
2.1.5 Antibiotika.....	24
2.1.6 Enzyme und Marker	25
2.1.7 Plasmide und Vektoren	26

2.1.8 Oligonukleotide und Primer	31
2.1.9 Kits	32
2.1.10 Bakterienstämme	32
2.1.11 Medien für bakterielle Kulturen	32
2.1.12 Zelllinien	33
2.1.13 Medien für eukaryotische Zellkultur	34
2.1.14 Software	35
2.2 Methoden	36
2.2.1 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden.....	36
2.2.1.1 Restriktionsverdau.....	36
2.2.1.2 Primer Hybridisierung.....	36
2.2.1.3 Ligation	37
2.2.1.4 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E.coli</i>	37
2.2.1.5 Kultivierung <i>E.coli</i>	38
2.2.1.6 Plasmidisolation	38
2.2.1.7 Analyseverdau	39
2.2.1.8 Agarose Gelelektrophorese	40
2.2.1.9 DNA-Sequenzierung	40
2.2.1.10 Herstellung von Glycerolstocks	41
2.2.1.11 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	41
2.2.1.12 iCas-Klonierung Überblick	41
2.2.2 Zellbiologische Methoden.....	42
2.2.2.1 Kultivierung HEK293-T-Zellen.....	42
2.2.2.2 Kultivierung iNGNs	43
2.2.2.3 Kryokonservierung der iNGN Zellen.....	43
2.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl	43
2.2.2.5 Transfektion HEK293-T-Zellen.....	44

2.2.2.6 Transfektion iNGNs	45
2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie.....	46
2.2.4 Proteinchemische Methoden	46
2.2.4.1 Zellyse	46
2.2.4.2 BRET-Assay.....	46
2.2.4.3 Durchflusszytometrie	48
2.2.5 Statistik.....	48
3. Ergebnisse	49
3.1 Überprüfung der Funktionalität von Cas9 und BRET-Reportersystem in HEK293-T-Zellen	49
3.1.1 Quantifizierung der Schneideaktivität nach Cotransfektion in HEK293-T-Zellen mittels BRET-Assay	53
3.1.2 Durchflusszytometrische Analyse der Schneideaktivität.....	55
3.2 Klonierung von iCas9-System mit Guide-Sequenzen	56
3.3 Optimierung der 4-Hydroxytamoxifen Induktion der Cas9-Expression	58
3.4 Überprüfung der Funktionalität der klonierten gRNA/iCas-Plasmide.....	59
3.5 Überprüfung der Funktionalität von Cas9 und BRET-Reportersystem in iNGNs	65
4. Diskussion	68
5. Zusammenfassung.....	78
6. Summary	79
7. Abkürzungsverzeichnis	80
8. Abbildungsverzeichnis	83
9. Tabellenverzeichnis.....	85
10. Literaturverzeichnis.....	86
11. Publikationsverzeichnis.....	95
12. Erklärung zur Dissertation	96
13. Danksagung.....	97

1. Einleitung

1.1 Aufbau des menschlichen Auges

Das menschliche Auge, genauer der Augapfel (*Bulbus oculi*), umfasst drei Schichten. Die äußere Schicht (*Tunica fibrosa bulbi*) dient der Stabilisierung, während die mittlere Schicht (*Tunica vascula bulbi*, Uvea) gefäßführend ist. Die innere Schicht (*Tunica interna bulbi*, Retina), auch als Netzhaut bezeichnet, beinhaltet die Nervenzellen (Aumüller et al. 2020).

Die Netzhaut besteht aus unterschiedlichen Schichten und verarbeitet optische Informationen in neuronale Impulse, welche im Gehirn verarbeitet werden und zu visueller Wahrnehmung führen (Bergua 2017). Sie unterteilt sich in ein *Stratum pigmentosum retinae* (retinales Pigmentepithel, RPE), welches zum einen für den Stoffwechsel zwischen Choroidea und Photorezeptoren verantwortlich ist und zum anderen für die Regeneration des Lichtsensors 11-cis-Retinal sorgt (Grehn 2019; Aumüller et al. 2020). Das *Stratum nervosum retinae* beinhaltet die ersten drei Neurone der Sehbahn. Neben den bipolaren Photorezeptoren spielen auch Bipolarzellen und Ganglienzellen für die Weiterleitung und Verarbeitung der Signale eine entscheidende Rolle. Die Photorezeptoren stellen das erste Neuron in der Signalkaskade dar und sind überwiegend für die Phototransduktion verantwortlich. Es können helligkeitsempfindliche Stäbchen von farbempfindlichen Zapfen unterschieden werden. Während Zapfen für das Farbsehen sowie das Sehen bei Tageslicht verantwortlich sind und überwiegend in zentralen Anteilen der Netzhaut zu finden sind, sind Zapfen peripher für das Dämmerungs- und Nachtsehen entscheidend. Die Bipolarzellen stellen das zweite Neuron dar, welches über Synapsen und *Gap Junctions* an der Weitergabe der Information beteiligt ist. Es erfolgt dabei eine vertikale Verschaltung über Bipolarzellen und eine horizontale Verschaltung über Horizontal- und amakrine Zellen. Das dritte Neuron wird durch Gliazellen gebildet, welche mit ihrem Axon in den Nervus opticus münden und zum visuellen Kortex im Gehirn ziehen (Aumüller et al. 2020; Grehn 2019; Schünke et al. 2022). Durch die Blut-Retina-Schranke zwischen RPE und Endothel der Retinakapillaren entsteht eine Barriere zwischen der Netzhaut und dem Blut, welche den Übertritt von hydrophilen Stoffen oder Toxinen verhindert. Somit resultiert ein funktionell separates Kompartiment, das nur in geringem Maße mit dem systemischen Kreislauf interagiert (Walter de Gruyter & Co 2020).

1.2 Erblich bedingte Netzhautdegenerationen

Erblich bedingte Netzhauterkrankungen sind eine Gruppe von neurodegenerativen, heterogenen und klinisch komplexen Erkrankungen, die von einer Abnahme des Visus bis hin zur Blindheit führen können (Schneider et al. 2022). Insgesamt beläuft sich die Zahl der von einer erblich bedingten Netzhaut-, Aderhaut- oder Sehbahnerkrankung betroffenen Menschen in Deutschland auf ca. 45.000 bis 80.000 (ProRetina 2022). Man geht davon aus, dass weltweit ca. 5,5 Millionen Menschen an *Inherited retinal diseases* (IRDs) leiden, was einer Prävalenz von 1/3000 Menschen entspricht (Ben-Yosef 2022).

Die Grundlage von erblich bedingten Netzhauterkrankungen ist meist eine Genmutation, welche zu einem Funktionsverlust des kodierten Proteins führt. Im Fall der erblich bedingten Netzhautdegenerationen können unterschiedliche Bestandteile der Netzhaut betroffen sein, was zur Erkrankung der Netzhaut führen kann (Grehn 2006). Die Vererbung von Mutationen kann autosomal-dominant, autosomal-rezessiv oder X-chromosomal erfolgen. Je nach Erbgang führt dies zu unterschiedlichen Schweregraden der Krankheitsverläufe (Kellner et al. 2012). Nach heutigem Stand sind Mutationen in über 280 netzhautspezifischen Genen bekannt, welche mit einer Netzhautdegeneration assoziiert sind (RetNet 2023). Die Unterscheidung der verschiedenen Formen der Netzhauterkrankungen basiert auf der primären zellulären Beteiligung (Stäbchen, Zapfen, retinales Pigmentepithel) sowie auf der lokalen Ausbreitung der Erkrankung (peripher oder zentral) (Ziccardi et al. 2019). Eine der häufigsten IRDs ist die Retinitis pigmentosa (RP). Andere Formen sind unter anderem die Zapfen-Stäbchen-Dystrophien, die kongenitale Leber-Amaurose und vererbte Makuladystrophien (Ben-Yosef 2022). Auch lysosomale Speicherkrankheiten fallen in diesen Bereich und führen neben einem Sehkraftverlust zu kognitiven Störungen (Mirza et al. 2019).

Aufgrund der klinischen und genetischen Heterogenität dieser Erkrankungen ist eine exakte Diagnosestellung oftmals schwierig (Schneider et al. 2022). Auch wenn sich die Anfangssymptomatik oft sehr unspezifisch darstellt, ist eine frühzeitige Diagnosestellung entscheidend, um einen frühen Therapiebeginn zu ermöglichen (Kellner et al. 2012). Für die Entwicklung von gezielten Therapien ist es essenziell, das betroffene Gen sowie die entsprechende Mutation zu identifizieren und zu untersuchen, um den Sehkraftverlust zu verlangsamen bzw. die Sehkraft wiederherstellen zu können (Duncan et al. 2018).

1.3 Therapeutische Optionen bei erblich bedingten Netzhauterkrankungen

Für die Behandlung erblich bedingter Netzhauterkrankungen existieren unterschiedliche therapeutische Ansätze, die von der Kenntnis der genetischen Ursache sowie vom Fortschreiten der Erkrankung abhängen. Die Bandbreite an Therapieoptionen erstreckt sich von Netzhautprothesen über Zelltherapien oder optogenetische Verfahren bis hin zu genetischen Therapieansätzen (Vázquez-Domínguez et al. 2019). Solche Therapieansätze werden bei bekannter genetischer Ursache in den ersten Phasen der Erkrankung eingesetzt. Bei fortschreitender Erkrankung und Abnahme der Kenntnis über die Pathogenese werden hingegen vermehrt Zelltherapien, Netzhautprothesen oder Implantate eingesetzt (Abb.1) (Vázquez-Domínguez et al. 2019).

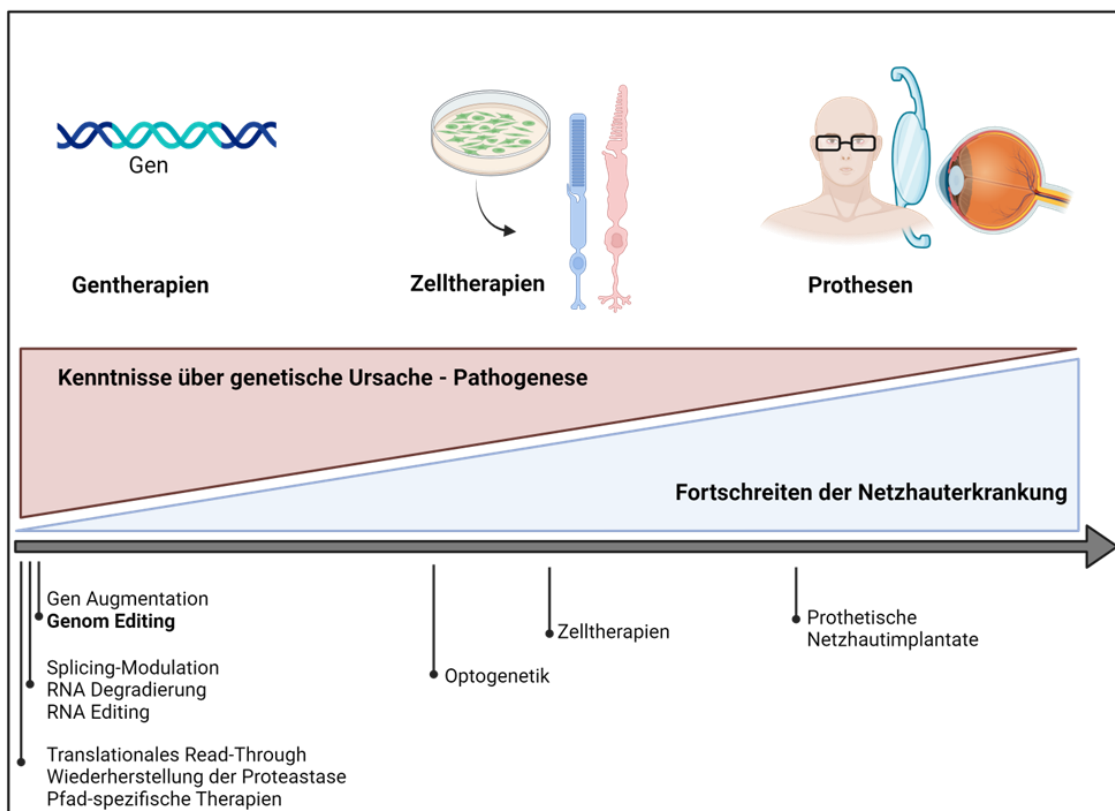


Abbildung 1: Schematische Darstellung therapeutischer Optionen erblich bedingter Netzhauterkrankungen. Dargestellt werden die unterschiedlichen therapeutischen Optionen in Bezug auf den Beginn und das Voranschreiten der Erkrankung. Erstellt mit BioRender.com und angelehnt an die Abbildung von Vázquez-Domínguez et al. von 2019.

Unter die genetischen Therapieoptionen fällt auch die *Gene Augmentation*, bei der eine funktionsfähige Kopie des betroffenen Gens eingebracht wird, um so die Expression wiederherzustellen. Das Einbringen des funktionsfähigen Gens erfolgt meist mittels eines viralen Vektors, vorzugsweise Adeno-assoziierte Vektoren (AAV) oder lentivirale Vektoren (LV) (Gasparini et al. 2019). Die Applikation des Vektors kann durch intravitreale oder subretinale Injektion erfolgen (Sanjurjo-Soriano und Kalatzis 2018). Die Integration des korrigierten Gens in die Zelle zielt darauf ab, die Mutation in der genomischen DNA-Sequenz zu korrigieren, was man als *Genome Editing* oder *Genome Surgery* bezeichnet. Diese Form der Therapie ermöglicht einen neuen Ansatz in Bezug auf genetische vererbte Erkrankungen (Hu et al. 2021). Eine mutationsunabhängige Therapieform stellt die Zellaustausch- bzw. Zellersatztherapie dar. Hierbei kommen aus Stammzellen differenzierte Zellen zum Einsatz, um die zuvor degenerierten Zellen zu ersetzen (Battu et al. 2022).

Mit dem Voranschreiten der Erkrankung verändern sich auch die Therapiemöglichkeiten. Eine Möglichkeit für die Behandlung bereits leicht vorangeschrittener Erkrankung ist die Optogenetik, welche auf mikrobiellen Opsinen basiert. Diese erhöhen die Lichtempfindlichkeit in den noch verbleibenden Netzhautzellen (Gasparini et al. 2019). Für die Behandlung der späteren Phasen werden häufig retinale Prothesen verwendet. Hierfür wird eine künstliche Vorrichtung verwendet, die Lichtenergie erkennt und in ein elektrisches Signal umwandelt, welches an die nicht-betroffenen Bereiche der inneren Netzhautneuronen weitergeleitet wird. Ziel dieser Behandlungsform ist die Aktivierung der Sehbahn, wodurch jedoch nur eine geringe Verbesserung der Sehfunktionen und Schärfe erreicht werden kann (Lin et al. 2015).

1.4 Therapeutisches *Genome Editing*

Das *Genome Editing* bietet die Möglichkeit einer partiellen Veränderung der DNA, weshalb es im Bereich der monogenen Erkrankungen einen vielversprechenden Therapieansatz darstellt (Pasquini et al. 2020). Für die Veränderung der genomischen DNA muss zunächst mithilfe von spezifischen Endonukleasen ein Doppelstrangbruch oder Einzelstrangbruch im Bereich der Mutationssequenz erzeugt werden. Im nächsten Schritt werden die zelleigenen Reparaturmechanismen wie *Non-homologous end joining* (NHEJ), *Homology-directed repair* (HDR) oder *Microhomology-mediated end joining* (MMEJ)

genutzt, um die mutierte Sequenz zu entfernen und zu ersetzen (Yanik et al. 2017). Die direkte Veränderung der mutierten DNA-Sequenz stellt eine besonders interessante Therapieoptionen für angeborene Erkrankungen dar, da die Korrektur unmittelbar in der DNA des Patienten stattfinden kann (Sanjurjo-Soriano und Kalatzis 2018).

1.5 Endonukleasen

Endonukleasen, die Werkzeuge der Genomeditierung, spalten hydrolytisch DNA oder RNA und erzeugen damit einen Doppelstrang- oder Einzelstrangbruch. Die am häufigsten verwendeten Nukleasen sind die Zink-Finger-Nukleasen (ZFN), *Transcription activator-like effector nucleases* (TALENs) und als neues Endonuklease-System *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR-Cas) (Chandrasegaran und Carroll 2016). Diese Nukleasen können so designt werden, dass sie genau dort binden, wo der Doppelstrangbruch erzeugt werden soll.

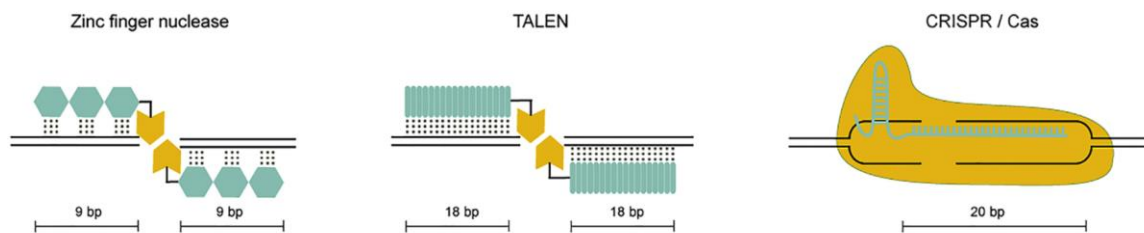


Abbildung 2: Schematische Darstellung der am häufigsten genutzten Endonukleasen und ihrer Funktionsbereiche. Die blauen Bereiche stellen die DNA-bindende Domäne dar, die gelben Bereiche die DNA-spaltenden Proteine. Die Länge der DNA-bindenden Sequenz ist schematisch in Basenpaaren (bp) dargestellt (Yanik et al. 2017).

1.5.1 Zinkfinger-Nukleasen und TALENs

In der Entwicklung der letzten Jahre haben sich vor allem ZFN, TALEN und CRISPR/Cas als zielführende Endonukleasen im Bereich der Genomeditierung herausgestellt.

Zink-Finger-Nukleasen bestehen aus einer DNA-Bindungsdomäne (Zink-Finger-Domäne) und einer katalytisch aktiven Nuklease-Domäne (Ben Jehuda et al. 2018). Im *Genome Editing* werden am häufigsten die Cys2-His2 ZFN verwendet, welche sich aus einer alpha-Helix und zwei beta-Helices zusammensetzen. Jeder Zink-Finger enthält 30 Aminosäuren und ermöglicht die Bindung von je drei Nukleotiden (Hung et al. 2016). Die

Kombination von mehreren Zink-Finger-Domänen ermöglicht das Erkennen einer längeren DNA-Sequenz (Mandell und Barbas 2006). Es werden zwei ZFN mit unterschiedlichen Bindungsdomänen für die DNA Spaltung benötigt, die jeweils am Gegenstrang mit einem Abstand von ca. 5-7 bp in umgekehrter Orientierung binden (Yanik et al. 2017).

TALENs bestehen wie ZFN aus einer sequenzspezifischen DNA-Bindungsdomäne, fusioniert mit einer DNA-spaltenden Nuklease-Domäne (Hung et al. 2016). Ebenso wie bei den ZFNs kommt hier die katalytische Einheit des Restriktionsenzym FokI zum Einsatz (Ran et al. 2013). Die Bindungsdomäne stammt ursprünglich aus dem *Proteobakterium Xanthomonas*. Eine TALEN entsteht, wenn die *Transcription Aktivator-Like Effektor* (TALE)-Domäne mit einer Nuklease fusioniert wird, um spezifische Sequenzen im Genom spalten zu können (Hung et al. 2016). TALENs enthalten aus 34 Aminosäuren bestehende repetitive Sequenzen, die sich immer nur in der 12. und 13. Aminosäure unterscheiden und so die spezifische Erkennung der Nukleotide in der DNA ermöglichen (Yanik et al. 2017). TALENs erkennen ihre aus zwei TALE-DNA-Bindungsstellen bestehenden Zielstellen, die eine 12- bis 20-bp-Spacer-Sequenz flankieren, welche von der FokI-Spaltungsdomäne erkannt wird (Gaj et al. 2016). Ein Nachteil der TALENs ist ihre Größe, welche die Transportmöglichkeiten mittels viraler Vektoren begrenzt (Hung et al. 2016).

Gemeinsam haben diese Endonukleasen, dass sie einen Doppelstrangbruch in der DNA herbeiführen und damit im Anschluss die zelleigenen Reparaturmechanismen in Gang setzen können (Peddle und MacLaren 2017).

1.5.2 CRISPR/Cas

Das CRISPR/Cas System stammt ursprünglich aus dem adaptiven Immunsystem von Prokaryoten und dient der Abwehr viraler DNA (Yanik et al. 2017). In den Bakterien wird die eingedrungene DNA fragmentiert, woraufhin Fragmente mit einer Länge von ca. 20 bp als Proto-Spacer zwischen kurze palindromische *Repeats* in das prokaryotische Genom integriert werden (Yanik et al. 2017). Diese Abschnitte der viralen DNA werden in eine CRISPR-RNA (crRNA) transkribiert. Die crRNA bildet einen Komplex mit einem zweiten RNA-Molekül, der trans-aktivierenden crRNA (tracrRNA). Dieser Komplex kann verknüpft mit dem CRISPR-assoziierten Protein 9 (Cas9) fremde DNA spalten. Sowohl die crRNA als auch die tracrRNA und Cas9 sind im bakteriellen Genom kodiert (Peddle und MacLaren 2017). Es existieren unterschiedliche CRISPR Systeme, Typ I bis

Typ III. Eines der am häufigsten verwendeten CRISPR-Systeme, das Typ II System, wovon auch die Cas9-Nuklease fällt, stammt aus dem Bakterium *Streptococcus pyogenes* (Ran et al. 2013). Die Cas9-Nuklease verarbeitet eine prä-crRNA, indem es zu einer Komplexbildung mit einer trans-aktivierenden crRNA (tracrRNA) kommt, welche komplementär zu den Wiederholungssequenzen in der prä-crRNA ist (Doudna und Charpentier 2014). Cas9-Proteine bilden also eine Familie von Enzymen, die eine basengepaarte Struktur zwischen der aktivierenden tracrRNA und der zielgerichteten crRNA benötigen, um einen DNA-Doppelstrangbruch zu erzeugen (Ran et al. 2013; Doudna und Charpentier 2014). Die sequenzspezifische Spaltung der DNA erfolgt an Stellen, die sowohl durch die Komplementarität der crRNA und der Ziel-Protospacer-DNA als auch durch ein kurzes Motiv, die sogenannte *protospacer adjacent motif* (PAM)- Sequenz, bestimmt werden, das an die komplementäre Region in der Ziel-DNA angrenzt (Jinek et al. 2012; Doudna und Charpentier 2014). Cas9 spaltet lediglich drei Basen stromaufwärts der PAM-Sequenz (NGG) (Jasin und Haber 2016).

Emanuelle Charpentier und Jennifer Doudna gelang es 2012, die crRNA und tracrRNA zu einer Leit-RNA, der single guide RNA (sgRNA)/ guide RNA (gRNA), zu fusionieren (Doudna und Charpentier 2014). Dies führte zu einer Vereinfachung in der Anwendung bei gleichbleibender Effizienz in Bezug auf die Erkennung und Bindung von Cas9 an die gewünschte DNA-Sequenz (Jinek et al. 2012).

Da durch die Verwendung von hochspezifischen sgRNAs ein zielgerichteter Doppelstrangbruch in jeder beliebigen Sequenz eingebracht werden kann, kann das CRISPR/Cas-System zur effizienten Genomeditierung in eukaryotischen Zellen genutzt werden (Abb.3) (Jinek et al. 2012). Dies eröffnet neue Möglichkeiten im Bereich der patientenspezifischen, therapeutischen und regenerativen Medizin. Zwar kann auch im CRISPR/Cas9-System eine *off-target*-Aktivität nicht vollkommen ausgeschlossen werden, allerdings kann diese durch Modifizierungen auf ein Minimum reduziert werden (Ran et al. 2013; Jinek et al. 2012). Die Abbildung 3 zeigt schematisch den Ablauf der Genomeditierung mittels CRISPR/Cas9. Zunächst erfolgt die Komplexbildung aus Cas9 und sgRNA inklusive der PAM-Sequenz. Es folgt die Identifikation der Targetsequenz und der DSB durch die Endonuklease. Anschließend werden die Brüche mittels zelleigenen Reparaturmechanismen wie NHEJ, HDR oder MMEJ repariert.

CRISPR/Cas9 Genome Editing

1) Cas9 und guide RNA

2) Identifikation und Spaltung der Ziel-DNA

3) Doppelstrangbruchreparatur

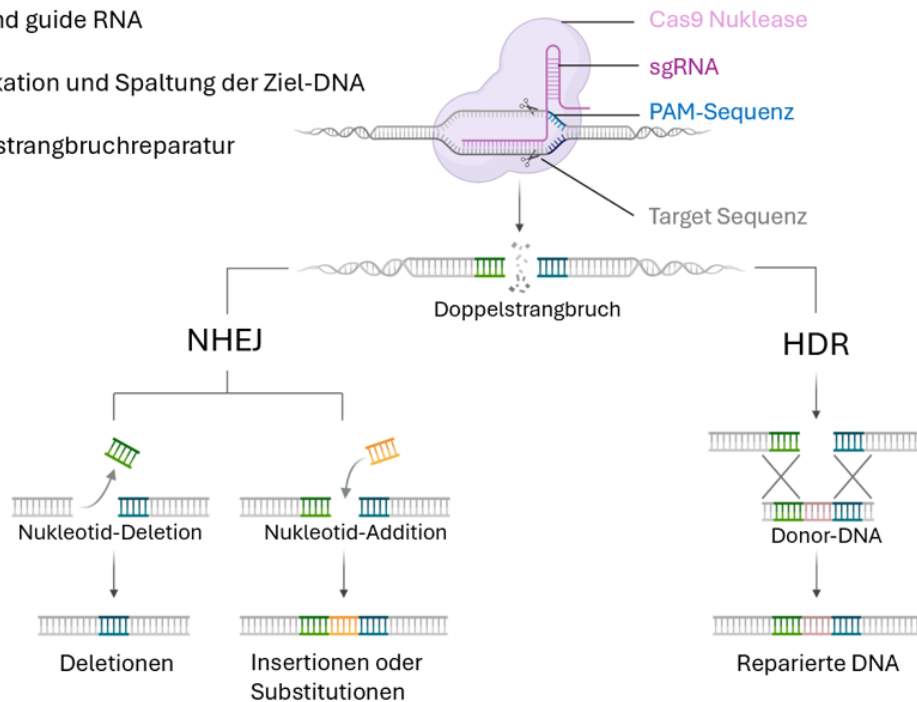


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems im *Genome Editing*. 1) bezieht sich auf den Ausgangskomplex aus Cas9 und sgRNA inklusive der PAM-Sequenz. 2) zeigt die Identifikation der Zielsequenz und den Doppelstrangbruch. 3) stellt schematisch einen Überblick über die Reparatur des DSB durch NHEJ oder HDR dar. Erstellt mit BioRender.com

1.6 DNA-Reparaturmechanismen

Wird die DNA beschädigt, sei es durch endogene Noxen wie reaktive Sauerstoffspezies, durch exogene Noxen wie ionisierende Strahlung oder explizit eingebrachte Endonukleasen, folgt bei einem Doppelstrangbruch die Aktivierung des zelleigenen Reparaturmechanismus, um die Genomstabilität aufrechtzuerhalten und die Tumorbildung zu unterdrücken (Chatterjee und Walker 2017; Shrivastav et al. 2008). Es gibt eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen (Abb.4), wann jedoch welcher Reparaturmechanismus erfolgt, ist noch nicht endgültig geklärt. Entscheidend sind aber unter anderem die Zellzyklusphasen sowie die Regulation durch *cyclin dependent kinases* (CDKs) (Yanik et al. 2017). Die führenden Mechanismen sind das *Non-homologous end joining* (NHEJ) und *Homology-directed repair* (HDR) (Ben Jehuda et al. 2018). Eine Unterform des NHEJ stellt das alternative NHEJ dar, welches auch als MMEJ bekannt ist (vgl. Abb. 4) (Yanik et al. 2018). Jeder Reparaturweg bedarf unterschiedlicher Gruppen an Proteinen und Protein-

komplexen. Bis zur Reparatur ist also eine Kaskade an Proteinen und komplexen Botenstoffen notwendig, welche das Einsetzen der Reparatur durch ihre An- bzw. Abwesenheit deutlich beeinflussen können (Yanik et al. 2018; Shrivastav et al. 2008)

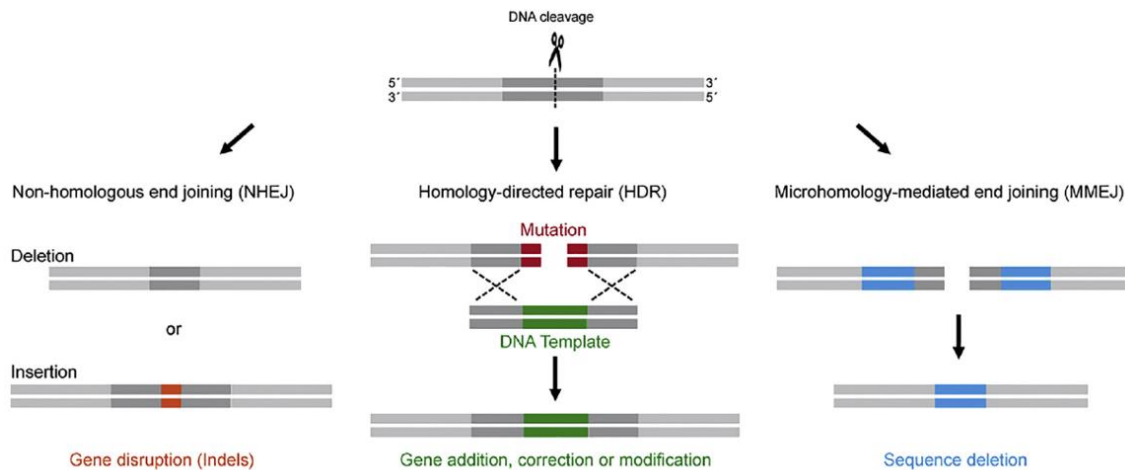


Abbildung 4: Schematische Darstellung von NHEJ, HDR und MMEJ. Grob aufgezeigt werden die unterschiedlichen Reparaturmechanismen und deren Resultate. NHEJ führt zu Deletionen oder Insertionen im Bereich des DSB (links). HDR benötigt ein homologes DNA-Templat (Schwesterchromatid), um eine fehlerfreie Korrektur zu erreichen (Mitte). MMEJ führt durch das Zurückschneiden bis zu Mikrohomologien zu Sequenzdeletionen (rechts) (Yanik et al. 2016).

1.6.1 NHEJ

NHEJ stellt den am häufigsten auftretenden Reparaturmechanismus von Doppelstrangbrüchen in einer eukaryotischen Zelle dar. Er ist in jeder Phase des Zellzyklus möglich, jedoch besonders effizient in der G1 Phase, solange noch kein Schwesterchromatid vorhanden ist (Lieber 2008; Wimmer et al. 2021). Das Tumorsuppressorprotein p53 spielt hierbei eine wichtige regulatorische Rolle und ist maßgeblich an der Rekrutierung der Proteine und Komplexe an den Doppelstrangbruch beteiligt (Chatterjee und Walker 2017). Nachdem p53 involviert ist, folgt dann die Bindung des Ku-Komplexes, bestehend aus Ku70 und Ku80, an den beiden Enden des Doppelstrangbruchs, um diese vor dem Abbau durch Exonukleasen zu schützen (Lieber 2008; Chatterjee und Walker 2017). Die offenen Enden werden durch Nukleasen (DNA-PKcs) prozessiert und im Verlauf mit Nukleotiden durch eine Polymerase (μ oder λ) aufgefüllt. Das Prozessieren der Enden und die Ligation erfolgt mittels einer speziellen DNA-Ligase, welche sich aus den Komponenten XLF, XRCC4 und der DNA-Ligase 4 zusammensetzt (Yang et al. 2020). Durch

Modifikation der DNA-Enden führt der Reparaturvorgang des NHEJ zu Insertionen und Deletionen in der Gensequenz, was meist mit einer Sequenzänderung einhergeht. Insgesamt ist NHEJ ein sehr schneller und effizienter Reparaturmechanismus (Yanik et al. 2017). Die Anpassungsfähigkeit des NHEJ ermöglicht die Reparatur eines breiten Spektrums von DNA-Doppelstrangbrüchen (Pasquini et al. 2020).

1.6.2 MMEJ

Der Reparaturmechanismus MMEJ erfordert Mikrohomologie-Regionen von 5-25 bp und bedarf anderer Proteine als das HDR (Yanik et al. 2017). Beim MMEJ werden kurze homologe Sequenzen auf beiden Seiten des Doppelstrangbruchs freigelegt, indem die DNA entsprechend weit zurückgeschnitten wird und anschließend die mikrohomologen Sequenzen miteinander rekombiniert werden. Dabei kommt es im Bereich der Reparaturstellen in Abwesenheit eines Templates zu größeren Deletionen, was zu einem höheren Mutationspotential führt (Xue und Greene 2021). In Anwesenheit eines DNA-Templates mit gleichen mikrohomologen Sequenzen kann aber die Information des Templates auch effizient ins Genom eingebaut werden. Jedoch birgt die Insertion und Deletion die Gefahr im Bereich von DNA-Sequenzen Stopcodons zu generieren mit anschließendem Ausfall bestimmter Funktionen (Ben Jehuda et al. 2018). MMEJ scheint bei sich teilenden Zellen während der M- und frühen S-Phase aktiv zu sein (Yanik et al. 2018). Da sich sowohl die benötigten Proteine und Komplexe als auch die Aktivität in der Zellzyklusphase zu HDR und NHEJ unterscheiden, stellt MMEJ einen alternativen Ansatz für das *Genome Editing* im therapeutischen Bereich dar (Yanik et al. 2018).

1.6.3 HDR

Die homologievermittelte Reparatur (*homology directed repair*, HDR) stellt einen nahezu fehlerfreien Reparaturmechanismus für Doppelstrangbrüche dar und wird auch als *High-Fidelity*-Reparaturweg bezeichnet (Xue und Greene 2021). Entscheidend für eine fehlerfreie homologe Rekombination ist das Vorhandensein einer homologen DNA-Vorlage (Xue und Greene 2021).

Sobald der DSB erkannt wurde, werden zum Schwesterchromatid passend homologe 3'-Überhänge erzeugt, welche im Anschluss stabilisiert und später ligiert werden. Es erfolgt

zur Erzeugung der 3' *single-stranded-DNA*-(ssDNA)-Überhänge eine umfangreiche 5'-3'-Endverarbeitung durch den MRN/MRX- Enzymkomplex (MRE11-RAD50-NBS1-Komplex), *Exonuclease 1* (EXO1), *DNA replication helicase 2* (DNA2) und *CtBP-Interacting Protein* (CtIP) (Shrivastav et al. 2008; Chapman et al. 2012). Da freie einzelsträngige DNA-Enden sehr instabil sind, werden sie von dem Replikationsprotein A (RPA) abgeschirmt. Rekombinationsvermittler helfen dann, RPA durch RAD51 zu ersetzen. Zusammen mit dem Tumorsuppressorgen *Breast Cancer Gene 2* (BRCA2) erzeugt RAD51 verlängerte Nucleoproteinfilamente an der ssDNA und erleichtert dadurch die Homologiesuche und Stranginvasion der homologen DNA-Vorlage (Yang et al. 2020). Die Ligation der DNA-Enden erfolgt durch eine DNA-Ligase (LIG1) (Yanik et al. 2017). Diese Form der Reparatur findet in der späten S-Phase und G2-Phase des Zellzyklus statt (Yanik et al. 2017).

Interessant ist dieser Reparaturmechanismus für das *Genome Editing* vor allem, um krankheitsspezifische Mutationen in der gesunden Zelle zu erzeugen oder krankheitsbedingte Mutationen in von Patienten stammenden Zellen zu korrigieren (Ben Jehuda et al. 2018).

1.7 Reportersystem BRET

Das Einführen von genetisch kodierten Reportersystemen in lebende Zellen ist verbreitet, um biologische Phänomene beobachten zu können (Kaku et al. 2021). Biolumineszenz-Reporter werden insbesondere in Zellkulturexperimenten, aber auch in der Bildgebung von Kleintieren eingesetzt. Da sie Licht emittieren und somit eine Beobachtung biologischer Prozesse ohne direkte Eingriffe in das System ermöglichen, haben sie sich zu unverzichtbaren Werkzeugen in der biomedizinischen Forschung entwickelt. (Loening et al. 2007). Besonders für die DNA-Reparaturforschung und Weiterentwicklung von *Genome Editing*-Strategien bedarf es leistungsfähiger und analytisch korrekter Werkzeuge (Wimmer et al. 2021). Der Biolumineszenz Resonanzenergietransfer (BRET) ist eine Abwandlung des Förster Resonanzenergietransfer (FRET) (Wimmer et al. 2017). Das grundsätzliche Prinzip des BRET ist das Zusammenspiel eines Energiedonors und eines Energieakzeptors. Genauer muss hierbei der Energiedonor im Gegensatz zum FRET nicht von außen angeregt werden, sondern überträgt seine Energie auf den Akzeptor mittels Emis-

sion (Kaku et al. 2021). Zusätzlich entfallen beim BRET die Nachteile wie Photobleichung, Phototoxizität und Fluorophoranregung (Stumpf et al. 2020). Das BRET-System besteht aus einem Fluorophor (GFP2) und einer Luciferase (mutierte *Renilla reniformis* Luciferase (8 RLuc)). Die Luciferase spaltet das Substrat Coelenterazine 400a, wodurch Licht emittiert und die Lumineszenz von GFP2 angeregt wird (Abb. 5) (Loening et al. 2007). Die Maxima der Emission und Anregungswellenlängen sind von der Luciferase als Energiedonor, dem verwendeten Luciferasesubstrat sowie vom gewählten Energieakzeptor abhängig (Stumpf et al. 2020; Wimmer et al. 2016).

Auf Plasmidebene setzt sich der BRET-Reporter also aus einer RLuc8-Domäne und einer GFP2-Domäne zusammen, welche durch eine eingefügte In-Frame-Endonuklease-Zielsequenz getrennt werden (Targetsequenz) (Wimmer et al. 2021). Die Zielsequenz ist komplementär zur gRNA-Sequenz und ist damit Angriffspunkt der Endonuklease (siehe Abbildung 5). Wird ein DSB in der Zielsequenz generiert, kann eine mutagene Reparatur mittels NHEJ stattfinden. Mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit erfolgt die Reparatur des Doppelstrangs mittels NHEJ, wodurch Basen eingefügt oder herausgeschnitten werden. Aufgrund von ein oder zwei bp Deletionen/Insertionen kommt es dann zu einer Leserasterverschiebung des GFP2s, welche zu einem Wegfall der GFP2-Expression und daraus resultierender niedrigerer Fluoreszenz im BRET-System führt (Wimmer et al. 2021). Das durch den BRET-Assay gemessene Emissionsverhältnis ergibt das BRET-Verhältnis ($I_{\text{emGFP2}}/I_{\text{emRLuc8}}$). Hierbei wird die Intensität der Emissionen der beiden Partner durch geeignete Transmissionsfilter quantifiziert (Wimmer et al. 2021).

Der BRET-Reporter kann durch den vorhergehenden NHEJ-Reparaturmechanismus auch als Indel-Analysewerkzeug angesehen werden und zur Überprüfung der Aktivität der gRNA/Cas9- Funktion genutzt werden.

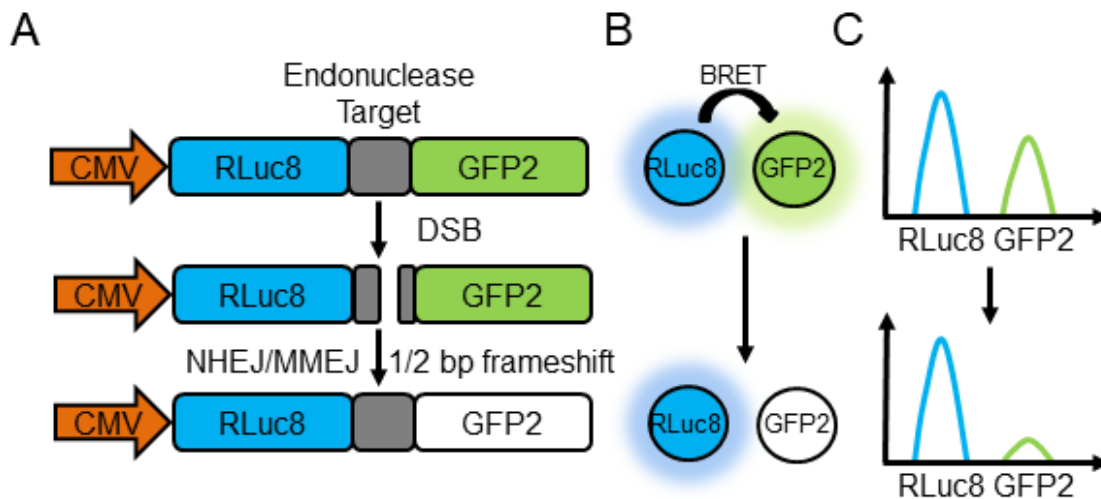


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktion des BRET-Assays. Dargestellt ist auf der linken Seite die vereinfachte Gen-Sequenz des BRET-Reporters inkl. Luciferase (RLuc8), der Targetsequenz und des GFP2. Durch die Bindung einer Endonuklease kommt es zu einem Doppelstrangbruch. Auf der rechten Seite dargestellt ist die durch den DSB verursachte Leserasterverschiebung und Bildung eines Stoppcodons im GFP. Die Graphen stellen schematisch die Abnahme der BRET-Ratio vor und nach dem DSB dar (Wimmer et al. 2021)

Bislang stammte ein großer Anteil der Informationen über DNA-Reparatur aus in vitro Analysen verschiedener künstlicher Zelllinien. Das Wissen über DNA-Reparatur und der Genomeditierung in spezifischen Zellen, wie zum Beispiel in postmitotischen Neuronen, kann mit der Anwendung und Integration des BRET-Reporter erweitert werden (Wimmer et al. 2021).

1.8 iPSCs als intermediäres System

Die Netzhaut von Säugetieren ist nicht in der Lage, sich zu selbst zu regenerieren und geschädigte oder degenerierte Zellen auszutauschen (Busskamp 2022). Eine genetische oder traumatische Schädigung der Netzhaut und deren Zellen führt deshalb zur Veränderung und Einschränkung der visuellen Wahrnehmung (Sharma et al. 2020).

Um genetische Krankheiten verstehen und simulieren zu können und Möglichkeiten der Regeneration der Netzhaut und deren Zellen zu finden, bedient man sich unterschiedlicher experimenteller Modelle. Lange Zeit stand das Nagetiermodell im Zentrum der Forschung. Einige Nachteile dieses Modells sind jedoch nicht von der Hand zu weisen, wie das Fehlen einer Makula und somit die physiologisch andersartige visuelle Wahrnehmung

im Vergleich zum Menschen (Buskamp 2022; Sharma et al. 2020). Besonders die Entstehung, der Verlauf und die Therapie der neurodegenerativen Erkrankungen kann in Tiermodellen nur teilweise rekonstruiert werden (Hockemeyer und Jaenisch 2016). Darüber hinaus spielen ethische Bedenken bei der Verwendung von Modellen nicht-menschlicher Primaten eine nicht außer Acht zu lassende Rolle. Ein möglicher Lösungsansatz ist der Einsatz von funktionellem Netzhautgewebe *in vitro*, welches aus einer ethisch akzeptablen menschlichen Zellquelle stammt (Sharma et al. 2020). Dafür können menschliche Stammzellen, genauer induzierbare pluripotente Stammzellen (iPSC), genutzt werden, die sich zu einem wichtigen Instrument in der experimentellen und klinischen Augenheilkunde entwickelt haben (Buskamp 2022).

iPSC sind pluripotente Stammzellen, die aus somatischen Zellen generiert und in einen embryonal-ähnlichen Zustand rückversetzt werden (Ye et al. 2013). Die ersten iPSCs wurden 2006 von Kazutoshi Takahashi und Shinya Yamanaka aus murinen Fibroblasten erzeugt (Takahashi und Yamanaka 2006). Vorteil der iPSCs ist, dass sie aus einfach verfügbaren somatischen Zellen gewonnen und vielfältig *in vitro* gezüchtet werden können. Entscheidender Vorteil ist auch, dass iPSCs sich in eine Vielzahl von Zelltypen wie hämatopoetische, kardiale und neuronale Zellen differenzieren lassen (Ben Jehuda et al. 2018). Im Bereich der Forschung zu retinaspezifischen Zellmodellen steht vor allem die Differenzierung in RPE und Photorezeptorzellen im Vordergrund. Die Differenzierung von iPSCs in den retinalen oder neuronalen Zielzelltyp bedarf unterschiedlicher differenzierender retinaler Faktoren, Wachstumsfaktoren, Medien und Umgebungsbedingungen (Bellapianta et al. 2022; Buskamp et al. 2014).

Die 2D-Modelle von retinaspezifischen Zellen sind im Bereich der Krankheitsmodellierung, vor allem von genetisch bedingten Erkrankungen, von großer Bedeutung. Die Herstellung von iPSC-Zelllinien von Patienten mit Varianten von beispielsweise Retinitis pigmentosa (RP), kongenitaler Leber-Amaurose (LCA) und dem Usher-Syndrom ermöglichen eine pathophysiologische Untersuchung der Krankheit (Chuang et al. 2017). In Verbindung mit CRISPR/Cas bieten die iPSCs perspektivisch diverse Anwendungsmöglichkeiten in der Gen- und Zelltherapie von angeborenen Erkrankungen (Cai et al. 2018). So könnten iPSCs beispielsweise auch für die autologe Transplantation als Lieferanten der Zellersatztherapie für Photorezeptorzellen eingesetzt werden und durch den Einsatz von CRISPR/Cas eine patientenspezifische Reparatur auf genetischer Ebene in diesen

Zellen ermöglichen (Chuang et al. 2017). Die retinaspezifischen 2D-Modelle können jedoch die strukturellen, funktionellen und physiologischen Aspekte nicht ganz vollständig wiedergeben (Sharma et al. 2020).

Ein weiteres intermediäres System stellen organähnliche 3D-Modelle dar, die Organoide. Organoide sind dreidimensionale Zellstrukturen, die morphologische, funktionelle und transkriptionale Merkmale eines Organsystems abbilden (Cowan et al. 2020). Sie können *in vitro* aus embryonalen, adulten oder pluripotenten Stammzellen erzeugt werden und mittels Selbstorganisation oder Gerüst die *in vivo* Situation einiger Organsysteme besser nachahmen (Sharma et al. 2020; Cowan et al. 2020). Retinale Organoide sind aufgrund der Komplexität und Struktur der menschlichen Retina in ihrer Entwicklung und Herstellung anspruchsvoll. Es konnten aber bereits unterschiedlich komplexe retinale Organoide erzeugt werden, die verschiedene Aspekte der Netzhaut aufgreifen, wie eine korrekte Schichtaufteilung und das Vorhandensein von lichtempfindlichen Photorezeptoren (Bellapianta et al. 2022; Völkner et al. 2016).

Zusammenfassend stellen iPSCs ein intermediäres System zwischen den Standard-Zellkultur-Modellen und den Tiermodellen dar. So bilden aus iPSC generierte Neuronen einen Übergang zwischen dem klassischen Zellkulturmodell und dem *in vivo* Einsatz mittels subretinaler Injektion in Mäusen und Schweinen ab (Abb. 6).

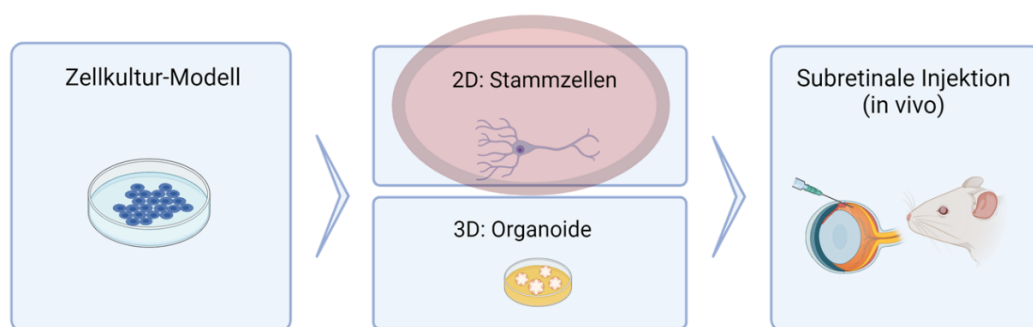


Abbildung 6: Schematische Darstellung iPSCs als intermediäres System. Links dargestellt ist das klassische Zellkulturmodell, mittig als 2D-Modell die iPSCs und als 3D-Modell die Organoide. Rechts in der Abbildung dargestellt ist der Einsatz *in vivo*, beispielsweise als subretinale Injektion. Erstellt mit BioRender.com.

1.9 *Inducible neurogenin (iNGN) Zelllinie*

Inducible neurogenin cell line (iNGN) ist eine humane, induzierbare, pluripotente Stammzelllinie (hiPSC). Erstellt wurde sie durch die Harvard Universität im Rahmen des *Harvard Personal Genome Project* unter der Leitung von George Church. Bereitgestellt wurde die Zelllinie für dieses Projekt von Volker Busskamp (Bonn). Ausgangszelllinie war die hiPS-Zelllinie aus dem *Personal Genome Project*, welche von Teilnehmer Nummer 1 (PGP1, hu43860C) stammt. Diese Stammzelllinie wurde durch einen lentiviralen Gentransfer und die genomische Integration der Doxycyclin-induzierbaren Neurogenin- und rTA3-Vektoren genetisch modifiziert (Sauter et al. 2019; Busskamp et al. 2014). Daraus entstanden ist die iNGN-Zelllinie, welche sich durch eine Überexpression von Transkriptionsfaktoren (Neurogenin-1 und Neurogenin-2) innerhalb von 4 Tagen zu einer homogenen Population von funktionellen bipolaren Neuronen entwickeln lässt (Busskamp et al. 2014). Bei Langzeitkulturen der iNGNs mit Co-Kultivierung von Astrozyten konnte die funktionelle Entwicklung der iNGNs beurteilt, Charakteristika der neuronalen Reifung beobachtet und eine Aufrechterhaltung über Monate hinweg ermöglicht werden (Lam et al. 2017). Zusammenfassend ermöglicht es diese Zelllinie, durch eine zelluläre Reprogrammierung eine *in vitro* Situation abzubilden, welche die neuronale Differenzierung und die Eigenschaften neuronaler Zellen darstellen kann.

1.10 Induzierbares Cas-System

CRISPR/Cas als führendes Werkzeug im Bereich des *Genome Editing* bedarf einer hohen Präzision und guter Kontrollierbarkeit (Liu et al. 2018). Um die Einsatzbereiche des CRISPR/Cas-Systems zu erweitern und noch flexibler einsetzen zu können, beschäftigten sich einige Arbeitsgruppen mit der Entwicklung unterschiedlicher induzierbarer Cas (i-Cas)-Systeme. Sowohl die Cas9-Endonuklease als auch die sgRNA können moduliert werden, um eine Induzierbarkeit innerhalb dieses Systems zu erreichen (Dai et al. 2018). Ein großer Anteil der Methoden stellt dabei die Cas9-Variante mit ihrer Verfügbarkeit und Funktion in den Mittelpunkt. Von Knock-in-Techniken, gesplittetem Cas über thermoinduzierbarer Cas bis hin zu chemisch aktivierbarer Cas, die Entwicklung dieser unterschiedlichen Modelle erstreckt sich über eine große Bandbreite (Cao et al. 2016).

2016 entwickelten Lui und Ramil das CRISPR/Cas9 zu einer induzierbaren Variante weiter. Es schafft die Möglichkeit, die Cas9-Aktivität zu modulieren, die *off-target*-Reparatur reduzieren und ein präzises *Genome Editing* erleichtern (Liu et al. 2016). Es handelt sich um eine induzierbare Cas9-Variante, deren Aktivität posttranslational in menschlichen Zellen durch die Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (4-HT) an und wieder abgeschaltet werden kann. Eine Fusion der Cas9-Domäne mit der hormonbindenden Einheit des Östrogenrezeptors (ERT2) ermöglicht dieses An- und Abschalten (Abb.7). Während der Abwesenheit von 4-Hydroxytamoxifen ist das Enzym im Zytoplasma sequestriert und kann nicht auf das im Zellkern vorhandene Genom einwirken. Durch die Zugabe des aktiven Metabolits von Tamoxifen gelangt das iCas-Protein in den Zellkern und kann dort seine Endonukleasefunktion ausführen (Abb.8) (Liu et al. 2016). Das System des hormonbindenden ERT2-Rezeptors in Verbindung mit 4-Hydroxytamoxifen wurde zusammen mit der Cre-Rekombinase entwickelt und erfolgreich eingesetzt (Indra et al. 1999). Dieses System ermöglicht somit eine zeitliche Flexibilität und präzise Kontrollierbarkeit. Die Arbeitsgruppe um Liu entwickelte ein System, welches durch seine (ERT2)²-Cas9- (ERT2)² Kombination eine geringe Hintergrundaktivität der Endonuklease im nicht-aktivierten Zustand aufweist sowie reversibel und einfach einzubringen und anzuwenden ist (Liu et al. 2016).



Abbildung 7: Schematische Darstellung des induzierbaren Cas-Systems. Der iCas9-Genabschnitt besteht aus einem CMV-Promotor, zwei SV40/NLS und zwei Mal zwei ERT2-Einheiten, welche die Cas9 umrahmen. Sie ermöglichen in der Abwesenheit von 4-Hydroxytamoxifen das Anlagern der Cas9-Domäne an die hormonbindenden Östrogenrezeptoren. Durch den chemischen Input von 4-HT kommt es zu einer Aktivierung und Endonukleaseaktivität im Zellkern. Entwickelt wurde dieses System von Kaiwen Ivy Liu et. al. 2016 und wird hier schematisch nachempfunden.

Mit dem Einsatz der iCas kann die Endonukleasefunktion sowohl zu einem frühen Zeitpunkt in der Entwicklung von Zellen (iPSC) als auch in späten Entwicklungsstadien oder schon endgültig differenzierten Zelltypen untersucht werden (Liu et al. 2016). Der Einsatz dieses Systems ermöglicht es, die iPSC zunächst zu Neuronen auszudifferenzieren, anschließend durch Induktion eine Aktivierung der Endonuklease zu erreichen und eine anschließende Reparatur bzw. Veränderung innerhalb der DNA zu beobachten.

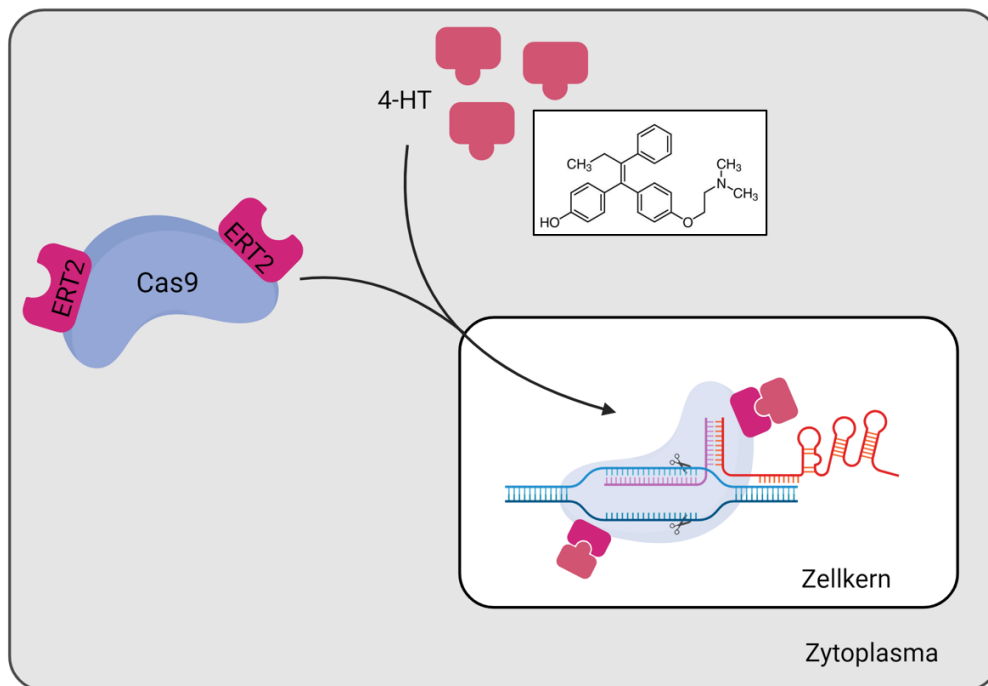


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Funktionsweise des induzierbaren Cas9-Systems. Liu et al. 2016 fusionierten Cas9 mit vier Kopien der hormonbindenden Domäne des Östrogenrezeptors (ERT2), was zum Ausschluss von Cas9 aus dem Zellkern führt. Nach Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen (4-HT) wird das Cas9-ERT2-Fusionsprotein in den Zellkern importiert, wo es einen Komplex mit gRNAs bilden und die genomische Ziel-DNA schneiden kann. Erstellt mit BioRender.com.

1.11 Zielsetzung

Aufgrund der Komplexität und Diversität im Bereich der erblich bedingten Netzhauterkrankungen bedarf es einer Weiterentwicklung im Bereich der Therapieoptionen. Ziel dieser Arbeit war es, durch den Einsatz von pluripotenten Stammzellen und der Genome-ditierung mittels CRISPR/Cas9 mehr Informationen über die DNA-Reparaturmechanismen von Neuronen und deren Verhalten nach einem DSB zu erlangen, da dies mögliche Rückschlüsse auf das Verhalten körpereigener Neuronen zulässt.

Genauer wird hierfür ein induzierbares Cas9-System zunächst in der Standardzelllinie HEK293-T und anschließend in iNGNs getestet. Hierfür wird das iCas-System an bereits bestehende Guide-Sequenzen angepasst, welche bereits mit der Cas9 erfolgreich verwendet wurden. Im Verlauf erfolgt nach Transfektion der Zellen die Funktionsüberprüfung des induzierbaren Systems zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels BRET-Assay.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräteliste

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller, Ort
Autoklav DX-65	Systec, Linden (DE)
BioPhotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf (DE)
Dest. H ₂ O-Anlage	Sartorius, Göttingen (DE)
Eismaschine AF 80 Ice Flaker	Scotsman, Berlin (DE)
Elektroporationsküvette	Eppendorf, Köln (DE) Bio-Rad, München (DE) Peqlab, Erlangen (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, Biberach an der Riß (DE)
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (DE)
Gelkammer für Agarosegele Compact XS/S und M	Biometra, Göttingen (DE)
Heizblock TB2	Biometra, Göttingen (DE)
Inkubator für eukaryotische Zellen C150	Binder, Tuttlingen (DE)
Inkubator für prokaryotische Zellen BD115	Binder, Tuttlingen (DE)
Kühlschrank (+4°C)	VWR International, Darmstadt (DE) Bosch Gerlingen (DE) Liebherr, Biberach an der Riß (DE)
Laminar Flow Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, Schwerte (DE)
Magnetrührer RCT classic	IKA, Staufen (DE)

2. Material und Methoden

Mikroskop VWRI 630	VWR International, Darmstadt (DE)
Mikrowelle	Siemens, München (DE)
Minizentrifuge	VWR International, Darmstadt (DE)
Multimode Platereader Infinite M1000Pro	Tecan, Gröding (AT)
Multiporator	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf (DE)
PCR Thermocycler T-Professional/ T-Personal	Biometra, Göttingen (DE)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg (DE) Brand, Wertheim (DE)
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt (DE)
Power-Supply für Elektrophorese PS305T	Whatman-Biometra, Göttingen (DE)
Schüttler Certomat H/MOII	Sartorius AG, Göttingen (DE)
Spülmaschine	Miele Professional, Gütersloh (DE)
Stickstofftonne (-196°C) Locator Plus 6	Thermolyne, Pfullingen (DE)
Trockenschrank	Binder, Tuttlingen (DE)
UV-Transilluminator BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen (DE)
Vortexer	VWR International, Darmstadt (DE) LLG Labware, Meckenheim (DE)
Waage Pioneer	Ohaus, Naenikon (CH)
Wasserbad TW12	Julabo, Seelbach (DE)
Zählkammer nach Neubauer	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen (DE)
Zentrifuge 4K15/1-15PK	Sigma, München (DE)
Zentrifuge Mikro200	Hettich, Tuttlingen (DE)
Zentrifuge MiniStar silverline	VWR International, Darmstadt (DE)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Typ	Hersteller, Ort
Bakterienkulturplatte	Pertri Dish 100x15	Greiner Bio-One, Frickenhausen (DE)
Filteraufsatz	Rapid-Filtermax	TPP, Trasadingen (CH)
Filterpipettenspitzen	10 µl/ 200 µl/ 1250 µl	Nerbe plus, Winsen (DE) Biozym, Hess. Oldendorf (DE)
Glaspipetten	5 ml/ 10 ml/ 20 ml	Brand, Wertheim (DE)
Kryoröhrchen	MX 500	LVL-Technologies, Crailsheim (DE)
Parafilm	Laboratory Film	Bemis, Braine L'Alleud (BE)
PCR Soft Tubes	0,2 ml	Biozym, Hess. Oldendorf (DE)
Pipettenspitzen	1-10 µl	Biozym, Hess. Oldendorf (DE) Brand, Wertheim (DE)
Pipettenspitzen	2-200 µl	Sarstedt, Nümbrecht (DE) Eppendorf, Hamburg (DE)
Pipettenspitzen	100-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht (DE) Eppendorf, Hamburg (DE)
Pipettenspitzen	0,5 - 5,0 ml	Brand, Wertheim (DE)
Reaktionsgefäße	0,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht (DE)
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht (DE) Eppendorf, Hamburg (DE)
Reaktionsgefäße	2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht (DE) Eppendorf, Hamburg (DE)
Reaktionsgefäße	15 ml / 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen (DE)
Zellkulturplatte	Cell culture dishes 100 x 20 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen (DE)

6-Well Platte	Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen (DE) Corning, Wiesbaden (DE)
24-Well Platte	Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen (DE)
96-Well Platte	Costar 96 Flat White	Corning, Wiesbaden (DE)
Zellschaber	S/ M	Sarstedt, Nümbrecht (DE)
Filter	Filterpur S 0.45	Sarstedt, Nümbrecht (DE)

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Ort
4-Hydroxytamoxifen	Sigma-Aldrich, Darmstadt (DE)
Agar	Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt (DE)
Agarose LE	Genaxxon Bioscience, Ulm (DE)
Borsäure	Roth, Karlsruhe (DE)
Coelenterazine 400a	Nanolight Technology, Pinetop (USA)
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe (DE)
DMSO	Merck, Darmstadt (DE)
dNTPs	Fermentas, Waltham (USA)
DPBS	Life Technologies/ ThermoFisher Scientific, Darmstadt (DE)
EDTA	Roth, Karlsruhe (DE)
Ethanol	Roth, Karlsruhe (DE)
Fötale Kälberserum (FKS)	Anprotec, Bruckberg (DE)
Glycerin	Merck, Darmstadt (DE)
Hefeextrakt	BD Biosciences, Heidelberg (DE)
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Darmstadt (DE)

Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe (DE)
L-Glutamin	Anprotec, Bruckberg (DE)
Lipofectamine Stem reagent	Life Technologies/ ThermoFisher Scientific, Darmstadt (DE)
Luria Broth Base (LB)	Life Technologies/ ThermoFisher Scientific, Darmstadt (DE)
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt (DE)
Magnesiumsulfat	Fermentas, Karlsruhe (DE)
Magnesiumsulfid	Merck, Darmstadt (DE)
Matrigel Growth Factor Reduced (GFR), LDEV-Free	Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam (NL)
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt (DE)
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstraße (DE)
Stickstoff (flüssig)	Linde, München (DE)
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, Darmstadt (DE)
Tris-NH ₃	Roth, Karlsruhe (DE)
Trypton	BD Biosciences, Heidelberg (DE)

2.1.4 Puffer und Lösungen

Verwendete Puffer und Lösungen (eigene Herstellung):

PBS (1x):

- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 10 mM Na₂HPO₄
- 1,8 mM KH₂PO₄

PEI-Mix:

- 0,1 g/l PEI
- 150 mM NaCl

TBE (10x):121,0 g Tris-NH₃

51,5 g Borsäure

3,5 g EDTA

1000 ml ddH₂O**Tabelle 4: Weitere verwendete Puffer und Lösungen**

Bezeichnung	Hersteller, Ort
Cut Smart Buffer (10x)	NEB, Frankfurt a. M. (DE)
DNA Loading Dye (6x)	Life Technologies/ ThermoFisher Scientific, Darmstadt (DE)
FD Buffer (10x)	NEB, Frankfurt a. M. (DE)
Orange G DNA Stain (10x)	Roth, Karlsruhe (DE)
S1-Resuspension Buffer	Macherey-Nagel, Düren (DE)
S2-Lysis Buffer	Macherey-Nagel, Düren (DE)
S3-Neutralization Buffer	Macherey-Nagel, Düren (DE)
SAM (20x) (10nm)	NEB, Frankfurt a. M. (DE)
Serva DNA Stain Clear G	SERVA Electrophoresis, Heidelberg (DE)
T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10x)	NEB, Frankfurt a. M. (DE)

2.1.5 Antibiotika**Tabelle 5: Verwendete Antibiotika**

Antibiotika	Konzentration	Hersteller
Penicillin-Streptomycin	10.000 U/ml Penicillin G 10 mg/ml Streptomycin	Anprotec, Bruckenberg (DE)
Ampicillin	100 µg/µl	Sigma-Aldrich, Darmstadt (DE)

2.1.6 Enzyme und Marker

Tabelle 6: Verwendete Restriktionsenzyme

Bezeichnung	Erkennungssequenz	Hersteller
<i>Bp</i> II-FD	5'... ↓8(N) G A G (N)5 C T C (N)13↓...3' 3'... ↑13(N) C T C (N)5 G A G (N) 8↑...5'	Life Technologies/ ThermoFisher Scientific, Darmstadt (DE)
<i>Nhe</i> I-HF	5'...G↓CTAGC...3' 3'...CGATC↑G...5'	NEB, Frankfurt a. M. (DE)
<i>Mlu</i> I-HF	5'...A↓CGCGT...3' 3'...TGCGC↑A...5'	NEB, Frankfurt a. M. (DE)
<i>Spe</i> I-HF	5'...A↓CTAGT...3' 3'...TGATC↑A...5'	NEB, Frankfurt a. M. (DE)

Tabelle 7: Verwendete Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
Accutase	Anprotec, Bruckenberg (DE)
Phusion® High-Fidelity Polymerase	Life Technologies/ ThermoFisher Scientific, Darmstadt (DE)
T4 DNA Ligase	NEB, Frankfurt a. M. (DE)
TrypLE	Life Technologies/ ThermoFisher Scientific, Darmstadt (DE)

Tabelle 8: Verwendete DNA-Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller, Ort
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Life Technologies/ ThermoFisher Scientific, Darmstadt (DE)
Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder	Life Technologies/ ThermoFisher Scientific, Darmstadt (DE)

2.1.7 Plasmide und Vektoren

Tabelle 9: Verwendete Plasmide/Vektoren

Plasmid	Hersteller
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (px459)	Feng Zhang. Addgene Headquarters; Watertown (USA), #62988
gRNA/Cas9-Konstrukt für BRET-Reporter, (In6G1/In8G2/In8G3)	Herstellung Arbeitsgruppe. Modifikation des pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 von Addgene Headquarters; Watertown (USA), #62988
gRNA/iCas9-Konstrukt für BRET-Reporter, (In6G1i/In8G2i/In8G3i)	Eigene Herstellung
gRNA/iCas9-Konstrukt für BRET-Reporter (T11), (iCas/G11)	Herstellung Arbeitsgruppe
iCas-Plasmid	Addgene Headquarters; Watertown (USA), # 84232
BRET-Reporter, (In6T1/In8T2/In8T3)	Herstellung Arbeitsgruppe
BRET-Reporter (T11)	Herstellung Arbeitsgruppe
pcDNA-RLuc8	Sanjiv Sam Gambhir, MD, PhD; Stanford University, (USA)
pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2-pA (BRET-Reporter)	Herstellung Arbeitsgruppe Dr. Tobias Wimmer; Justus-Liebig-Universität Gießen (DE)
pTagGFP2-N	Evrogen Joint Stock Company, (RU), BioCat; Heidelberg (DE)

BRET-Reporter (In6T1/In8T2/In8T3)

Die Klonierung, Testung und Anwendung dieser Plasmide erfolgte bereits zuvor durch die Arbeitsgruppe. Es wurden die entsprechenden Target-Sequenzen, passend zu den gRNA-Sequenzen, integriert. Hierzu erfolgte der Restriktionsverdau des BRET-Reporters (pRLuc8-AvrII/BsiWI-GFP2-pA) mit *AvrII* und *BsiWI*. Durch Hybridisierung von zueinander komplementären Oligonukleotiden wurden doppelsträngige DNA-Fragmente

mit kompatiblen *AvrII*/*BsiWI*-Überhängen generiert. Durch eine anschließende Ligation mit den Targetsequenzen 6T1, 8T2 und 8T3 wurden die BRET-Reporter (In6T1/In8T2/In8T3) erstellt (Abb.9). Der BRET-Reporter steht unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Das Plasmid trägt unter anderem eine Ampicillin-Resistenz.

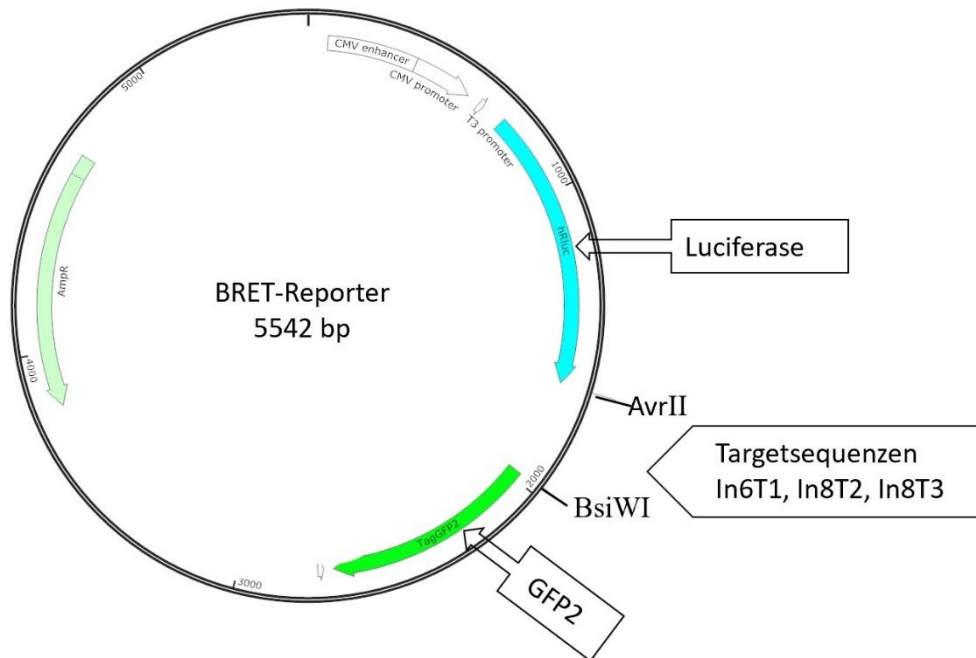


Abbildung 9: Plasmidkarte BRET-Reporter. Auch als BRET-Reporter (In6T1/In8T2/ In8T3) mit entsprechenden Targetsequenzen bezeichnet. Abgebildet in hellblau der Bereich der Luciferase und in hellgrün der Bereich des GFP2. Dargestellt sind auch die Schnittstellen von *AvrII* und *BsiWI*. Erstellt mit SnapGene® software (from Dotmatics; available at snapgene.com) und nachträglich modifiziert.

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

Der px459-Vektor (von Feng Zhang, Addgene plasmid # 62988), welcher im Verlauf auch als Cas9 oder Cas9 (-) bezeichnet wird, enthält die Schnittstellen für das Restriktionsenzym *BbsI* (Abb.10). Die Cas9-Endonuklease-Sequenz steht unter Kontrolle des CMV-Promotors. Zur bakteriellen Selektion enthält das Plasmid sowohl eine Ampicillin- als auch eine Puromycinresistenz zur eukaryotischen Selektion. Zudem enthält das Plasmid einen U6-Promotor zur Transkription der gRNA.

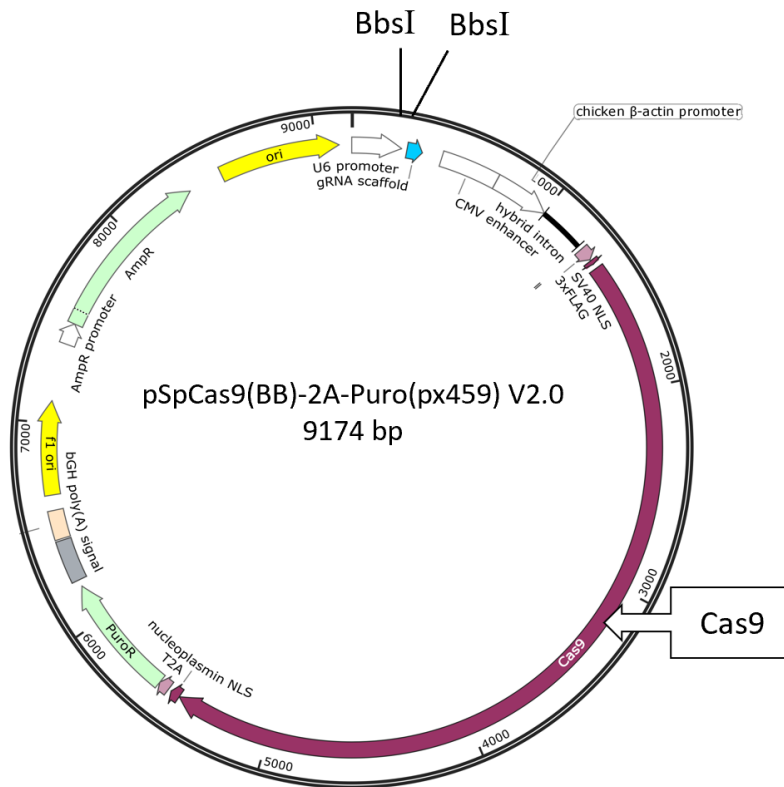


Abbildung 10: Plasmidkarte pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459). Dargestellt werden die Schnittstellen für *BbsI*. Vor den Schnittstellen dargestellt ist ein U6-Promoter, dahinter ein *gRNA scaffold* sowie CMV- und CBA-Promoter (*chicken beta actin promoter*), in Grün der Bereich der Cas9 sowie nachfolgend die Puro-mycin-Resistenz und die Ampicillin-Resistenz.

gRNA/Cas9 Konstrukt für BRET-Reporter (In6G1/In8G2/In8G3)

In den px459-Vektor wurden zuvor innerhalb der Arbeitsgruppe drei verschiedene Guide-Sequenzen integriert (siehe 2.1.8). Für die Klonierung erfolgte zunächst der Restriktionsverdau mit *BbsI*, anschließend eine Gelelektrophorese sowie das Ausschneiden und Aufreinigen des linearisierten Plasmids. Es erfolgte dann die Ligation mit den bereits hybridisierten Oligonukleotiden (siehe 2.2.1.2) der Sequenzen 6G1, 8G2 und 8G3 (siehe 2.1.8).

iCas-Plasmid

Dargestellt ist das iCas-Plasmid mit den zwei relevanten Schnittstellen des *BpI*-Enzyms sowie den unterschiedlichen Expressionskassetten (Abb.11). Das Plasmid ist 13043 bp groß und enthält eine bakterielle Selektionskassette für Ampicillin. Die SpCas9-Expressionskassette wird umrahmt von je zwei ERT2-Regionen, welche eine mutierte Östrogen-Liganden-Bindungsdomäne darstellen und für ihre Aktivität die Anwesenheit von

Tamoxifen erfordern. Über einen CMV-Promotor wird dieses Konstrukt mit den Fusionsproteinen reguliert. Es enthält außerdem eine „leere“ gRNA-Kassette, welche unter Regulation eines U6-Promotors steht. Induziert wird die Cas9-Expression mittels 4-Hydroxytamoxifen.

gRNA/iCas9-Konstrukt für BRET-/NHEJ-Reporter (In6G1i/In8G2i/In8G3i)

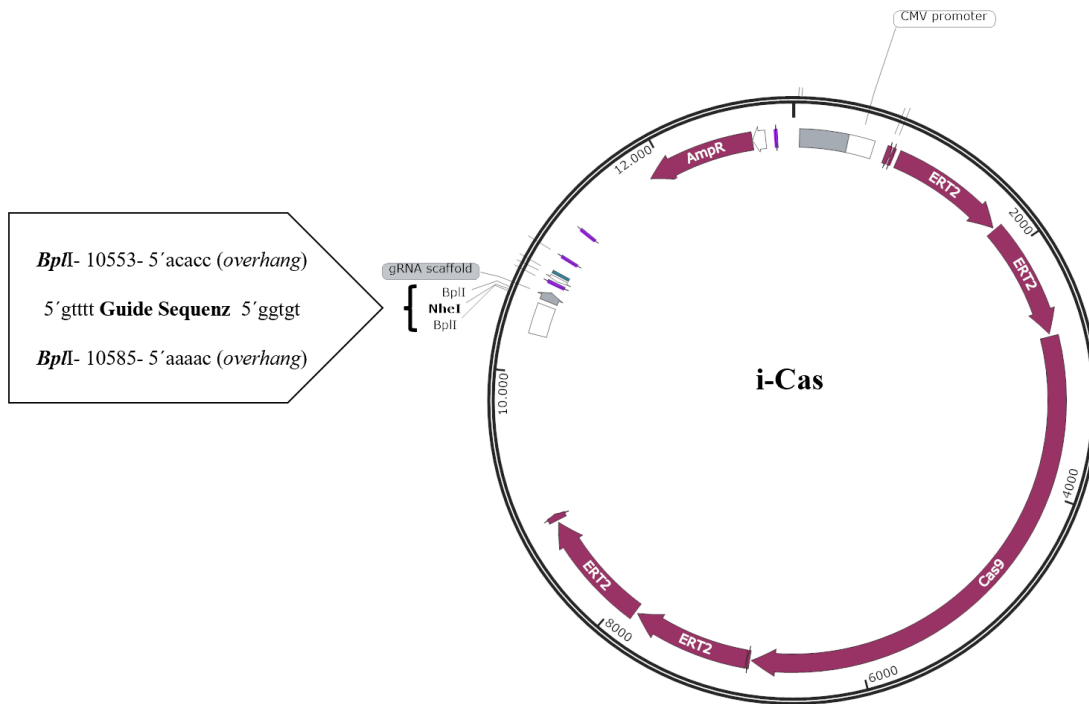


Abbildung 11: iCas-Plasmid mit dargestellten *BpII*-Schnittstellen und Guide-Sequenzbereich. Gezeigt werden auch die benötigten Überhänge zur Integration der Guide-Sequenzen. Die Cas9-Domäne wird umrahmt von je zwei ERT2-Domänen. Insgesamt steht dieser Bereich (lila) unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Im Plasmid enthalten ist außerdem eine Ampicillin-Resistenz (AmpR). Erstellt mit SnapGene® software (from Dotmatics; available at snapgene.com) und nachträglich modifiziert.

Schematisch dargestellt ist auch, an welcher Stelle die unterschiedlichen gRNA-Sequenzen in das iCas-Plasmid kloniert wurden (Abb. 11). In den oben beschriebenen Vektor wurde mittels Restriktionsverdau die entsprechende gRNA-Sequenz eingefügt. Durch Linearisierung mittels *BpII* Verdau und Ligation werden die zuvor hybridisierten Oligonukleotide eingebracht. Für den In6G1i werden die Oligosequenzen 6G1f-iCas und 6G1r-iCas, für In8G2i 8G2f-iCas und 8G2r-iCas und für In8G3i die beiden Oligonukleotidsequenzen 8G3f-iCas und 8G3r-iCas hybridisiert. Dadurch entsteht ein Konstrukt, welches 20 bp lang ist und mittels Ligation mit einer T4-Ligase integriert wurde.

pcDNA-RLuc8

Das pcDNA-RLuc8-Plasmid wurde innerhalb der Arbeitsgruppe (Experimentelle Ophthalmologie Gießen) hergestellt, der RLuc8Anteil stammt jedoch von Sanjiv Sam Gambhir (Addgene *plasmid* # 87121; <http://n2t.net/addgene:87121>; RRID: Addgene_87121). Reguliert wird die RLuc8-Expression über einen CMV-Promotor. Zusätzlich trägt das Plasmid sowohl eine Ampicillin- als auch Neomycin-/ Kanamycin-Resistenz.

pTagGFP2-N

Das pTagGFP2-N-Plasmid enthält unter anderem ein über einen CMV-Promotor reguliertes TagGFP2. Es ist 4729 bp groß, beinhaltet eine Selektionskassette für Neomycin/Kanamycin und stammt von Evrogen (pTagGFP2-N *vector* cat. # FP192, <https://evrogen.com/products/vectors/pTagGFP2-N/pTagGFP2-N.shtml>).

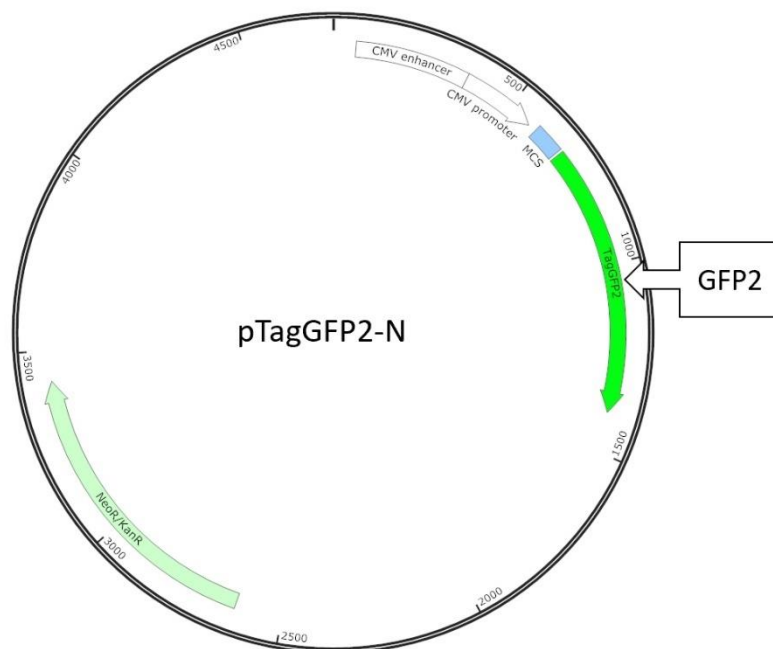


Abbildung 12: Plasmidkarte GFP2 (pTagGFP2-N). Dargestellt das TagGFP2 unter der Kontrolle eines CMV-Promotors sowie die auf dem Plasmid enthaltene Neomycin-/ Kanamycin-Resistenz (NeoR/KanR). Erstellt mit SnapGene® Software (*from Dotmatics; available at snapgene.com*) und nachträglich modifiziert.

2.1.8 Oligonukleotide und Primer

In der Tabelle 10 sind alle verwendeten Oligonukleotide zur Herstellung der Guide-RNA-Sequenzen durch Hybridisierung aufgeführt. Die Bezeichnung beinhaltet zunächst die interne Nummer der Arbeitsgruppe, gefolgt von einem bezeichnenden Namen. Alle Sequenzen sind in 5' - 3' Richtung dargestellt. Einzelsträngige Überhänge, die nach der Hybridisierung entstehen, sind in Kleinbuchstaben gekennzeichnet. In Tabelle 11 ist der Primer, der zur Sequenzierung genutzt wurde, aufgeführt. Alle Oligonukleotide und andere Primer wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, von der Firma Metabion (Planegg/Steinkirchen, DE) hergestellt.

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide für gRNA-Sequenzen

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Bemerkung
(6G1f-Cas9)	GGAGCTCTCCCGCACAGCGT	Guide in Cas9
(6G1r-Cas9)	ACGCTGTGCGGGAGAGCTCC	Guide in Cas9
(8G2f-Cas9)	GATATAAGCGGGGGGCCTGG	Guide in Cas9
(8G2r-Cas9)	CCAGGCCCCCGCTTATATC	Guide in Cas9
(8G3f-Cas9)	TGTGGGGCTTGCTCACCTCC	Guide in Cas9
(8G3r-Cas9)	GGAGGTGAGCAAGCCCCACA	Guide in Cas9
(6G1f-iCas)	GGAGCTCTCCCGCACAGCGTgtttt	Guide in iCas
(6G1r-iCas9)	ACGCTGTGCGGGAGAGCTCCggtgt	Guide in iCas
(8G2f-iCas)	GATATAAGCGGGGGGCCTGGgtttt	Guide in iCas
(8G2r-iCas)	CCAGGCCCCCGCTTATATCggtgt	Guide in iCas
(8G3f-iCas)	TGTGGGGCTTGCTCACCTCCgtttt	Guide in iCas
(8G3r-iCas)	GGAGGTGAGCAAGCCCCACAggtgt	Guide in iCas

Tabelle 11: Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
#3056 (Wolle 610)	GAC TAT CAT ATG CTT ACC GT	Sequenzierung

2.1.9 Kits

Tabelle 12: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller, Ort
NucleoSpin Plasmid Mini Kit	Macherey-Nagel, Düren (DE)
PCR clean-up Gel extraction	Macherey-Nagel, Düren (DE)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden (DE)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden (DE)

2.1.10 Bakterienstämme

Zur Klonierung ist der nachfolgende *Escherichia coli* (*E.coli*)-Stamm verwendet worden. Dieser wurde gebrauchsbereit von der Firma Fischer Scientific bezogen.

One Shot® TOP 10 Electrocomp™ E.coli: F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG λ

2.1.11 Medien für bakterielle Kulturen

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium):

Zur Flüssigkultur der Bakterien wurden 25 g Luria Broth Base (siehe 2.1.3) in 1000ml ddH₂O gelöst und anschließend nach Herstellerangaben autoklaviert.

LB-Ampicillin-Platten:

Zur Bakterienkultur auf ampicillinhaltigen Agarplatten wurden 12,5 g Luria Broth Base, 7,5 g Select Agar mit 500 ml ddH₂O gemischt und anschließend durch Autoklavieren gelöst. Nach dem Abkühlen auf 48°C wurden 500 µl Ampicillin (Endkonzentration 100

µl/ml) zugegeben und vermischt. Abschließend wurden vorbereitete Bakterienkulturplatten befüllt, nach dem Trocknen in den 4 °C Kühlschrank überführt und dort bis zum Gebrauch gelagert.

SOC-Medium:

Nach der Transformation wurde steriles SOC (Super Optimal Broth mit Katabolitrepression durch Glukose) verwendet.

2 % Trypton

0,5 % Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glukose

ad 1000 ml ddH₂O, pH 7,0 mit NaOH

autoklavieren

2.1.12 Zelllinien

Für die Transfektionen wurden folgende Zelllinien eingesetzt:

HEK293-T-Zelllinie

Humane, embryonale Nierenzelllinie, immortalisiert mit SV40 *large* T-Antigen: HEK293-T (ATCC: CRL-3216). Bezogen von ATTC (American Type Culture Collection) durch LGC Standards GmbH, Wesel (DE).

Inducible neurogenin cell line (iNGN Zelllinie)

iNGN (oder ENCBS369AAA) ist eine humane, induzierbare, pluripotente Stammzelllinie (hiPSC). Erstellt wurde sie durch die Harvard Universität im Rahmen des *Harvard Personal Genome Project* unter der Leitung von George Church. Bereitgestellt wurde die

Zelllinie für dieses Projekt von Volker Busskamp (Bonn). Ausgangszelllinie war die hiPS-Zelllinie aus dem *Personal Genome Project*, welche von Teilnehmer Nummer 1 (PGP1, hu43860C) stammt.

2.1.13 Medien für eukaryotische Zellkultur

DMEM --- (Transfektionsmedium):

DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) ist ein Basismedium von Anprotec.

DMEM ---R:

DMEM ---

RevitaCell Supplement (100x) (ThermoFisher)

DMEM +++:

DMEM ---

1 % Pen/Strep (v/v)

10 % FKS (v/v)

4 mM L-Glutamin

Einfriermedium HEK293-T:

9 ml FKS (90 %)

1 ml DMSO (10 %)

StemFlex BM ++:

90 ml StemFlex Basalmedium

10 ml Supplement

1 ml Antibiotic-Antimycotic (100X) (1 %)

StemFlex BM +++:

10 ml StemFlex ++

10 µl RevitaCell Supplement (100X)

Einfriermedium iNGNs:

9 ml StemFlex ++

1 ml DMSO (10%)

2.1.14 Software**Tabelle 13: Verwendete Software**

Programm	Hersteller
BioDocAnalyze v.2.67.3.0	Biometra, Göttingen (DE)
BioRender.com	Biorender, Toronto (CAN)
Biozero (BZ Analyzer) v. 3.60	Keyence, Neu-Isenburg (DE)
BZ-8100 Observation Application v.1.10 (BZ Viewer)	Keyence, Neu-Isenburg (DE)
Citavi 6.4 für Windows	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil (CH)
FACSDiva (Version 6.1.3)	BD Biosciences, San Jose (USA)
i-control v.1.11	Tecan Trading AG, Männedorf (CH)
Microsoft Excel für Office 356	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Microsoft Powerpoint für Office 356	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Microsoft Word für Office 356	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
Sigma-Plot 12 /14.5	Systat Software GmbH, Erkrath (DE)
SnapGene	GSL Biotech LLC, San Diego (USA)
FCS Express 7 Research Edition (Win64)	De Novo Software, Los Angeles (USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Restriktionsverdau

Die verwendeten Restriktionsenzyme (siehe 2.1.6) wurden nach Herstellerangaben und mit den mitgelieferten Puffern verwendet. Bei der gleichzeitigen Verwendung von zwei Enzymen innerhalb eines Restriktionsverdaus wurde auf die Kompatibilität der Enzyme im jeweiligen Puffer geachtet. Die Ansätze wurden mindestens 2 h bis max. 24 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Abgestoppt wurde der Verdau nach Herstellerangaben mittels Hitzeinaktivierung und der Ansatz anschließend bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C eingefroren. Nachfolgend ist der Ansatz des Restriktionsverdaus zur Linearisierung des iCas-Plasmids dargestellt.

Tabelle 14: Linearisierung iCas-Plasmid

iCas (Plasmid-DNA)	2 µg
BplI-FD	2 µl
FD Buffer (10X)	2 µl
SAM (20X)	1 µl
ddH ₂ O	Add 20 µl
Gesamt	20 µl

2.2.1.2 Primer Hybridisierung

Zur Hybridisierung der Oligonukleotide wurden nachfolgendes Pipettierschema verwendet (siehe 2.2.1.2). Hierbei wurden die entsprechenden Primer-Paare, wie sie nachfolgend in Tabelle 15 aufgeführt sind, eingesetzt. Die Hybridisierungsansätze wurden bei 95 °C für 10 min im Heizblock inkubiert, anschließend für 30 min bei Raumtemperatur zum Erkalten stehen gelassen und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

Tabelle 15: Primerkombinationen

	Primer 1	Primer 2
In6G1	6G1f-iCas	6G1r-iCas
In8G2	8G2f-iCas	8G2r-iCas
In8G3	8G3f-iCas	8G3r-iCas

Tabelle 16: Primer Hybridisierung zu Oligonukleotiden

Primer 1 (100 µM)	8 µl
Primer 2 (100 µM)	8 µl
ddH ₂ O	4 µl
Gesamt	20 µl

2.2.1.3 Ligation

Um die hybridisierten Oligonukleotide in das linearisierte iCas-Plasmid enzymatisch einzufügen, wurde die T4 DNA-Ligase verwendet. Die nachfolgende Tabelle 17 zeigt das hierfür verwendete Pipettierschema. Der Ansatz wurde bei 4°C über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Tabelle 17: Ligationsansatz

iCas (Plasmid DNA)	2 µl (100 ng)
Insert DNA (Hybridisierung)	5 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
T4 DNA-Ligase Reaction Buffer (10X)	2 µl
ddH ₂ O	10 µl
Gesamt	20 µl

2.2.1.4 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*

Zur Transformation der Plasmide in *E.coli* wurde die Elektroporation genutzt, bei welcher die Plasmamembran temporär permeabilisiert und so die Aufnahme der Fremd-DNA ermöglicht wird.

Durchgeführt wurde die Elektrotransformation mit 50 µl elektrokompetenten *E.coli*-Zellen, die auf Eis langsam aufgetaut wurden. Dazu wurden 3 µl des Ligationsansatzes gegeben, durch leichtes Anschnippen vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde dann in eine eiskalte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit maximal 2000 V für 5 ms. Sofort danach wurden 450 µl SOC-Medium in die Küvette gegeben, die Suspension in ein Eppendorf-Tube überführt und für 1h bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 120 µl des Ansatzes auf vorgewärmten LB-Agar-Platten mit Ampicillin oder Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.1.5 Kultivierung *E.coli*

Zur Kultivierung von *E.coli* wurde ein LB-Medium verwendet, dem je nach Selektionskassette Ampicillin oder Kanamycin zugesetzt wurden. Für die Flüssigkultur wurde flüssiges LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angesetzt und nach Zugabe der *E.coli* über Nacht bei 37 °C und 180 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Bei der Festkultur wurde den LB-Agar-Platten vor Fertigstellung Ampicillin oder Kanamycin zugesetzt. Diese wurden nach dem Ausplattieren der *E.coli* bei 37 °C in einem Inkubator inkubiert.

2.2.1.6 Plasmidisolaton

Aufreinigung mittels Mini-Präparation

Für die Plasmidisolaton aus den transformierten *E.coli* wurden am Tag nach der Transformation Klone von den LB-Agar-Platten gepickt, mittels Pipettenspitze in 5 ml LB-Medium mit 5 µl Ampicillin oder 1,75 µl Kanamycin überführt und anschließend über Nacht bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden 2 ml des Ansatzes bei 10000 rpm für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 100 µl S1-Puffer (siehe 2.1.4) resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension zuerst mit 100 µl S2-Lysis-Puffers, anschließend mit 100 µl des S3-Neutralisation-Puffers gemischt und bei 10000 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach dem Überführen des Überstandes in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube wurde 700 µl eiskaltes Ethanol (100 %) hinzugegeben und bei 14000 rpm für 50 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl Ethanol (70 %) gewaschen und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach

dem Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet 5-10 min bei RT getrocknet, abschließend in 27 µl ddH₂O aufgenommen und durch Vortexen gelöst. Produkt dieser Isolation ist die Plasmid-DNA.

Diese Plasmidisolation erlaubt keine photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration. Im Verlauf wurden von den hier isolierten Plasmiden im Analyse-Verdau 7 µl eingesetzt und für die Sequenzierung 6 µl verwendet.

Aufreinigung mittels Kits

Um Plasmid-DNA besonders sauber aufzureinigen, wurden die unter 2.1.9. aufgeführten Mini/Midi/Maxi-Plasmidisolations-Kits verwendet. Diese wurden nach den Herstellerangaben verwendet. Für die Mini-DNA-Präparation wurden 5 ml LB-Medium-Übernachtskulturen angesetzt, für eine Midi- oder Maxi-Präparation jeweils 100 ml LB-Medium-Übernachtskulturen. Die DNA-Pellets wurden am Ende in ddH₂O aufgenommen. Hier wurden für die Mini- 27 µl ddH₂O, für die Midi- 300 µl ddH₂O und für die Maxi-Präparation 300 - 500 µl ddH₂O verwendet.

2.2.1.7 Analyseverdau

Als Kontrolle einer Klonierung wurde das hergestellte DNA-Konstrukt mittels eines Restriktionsverdau analysiert (Tabelle 18 und 19). Die eingesetzten Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben verwendet. Bei einem Doppelverdau mit zwei Enzymen wurde auf dessen Kompatibilität geachtet.

Tabelle 18: Pipettierschema Analyseverdau

	Einfachverdau	Doppelverdau
DNA (1000 ng)	x µl	x µl
Enzym 1	1 µl	1 µl
Enzym 2	-	1 µl
Puffer (10x)	2 µl	2 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl	ad 20 µl
Gesamt	20 µl	20 µl

Tabelle 19: Beispielhafter Analyseverdau

DNA (1000 ng)	7 μ l
<i>NheI</i> -HF	1 μ l
<i>SpeI</i> -HF/ <i>MluI</i> -HF	1 μ l
10X rCutSmart Buffer	2 μ l
ddH ₂ O	ad 20 μ l
Gesamt	20 μl

2.2.1.8 Agarose Gelelektrophorese

Für die Herstellung eines 1 %igen Agarose-Gels wurden 0,5 g Agarose SE in 50 ml TBE-Puffer gelöst und für 5 min bei 600 W in der Mikrowelle gelöst. Der Flüssigkeitsverlust durch das Verdampfen wurde mit ddH₂O ausgeglichen und der Ansatz unter fließendem Wasser auf ca. 40 °C abgekühlt. Vor dem Gießen und dem anschließenden 20-minütigen Aushärten des Gels wurden der Agarose-Lösung noch 2,5 μ l Serva DNA Stain Clear G hinzugefügt. Zum Beladen des Gels mit den entsprechenden Proben wurde das Gel in eine Gelelektrophorese-Kammer gefüllt mit TBE-Puffer eingebettet und die Proben mit 1-2 μ l Orange G oder DNA Loading Dye (6x) versetzt. Der Strom wurde für 45 - 60 min bei 100 - 120 V angesetzt. Abschließend wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente durch einen UV-Analyzer sichtbar gemacht.

2.2.1.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Plasmide wurde extern von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Hierfür wurden der Sequenzierungsprimer 1:10 verdünnt und die Proben wie im aufgezeigten Schema in 1,5 ml Eppendorf-Tubes vorbereitet und verschickt (Tabelle 20). Zur Analyse der Sequenzierung wurde SnapGene oder FinchTV verwendet. Bestätigte die Sequenzierung den korrekten Einbau der Sequenz in das Plasmid, wurde es für den Einsatz in den Experimente freigegeben.

Tabelle 20: Schema DNA-Sequenzierung

Plasmid-DNA (1200 ng)	<12 µl
Sequenzierungsprimer (# 3056)	3 µl
ddH ₂ O	ad 15 µl
Gesamt	15 µl

2.2.1.10 Herstellung von Glycerolstocks

Für eine Weiter- oder Wiederverwendung der isolierten Plasmide wurde die DNA der korrekt klonierten Ansätze bei -80 °C in einem Kryoröhrchen eingefroren. Hierzu wurden vorab 200 µl der Bakterienkultur und 200 µl Glycerin vermischt.

2.2.1.11 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration wurde ein Photometer zur Absorptionsmessung (*Eppendorf*) verwendet, welches Wellenlängen im Bereich von 230 - 320 nm misst. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Genullt wurde das Gerät mittels ddH₂O. Vorab wurde die DNA-Probe 1:10 mit ddH₂O verdünnt und der Verdünnungsfaktor am Gerät eingestellt. Es wurden 7 µl der verdünnten Probe gemessen.

2.2.1.12 iCas-Klonierung Überblick

Nachfolgend wird schematisch die Klonierung des iCas-Plasmids mit den entsprechenden Sequenzen dargestellt. Hierbei erfolgte zunächst ein Restriktionsverdau des iCas-Plasmids mit *BpI* (siehe 2.2.1.1) und anschließend eine Gelelektrophorese zur Aufreinigung des geschnittenen Plasmids (siehe 2.2.1.8). Es folgte die Ligation des iCas-Plasmids (siehe 2.2.1.3) mit den Guide-Oligonukleotiden (siehe 2.2.1.2).

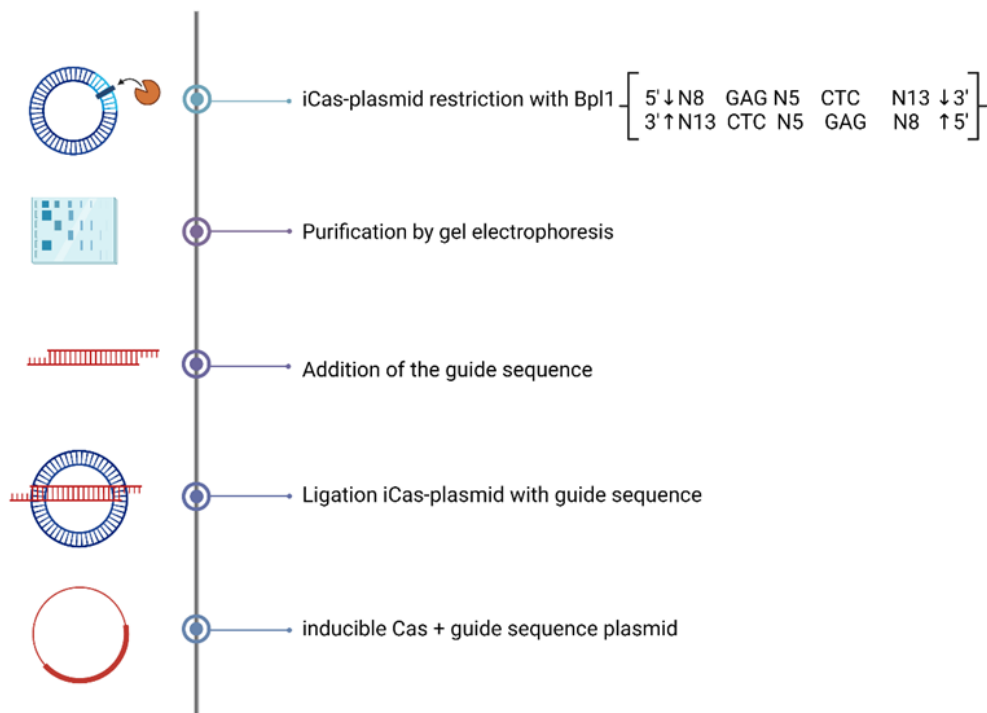


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Klonierung des induzierbaren Cas9-Plasmids mit entsprechenden Guide-Sequenzen. Nach dem Restriktionsverdau des iCas-Plasmids mit *BpI* und anschließender Elektrophorese zur Aufreinigung des geschnittenen Plasmids wurde das iCas-Plasmid mit den Guide-Oligonukleotiden ligiert. Erstellt mit BioRender.com.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung HEK293-T-Zellen

Für die Kultivierung von HEK293-T-Zellen wurde DMEM +++ (siehe 2.1.13) verwendet. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert. Passagiert wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 80 %. Hierfür wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml Accutase bei 37 °C kurzzeitig inkubiert. Anschließend wurden die Zellen unter Zugabe von 9 ml DMEM +++ abgelöst und je 1 ml der Zellsuspension in einer neuen Zellkulturschale mit 9 ml DMEM +++ ausgesät.

2.2.2.2 Kultivierung iNGNs

Für die Kultivierung der Zelllinie iNGN WT wurde StemFlex ++ Medium (siehe 2.1.13) verwendet. Die Zellen wurden auf mit Matrigel beschichteten 6-Well-Platten bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Passagiert wurden die Zellen je nach Vitalität und Konfluenz. Hierfür wurde das verbrauchte Medium abgenommen und die Zellen wurden mit 1ml DPBS -/- gewaschen. Zum Ablösen wurden die Zellen für 3 - 5 min mit 1 ml TrypLE bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die gelösten Zellen in 1 ml DPBS -/- aufgenommen und in 15 ml Falcon mit 4 ml DPBS -/- überführt. Die iNGN Zellen wurden bei 300 x g bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml StemFlex +++ resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in eine mit Matrigel beschichtete Platte mit 2 ml Medium ausgesät. Für die Kultivierung in 6-Well-Platten wurden ca. 300.000 Zellen pro Well ausgesät.

2.2.2.3 Kryokonservierung der iNGN Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die Zellen in frühen Passagestadien eingefroren. Dafür wurde das verbrauchte Medium abgenommen, die Zellen wurden mit DPBS -/- gewaschen und mit TrypLE abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit DPBS -/- in ein Falcon überführt und für 5 min bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Es wurden ca. 1 Millionen Zellen pro Kryo-Tube mit 90 % Medium und 10 % DMSO vermischt und zunächst für 24 h bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Neubauer Zählkammer eingesetzt. Hierfür wurden 20 µl der Zellsuspension in die Kammer gegeben und anschließend mittels Mikroskops die sich in den 4 Großquadranten befindende Zellzahl ermittelt. Das Großquadrat besteht aus 16 Kleinquadraten, ist 1 x 1 mm groß und fasst ca. 0,1 µl. Bei einer zu erwartenden hohen Zellzahl, kann die Zellsuspension vor Zählung verdünnt werden. Zur Errechnung der Zellzahl/ml wurde nachfolgende Formel angewendet:

$$\frac{(GQ1 + GQ2 + GQ3 + GQ4)}{4} \times VF \times 10^4 = ZZ/ml$$

Formel 1: Bestimmung der Zellzahl mit Neubauer Zählkammer. (GQ = Großquadrat, VF = Verdünnungsfaktor, ZZ = Zellzahl)

2.2.2.5 Transfektion HEK293-T-Zellen

Für die Transfektion von HEK293-T-Zellen mit Plasmid-DNA wurde Polyethylenimin (PEI) verwendet. Hierfür wurden am Vortag ca. 100.000 Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte ausgesät. Eine halbe Stunde vor der Transfektion wurde das Medium der Zellen durch 400 µl frisches, vorgewärmtes (37 °C) DMEM +++ ersetzt. Für die Transfektionsansätze wurden PEI, NaCl (150 mM) und DNA gemischt (Tabelle 21 - 23), gevortext und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze vorsichtig tropfenweise auf die Zellen gegeben und für 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 4 - 6 h wurde das Medium abgenommen und durch frisches DMEM+++ ersetzt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Transfektionskontrollen wurden pGFP2 (500 ng) als Positivkontrolle und RLuc8 (500 ng) als Kontrolle des BRET-Assays verwendet (siehe 2.1.7).

Tabelle 21: Transfektion HEK293-T mit BRET-Reporter und Cas9-System

Kotransfektion	(-) gRNA	(+) gRNA
NaCl (150 nm)	40 µl	40 µl
Plasmid 1 (BRET-Reporter In6T1/In8T2/In8T3)	500 ng	500 ng
Plasmid 2 (Cas9 - Guide)	400 ng	-
Plasmid 3 (Cas9 + Guide In6G1/ In8G2/In8G3)	-	400 ng
PEI	30 µl	30 µl

Tabelle 22: Transfektion HEK293-T TMF/4-Hydroxytamoxifen-Konzentrationsreihe

Kotransfektion	(-) gRNA	(+) gRNA
NaCl (150 nm)	30 µl	30 µl
Plasmid 1 (BRET-Reporter T11)	500 ng	500 ng
Plasmid 2 (iCas (T11) – Guide)	800 ng	-
Plasmid 3 (iCas (T11) + Guide)	-	800 ng
PEI	40 µl	40 µl

Tabelle 23: Transfektion HEK293-T mit BRET-Reporter und iCas-System

Kotransfektion	(-) gRNA	(+) gRNA
NaCl (150 nm)	30 µl	30 µl
Plasmid 1 (BRET-Reporter In6T1/In8T2/In8T3)	500 ng	500 ng
Plasmid 2 (iCas9 - Guide)	600 ng	-
Plasmid 3 (iCas9 + Guide In6G1/ In8G2/In8G3)	-	600 ng
PEI	40 µl	40 µl

2.2.2.6 Transfektion iNGNs

Für die Transfektion von iNGNs wurden am Vortag ca. 100.000 Zellen pro 24 Well ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Transfektionsmedium DMEM--- wurde auf 37 °C erwärmt und mit RevitaCell versetzt (DMEM---R). Als Transfektionsmittel wurde Lipofectamine Stem Reagent (ThermoFisher) verwendet. Die Transfektionsansätze wurden wie folgt angesetzt:

Tube 1: 25 µl DMEM---R und 2 µl Lipofectamine Stem Reagent

Tube 2: 25 µl DMEM---R und entsprechende DNA-Mengen

Tube 1 und Tube 2 wurden gut gevortext, zusammengeführt und 10 min inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der Zellen abgenommen und durch 500 µl DMEM---R ersetzt. Anschließend wurden die Transfektionsansätze auf die Zellen gegeben und für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 4 - 6 h wurden dem Medium 500 µl StemFlex +++ hinzugegeben und die Zellen für weitere 24 h inkubiert.

Die eingesetzten DNA-Mengen sind in Tabelle 23 (siehe 2.2.2.5) dargestellt.

Tabelle 24: Transfektionsansatz für ±gRNA/Cas9 und BRET-Reporter in iNGN Zellen

Kotransfektion	(-) gRNA	(+) gRNA
DMEM--R	2x 25 µl	2x 25 µl
Plasmid 1 (BRET-Reporter In6T1/In8T2/In8T3)	500 ng	500 ng
Plasmid 2 (Cas9 - Guide)	400 ng	-
Plasmid 3 (Cas9 + Guide In6G1/ In8G2/In8G3)	-	400 ng
Lipofectamine Stem Reagent	2 µl	2 µl

Tabelle 25: DNA-Mengen der Kontrollen RLuc8 und GFP

	RLuc8-Kontrolle	GFP2-Kontrolle
Plasmid-DNA	500 ng	500 ng

2.2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde zur Kontrolle der Transfektion bzw. des Transfektionserfolges verwendet. Hierfür wurde das Medium der Zellen abgenommen, die Zellen wurden mit PBS oder DPBS (-) gewaschen und anschließend Bilder aufgenommen. Für die Aufnahmen wurde ein Objektiv mit 4 x optischen und 2 - 4 x digitalem Zoom bzw. ein Objektiv mit 20 x optischem und 10 - 20 x digitalem Zoom eingesetzt.

2.2.4 Proteinchemische Methoden

2.2.4.1 Zellyse

Für die Herstellung von Zellysaten wurde das Prinzip des wiederholten Einfrierens und Auftauens (*Freeze-Thaw*) verwendet. Nach Abnehmen des Mediums wurden die Zellen mit 0,5 - 1 ml PBS gewaschen. Daraufhin wurden 100 µl frisches PBS auf die Zellen gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension 2 - 3 mal für 3 - 5 s in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension bei 17968 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Zellysate wurden in ein neues Tube überführt.

2.2.4.2 BRET-Assay

Zur Bestimmung der *Frameshift*-Rate wurde unter anderem ein BRET-Assay durchgeführt. Hierfür wurden die Gesamtzellysate verwendet. Als Substrat für die Luciferase wurde Colenterazine 400a 1:100 in 1 x PBS verdünnt und lichtgeschützt 20 min auf Eis inkubiert. Die benötigte Menge des Substrates ergibt sich aus der Anzahl der eingesetzten Wells einer 96-Well-Lumineszenz-Platte (je 100 µl) und dem Vorspülen des Gerätes (1,5 ml). Pro Ansatz werden 4 Wells der 96-Well-Lumineszenz-Platte benötigt und eine Zellysatsmenge von 5 µl eingesetzt. Die Messung erfolgte am Tecan Infinite M1000Pro. Hier-

bei wurde ein Dual-Lumniscene-Modus des Gerätes verwendet, welches zwei Lichtbereiche erfasst: Zum einen die Emission der Luciferase mittels des Filters „Magenta“, welcher Wellenlängen im Bereich von < 450 nm erfasst, zusätzlich eine Transmission im Magenta-Bereich hat und die Luciferase mit 400 nm inkludiert, zum anderen über den Filter „Green“ einen Bereich zwischen 500 - 550 nm, wodurch das angeregte GFP2 gemessen werden kann. Aus beiden korrespondierenden Emissionsmessungen kann die BRET-Ratio bestimmt werden, welche in nachfolgender Gleichung mit Korrekturfaktor dargestellt ist. Der Korrekturfaktor (*correction factor*; cF) ergibt sich aus der Messung des Luciferasedonors ohne Akzeptorfluorophor.

Die BRET-Ratio ermittelt sich wie folgt:

$$\text{BRET-Ratio} = \frac{\text{Biosensor Em (Green)}}{\text{Biosensor Em (Magenta)}} - \frac{\text{cF (Green)}}{\text{cF (Magenta)}}$$

Formel 2: BRET-Ratio. Emissionen (Em), die durch den Filter Green wahrgenommen werden, geteilt durch die Emissionen, die durch den Filter Magenta erfasst werden, unter Abzug des Quotienten aus den Korrekturfaktoren.

Damit die Schneideaktivität der Komplexe der (i)Cas9 mit und ohne gRNA sowie später auch 6T1, 8T2 und 8T3 in Form einer *Frameshift*-Rate miteinander verglichen werden können, wurden in jeder Versuchsreihe Positiv- und Negativkontrollen durchgeführt (siehe 2.2.2). Als Positivkontrolle wurden die Ansätze ohne gRNA und als Negativkontrolle die Ansätze mit gRNA eingesetzt. Um die prozentuale *Frameshift*-Rate zu generieren, wurde der Mittelwert der Rluc8-Kontrolle von den Mittelwerten der ±gRNA/(i)Cas9-Komplexen abgezogen und fungiert somit als untere Grenze und Negativkontrolle. Anschließend wird der Mittelwert der BRET-Ratio -gRNA/(i)Cas durch den +gRNA/(i)Cas geteilt und prozentual umgewandelt.

Die *Frameshift*-Rate ermittelt sich wie folgt:

$$\text{Frameshift-Rate (\%)} = \left(1 - \frac{(\text{MW BRET Ratio (+gRNA)} - \text{MW BRET Ratio (Rluc8)})}{(\text{MW BRET Ratio (-gRNA)} - \text{MW BRET Ratio (Rluc8)})} \right) \times 100$$

Formel 3: *Frameshift*-Rate. Die aus dem BRET-Assay resultierenden Mittelwerte und Standardabweichungen wurden zur Berechnung der *Frameshift*-Rate verwendet. Mittelwert (MW)

2.2.4.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde zur Quantifizierung der GFP exprimierenden Zellen des BRET-Reporter-Plasmids verwendet und erfolgte mit dem FACSCanto II (FACSDiva Software Version 6.1.3). Nach dem Waschen der Zellen mit PBS und dem Ablösen mittels Accutase (5 min bei RT) wurden die Zellen in PBS resuspendiert und mit 300 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Für die Messung wurden die Zellen anschließend in PBS aufgenommen und auf Eis gelagert. Die Auswertung der erhobenen Werte erfolgte mit Microsoft Excel und die Darstellung mittels FCS Express 7 Research Edition (siehe 2.1.14).

2.2.5 Statistik

Die einzelnen Versuche wurden mehrfach unabhängig voneinander durchgeführt, falls nicht anders angegeben mit einem $n = 3$. Die einzelnen Messungen des BRET-Assays wurden als Quadrupel durchgeführt. Um fundierte Aussagen über die Daten treffen zu können, wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Zwischen den unterschiedlichen Experimenten und den entsprechenden Proben wurde bei einem Vergleich zwischen zwei Gruppen, bei Normalverteilung, der in SigmaPlot enthaltene paired t-Test herangezogen. Für den Vergleich mehrerer Gruppen untereinander kam bei Normalverteilung der ANOVA-Test zum Einsatz. Zur statistischen Analyse und Diagrammerstellung wurde das Programm SigmaPlot 12/14.5 verwendet. Zusammenhänge, die als höchst signifikant identifiziert wurden ($p < 0,001$), sind mit *** gekennzeichnet. Hochsignifikante Zusammenhänge mit einem p-Wert $< 0,01$ wurden mit ** markiert, und signifikante Ergebnisse ($p < 0,05$) sind mit * gekennzeichnet. Nicht signifikante Verhältnisse wurden mit # dargestellt.

3. Ergebnisse

Über die DNA-Reparaturmechanismen und das Verhalten nach einem DSB in iPSCs ist bisher wenig bekannt. Gerade im Hinblick auf die Weiterentwicklung des therapeutischen *Genome Editings* bei IRDs sollte jenes Verhalten mithilfe von iPSCs und des CRISPR/Cas9-Systems in dieser Arbeit untersucht werden. Hierfür wurde im ersten Schritt der BRET-Reporter mit \pm gRNA/Cas9-Komplexen in HEK293-T-Zellen transfiziert, um die Funktionalität der Elemente zu untersuchen. Zum Einbringen gezielter DSB und zur Untersuchung ihrer Reparatur sollte der BRET-Reporter gemeinsam mit einem induzierbaren Cas9-System in die HEK293-T-Zellen transfiziert werden. Im letzten Schritt dieser Arbeit sollte das in den HEK293-T-Zellen erprobte gRNA/Cas9-System zusammen mit den entsprechenden BRET-Reportern in iPSCs transfiziert werden, um ein intermediäres System zwischen den Standard-Zellkultur-Modellen und den Tiermodellen zu etablieren.

3.1 Überprüfung der Funktionalität von Cas9 und BRET-Reportersystem in HEK293-T-Zellen

Die eingesetzten Plasmide mit dem BRET-Reporter (inkl. Targetsequenzen) und die Endonuklease Cas9 mit und ohne den drei unterschiedlichen gRNAs wurden bereits in anderen Projekten der Arbeitsgruppe eingesetzt. Die drei unterschiedlichen gRNA-Sequenzen wurden hier zufällig ausgewählt und waren bereits in anderen Projekten unterschiedlich effektiv. Die Targetsequenzen und passenden Guide-Sequenzen wurden durch das Onlinetool www.autnm.bio generiert (siehe 2.1.8). Der entsprechende BRET-Reporter enthält also jeweils eine spezifische Targetsequenz. Die Targetsequenzen stammen aus dem CLN3-Gen, welches hierbei lediglich als ein unabhängiges Modellsystem fungiert. Wenn nun im Verlauf von dem BRET-Reporter die Rede ist, ist immer der zu der gRNA passende Reporter gemeint. Die Überprüfung auf Funktionalität der Plasmide erfolgte zunächst durch eine Transfektion in HEK293-T-Zellen (siehe 2.2.2.5) und anschließende Bestätigung mittels BRET-Assay (siehe 2.2.4.2) und Durchflusszytometrie (siehe 2.2.4.3) (siehe Abb. 14).

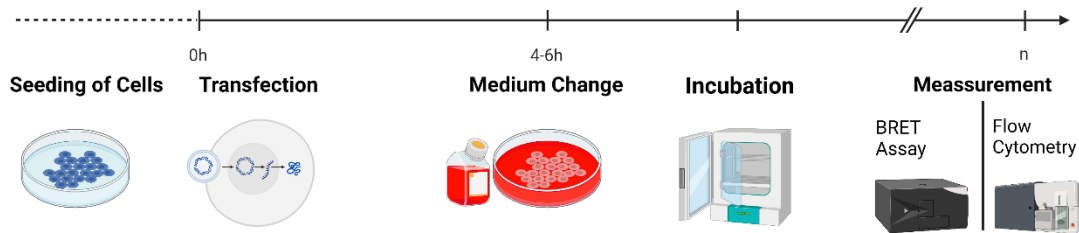


Abbildung 14: Schematischer Versuchsaufbau zur Überprüfung der Funktionalität der Plasmide mithilfe einer Transfektion in HEK-Zellen und anschließendem BRET-Assay bzw. Durchflusszytometrie. Nach einer Übernachtskultivierung wurden die Zellen für 4–6 Stunden transfiziert. Anschließend wurde das Transfektionsmedium entfernt, und die Zellen wurden für weitere 24 Stunden kultiviert. Zu einem definierten Zeitpunkt (n) wurden die Zellen entweder einem BRET-Assay oder einer durchflusszytometrischen Analyse unterzogen, um die Transfektionseffizienz sowie die Funktionalität der transfizierten Elemente zu überprüfen. Erstellt mit BioRender.com.

Die Cotransfektion in HEK293-T-Zellen setzte sich wie folgt zusammen: ① BRET-Reporter (In6T1/In8T2/In8T3) und Cas9 (-) ohne gRNA, was dem px459-Plasmid entspricht, und ② BRET-Reporter (In6T1/In8T2/In8T3) mit Cas9 (+) gRNA (Abb. 15). Als Positivkontrolle über den Transfektionserfolg wurde ein GFP2-Plasmid transfiziert und durch die Fluoreszenzmikroskopie betrachtet. Weitere Positivkontrollen des Transfektionserfolgs stellten die transfizierten Zellen der Cotransfektionen mit BRET-Reporter und Cas9 ohne gRNA dar. Hierbei konnte kein DSB erzeugt werden und das auf dem BRET-Reporterplasmid vorhandene GFP2 vollständig exprimiert werden. Die transfizierten Zellen der Cotransfektionen mit gRNA führten durch einen eingebrachten DSB zu einer Leserasterverschiebung und damit zur Inaktivierung GFP-Sequenz. Eine Beurteilung der Funktion der gRNA/Cas9-Systeme bezüglich des GFP-Signals ist unter dem Fluoreszenzmikroskop möglich.

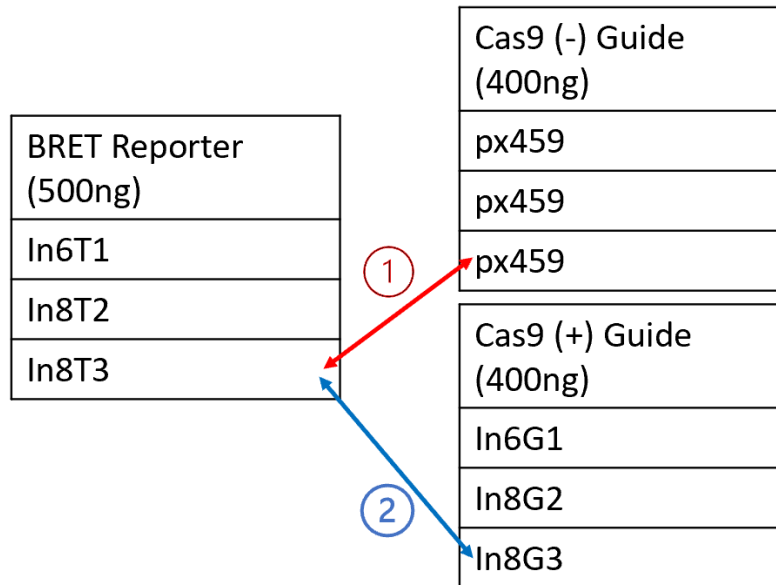


Abbildung 15: Schema der Cotransfektion des BRET-Reporters mit +/- gRNA/Cas9. Schematisch dargestellt ist unter 1 die Transfektion aus BRET-Reporter (In8T3) und Cas9 ohne gRNA (px459) und unter 2 die Transfektion des BRET-Reporters (In8T3) und Cas9 mit gRNA (In8G3).

Abbildung 16 zeigt repräsentative Bilder der Zellen 48 h nach der Transfektion. Beispielhaft beschreibt In6T1 (-) die Transfektionsansätze ohne gRNA und In6T1 (+) mit gRNA. Stellt man die transfizierten Zellen ohne gRNA denen mit gRNA gegenüber, zeigt sich eine Abnahme der Intensität des GFP-Signals sowie eine geringere Anzahl an sichtbar fluoreszierenden Zellen bei den Cotransfektionen mit gRNA. Diese Beobachtung findet sich auch bei transfizierten Zellen der Sequenzen 8T2 und 8T3 wieder. Unabhängig von der verwendeten Targetsequenz zeigen alle Ansätze mit gRNA eine geringere Anzahl an grün fluoreszierenden Zellen als die Ansätze ohne gRNA. Außerdem weisen die Ansätze ohne gRNA eine deutliche höhere Intensität der Fluoreszenz auf.

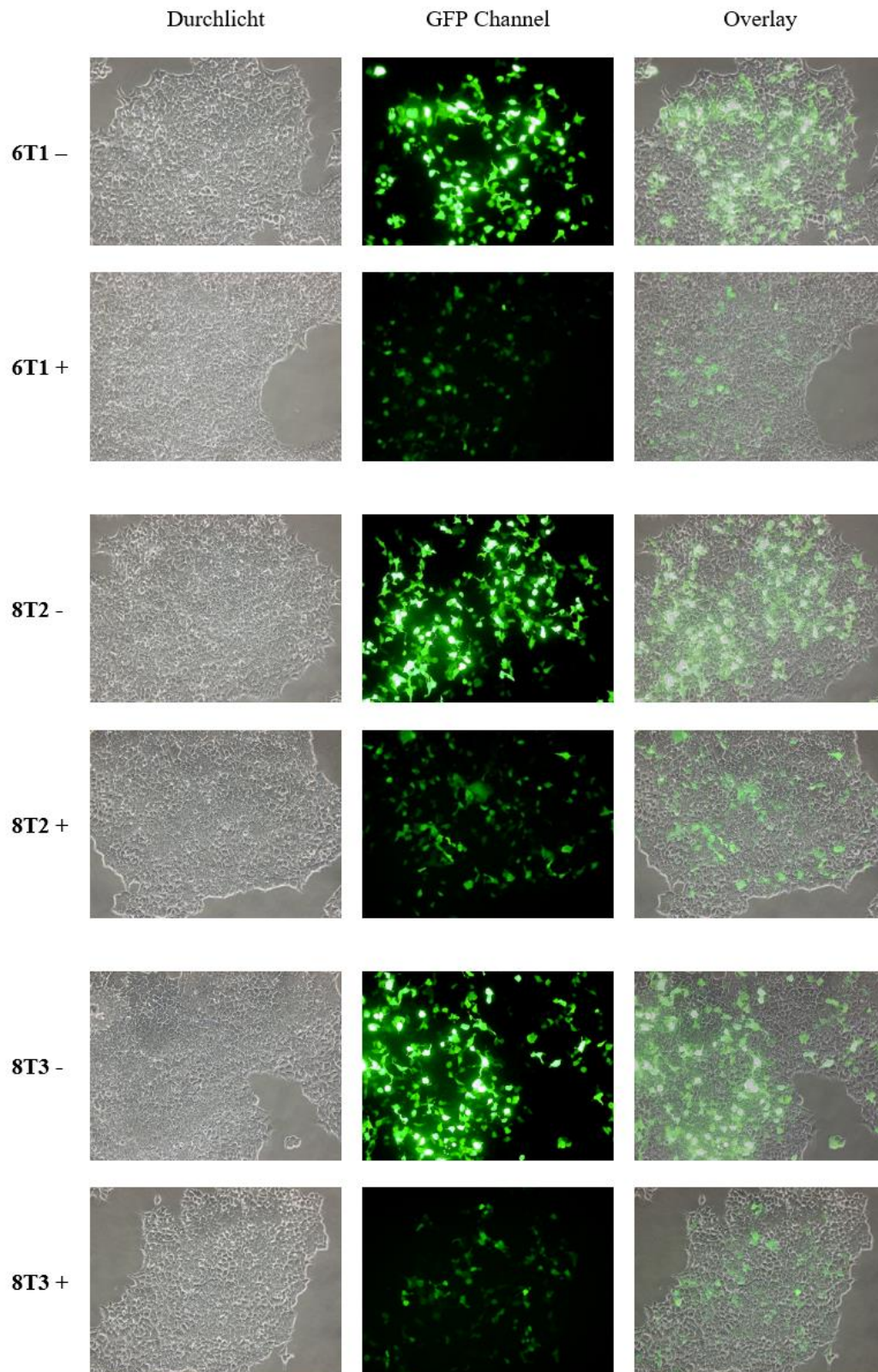


Abbildung 16: Transfizierte HEK293-T-Zellen mit BRET-Reporter und \pm gRNA/Cas9, T0T2M. Zu sehen sind die Zellen im Durchlicht, das GFP Signal sowie die Überlagerung aus beiden. Gezeigt werden die transfizierten Zellen mit dem BRET-Reporter 6T1 ohne gRNA und mit gRNA. Darunter dargestellt sind die transfizierten Zellen der Transfektionen mit 8T2 ohne und mit gRNA. 8T3 - und + zeigen die transfizierten Zellen mit dem BRET-Reporter 8T3, ohne gRNA und mit gRNA.

3.1.1 Quantifizierung der Schneideaktivität nach Cotransfektion in HEK293-T-Zellen mittels BRET-Assay

Zur Quantifizierung der Schneideaktivität des gRNA/Cas9-Systems in Verbindung mit dem BRET-Reporter wurde unter anderem ein BRET-Assay nach 48 h bzw. nach 120 h durchgeführt. Gegenübergestellt und verglichen werden die Werte der Zellen der Cotransfektionen des BRET-Reporters und der Cas9 mit und ohne gRNA. Eine Änderung der BRET-Ratio zwischen -gRNA und +gRNA ist aufgrund der Schneideaktivität des integrierten und durch die gRNA aktiven CRISPR/Cas-Systems zu erwarten. Der BRET-Ratio (einheitslos) wurde die Einheit BRET Units (BU), zenti BRET Units (cBU) oder milli BRET Units (mBU) zugeteilt.

48 h Stunden nach der Transfektion wiesen alle Lysate der Zellen mit gRNA eine hoch signifikant ($p < 0,001$) verringerte BRET-Ratio auf (Abb. 17). Bei den Zellen mit der Targetsequenz 6T1 konnte eine Differenz von 7,6 cBU (von $19,5 \pm 0,4$ cBU auf $11,9 \pm 0,5$ cBU) nachgewiesen werden, bei den Zellen mit 8T2 eine Differenz von 4,8 cBU (von $18,9 \pm 0,4$ cBU auf $14,1 \pm 0,3$ cBU) und bei den Zellen mit 8T3 eine Differenz von 13,9 cBU (von $24,8 \pm 0,7$ cBU auf $10,9 \pm 0,2$ cBU). Aus den Änderungen der BRET-Ratio folgt für 6T1 eine *Frameshift*-Rate von $45 \pm 4,2$ % sowie bei 8T2 von $29 \pm 3,2$ % und bei 8T3 von $62 \pm 3,6$ %. Jede Targetsequenz zeigt einzeln eine signifikante Schneideaktivität, auch im Vergleich untereinander ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen den Sequenzen (vgl. Abb. 17B).

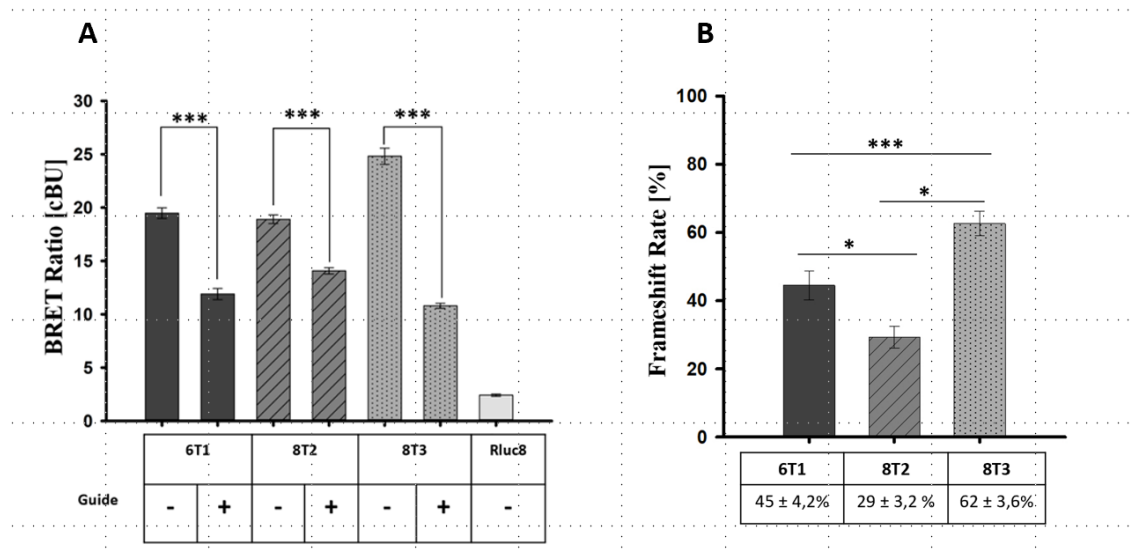


Abbildung 17: BRET-Assay 48 h nach Transfektion in HEK293-T mit \pm gRNA/Cas9. **A:** 48 h nach der Transfektion wurde die Aktivität der Luciferase als BRET-Ratio in BRET Units (cBU) in den mit dem BRET-System und \pm gRNA/Cas9 transfizierten Zellen bestimmt. Die BRET-Reporter enthielten jeweils die zu den Guide-Sequenzen passenden Targetsequenzen 6T1, 8T2 oder 8T3. RLuc8 fungiert als Kontrolle des BRET-Assays. **B:** Die *Frameshift*-Raten, Ausdruck der unterschiedlichen Schneideaktivität der einzelnen Targetsequenzen vergleichend dargestellt. Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt und die einzelnen Messungen vierfach bestimmt. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$. $n = 3$.

Auch 120 h nach der Transfektion konnte eine hoch signifikante Abnahme der BRET-Ratio bei allen drei Sequenzen beobachtet werden (Abb. 18). Die BRET-Ratio der mit 6T1 (-gRNA) transfizierten Zellen sank von $24,6 \pm 0,3$ cBU auf $8,5 \pm 0,3$ cBU (+gRNA), die Ratio der mit 8T2 transfizierten Zellen von $24,5 \pm 0,4$ cBU auf $11,7 \pm 0,3$ cBU. Die größte Reduktion von $31,7 \pm 0,9$ cBU (-gRNA) auf $7,0 \pm 0,1$ (+gRNA) konnte bei den Zellen mit der 8T3-Sequenz gemessen werden. Die BRET-Ratio der Negativkontrolle RLuc8 liegt bei $5,9 \pm 0,1$ cBU. Die Sequenz 8T3 nähert sich somit fast den BRET-Ratio-Werten der Luciferase an. Die *Frameshift*-Rate für 6T1 ergibt $86 \pm 3,9$ % für 8T2 $69 \pm 3,0$ % und für 8T3 $96 \pm 3,8$ %.

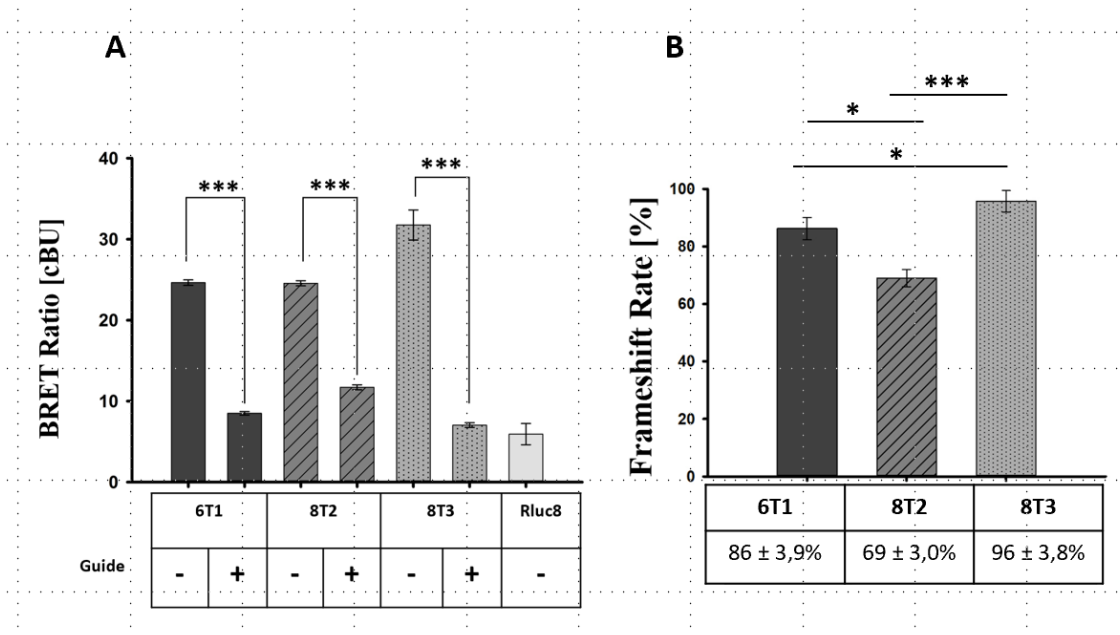


Abbildung 18: BRET-Assay 120 h nach Transfektion in HEK293-T mit \pm gRNA/Cas9. **A:** 120 h nach der Transfektion wurde die Aktivität der Luciferase als BRET-Ratio in BRET Units (cBU) in den mit dem BRET-System und \pm gRNA/Cas9 transfizierten Zellen bestimmt. Die BRET-Reporter enthielten jeweils die zu den Guide-Sequenzen passenden Targetsequenzen 6T1, 8T2, oder 8T3. RLuc8 fungiert als BRET-Assay Kontrolle. **B:** Die *Frameshift*-Raten sind Ausdruck der unterschiedlichen Schneideaktivität der einzelnen Targetsequenzen vergleichend dargestellt. Jeder Versuch erfolgte dreimal und die Messwerte wurden durch eine Vierfachbestimmung errechnet. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$. $n = 3$.

Sowohl für die Messungen nach 48 h als auch nach 120 h zeigt sich zwischen 6T1 und 8T1 für 6T1 eine signifikant höhere Schneideaktivität, mit einem $p < 0,05$. Zwischen 6T1 und 8T3 ergibt sich für 8T3 eine signifikant höhere *Frameshift*-Rate ($p < 0,05$). Im Vergleich von 8T2 und 8T3 kann eine statistische Signifikanz von $p < 0,001$ berechnet werden.

3.1.2 Durchflusszytometrische Analyse der Schneideaktivität

Um Veränderungen in der Expression von GFP2, welches auf dem BRET-Reporter lokalisiert ist, in den cotransfizierten Zellen quantifizieren zu können, wurde eine Durchflusszytometrie 120 h nach der Transfektion durchgeführt. Eine Reduktion des GFP-Signals präsentiert sich nach einer erfolgreichen Kotransfektion von BRET-Reporter und +gRNA/Cas9, welche bei entsprechender Funktionalität einen Doppelstrangbruch mit neuentstandem Stoppcodon vor der Sequenz für GFP2 nach sich zieht.

Bei allen drei verwendeten gRNAs konnte ein Unterschied zwischen den transfizierten Zellen mit und ohne Guide-Sequenz dargestellt werden (Abb. 19). Der Unterschied bei Zellen mit der Targetsequenz 6T1 -gRNA zu +gRNA betrug im Mittel $5,19 \pm 0,64\%$. Bei Zellen, welche mit der Sequenz 8T2 transfiziert wurden, konnte eine Reduktion von $11,51 \pm 0,77\%$ auf $4,44 \pm 0,19\%$ gemessen werden, was einen Mittelwert von $7,08 \pm 0,72\%$ ergab. Auch die mit Sequenz 8T3 transfizierten Zellen zeigten eine Abnahme der Intensität und Anzahl der GFP-positiven Zellen von $4,38 \pm 0,43\%$.

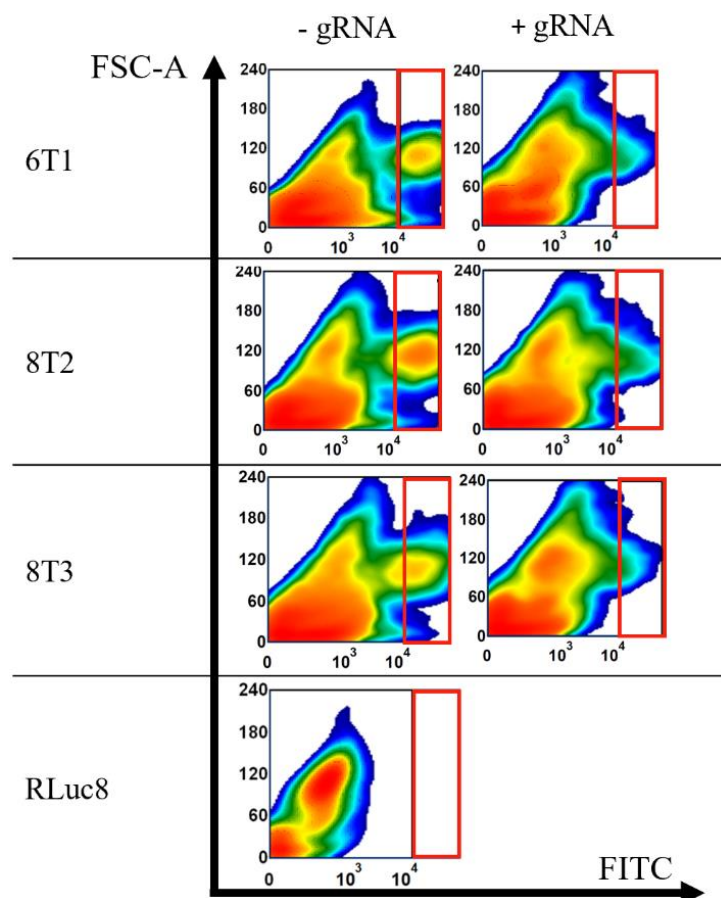


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der mit 6T1, 8T2 und 8T3 transfizierten Zellen. Repräsentative Darstellung der Durchflusszytometrie der Zellen mit den Targetsequenzen 6T1, 8T2, 8T3 \pm gRNA. Als Negativkontrolle wurde die Luciferase (RLuc8) verwendet. Der rot markierte Bereich zeigt die GFP-positiven Zellen. Erstellt mit FCS Express 7 Research Edition und nachträglich modifiziert. n = 3.

3.2 Klonierung von iCas9-System mit Guide-Sequenzen

Nachdem die Funktionalität des BRET-Reporters und der gRNAs in einem nicht-induzierbaren Cas9-System getestet wurde, sollte im nächsten Schritt ein induzierbares Cas9-

System in Kombination mit den gleichen gRNAs getestet werden. Durch eine Fusion der Cas9-Domäne mit der hormonbindenden Domäne des Östrogenrezeptors (ERT2) wird ein An- und Abschalten der Endonukleaseaktivität durch die Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen ermöglicht.

Zunächst erfolgte die Hybridisierung der Oligonukleotide als Ausgangsprodukt der gRNA, dann die Linearisierung des iCas9-Plasmids mittels des *BplI*-Enzyms sowie die Ligation. Überprüft wurde die korrekte Integration der gRNA-Sequenzen durch einen Analyseverdau und eine Teilsequenzierung im Bereich der Ligationstelle. Hierbei konnte für jede der drei Guide-Sequenzen eine erfolgreiche Integration bestätigt werden (Abb. 20).

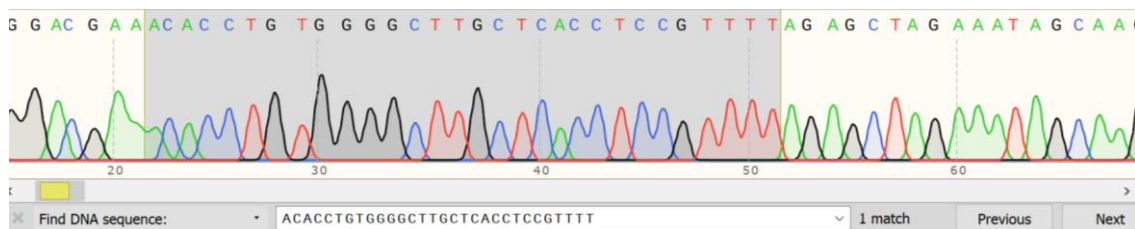


Abbildung 20: Sequenzierung eines im Restriktionsverdau positiven Klons des gRNA/iCas-(8G3) Konstruktes mit #3056 (Wolle) nach der Klonierung. Der graue Bereich markiert die gesuchte Guide-Sequenz von 8G3. Erstellt mit snapgene.com und nachträglich modifiziert.

Abschließend dargestellt ist in Abbildung 21 schematisch der Bereich des iCas-Plasmids, in dem die Klonierung stattgefunden hat.

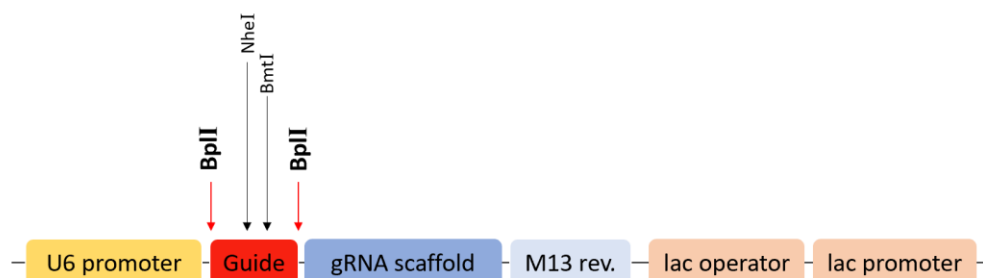


Abbildung 21: Schematische Darstellung der erzielten Klonierung. Dargestellt ist der U6-Promotor (gelb), dem die unterschiedlichen Guide-Sequenzen (6T1, 8T2, 8T3) (rot) folgen. Darüber ist schematisch die Lokalisation der Schnittstellen von *BplI*, *NheI* und *BmtI* dargestellt. Der Guide-Sequenz folgen ein *gRNA scaffold* (blau), ein *lac operator* und *promotor* (orange).

3.3 Optimierung der 4-Hydroxytamoxifen Induktion der Cas9-Expression

Um die optimale Konzentration [nM] an 4-Hydroxytamoxifen zu ermitteln, die für die Induktion der Expression von Cas9 nötig ist, aber einen sehr geringen zytotoxischen Effekt hat, erfolgte die Induktion der induzierbaren Cas9 mit unterschiedlichen Mengen von Tamoxifen und im zweiten Experiment mit unterschiedlichen Mengen des 4-Hydroxytamoxifen. Hierfür wurden je 20 Konzentrationen im Bereich von 0 - 10.000 nM gewählt. Die Induktion erfolgte 4 h nach Transfektion der HEK293-T-Zellen mit einem zuvor in der Arbeitsgruppe getesteten gRNA(G11)/iCas-Plasmid und dem entsprechenden getesteten BRET-(T11)-Reporter. Die Überprüfung über die Transfektionseffizienz erfolgte zunächst mittels Fluoreszenzmikroskopie. Nachfolgend wurde die Effizienz der Induktion der Expression über das BRET-Assay gemessen.

Eine Abnahme der BRET-Ratio spiegelt eine Funktionalität der Endonuklease mit Inaktivierung des GFP2 im BRET-Reporter wider. Es zeigt sich, dass 4-HT schon bei geringeren Konzentrationen eine Induktion der Endonuklease auslöst (Abb. 22). Des Weiteren ist zu beobachten, dass sich die Kurve des Tamoxifen bei Mengen von 10.000 nM der Kurve des 4-HT annähert und ähnliche Reduktionen der BRET-Ratio zulässt. Für die nachfolgenden Experimente mit 4-Hydroxytamoxifen wurde eine Menge von 10.000 nM eingesetzt.

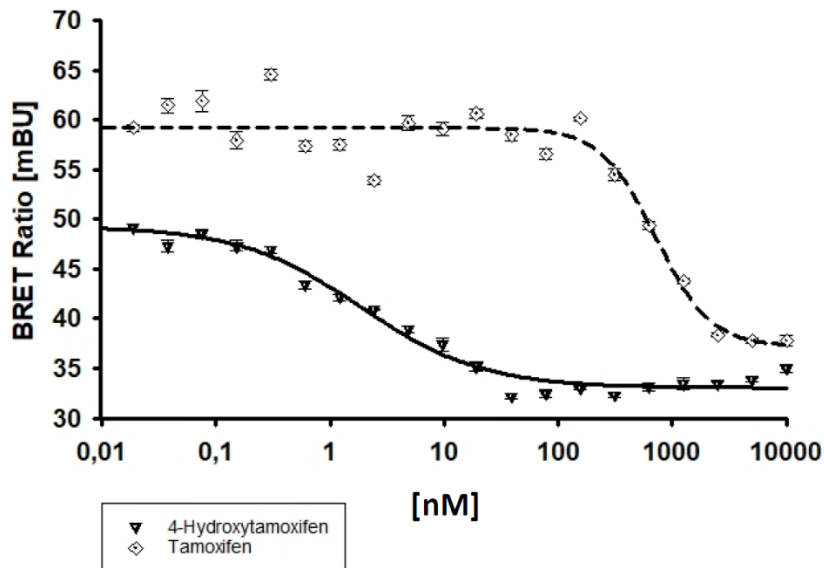


Abbildung 22: Bestimmung der benötigten (4-Hydroxy-)Tamoxifen Menge für die Induktion von Cas9. Konzentrationsreihe Tamoxifen vs. 4-Hydroxytamoxifen. 4 h nach der Transfektion des iCas-Systems mit BRET-Reporter in HEK293-T-Zellen wurden die Zellen für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von 4-Hydroxytamoxifen oder Tamoxifen behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und einem BRET-Assay unterzogen und jeder Ansatz vierfach gemessen. n = 1

3.4 Überprüfung der Funktionalität der klonierten gRNA/i-Cas-Plasmide

Um die zuvor klonierten gRNA/iCas-Plasmide auf ihre Funktionalität zu testen, wurden die HEK293-T-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit 10.000 nM 4-Hydroxytamoxifen behandelt. Des Weiteren sollte mittels BRET-Assays die Funktion und Aktivität der BRET-Reporter (inkl. der Targetplasmide) zusammen mit den neu klonierten gRNA/iCas-Plasmiden überprüft werden. Da das iCas-Plasmid größer als das der nicht-induzierbaren Cas9 ist, erfolgte eine Anpassung der eingesetzten Menge in der Transfektion. Um die Experimente der Cas9 mit denen der iCas vergleichen zu können, orientierten sich die Ansätze der iCas-Transfektionen an denen der Cas9.

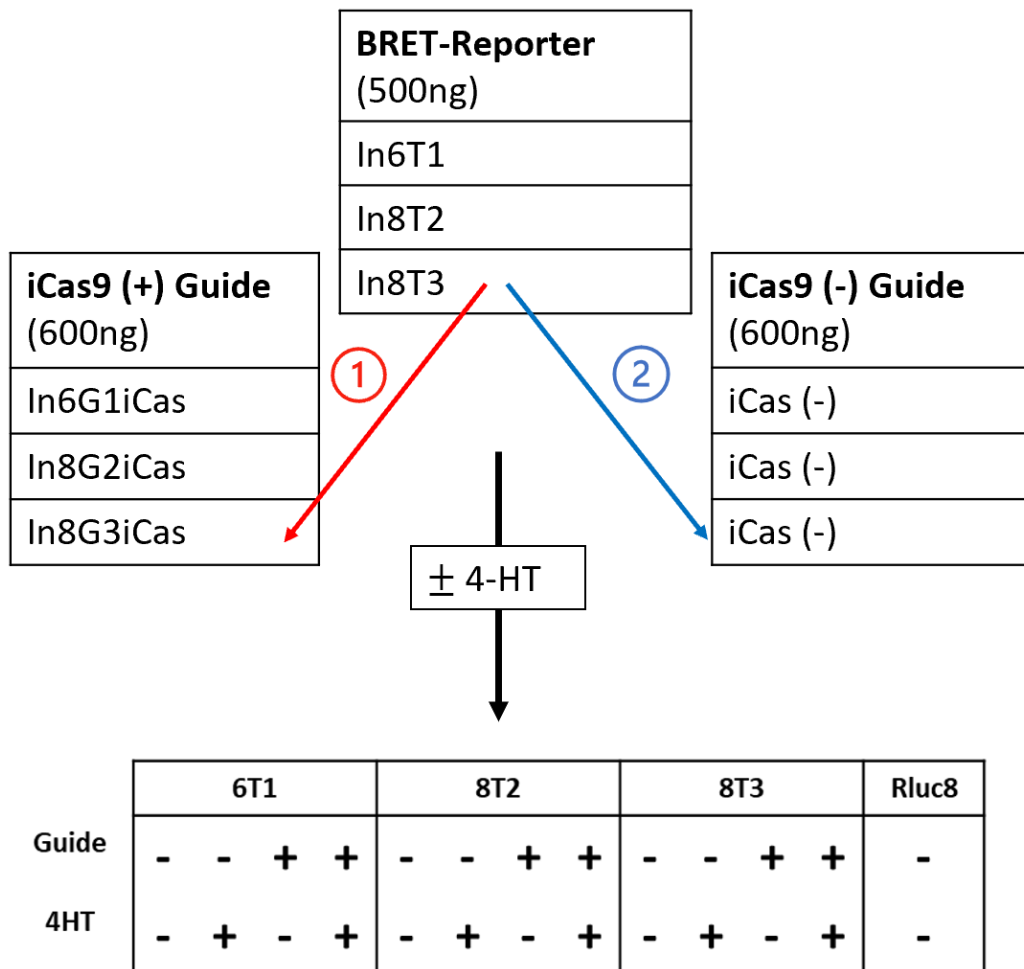


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Cotransfektion des BRET-Reporters und iCas mit und ohne gRNA und anschließender Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen. Außerdem dargestellt sind die daraus entstehenden Einzelexperimente, die gleichzeitig auch als Kontrollen dienen. Diese Bandbreite an Kombinationen wurde lediglich für den Zeitpunkt T0iT2M durchgeführt.

Um den zeitlichen Einfluss der Induktion und der Messung zu untersuchen, wurde der Zeitpunkt der Induktion nach der Transfektion sowie der Zeitpunkt der Messung variiert.

Bezeichnet werden sie in den nachfolgenden Abschnitten und Diagrammen wie folgt:

T0iT1M → Induktion: 4 h nach Transfektion, Messung: 24 h nach Transfektion

T0iT2M → Induktion: 4 h nach Transfektion, Messung: 48 h nach Transfektion

T2iT4M → Induktion: 48 h nach Transfektion, Messung: 96 h nach Transfektion

Als Negativkontrolle wurde die Luciferase (RLuc8) verwendet.

BRET-Assay Transfektion T0iT1M

Für den ersten Ansatz erfolgte die Induktion mit 4-Hydroxytamoxifen 4 h nach der Transfektion. 20 h später erfolgte der BRET-Assay.

Hierbei zeigten die mit 4-HT behandelten Zellen eine signifikante Abnahme der BRET-Ratio im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 24). Die größte Reduktion von $27,7 \pm 0,7$ cBU (-4HT) auf $20,8 \pm 0,9$ cBU (+4HT) zeigte sich bei den mit 8T3 transfizierten Zellen, aber auch die Abnahme der BRET-Ratio der mit 6T1 bzw. 8T2 transfizierten Zellen waren statistisch höchst signifikant (***) $p < 0,001$). Die *Frameshift*-Raten beliefen sich bei 6T1 auf 11 ± 20 %, bei 8T2 auf 6 ± 17 % und bei 8T3 auf 29 ± 12 %, untereinander unterschieden sie sich nicht signifikant voneinander.

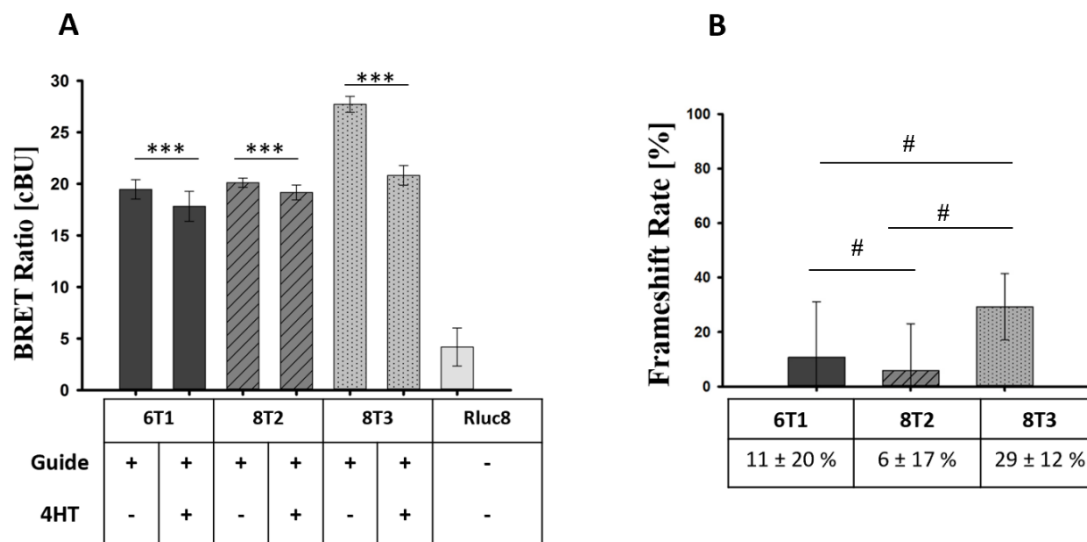


Abbildung 24: Überprüfung der iCas-Induktion 20 h nach Stimulation mit 4-HT, Ti0T1M. A: 4 Stunden nach der Transfektion von HEK293-T-Zellen mit +gRNA/iCas und BRET-Reporter wurde ein Teil der Zellen für 24 h mit 10.000 nM 4-Hydroxytamoxifen (4HT) behandelt. Anschließend wurde ein BRET-Assay durchgeführt. B: Die *Frameshift*-Raten, Ausdruck der unterschiedlichen Schneideaktivität der einzelnen Targetsequenzen vergleichend dargestellt. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,05$, # $p =$ nicht signifikant. $n = 3$.

BRET-Assay Transfektion T0iT2M

Für den zweiten Ansatz erfolgte die Induktion mit 4-Hydroxytamoxifen 4 h nach der Transfektion. 48 h nach der Transfektion erfolgte der BRET-Assay. Im Gegensatz zu Ansatz Ti0T1M wurden hier nicht alle Zellen mit der gRNA transfiziert (Abb. 25). In Abwesenheit der gRNA zeigt sich unabhängig von der Stimulation kaum bzw. gar keine

Minderung der BRET-Ratio. Eine Stimulation der mit den drei unterschiedlichen gRNAs transfizierten Zellen führte jedoch zu einer Abnahme der BRET-Ratio um durchschnittlich 8,97 cBU (verdeutlicht in Abb. 25 B). Bei den mit 6T1 transfizierten Zellen wurde eine Reduktion von $19,9 \pm 0,1$ cBU (6T1/+ gRNA/- 4HT) auf $13,1 \pm 0,5$ cBU (6T1/+ gRNA/+ 4HT) ermittelt, für die mit 8T2 transfizierten Zellen eine Abnahme von $19,2 \pm 0,3$ cBU (8T2/+gRNA/- 4HT) auf $13,1 \pm 0,2$ cBU (8T2/+gRNA/+ 4HT) und bei den mit 8T3 transfizierten Zellen kann eine Verminderung von $23,9 \pm 3,2$ cBU (8T3/+ gRNA/- 4HT) auf $10,0 \pm 0,1$ cBU (8T3/+ gRNA/+ 4HT) beobachtet werden. Außerdem sind die Experimente (-gRNA/- 4HT), (-gRNA/+ 4HT) und (+gRNA/- 4HT) in Bezug auf (+gRNA/+ 4HT) bei allen drei Guide-Sequenzen mit einem $p < 0,001$ signifikant (Abb. 25 A).

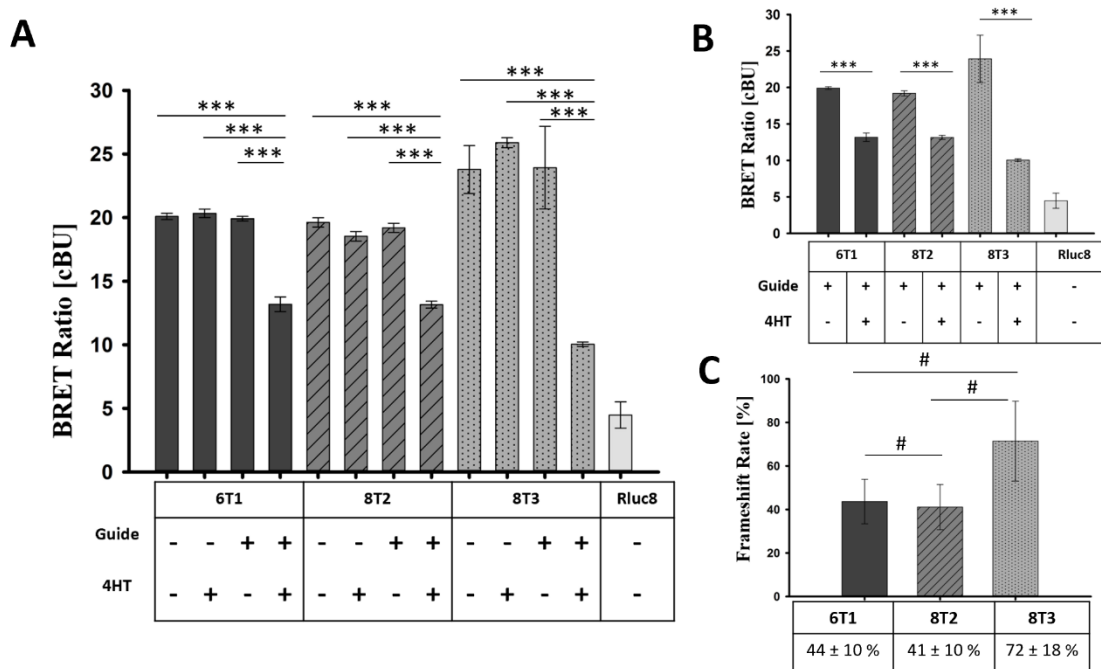


Abbildung 25: Überprüfung der BRET-Ratio nach 44 h Stimulation mit 4-HT, Ti0T2M. A. 4 Stunden nach der Transfektion von HEK293-T-Zellen mit \pm gRNA/iCas und BRET-Reporter wurde ein Teil der Zellen für 44 h mit 10.000 nM 4-Hydrtamoxifen (4HT) behandelt. Anschließend wurde ein BRET-Assay durchgeführt. B. Verdeutlichung der Abnahme der BRET-Ratio nach Stimulation mit 4HT in den mit gRNA transfizierten Zellen (Daten aus A). C. Die *Frameshift*-Raten, Ausdruck der unterschiedlichen Schneideaktivität der einzelnen Targetsequenzen vergleichend dargestellt. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,05$, # $p =$ nicht signifikant. $n = 3$.

Anhand der BRET-Ratio kann die prozentuale *Frameshift*-Rate ermittelt werden (Abb. 25 C). Für die Sequenz 8T3 wurde eine *Frameshift*-Rate von 72 ± 18 % berechnet, für 6T1 eine Rate von 44 ± 10 % und für 8T2 eine Rate von 41 ± 10 %. Die Sequenzen

konnten vergleichend untereinander aufgrund der hohen Standardabweichungen keine statistische Signifikanz zeigen.

BRET-Assay Transfektion T2iT4M

Im letzten Ansatz dieser Versuchsreihe wurden erneut alle Zellen mit der gRNA transfiziert. Die Induktion der induzierbaren Cas9 erfolgte 48 h nach der Transfektion, der BRET-Assay wurde 96 h nach der Transfektion durchgeführt. Im Vergleich zu den anderen beiden Ansätzen wurden in diesem Experiment die geringsten Differenzen in Abhängigkeit von der 4-Hydroxytamoxifenbehandlung ermittelt. Dennoch konnte bei den mit 8T3 und 6T1 transfizierten Zellen eine hoch signifikante Abnahme der BRET-Ratio nach Behandlung mit 4HT nachgewiesen werden. Bei den mit 8T2 transfizierten Zellen konnte nur eine Abnahme mit einer Signifikanz von $p < 0.05$ nachgewiesen werden. Bei 6T1 wurde eine Abnahme von $20,1 \pm 0,3 \text{ cBU}$ (6T1/+gRNA/-4HT) auf $19,6 \pm 0,2 \text{ cBU}$ (6T1/+gRNA/+4HT) gemessen. Für 8T3 verminderte sich die BRET-Ratio von $25,7 \pm 0,4 \text{ cBU}$ (8T3/+gRNA/-4HT) auf $22,8 \pm 0,5 \text{ cBU}$ (8T3/+gRNA/+4HT) (Abb. 26 A). Die *Frameshift*-Rate beläuft sich bei 6T1 auf $2,5 \pm 12,8 \%$, bei 8T2 auf $1,6 \pm 13,5 \%$ und bei 8T3 auf $13,2 \pm 9,8 \%$. Vergleichend ergibt sich in Bezug auf die *Frameshift*-Raten der unterschiedlichen Sequenzen aufgrund der hohen Standardabweichungen keine statistischen Signifikanzen (Abb 26 B).

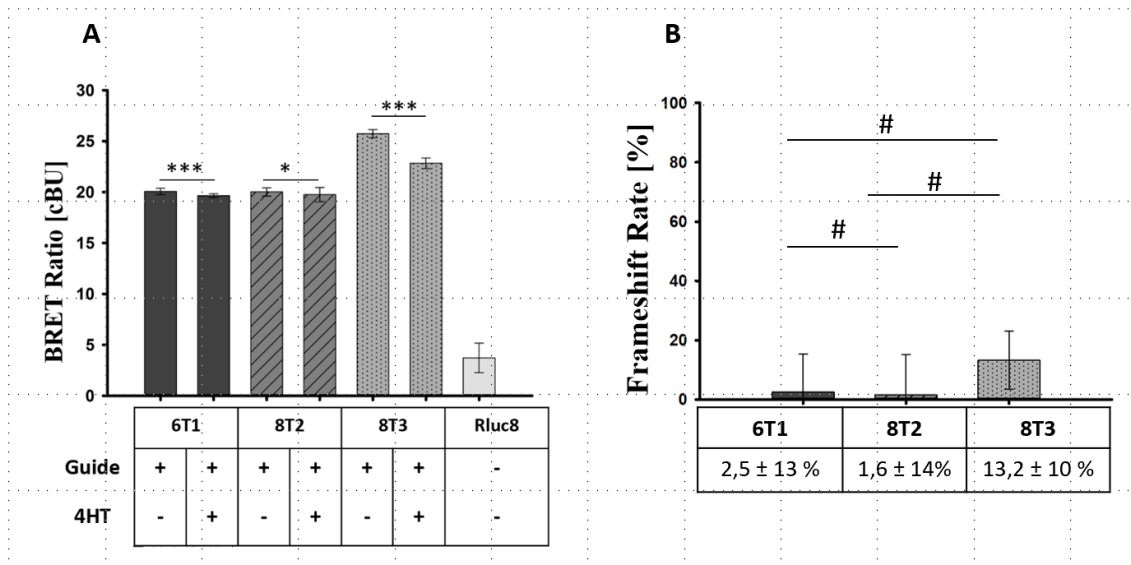


Abbildung 26: Überprüfung der BRET-Ratio 96 h nach Transfektion und 48 h nach Stimulation mit 4-HT, Ti2T4M. A: 48 Stunden nach der Transfektion von HEK293-T-Zellen mit \pm gRNA/iCas und BRET-Reporter wurde ein Teil der Zellen für weitere 48 h mit 10.000 nM 4-Hydrtamoxifen (4HT) behandelt. Anschließend wurde ein BRET-Assay durchgeführt. B: Die *Frameshift*-Raten, Ausdruck der unterschiedlichen Schneideaktivität der einzelnen Targetsequenzen vergleichend dargestellt. *** p < 0,001, * p < 0,05, # p = nicht signifikant. n = 3.

Nachfolgend aufgeführt sind alle drei Experiment mit unterschiedlichen Induktions- und Messzeitpunkten. Besonders hervorgehoben wird das Experiment, welches zum Zeitpunkt 0 transfiziert und induziert und 48 h später einem BRET-Assay zugeführt wurde (Abb. 27).

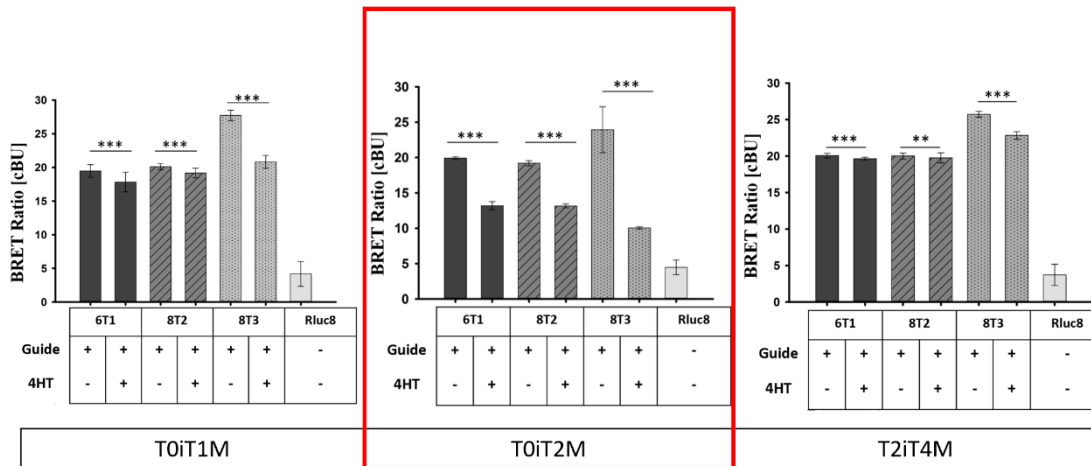


Abbildung 27: Unterschiedliche Induktions- und Messzeitpunkte der gRNA/iCas Komplexe \pm 4-HT und BRET-Reporter. Messung erfolgte mittels BRET-Assay. T0i1M stellt die Induktion mittels 4-HT 4 h nach Transfektion und Messung nach 24 h dar. Bei T0i2M wurde nach 4 h induziert und nach 48 h gemessen. T2i4M zeigt die Induktion nach 24 h und die Messung nach weiteren 24 h. Auf den x-Achsen aufgetragen die unterschiedlichen Experimente +gRNA/iCas \pm 4-HT für 6T1, 8T2 und 8T3. Auf den y-Achsen wird die BRET-Ratio dargestellt. Rot umrahmt ist das Experiment mit den deutlichsten Reduktionen der BRET-Ratio. ** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. $n = 3$.

3.5 Überprüfung der Funktionalität von Cas9 und BRET-Reportersystem in iNGNs

Nachdem das BRET-Reportersystem mit den drei unterschiedlichen Targetsequenzen in HEK293-T-Zellen überprüft wurde, sollte jenes im nächsten Schritt in iPSCs transferiert werden. Hierfür wurden Cas9 mit den gRNA-Sequenzen und dem BRET-Reporter in iNGNs transfiziert. Im Gegensatz zu den HEK293-T-Zellen wurde hier Lipofectamine Stem Reagent als Transfektionsmittel verwendet. 48 h nach der Transfektion wurde der Transfektionserfolg unter dem Fluoreszenzmikroskop evaluiert. Im Vergleich zur Transfektionskontrolle mit GFP2 (Abb. 28), in welcher einige grün-fluoreszierende Zellen nachgewiesen werden konnten, zeigen die Aufnahmen der mit Cas9 und BRET-Reporter +/- der 8T3 gRNA transfizierten Zellen nur vereinzelt GFP2-positive Zellen (Abb. 29).

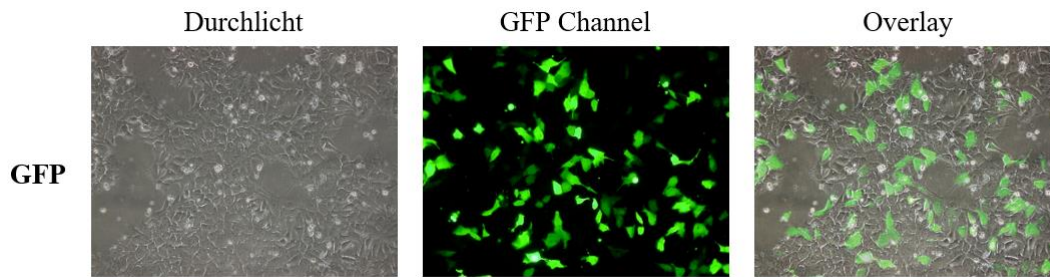


Abbildung 28: GFP2 Transfektionskontrolle in iNGNs 24 h nach Transfektion. Repräsentative mikroskopische Aufnahme der mit GFP2 transfizierten Zellen im Durchlicht, GFP-Kanal und als Overlay aus Durchlicht und GFP-Kanal.

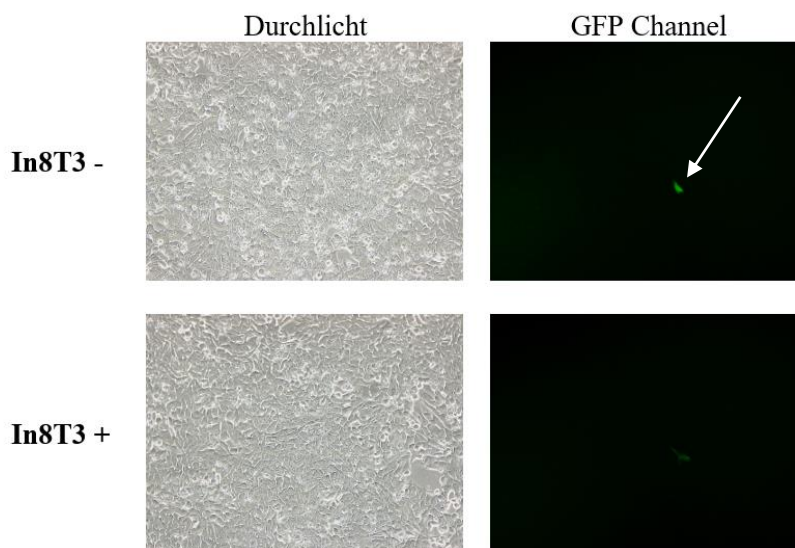


Abbildung 29: Transfektion von iNGNs mit \pm gRNA/Cas9 der Sequenz 8T3, 24 h nach Transfektion. Repräsentative Mikroskop-Aufnahme der mit \pm gRNA/Cas9 transfizierten Zellen im Durchlicht und im GFP-Kanal. Hinweis auf eine GFP positive Zelle mittels weißem Pfeil.

BRET-Assay der mit Cas9 und BRET-Reportersystemen transfizierten iNGNs

Unabhängig von dem Ergebnis der Fluoreszenzmikroskopie wurden die mit \pm gRNA/Cas9 und den BRET-Reportersystemen transfizierten Zellen einem BRET-Assay unterzogen. Hierbei zeigten sich jedoch hohe Standardabweichungen, sodass keine der drei Guide-Sequenzen eine signifikante Differenz ($p < 0,05$) in der BRET-Ratio der transfizierten Zellen mit bzw. ohne gRNA liefern konnte. Die Ergebnisse für 6T1 waren ohne gRNA bei $21,9 \pm 2,1$ cBU und mit gRNA bei $17,8 \pm 14,7$ cBU, für 8T2 ergab sich ohne gRNA eine BRET-Ratio von $20,6 \pm 3,4$ cBU und mit gRNA von $17,7 \pm 6,3$ cBU.

Die Reduktion bei 8T3 von $28,1 \pm 2,6$ cBU auf $21,2 \pm 13,4$ cBU fiel zwar am größten aus, war aber aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht statistisch signifikant. Für die *Frameshift*-Raten ergaben sich für 6T1 $30 \pm 128,4$ %, für 8T2 $24 \pm 95,7$ % und für 8T3 $35 \pm 83,4$ %.

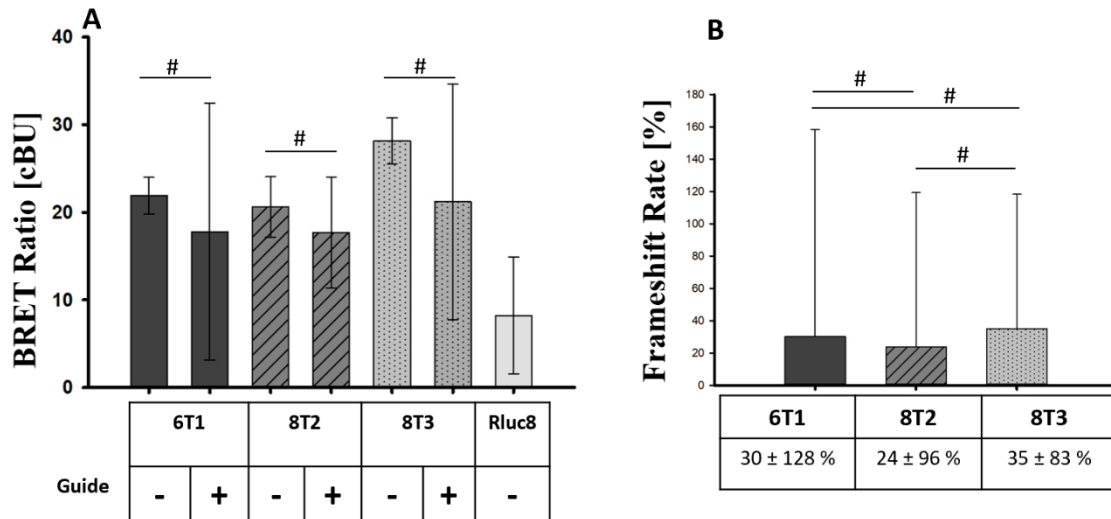


Abbildung 30: Überprüfung der BRET-Ratio 24 h nach Transfektion mit \pm gRNA/Cas9 in iNGNs. A: 24 h nach der Transfektion von iNGNs mit Cas9 \pm gRNA und den BRET-Reportersystemen wurde ein BRET-Assay durchgeführt. B: Die *Frameshift*-Raten, Ausdruck der unterschiedlichen Schneideaktivität der einzelnen Targetsequenzen vergleichend dargestellt. # p = nicht signifikant. n = 3.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein induzierbares (i)Cas9-System für Genomeditierungsstrategien etabliert und im BRET-Reporter-Assay validiert. Das System wurde in der Standardzelllinie HEK293-T zu unterschiedlichen Induktions- und Messzeitpunkten und in induzierbaren pluripotenten Stammzellen überprüft und charakterisiert.

Cas9 und induzierbare Cas-Systeme sind beides Werkzeuge des *Genom Editings*, die sich in ihrer Funktionsweise und Anwendbarkeit unterscheiden. Der Einsatz einer Cas9 war aufgrund seiner Einfachheit und Zuverlässigkeit die erste Wahl, um die unterschiedlichen Guide-Sequenzen mittels BRET-Assay in HEK293-T-Zellen zu validieren. Größter Nachteil ist jedoch die fehlende Steuerbarkeit der Endonukleaseaktivität (Xu und Li 2020). Induzierbare Cas-Systeme hingegen benötigen meist einen externen Induktor, um aktiviert zu werden. Dies bietet den Vorteil einer präziseren Kontrolle, da die Genomeditierung zeitlich gesteuert werden kann. Ein weiterer Unterschied ist die Reduzierung von *off-target*-Effekten bei induzierbaren Systemen (Zhao et al. 2018). Dies kann besonders wichtig sein, wenn die Genomeditierung in einem spezifischen Zelltypen oder Entwicklungsstadium erfolgen soll. Allerdings erfordern induzierbare Systeme eine sorgfältigere Planung und Validierung, da die korrekte Dosierung und das *Timing* des Induktors entscheidend für die Effizienz und Spezifität der Genomeditierung sind. Um einen gezielteren Einsatz einer Cas9-Endonuklease im *Genome Editing* zu ermöglichen, eine geringere *off-target*-Spaltungsaktivität zu erreichen und eine mögliche Kontrolle der Proteinaktivität zu generieren, wurde eine induzierbare Cas9-Variante nach Liu et. al etabliert.

Basierend auf den Angaben von Liu et al. erfolgte die Herstellung der gRNA/iCas-Sequenzen auf Grundlage der bereits überprüften gRNA/Cas9-Systeme (6T1, 8T2, 8T3). Die erfolgreiche Klonierung der gRNA/iCas-Systeme konnte mittels Sequenzierung bestätigt werden. Die Etablierung der gRNA/iCas-Systeme erfolgte nach Kotransfektion mittels BRET-Reporter-Assay in HEK293-T-Zellen. Hierbei konnten nach Induktion mit 4-HT signifikante Reduktionen der BRET-Ratios sowie positive *Frameshift*-Raten gemessen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass es durch die Induktion mittels 4-HT zunächst zu einem erfolgreichen Transport des iCas-Plasmids in den Zellkern sowie nachfolgend durch das Vorhandensein einer gRNA zu einem gezielt eingebrachten DSB gekommen ist und dieser mittels zelleigenem Reparaturmechanismus repariert wurde.

Dadurch lässt sich zunächst die Funktionalität der hergestellten gRNA/iCas-Systeme bestätigen (siehe 3.4). Dies zeigte sich für den Induktionszeitpunkt nach 4 h sowie den Messzeitpunkt nach 48 h für die alle drei Sequenzen (6T1, 8T2, 8T3) signifikant, sodass die drei klonierten, funktionsfähigen gRNA/iCas-Systeme für den weiteren Einsatz in pluripotenten Stammzellen bereitstehen. Durch die einfache und schnelle Klonierung und Herstellung der aktiven Plasmide, im Vergleich zu anderen Endonukleasen wie Zinkfinger oder TALENs, können somit einfacher und effizienter verschiedene gRNAs erstellt und getestet werden (Lone et al. 2018).

Um mögliche Nebeneffekte der gRNA und des 4-Hydroxytamoxifens zu bewerten, kamen pro gRNA-Sequenz jeweils drei Kontrollen in den Kombinationen -gRNA/- 4HT, +gRNA/- 4HT und -gRNA/+4HT zum Einsatz. Es konnte nach der BRET-Assay-Analyse gezeigt werden, dass die Endonuklease ausschließlich aktiv wird, sobald sowohl eine gRNA als auch eine zur Induktion notwendige Menge an 4-Hydroxytamoxifen vorhanden ist (siehe 3.4). Um den Vorteil der besseren Steuerbarkeit der induzierbaren Cas9-Systeme optimal nutzen zu können, wurden der Zeitpunkt der Induktion und des Einsatzes des Induktors genauer untersucht. Der Induktionszeitpunkt der iCas sowie die Behandlungsdauer mit 4-HT haben einen Einfluss auf die Endonukleasefunktion und somit auch auf die *Frameshift-Rate*. Wir konnten zeigen, dass eine Induktion in HEK293-T-Zellen 4 h (T0iT2M) nach Transfektion im Vergleich zur Induktion nach 48 h (T2iT4M) eine signifikant höhere *Frameshift-Rate* lieferte (siehe 3.4). Das zeigt, dass eine Induktion erst 48 h nach der Transfektion und eine anschließende Stimulation für 48 h eine deutlich geringere Endonukleaseaktivität erzielt. Vergleichend wurden unter Liu et al. lediglich Induktionszeitpunkte nach 24 h gewählt und der Fokus besonders auf die unterschiedlichen Behandlungsdauern gelegt. Hier konnte von Liu et al. gezeigt werden, dass der größte Teil der Proteintranslokation innerhalb der ersten 6 h der 4-HT Induktion stattfand und die Editieraktivität mit längerer Behandlungsdauer (bis max. 72 h) weiter zunahm (Liu et al. 2016). Die Zunahme der Endonukleaseaktivität bei längerer Induktion mit 4-HT konnte in dieser Arbeit teilweise nachvollzogen werden. Vergleicht man die Ergebnisse von T0iT1M und T0iT2M, zeigt sich nach 48 h Induktion eine stärkere Reduktion der BRET-Ratio und somit auch eine größere *Frameshift-Rate* als nach nur 24 h Stimulation mit 4-HT.

Grundsätzlich existieren unterschiedliche Varianten eines chemisch induzierbaren Cas9-Systems mit Vor- und Nachteilen. Die Auswahl der iCas von Liu et al. erfolgte aufgrund der Überlegenheit gegenüber anderen induzierbaren Systemen. Es konnte von Liu et al. gezeigt werden, dass die iCas, basierend auf einer posttranslationalen Induktion mittels Tamoxifen oder 4-HT, eine höhere *On-Rate* und eine höhere Spaltungseffizienz nach der Induktion aufweist als eine Split-Cas9 (Rapamycin-empfindliche Dimerisierungsdomäne) und Intein-Cas9 (4-HT empfindlichen Inteindomäne) (Davis et al. 2015; Zetsche et al. 2015; Liu et al. 2016; Indra et al. 1999). Im Vergleich zu einer PTRE3G-Cas (Doxycyclin induzierbarer Promotor) ergab sich ein Vorteil in der Reaktionsgeschwindigkeit. Nachteil der eingesetzten Variante ist die höhere Hintergrundaktivität als bei einer Split-Cas9-Variante (Liu et al. 2016; Dai et al. 2018).

Häufig kommt es durch den Einsatz von *Genome Editing* zu *off-target*-Effekten, welche zu genomischer Instabilität und damit einhergehend zu neuen Mutationen führen können. Die *off-target*-Aktivität, sowohl der hier verwendeten gRNA/Cas9-Komplexe als auch des induzierbaren Cas9-Systems, wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Es ist davon auszugehen, dass durch unterschiedlichen sgRNA-Sequenzen und Cas9-Endonukleasen auch unterschiedlich viel *off-target*-Spaltungsaktivität entsteht. Liu et al. konnten zeigen, dass die Dauer der 4-HT-Stimulation und damit einhergehend die Aktivität der Endonuklease Einfluss auf die *off-target*-Effekte hat und eine Reduktion der Cas9-Aktivität zu weniger *off target*-Effekten führt. Ebenso zeigen verschiedene sgRNAs unterschiedliche Affinitäten zu *on*- und *off-target* Stellen (Liu et al. 2016). In weiteren Studien sollten diese daher unbedingt untersucht werden, da eine potenziell hohe Anzahl an *off-target*-Effekten zu einer Einschränkung im Bereich der *in vivo* Experimente und der späteren Gentherapie führen kann (Xu und Li 2020).

Weiterhin können induzierbare Cas-Systeme komplexer in der Handhabung sein als nicht-induzierbare Cas-Systeme, da sie eine sorgfältige Kontrolle der Induktor-Konzentration und dessen pharmakologischen Wirkung erfordern. Durch den Einsatz eines selektiven Estrogenrezeptormodulators (4-Hydroxytamoxifen) als Induktor müssen mögliche zytotoxische Wirkungen berücksichtigt werden. Um eine Konzentration zu ermitteln, welche eine gute Induktionsrate des iCas-Systems bewirkt, aber gleichzeitig nur einen geringen zytotoxischen Effekt aufweist, wurden die transfizierten HEK293-T-Zellen mit

unterschiedlichen Konzentrationen von 4-Hydrotamoxifen und Tamoxifen stimuliert. Hierfür wurden die transfizierten Zellen mit Konzentrationen zwischen 0 und 10.000 nM des Tamoxifens bzw. 4-Hydrotamoxifens behandelt. Der anschließende BRET-Assay zeigte, dass ein Wert von 100 bis 10.000 nM 4-HT eine gute Induktionsrate des iCas-Systems zeigt, aber gleichzeitig nur einen geringen zytotoxischen Effekt aufweist (siehe 3.3). Vergleichend zeigen die von Liu et al. publizierten Daten die besten Ergebnisse mit einer Konzentration von 1000 nM, jedoch wurden hier höhere Konzentrationen nicht angewendet (Liu et al. 2016). Im Gegensatz zu 4-HT zeigte der BRET-Assay der mit Tamoxifen stimulierten Zellen erst bei sehr hohen Konzentrationen (10.000 nM) eine Induktion des iCas-Systems. Ursächlich für diesen Unterschied kann die höhere Bindungsaffinität des aktiven Metaboliten 4-HT zum Östrogenrezeptor verglichen mit Tamoxifen sein (Furr und Jordan 1984). Somit konnte sowohl für Tamoxifen als auch für 4-HT prinzipiell eine Induzierbarkeit der Endonuklease gezeigt werden (siehe 3.3). Aufgrund der besseren Effizienz des 4-HT und keiner relevanten Zellschädigung wurde in den folgenden Versuchen mit HEK-293-T-Zellen 4-HT mit einer Konzentration von 10.000 nM eingesetzt. Jedoch konnten andere Arbeitsgruppen auch mit deutlich geringeren 4-HT (400 nM) Konzentrationen eine Aktivität der Endonuklease erreichen (Zhao et al. 2018).

Eine Schwäche der Ermittlung der Induktionskonzentration von 4-HT stellt das eingesetzte gRNA(T11)/iCas-System dar. Verwendet wurde ein bereits aus der Arbeitsgruppe stammendes System, welches eine andere Target-/Guide-Sequenz als die neu hergestellten Kombinationen trägt. Sollten sich im Verlauf Probleme bei der Induktion der generierten Systeme zeigen, sollte eine kleinere Konzentrationsreihe mit den entsprechenden Plasmiden durchgeführt werden. Bei einer Transfektion des iCas-Systems in iNGNs empfiehlt sich aufgrund der möglichen Toxizität eine Kontrolle der notwendigen 4-HT Konzentration.

Nicht vollständig geklärt ist die Frage der Toxizität von Tamoxifen und 4-HT und deren Auswirkungen in Genomeditierungsansätzen, welche auf degenerative Netzhauterkrankungen abzielen. Tamoxifen wird unter anderem als selektiver Östrogenmodulator in der Therapie des Mammakarzinoms verwendet. Unter die Nebenwirkungen der Einnahme von Tamoxifen fallen unter anderem Augenerkrankungen wie reversible Sehstörungen durch Katarakte, Korneatrübungen, Retinopathien, optischen Neuropathien und selten Erblindung (Hsu et al. 2021; Nayfield und Gorin 1996). Wang et al. konnten zeigen, dass

Tamoxifen nicht zwingend mit okulärer Toxizität einhergehen muss. Mittels Tamoxifengabe konnte ein funktioneller Schutz von Photorezeptoren im akuten sowie im genetischen Modell der Photorezeptordegeneration erreicht werden, beruhend auf der Unterdrückung der retinalen Mikroglia-Aktivierung und der Expression proinflammatorischer Zytokine (Wang et al. 2017). Eine abschließende Beurteilung der Toxizität von 4-HT *in vivo* ist aufgrund der aktuellen Datenlage nicht möglich und bedarf weiterer Untersuchungen.

HEK293-T-Zellen stellen als Standardzelllinie aufgrund ihrer einfachen Handhabbarkeit, Kultivierung, Anpassungsfähigkeit und hohen Transfektionseffizienz eine gute Option dar, Plasmide auf ihre Funktionalität zu testen. Da sie bereits seit 1970 in der Forschung Verwendung finden, ist die Datenlage in vielen Bereichen gut. Besonders eignet sich die HEK293-T-Zelllinie, da sie eine hohe rekombinante Proteinproduktion ermöglicht sowie durch eine hohe Transfektionseffizienz eine transiente oder stabile Genexpressionsanalyse zulässt. Auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist aufgrund des robusten Wachstums ein Vorteil der Zelllinie (Tan et al. 2021; Pulix et al. 2021; Lin et al. 2021). Auch die in dieser Arbeit klonierten gRNA/iCas-Plasmide konnten erfolgreich zunächst in HEK293-T-Zellen getestet und deren Funktion nach Kotransfektion und Induktion mittels BRET-Assay erfasst werden.

Auch Liu et al. verwenden zur Untersuchung der Editierfähigkeit unterschiedliche iCas-Varianten die Zelllinie HEK293-T und etablierte später eine stabile HEK293-iCas-Zelllinie (Liu et al. 2016). Jedoch ist diese Zelllinie aus embryonalen Nierenzellen entstanden, welche überwiegend aus Fibroblasten, Endothelzellen und Epithelzellen bestehen (Stepanenko und Dmitrenko 2015). Hierbei ergeben sich Limitationen, was die Untersuchung von Therapieoptionen in Bezug auf degenerative Netzhauterkrankungen und Charakteristika neuronaler Zellen angeht. Hierfür eignen sich iPSC bzw. iNGNs besser, da sie sich zu Neuronen differenzieren lassen und somit die Charakteristika menschlicher körpereigener Neurone besser abbilden (Cowan et al. 2020; Buskamp 2022). Auch eine Simulation von Langzeitkulturen lässt sich im neuronalen Zellverband mit der Co-Kultivierung von Astrozyten ermöglichen (Lam et al. 2017).

Vor allem im Bereich der personalisierten regenerativen Medizin spielen iPSCs eine entscheidende Rolle. Sie kommen nicht nur in der Krankheitsmodellierung und Zellersatztherapie zum Einsatz, sondern können bei der Entschlüsselung der Ätiologie und der pathophysiologischen Mechanismen zahlreicher Erkrankungen helfen (Doss und Sachinidis 2019). iPSCs können als intermediäres System zwischen Standardzellkulturreihen und den *in vivo* Experimenten zum Einsatz kommen und erweitern gerade in Verbindung mit dem *Genome Editing* das Feld der Gentherapien (Busskamp 2022). In dieser Arbeit sollten iPSCs, die sich zu Neuronen differenzieren können (iNGNs), mit einem BRET-Reporter und CRISPR/Cas-System auf ihr Verhalten nach einem eingebrachten DSB hin untersucht werden. Ein Informationsgewinn im Bereich der DNA-Reparaturmechanismen ermöglicht die Weiterentwicklung von zellspezifischen Therapieoptionen in Bezug auf angeborene Erkrankungen.

In diesem Projekt erfolgte die Transfektion in undifferenzierten iNGNs mittels Lipofectamine Stem Reagent und zwei Plasmid-DNA-Anteilen, dem BRET-Reporter und dem entsprechenden gRNA/Cas9-System. Aktuell kann noch nicht abgeschätzt werden, welche Auswirkungen die Transfektion nachfolgend auf die Differenzierung der iNGNs hat und ob die integrierten Plasmide auch nach der Differenzierung der iNGNs noch funktionsfähig sind. In anderen Zelllinien konnte bereits gezeigt werden, dass CRISPR/Cas vermitteltes *Genome Editing* keine Auswirkungen auf die Pluripotenz und Differenzierungsfähigkeit hat (Geng et al. 2020).

Nach der Transfektion der iNGNs mit den BRET-Reportern und dem entsprechenden gRNA/Cas9-Systemen wurde zunächst die Transfektionseffizienz anhand des GFP-Signals der Zellen überprüft. Obwohl die Fluoreszenzmikroskopie bereits eine unzureichende Effizienz zeigte, folgte ein BRET-Assay. Dieser zeigte keine signifikante Reduktion der BRET-Ratio in Anwesenheit der gRNA, da die Ergebnisse sehr hohe Standardabweichungen aufwiesen, weshalb die Daten insgesamt nur bedingt aussagekräftig sind. Die Gründe für die geringe Transfektionseffizienz können vielfältig sein. Generell stellt das Einbringen von Transgenen immer eine große Herausforderung dar. Unterschieden werden mechanische, elektrische und chemische Transfektionsmethoden. Die Lipofektion ist eine chemische Möglichkeit der Integration von externer DNA. Obwohl das hier verwendete Transfektionsmittel für Stammzellen entwickelt wurde, konnte mit dieser Methode nur eine sehr geringe Effizienz erzielt werden. In Verbindung mit

iNGNs kamen bereits andere Techniken wie die Elektroporation und Nukleofektion erfolgreich zum Einsatz (Lam et al. 2017; Sauter et al. 2019). Auch in anderen hESC- oder iPSC-Linien wird die Lipofektion durch die Elektroporation und Nukleofektion verdrängt, da sie eine höhere Transfektionseffizienz erreichen (Lakshmipathy et al. 2004; Fontes und Lakshmipathy 2013; Liang et al. 2015). Jedoch weist die Lipofektion einen geringeren zytotoxischen Effekt auf (González et al. 2014). Die effektive Integration des CRISPR/Cas-Systems in anderen Stammzelllinien war in einigen Studien auch mittels Magnetotransfektion möglich und stellt somit eine weitere Option zur Einbringung von DNA dar (Tan et al. 2019; Thamodaran et al. 2022; Yamoah et al. 2018).

Gerade in Bezug auf in vivo Experimente oder longitudinale Experimente, bei denen die Endonukleaseaktivität gezielt gesteuert werden soll, ist eine erfolgreiche und stabile DNA-Integration unter anderem abhängig von der Bereitstellungsmethode der Transgene. Unterschieden werden hier virale von nicht-viralen Formen. In dieser Arbeit wurde die DNA als Plasmid eingesetzt. Nachteil der Bereitstellung durch Plasmide oder mRNA ist jedoch ihre geringere Effizienz (Khajanchi und Saha 2021). Andere Gruppen arbeiten mit dem Einsatz von adenoviralen, adenoassoziierten-viralen und lentiviralen Vektoren und konnten hier im Bereich der humanen Stammzelllinien einen Vorteil im Bereich der Übertragungseffizienz erzielen (Yanik et al. 2017). Rapti et al. konnten zeigen, dass adenovirale Vektoren sich sowohl für undifferenzierte als auch für differenzierte hESC und hiPSC eignen. Hingegen eignen sich AAVs eher für differenzierte Zellen und LV sich eher für undifferenzierte Zellen (Rapti et al. 2015). Gerade im Hinblick auf den Einsatz für in vivo-Experimente muss die Form der DNA-Übertragung überdacht werden. Viele in vivo Studien arbeiten bereits überwiegend mit AAVs und Lentiviren (Sanjurjo-Soriano und Kalatzis 2018). Limitierend ist hier die Größe der durch die Vektoren zu transportierenden DNA, die Reaktion des Immunsystems des Zielorganismus sowie eine Steigerung der *off-target*-Effekte (Wilbie et al. 2019).

Ein weiterer Ansatzpunkt für die Erklärung der schlechten Transfektionseffizienz könnte der Promotor der verwendeten Plasmide darstellen. In beiden eingesetzten Plasmiden wurde ein CMV-Promotor verwendet. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass der

CMV-Promotor im Vergleich zu anderen Promotoren, wie beispielsweise dem EF1 α -Promotor, in hiPSCs eine schlechtere Transfektionseffizienz aufweist (Kim et al. 2007; Byrne und Church 2015). Besonders in Langzeitkulturen konnte nachgewiesen werden, dass der CMV-Promotor im Verlauf, im Gegensatz zu EF1 α , PGK und ACTB-Promotoren, eine geringere Stabilität aufweist und eine geringere Effizienz generiert (Norrman et al. 2010). Neben den bereits erwähnten Promotern ist auch ein CAG-Promotor in Stammzellen transkriptionell aktiv und kann als starker Promotor für die Expression von Transgenen verwendet werden (Chatterjee et al. 2011). Um die Funktionalität und Aktivität der eingesetzten Promotoren abschätzen zu können und eine Kontrolle der Integration und Expression der Plasmide zu erhalten, sollte der Einsatz von Western Blot oder quantitativer PCR für weitere Experimente begleitend erwogen werden.

Bereits die besonderen Kultivierungsanforderungen stellen den Einsatz von iPSCs als Krankheitsmodell vor Herausforderungen. Die Zellvitalität, Konfluenz und eine geringe Passage der Stammzellen spielen für die Transfektionseffizienz in *Gen-Targeting*-Projekten eine wichtige Rolle (Byrne und Church 2015). Stammzellen wachsen zudem in Clustern und stellen so eine Erschwernis für die üblichen Gentransfermethoden dar. Die meisten Methoden erfordern eine Selektion durch beispielsweise Antibiotika oder eine klonale Expansion, was oft langes Kultivieren dieser Zellen notwendig macht (Fontes und Lakshmiathy 2013). Langzeitkulturen der iNGNs profitierten bereits von Co-Kulturen mit Astrozyten. Dies kann den längeren zeitlichen Rahmen ermöglichen, der für den Einsatz als Krankheitsmodell von erblich bedingten Netzhauterkrankungen benötigt wird (Lam et al. 2017).

Es existieren unterschiedliche Methoden zur Registrierung eines DSB und dem nachfolgenden Reparaturmechanismus, wie zum Beispiel *traffic light reporter* (TLR) und *bioluminescent reporter*. Als Nachweismethode für einen DSB wurde in dieser Arbeit ein Biolumineszenz-Reporter verwendet, welcher im Gegensatz zu Fluoreszenz-Reportern keine Probleme mit Photobleiche, Autofluoreszenz und gleichzeitiger Anregung von Donor- und Akzeptor-Fluorophoren mit sich bringt (Stumpf et al. 2020). Auch in Bezug auf die Untersuchung von lichtempfindlichem Gewebe ist das BRET-System dem FRET

überlegen (Pfleger und Eidne 2006). Der in der Arbeitsgruppe „Experimentelle Ophthalmologie Gießen“ entwickelte und in dieser Arbeit verwendete BRET-Reporter basiert auf einer Luciferase (Rluc8) – Shuttelbox – GFP2. In der Shuttelbox befinden sich die zu der gRNA komplementären Sequenzen. Die Bindung der Endonuklease Cas9 im Bereich der Targetsequenz mit sequenzspezifischem DSB zieht einen zelleigenen Reparaturmechanismus nach sich. Durch NHEJ/MMEJ kommt es zu Insertionen und Deletionen, folglich zu einer Verschiebung des Leserasters und somit zur Funktionslosigkeit des GFPs. Im Vergleich zu anderen Reportern können mithilfe des BRET-Reporters nur NHEJ oder MMEJ registriert werden und auch zwischen den beiden Mechanismen ist die Unterscheidung schwierig. Andere Reporter, wie zum Beispiel *traffic light reporter*, ermöglichen sowohl eine Analyse von NHEJ als auch von HDR. Der Einsatz dieser Form von Reportern könnte weitere Informationen über die DNA-Reparaturmechanismen liefern und die Ergebnisse des BRET-Reporters untermauern (Wimmer et al. 2021; Song und Stieger 2017; Tan et al. 2019; Rohiwal et al. 2020). Nachteil eines TLR ist jedoch die Messung mittels Durchflusszytometrie, was eine unterbrechungsfreie longitudinale Analyse der DSB-Reparatur einschränkt. Auch andere Reportersysteme, die sich der Biolumineszenz bedienen, wie der *bioluminescent repair reporter* (BLRR) von Chien et al. können sowohl HDR als auch NHEJ detektieren und ermöglichen so durch einen BLRR-Assay eine longitudinale Analyse der HDR/NHEJ-Aktivität in kultivierten Zellen oder implantierten Tumoren (Chien et al. 2020). Auch im Hinblick auf den Einsatz in vivo sowie zur Krankheitsmodellierung ist die Anwendung eines Reporters, der sowohl NHEJ/MMEJ als auch HDR monitoren kann, sinnvoll, da in menschlichen Zellen nicht nur ein Reparaturmechanismus abläuft. Aktuell stellt der BRET-Reporter jedoch eine schnelle, kostengünstige und einfach anwendbare Option dar, die keiner Aufbereitung der DNA bedarf (Chien et al. 2020; Pfleger und Eidne 2006).

Die Reduktion der BRET-Ratio von „ohne gRNA“ zu „mit gRNA“ bildet die Funktionalität der gRNA/Cas9-Systeme ab. Da es sich bei dem BRET-Reporter um eine Protein-Protein-Interaktion handelt, ist ein indirekter quantitativer Vergleich der gRNAs möglich. Somit kann eine besonders aktive gRNA ermittelt und für die weitere Verwendung ausgewählt werden (Sentmanat et al. 2018). Im Vergleich der gRNA-Sequenzen lieferte die Sequenz 8T3, sowohl im Cas9 als auch im iCas-System, die höchste *Frameshift*-Rate,

gefolgt von 6T1 und 8T2. Die hohe Aktivität und Funktionalität der Sequenz 8T3 qualifiziert sie für weitere Experimente. Die Unterschiede in der Aktivität der unterschiedlichen gRNA/(i)Cas9-Systeme konnte bislang noch nicht endgültig geklärt werden. Einige Erklärungsansätze basieren auf unterschiedlichen Mengen und Positionen bestimmter Basen, unterschiedlichen PAM-Sequenzen oder der räumlichen Struktur und Protein-Interaktionen, jedoch erlauben sie keine finale Aussage (Zhang et al. 2015; Xu und Li 2020).

Fazit und Ausblick

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein zeitgleicher Einsatz eines induzierbaren Cas9-Systems und eines BRET-Reporters eine gute Möglichkeit zur Registrierung zelleigener Reparaturprozesse darstellt. Besonders die erfolgreiche, einfache Herstellung und die reproduzierbar stabile Funktion der iCas mit den spezifischen Guide-Sequenzen qualifiziert sie für den weiteren Einsatz. Die einfache und erfolgreiche Anwendung in HEK293-T-Zellen lässt auf eine Ausweitung der Technik in anderen Zelllinien und iCas-Systemen hoffen. Im Hinblick auf den Einsatz von *Genome Editing* bei angeborenen Netzhauterkrankungen als zukünftig direkte Reparatur innerhalb des Genoms ist die genaue Kenntnis über das Reparaturverhalten netzhautspezifischer Zellen unerlässlich. In Zukunft wird also die Weiterentwicklung der intermediären Systeme entscheidend sein. In diesem Fall ist die Steigerung der Transfektionseffizienz der iNGNs sowie die Etablierung des iCas-Systems mit anschließender Differenzierung der Zellen anzustreben. Die in diesem Projekt geleistete Vorarbeit stellt die Grundlage für nachfolgende Verbesserungen und Weiterentwicklungen induzierbarer Cas9-Systeme innerhalb von iPSCs dar. Bedarf besteht auch in der weiteren Untersuchung und Reduzierung der *off-target*-Aktivität sowie in der Abklärung der Toxizität des 4-Hydroxytamoxifens in Bezug auf nachfolgende *in vivo* Experimente.

Um auch in Zukunft Therapiestrategien gegen krankheitsauslösende Mutationen im Bereich der angeborenen Netzhauterkrankungen entwickeln zu können, bedarf es einer genauen Kenntnis über die Funktionsweisen und Wechselwirkungen der DNA-Reparaturwege sowie eines präzisen *Genome Editings*.

5. Zusammenfassung

Erblich bedingte Netzhauterkrankungen betreffen viele Menschen und sind häufig verantwortlich für den Verlust der Sehkraft. Begründet liegen sie meist in einer Mutation eines relevanten Gens. Es existieren unterschiedliche therapeutische Optionen, die abhängig von dem Wissen um die Ursache und dem Fortschritt der Erkrankung zum Einsatz kommen. Therapeutische Genomeditierung, das damit einhergehende Einbringen eines DSBs sowie die nachfolgenden zelleigenen Reparaturmechanismen stellen eine wichtige Rolle im Bereich der Gentherapie dar.

Ziel dieser Arbeit war es, das BRET-Reportersystem in Verbindung mit einer induzierbaren Cas-Variante zu testen und mehr Informationen über das neuronenspezifische Verhalten nach einem induzierten DSB zu generieren.

Nachdem die Funktionalität des bereits in der Arbeitsgruppe entwickelten BRET-Systems mit den entsprechenden gRNA/Cas9-Komplexen bestätigt wurde, folgte die Herstellung eines induzierbaren Cas9-Systems passend zu den Targetsequenzen der BRET-Reporter, welche in HEK293-T-Zellen transfiziert und auf ihre Funktionalität hin überprüft wurden. Im letzten Schritt der Arbeit wurde versucht, das Cas9-System mit gRNA und BRET-Reporten mittels Cotransfektion in die iNGNs zu integrieren.

In Zukunft kann die Kombination der gRNA/iCas mit anderen Reportersystemen zu weiteren Informationen über das zellspezifische Reparaturverhalten nach einem DSB führen. Hier sollte jedoch zunächst die Erhöhung der Transfektionseffizienz der iNGNs im Fokus stehen und durch Änderung der Transfektionsmethode, der DNA-Bereitstellung und/oder des Promotors gesteigert werden.

Kurzfristiges Ziel ist es, die iNGNs als intermediäres System mit gRNA/iCas-Systemen zu etablieren, um neuronenspezifische Informationen im Bereich der DNA-Reparaturforschung in Bezug auf erblich bedingte Netzhauterkrankungen generieren zu können. Langfristig steht die Ermöglichung einer direkten Therapie von erblich bedingten Erkrankungen mittels *Genome Editing* im Zentrum des Bestrebens.

Zukünftig könnten CRISPR/(i)Cas und iPSCs somit einen wesentlichen Beitrag zu einer patientenspezifischen, regenerativen Medizin leisten.

6. Summary

Genetic retinal dystrophies affect many individuals and are often responsible for vision loss. These conditions are typically caused by mutations in specific, relevant genes. Various therapeutic options exist, which depend on the understanding of the underlying cause and the progression of the disease. Therapeutic genome editing, the associated introduction of a double-strand break, and subsequent activation of cellular repair mechanisms, play crucial roles in the field of gene therapy.

The aim of this study was to test the BRET reporter system in combination with an inducible Cas9 variant and to gather more information about neuron-specific behavior following an induced DSB.

After confirming the functionality of the BRET system, which had already been developed by the research group, along with the corresponding gRNA/Cas9 complexes, an inducible Cas9 system matching the target sequences of the BRET reporters was created. This system was transfected into HEK293-T cells and evaluated for its functionality. In the final step of the study, attempts were made to integrate the Cas9 system, along with gRNA and BRET reporters, into iNGNs via co-transfection.

In the future, the combination of gRNA/iCas with other reporter systems could provide further insights into cell-specific repair mechanisms following a DSB. However, future efforts should focus on increasing the transfection efficiency in iNGNs. This could be achieved by optimizing the transfection method, DNA preparation, and/or promoter choice.

The short-term goal is to establish iNGNs as an intermediate system with gRNA/iCas systems to generate neuron-specific insights in the field of DNA repair research related to genetic retinal diseases. The long-term objective is to enable direct therapy for hereditary diseases through genome editing.

In the future, CRISPR/(i)Cas and iPSCs could thus make a significant contribution to patient-specific regenerative medicine.

7. Abkürzungsverzeichnis

(c)BU	(centi) BRET Unit
μ	Mikro
3'	Position der OH-Gruppe
4-HT	4-Hydroxytamoxifen
5'	Position des Phosphatrestes
AAV	<i>Adeno-associated virus</i>
AmpR	Ampicillin Resistenz
AS	Aminosäuren
BLRR	<i>Bioluminescent repair reporter</i>
bp	Basenpaare
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
BRET	<i>Bioluminescence resonance energy transfer</i>
bzw	Beziehungsweise
Cas	<i>CRISPR-associated</i>
CDK	<i>Cyclin dependend kinases</i>
CLN3	<i>ceroid-lipofuscinosis, neuronal 3</i>
CMV	Cytomegalovirus
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CtIP	<i>CtBP-Interacting Protein</i>
ddH ₂ O	Bi-destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimehtylsulfoxid
DNA2	<i>DNA replication helicase 2</i>
dNTP	Desoxyribonucleosid-Triphosphat
DSB	Doppelstrangbruch
ERT2	<i>Estrogen receptor T2</i>
EXO1	<i>Exonuclease 1</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>

7. Abkürzungsverzeichnis

FKS	Fetales Kälberserum
FRET	<i>Fluoreszenz resonanz energy transfer</i>
G	<i>Guide</i>
g	Gramm
GFP2	<i>Green fluorescent protein 2</i>
gRNA	<i>Guide RNA</i>
h	<i>Hours</i>
HDR	<i>Homology directed repair</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
hiPSC	<i>Human induced pluripotent stem cells</i>
HR	Homologe Rekombination
IDR	<i>inherited retinal diseases</i>
Indels	Insertionen und Deletionen
iPSC	<i>Inducend pluripotent stem cell</i>
KanR	Kanamycin Resistenz
kb	Kilo-Basenpaare
L/l	Liter
LB	Luria Broth
m	Milli
M	Molare Masse
min	Minuten
MMEJ	<i>Microhomology-mediated end joining</i>
MRN/MRX	Enzymkomplex (MRE11-RAD50-NBS1-Komplex)
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
NeoR	Neomycin Resistenz
ng	Nanogramm
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nm	Nanometer

nM	nanomolar
norm.	normiert
Nr.	Nummer
°C	Grad Celsius
p	Pico
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
PBS	<i>Phosphate bufferd saline</i>
PEI	Polyethylenimin
Pen	Penicillin
PR	Photorezeptor
Puro	Puromycin
RET	<i>Resonanz energy transfer</i>
RLuc8	<i>Renilla Luciferase 8</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RZB	Relative Zentrifugalbeschleunigung
s	Sekunde
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
siRNA	<i>Small-interfering RNA</i>
SOC	<i>Super optimal broth with catabolite repression</i>
ssDNA	<i>single stranded DNA</i>
Strep	Streptomycin
SV40	<i>simian virus 40</i>
T	<i>Target</i>
TALEN	<i>Transcription activator-like effector nucleases</i>
TLR	<i>Traffic light reporter</i>
tracrRNA	<i>Trans-activating crRNA</i>
V	Volt
W	Watt

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung therapeutischer Optionen erblich bedingter Netzhauterkrankungen.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der am häufigsten genutzten Endonukleasen und ihrer Funktionsbereiche.....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems im <i>Genome Editing</i>	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung von NHEJ, HDR und MMEJ.....	9
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Funktion des BRET-Assays.....	13
Abbildung 6: Schematische Darstellung iPSCs als intermediäres System.....	15
Abbildung 7: Schematische Darstellung des induzierbaren Cas-Systems.....	17
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Funktionsweise des induzierbaren Cas9-Systems.....	18
Abbildung 9: Plasmidkarte BRET-Reporter.....	27
Abbildung 10: Plasmidkarte pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459).....	28
Abbildung 11: iCas-Plasmid mit dargestellten <i>BpI</i> -Schnittstellen und Guide-Sequenzbereich.....	29
Abbildung 12: Plasmidkarte GFP2 (pTagGFP2-N).....	30
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Klonierung des induzierbaren Cas9-Plasmids mit entsprechenden Guide-Sequenzen.....	42
Abbildung 14: Schematischer Versuchsaufbau zur Überprüfung der Funktionalität der Plasmide mithilfe einer Transfektion in HEK-Zellen und anschließendem BRET-Assay bzw. Durchflusszytometrie.....	50
Abbildung 15: Schema der Cotransfektion des BRET-Reporters mit +/- gRNA/Cas9.....	51
Abbildung 16: Transfizierte HEK293-T-Zellen mit BRET-Reporter und \pm gRNA/Cas9, T0T2M.....	52
Abbildung 17: BRET-Assay 48 h nach Transfektion in HEK293-T mit \pm gRNA/Cas9.....	54
Abbildung 18: BRET-Assay 120 h nach Transfektion in HEK293-T mit \pm gRNA/Cas9.....	55
Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der mit 6T1, 8T2 und 8T3 transfizierten Zellen.....	56
Abbildung 20: Sequenzierung eines im Restriktionsverdau positiven Klons des gRNA/iCas-(8G3) Konstruktes mit #3056 (Wolle) nach der Klonierung.....	57
Abbildung 21: Schematische Darstellung der erzielten Klonierung.....	57

Abbildung 22: Bestimmung der benötigten (4-Hydroxy-)Tamoxifen Menge für die Induktion von Cas9. Konzentrationsreihe Tamoxifen vs. 4-Hydroxytamoxifen.	59
Abbildung 23: Schematische Darstellung der Cotransfektion des BRET-Reporters und iCas mit und ohne gRNA und anschließender Behandlung mit 4-Hydroxytamoxifen.	60
Abbildung 24: Überprüfung der iCas-Induktion 20 h nach Stimulation mit 4-HT, Ti0T1M.	61
Abbildung 25: Überprüfung der BRET-Ratio nach 44 h Stimulation mit 4-HT, Ti0T2M.	62
Abbildung 26: Überprüfung der BRET-Ratio 96 h nach Transfektion und 48 h nach Stimulation mit 4-HT, Ti2T4M.	64
Abbildung 27: Unterschiedliche Induktions- und Messzeitpunkte der gRNA/iCas Komplexe \pm 4-HT und BRET-Reporter.	65
Abbildung 28: GFP2 Transfektionskontrolle in iNGNs 24 h nach Transfektion.	66
Abbildung 29: Transfektion von iNGNs mit \pm gRNA/Cas9 der Sequenz 8T3, 24 h nach Transfektion.	66
Abbildung 30: Überprüfung der BRET-Ratio 24 h nach Transfektion mit \pm gRNA/Cas9 in iNGNs.	67

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	19
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	21
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.....	22
Tabelle 4: Weitere verwendete Puffer und Lösungen.....	24
Tabelle 5: Verwendete Antibiotika.....	24
Tabelle 6: Verwendete Restriktionsenzyme.....	25
Tabelle 7: Verwendete Enzyme.....	25
Tabelle 8: Verwendete DNA-Größenstandards.....	25
Tabelle 9: Verwendete Plasmide/Vektoren.....	26
Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotide für gRNA-Sequenzen.....	31
Tabelle 11: Primer.....	32
Tabelle 12: Verwendete Kits.....	32
Tabelle 13: Verwendete Software.....	35
Tabelle 14: Linearisierung iCas-Plasmid.....	36
Tabelle 15: Primerkombinationen.....	37
Tabelle 16: Primer Hybridisierung zu Oligonukleotiden.....	37
Tabelle 17: Ligationsansatz.....	37
Tabelle 18: Pipettierschema Analyseverdau.....	39
Tabelle 19: Beispielhafter Analyseverdau.....	40
Tabelle 20: Schema DNA-Sequenzierung.....	41
Tabelle 21: Transfektion HEK293-T mit BRET-Reporter und Cas9-System.....	44
Tabelle 22: Transfektion HEK293-T TMF/4-Hydroxytamoxifen- Konzentrationsreihe.....	44
Tabelle 23: Transfektion HEK293-T mit BRET-Reporter und iCas-System.....	45
Tabelle 24: Transfektionsansatz für \pm gRNA/Cas9 und BRET-Reporter in iNGN Zellen.....	45
Tabelle 25: DNA-Mengen der Kontrollen RLuc8 und GFP.....	46

10. Literaturverzeichnis

Aumüller, Gerhard; Aust, Gabriela; Conrad, Arne; Engele, Jürgen; Kirsch, Joachim; Maio, Giovanni et al. (2020): Duale Reihe Anatomie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

Battu, Rajani; Ratra, Dhanashree; Gopal, Lingam (2022): Newer therapeutic options for inherited retinal diseases: Gene and cell replacement therapy. In: *Indian journal of ophthalmology* 70 (7), S. 2316–2325. DOI: 10.4103/ijo.IJO_82_22.

Bellapianta, Alessandro; Cetkovic, Ana; Bolz, Matthias; Salti, Ahmad (2022): Retinal Organoids and Retinal Prostheses: An Overview. In: *International journal of molecular sciences* 23 (6). DOI: 10.3390/ijms23062922.

Ben Jehuda, Ronen; Shemer, Yuval; Binah, Ofer (2018): Genome Editing in Induced Pluripotent Stem Cells using CRISPR/Cas9. In: *Stem cell reviews and reports* 14 (3), S. 323–336. DOI: 10.1007/s12015-018-9811-3.

Ben-Yosef, Tamar (2022): Inherited Retinal Diseases. In: *International journal of molecular sciences* 23 (21). DOI: 10.3390/ijms232113467.

Bergua, Antonio (Hg.) (2017): Das menschliche Auge in Zahlen. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Busskamp, Volker (2022): Stem cells for treating retinal degeneration. In: *Journal of perinatal medicine*. DOI: 10.1515/jpm-2022-0510.

Busskamp, Volker; Lewis, Nathan E.; Guye, Patrick; Ng, Alex H. M.; Shipman, Seth L.; Byrne, Susan M. et al. (2014): Rapid neurogenesis through transcriptional activation in human stem cells. In: *Molecular systems biology* 10 (11), S. 760. DOI: 10.15252/msb.20145508.

Byrne, Susan M.; Church, George M. (2015): Crispr-mediated Gene Targeting of Human Induced Pluripotent Stem Cells. In: *Current protocols in stem cell biology* 35 (Suppl 35), 5A.8.1-5A.8.22. DOI: 10.1002/9780470151808.sc05a08s35.

Cai, Bincui; Sun, Shuo; Li, Zhiqing; Zhang, Xiaomin; Ke, Yifeng; Yang, Jin; Li, Xiaorong (2018): Application of CRISPR/Cas9 technologies combined with iPSCs in the study and treatment of retinal degenerative diseases. In: *Human genetics* 137 (9), S. 679–688. DOI: 10.1007/s00439-018-1933-9.

Cao, Jian; Wu, Lizhen; Zhang, Shang-Min; Lu, Min; Cheung, William K.C.; Cai, Wesley et al. (2016): An easy and efficient inducible CRISPR/Cas9 platform with improved specificity for multiple gene targeting. In: *Nucleic Acids Research* 44 (19), e149. DOI: 10.1093/nar/gkw660.

Chandrasegaran, Srinivasan; Carroll, Dana (2016): Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. In: *Journal of molecular biology* 428 (5 Pt B), S. 963–989. DOI: 10.1016/j.jmb.2015.10.014.

Chapman, J. Ross; Taylor, Martin R. G.; Boulton, Simon J. (2012): Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. In: *Molecular cell* 47 (4), S. 497–510. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.07.029.

Chatterjee, Nimrat; Walker, Graham C. (2017): Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. In: *Environmental and molecular mutagenesis* 58 (5), S. 235–263. DOI: 10.1002/em.22087.

Chatterjee, Papri; Cheung, Yuri; Liew, Chee (2011): Transfecting and nucleofecting human induced pluripotent stem cells. In: *Journal of visualized experiments : JoVE* (56). DOI: 10.3791/3110.

Chien, Jasper Che-Yung; Tabet, Elie; Pinkham, Kelsey; Da Hora, Cintia Carla; Chang, Jason Cheng-Yu; Lin, Steven et al. (2020): A multiplexed bioluminescent reporter for sensitive and non-invasive tracking of DNA double strand break repair dynamics in vitro and in vivo. In: *Nucleic Acids Research* 48 (17), e100. DOI: 10.1093/nar/gkaa669.

Chuang, Katherine; Fields, Mark A.; Del Priore, Lucian V. (2017): Potential of Gene Editing and Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) in Treatment of Retinal Diseases. In: *The Yale Journal of Biology and Medicine* 90 (4), S. 635–642.

Cowan, Cameron S.; Renner, Magdalena; Gennaro, Martina de; Gross-Scherf, Brigitte; Goldblum, David; Hou, Yanyan et al. (2020): Cell Types of the Human Retina and Its Organoids at Single-Cell Resolution. In: *Cell* 182 (6), 1623-1640.e34. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.013.

Dai, Xiaofeng; Chen, Xiao; Fang, Qiuwu; Li, Jia; Bai, Zhonghu (2018): Inducible CRISPR genome-editing tool: classifications and future trends. In: *Critical reviews in biotechnology* 38 (4), S. 573–586. DOI: 10.1080/07388551.2017.1378999.

Davis, Kevin M.; Pattanayak, Vikram; Thompson, David B.; Zuris, John A.; Liu, David R. (2015): Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. In: *Nature chemical biology* 11 (5), S. 316–318. DOI: 10.1038/nchembio.1793.

Doss, Michael Xavier; Sachinidis, Agapios (2019): Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. In: *Cells* 8 (5). DOI: 10.3390/cells8050403.

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

Duncan, Jacquie L.; Pierce, Eric A.; Laster, Amy M.; Daiger, Stephen P.; Birch, David G.; Ash, John D. et al. (2018): Inherited Retinal Degenerations: Current Landscape and Knowledge Gaps. In: *Translational vision science & technology* 7 (4), S. 6. DOI: 10.1167/tvst.7.4.6.

Fontes, Andrew; Lakshmipathy, Uma (2013): Advances in genetic modification of pluripotent stem cells. In: *Biotechnology advances* 31 (7), S. 994–1001. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.07.003.

Furr, B. J.; Jordan, V. C. (1984): The pharmacology and clinical uses of tamoxifen. In: *Pharmacology & therapeutics* 25 (2), S. 127–205. DOI: 10.1016/0163-7258(84)90043-3.

Gaj, Thomas; Sirk, Shannon J.; Shui, Sai-Lan; Liu, Jia (2016): Genome-Editing Technologies: Principles and Applications. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8 (12). DOI: 10.1101/cshperspect.a023754.

Gasparini, Sylvia J.; Llonch, Sílvia; Borsch, Oliver; Ader, Marius (2019): Transplantation of photoreceptors into the degenerative retina: Current state and future perspectives. In: *Progress in retinal and eye research* 69, S. 1–37. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2018.11.001.

Geng, Bing-Chuan; Choi, Kyoung-Han; Wang, Shan-Zhi; Chen, Peng; Pan, Xiu-di; Dong, Nian-Guo et al. (2020): A simple, quick, and efficient CRISPR/Cas9 genome editing method for human induced pluripotent stem cells. In: *Acta pharmacologica Sinica* 41 (11), S. 1427–1432. DOI: 10.1038/s41401-020-0452-0.

González, Federico; Zhu, Zengrong; Shi, Zhong-Dong; Lelli, Katherine; Verma, Nipun; Li, Qing V.; Huangfu, Danwei (2014): An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells. In: *Cell stem cell* 15 (2), S. 215–226. DOI: 10.1016/j.stem.2014.05.018.

Grehn, Franz (2006): *Augenheilkunde*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Grehn, Franz (2019): Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Auges. In: Franz Grehn (Hg.): *Augenheilkunde*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 5–21.

Hockemeyer, Dirk; Jaenisch, Rudolf (2016): Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing. In: *Cell stem cell* 18 (5), S. 573–586. DOI: 10.1016/j.stem.2016.04.013.

Hsu, S. Tammy; Ponugoti, Arathi; Deaner, Jordan D.; Vajzovic, Lejla (2021): Update on Retinal Drug Toxicities. In: *Current ophthalmology reports* 9 (4), S. 168–177. DOI: 10.1007/s40135-021-00277-x.

Hu, Monica L.; Edwards, Thomas L.; O'Hare, Fleur; Hickey, Doron G.; Wang, Jiang-Hui; Liu, Zhengyang; Ayton, Lauren N. (2021): Gene therapy for inherited retinal diseases: progress and possibilities. In: *Clinical & experimental optometry* 104 (4), S. 444–454. DOI: 10.1080/08164622.2021.1880863.

Hung, Sandy S. C.; McCaughey, Tristan; Swann, Olivia; Pébay, Alice; Hewitt, Alex W. (2016): Genome engineering in ophthalmology: Application of CRISPR/Cas to the treatment of eye disease. In: *Progress in retinal and eye research* 53, S. 1–20. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2016.05.001.

Indra, A. K.; Warot, X.; Brocard, J.; Bornert, J. M.; Xiao, J. H.; Chambon, P.; Metzger, D. (1999): Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. In: *Nucleic Acids Research* 27 (22), S. 4324–4327. DOI: 10.1093/nar/27.22.4324.

Jasin, Maria; Haber, James E. (2016): The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair. In: *DNA repair* 44, S. 6–16. DOI: 10.1016/j.dnarep.2016.05.001.

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.

Kaku, Tomomi; Sugiura, Kazunori; Entani, Tetsuyuki; Osabe, Kenji; Nagai, Takeharu (2021): Enhanced brightness of bacterial luciferase by bioluminescence resonance energy transfer. In: *Scientific reports* 11 (1), S. 14994. DOI: 10.1038/s41598-021-94551-4.

Kellner, U.; Renner, A. B.; Herbst, S. M.; Kellner, S.; Weinitz, S.; Weber, B. H. F. (2012): Hereditäre Netzhautdystrophien. In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 229 (2), 171-93; quiz 194-6. DOI: 10.1055/s-0031-1280461.

Khajanchi, Namita; Saha, Krishanu (2021): Controlling CRISPR with small molecule regulation for somatic cell genome editing. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 30 (1), S. 17–31. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.06.014.

Kim, Sinae; Kim, Gi Jin; Miyoshi, Hiroyuki; Moon, Sung-Hwan; Ahn, Seong Eun; Lee, Jae Ho et al. (2007): Efficiency of the elongation factor-1alpha promoter in mammalian embryonic stem cells using lentiviral gene delivery systems. In: *Stem cells and development* 16 (4), S. 537–545. DOI: 10.1089/scd.2006.0088.

Lakshmipathy, Uma; Pelacho, Beatriz; Sudo, Kazuhiro; Linehan, Jonathan L.; Coucouvanis, Electra; Kaufman, Dan S.; Verfaillie, Catherine M. (2004): Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22 (4), S. 531–543. DOI: 10.1634/stemcells.22-4-531.

Lam, Rebecca S.; Töpfer, Felix M.; Wood, Phillip G.; Busskamp, Volker; Bamberg, Ernst (2017): Functional Maturation of Human Stem Cell-Derived Neurons in Long-Term Cultures. In: *PloS one* 12 (1), e0169506. DOI: 10.1371/journal.pone.0169506.

Liang, Xiquan; Potter, Jason; Kumar, Shantanu; Zou, Yanfei; Quintanilla, Rene; Sridharan, Mahalakshmi et al. (2015): Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. In: *Journal of biotechnology* 208, S. 44–53. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.04.024.

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.

Lin, Hsiu-Chuan; He, Zhisong; Ebert, Sebastian; Schörnig, Maria; Santel, Malgorzata; Nikolova, Marina T. et al. (2021): NGN2 induces diverse neuron types from human pluripotency. In: *Stem cell reports* 16 (9), S. 2118–2127. DOI: 10.1016/j.stemcr.2021.07.006.

Lin, Tai-Chi; Chang, Hua-Ming; Hsu, Chih-Chien; Hung, Kuo-Hsuan; Chen, Yan-Ting; Chen, Szu-Yu; Chen, Shih-Jen (2015): Retinal prostheses in degenerative retinal diseases. In: *Journal of the Chinese Medical Association : JCMA* 78 (9), S. 501–505. DOI: 10.1016/j.jcma.2015.05.010.

Liu, Kaiwen Ivy; Ramli, Muhammad Nadzim Bin; Sutrisnoh, Norfala-Aliah Binte; Tan, Meng How (2018): Rapid Control of Genome Editing in Human Cells by Chemical-Inducible CRISPR-Cas Systems. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1772, S. 267–288. DOI: 10.1007/978-1-4939-7795-6_15.

Liu, Kaiwen Ivy; Ramli, Muhammad Nadzim Bin; Woo, Cheok Wei Ariel; Wang, Yuanming; Zhao, Tianyun; Zhang, Xiujun et al. (2016): A chemical-inducible CRISPR-Cas9 system for rapid control of genome editing. In: *Nature chemical biology* 12 (11), S. 980–987. DOI: 10.1038/nchembio.2179.

Loening, Andreas Markus; Fenn, Timothy David; Gambhir, Sanjiv Sam (2007): Crystal structures of the luciferase and green fluorescent protein from *Renilla reniformis*. In: *Journal of molecular biology* 374 (4), S. 1017–1028. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.09.078.

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. 3797214. DOI: 10.1155/2018/3797214.

Mandell, Jeffrey G.; Barbas, Carlos F. (2006): Zinc Finger Tools: custom DNA-binding domains for transcription factors and nucleases. In: *Nucleic Acids Research* 34 (Web Server issue), W516–23. DOI: 10.1093/nar/gkl209.

Mirza, Myriam; Vainshtein, Anna; DiRonza, Alberto; Chandrachud, Uma; Haslett, Luke J.; Palmieri, Michela et al. (2019): The CLN3 gene and protein: What we know. In: *Molecular genetics & genomic medicine* 7 (12), e859. DOI: 10.1002/mgg3.859.

Nayfield, S. G.; Gorin, M. B. (1996): Tamoxifen-associated eye disease. A review. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 14 (3), S. 1018–1026. DOI: 10.1200/JCO.1996.14.3.1018.

Norrman, Karin; Fischer, Yvonne; Bonnamy, Blandine; Wolfhagen Sand, Fredrik; Ravassard, Philippe; Semb, Henrik (2010): Quantitative comparison of constitutive promoters in human ES cells. In: *PloS one* 5 (8), e12413. DOI: 10.1371/journal.pone.0012413.

Pasquini, Giovanni; Cora, Virginia; Swiersy, Anka; Achberger, Kevin; Antkowiak, Lena; Müller, Brigitte et al. (2020): Using Transcriptomic Analysis to Assess Double-Strand Break Repair Activity: Towards Precise in vivo Genome Editing. In: *International journal of molecular sciences* 21 (4). DOI: 10.3390/ijms21041380.

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

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.

ProRetina: Was ist eine Netzhauterkrankung? Hg. v. ProRetina. Online verfügbar unter <https://www.pro-retina.de/leben/was-ist-eine-netzhauterkrankung>, zuletzt geprüft am 08.12.2022.

Pulix, Michela; Lukashchuk, Vera; Smith, Daniel C.; Dickson, Alan J. (2021): Molecular characterization of HEK293 cells as emerging versatile cell factories. In: *Current opinion in biotechnology* 71, S. 18–24. DOI: 10.1016/j.copbio.2021.05.001.

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.

Rapti, Kleopatra; Stillitano, Francesca; Karakikes, Ioannis; Nonnenmacher, Mathieu; Weber, Thomas; Hulot, Jean-Sebastian; Hajjar, Roger J. (2015): Effectiveness of gene delivery systems for pluripotent and differentiated cells. In: *Molecular therapy. Methods & clinical development* 2, S. 14067. DOI: 10.1038/mtm.2014.67.

RetNet: Summaries of Genes and Loci Causing Retinal Diseases. Unter Mitarbeit von Stephen P. Daiger. The University of Texas Health Science Center. Online verfügbar unter <https://web.sph.uth.edu/RetNet/>, zuletzt geprüft am 17.01.2023.

Rohiwal, S. S.; Dvorakova, N.; Klima, J.; Vaskovicova, M.; Senigl, F.; Slouf, M. et al. (2020): Polyethylenimine based magnetic nanoparticles mediated non-viral CRISPR/Cas9 system for genome editing. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 4619. DOI: 10.1038/s41598-020-61465-6.

Sanjurjo-Soriano, Carla; Kalatzis, Vasiliki (2018): Guiding Lights in Genome Editing for Inherited Retinal Disorders: Implications for Gene and Cell Therapy. In: *Neural plasticity* 2018, S. 5056279. DOI: 10.1155/2018/5056279.

Sauter, Evelyn J.; Kutsche, Lisa K.; Klapper, Simon D.; Busskamp, Volker (2019): Induced Neurons for the Study of Neurodegenerative and Neurodevelopmental Disorders. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1942, S. 101–121. DOI: 10.1007/978-1-4939-9080-1_9.

Schneider, Nina; Sundaresan, Yogapriya; Gopalakrishnan, Prakadeeswari; Beryozkin, Avigail; Hanany, Mor; Levanon, Erez Y. et al. (2022): Inherited retinal diseases: Linking genes, disease-causing variants, and relevant therapeutic modalities. In: *Progress in retinal and eye research* 89, S. 101029. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2021.101029.

Schünke, Michael; Schulte, Erik; Schumacher, Udo (2022): Prometheus LernAtlas der Anatomie - Kopf, Hals und Neuroanatomie. Unter Mitarbeit von Markus Voll und Karl Wesker. 6., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag (PROMETHEUS LernAtlas der Anatomie). Online verfügbar unter https://eref.thieme.de/ebooks/cs_18679585#.

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.

Sharma, Kritika; Krohne, Tim U.; Busskamp, Volker (2020): The Rise of Retinal Organoids for Vision Research. In: *International journal of molecular sciences* 21 (22). DOI: 10.3390/ijms21228484.

Shrivastav, Meena; Haro, Leyma P. de; Nickoloff, Jac A. (2008): Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. In: *Cell research* 18 (1), S. 134–147. DOI: 10.1038/cr.2007.111.

Song, Fei; Stieger, Knut (2017): Optimizing the DNA Donor Template for Homology-Directed Repair of Double-Strand Breaks. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 7, S. 53–60. DOI: 10.1016/j.omtn.2017.02.006.

Stepanenko, A. A.; Dmitrenko, V. V. (2015): HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. In: *Gene* 569 (2), S. 182–190. DOI: 10.1016/j.gene.2015.05.065.

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.

Takahashi, Kazutoshi; Yamanaka, Shinya (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. In: *Cell* 126 (4), S. 663–676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

Tan, Evan; Chin, Cara Sze Hui; Lim, Zhi Feng Sherman; Ng, Say Kong (2021): HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. In: *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 9, S. 796991. DOI: 10.3389/fbioe.2021.796991.

Tan, Shihua; Tao, Zhonghao; Loo, Szejie; Su, Liping; Chen, Xin; Ye, Lei (2019): Non-viral vector based gene transfection with human induced pluripotent stem cells derived cardiomyocytes. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 14404. DOI: 10.1038/s41598-019-50980-w.

Thamodaran, Vasanth; Rani, Sonam; Velayudhan, Shaji R. (2022): Gene Editing in Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Doxycycline-Inducible CRISPR-Cas9 System. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2454, S. 755–773. DOI: 10.1007/7651_2021_348.

Vázquez-Domínguez, Irene; Garanto, Alejandro; Collin, Rob W. J. (2019): Molecular Therapies for Inherited Retinal Diseases-Current Standing, Opportunities and Challenges. In: *Genes* 10 (9). DOI: 10.3390/genes10090654.

Völkner, Manuela; Zschätzsch, Marlen; Rostovskaya, Maria; Overall, Rupert W.; Busskamp, Volker; Anastassiadis, Konstantinos; Karl, Mike O. (2016): Retinal Organoids from Pluripotent Stem Cells Efficiently Recapitulate Retinogenesis. In: *Stem cell reports* 6 (4), S. 525–538. DOI: 10.1016/j.stemcr.2016.03.001.

Walter de Gruyter & Co (2020): *Pschyrembel - Klinisches Wörterbuch*. 268., neu bearbeitete Auflage. Berlin, Boston: De Gruyter.

Wang, Xu; Zhao, Lian; Zhang, Yikui; Ma, Wenxin; Gonzalez, Shaimar R.; Fan, Jianguo et al. (2017): Tamoxifen Provides Structural and Functional Rescue in Murine Models of Photoreceptor Degeneration. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 37 (12), S. 3294–3310. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2717-16.2017.

Wilbie, Danny; Walther, Johanna; Mastrobattista, Enrico (2019): Delivery Aspects of CRISPR/Cas for in Vivo Genome Editing. In: *Accounts of chemical research* 52 (6), S. 1555–1564. DOI: 10.1021/acs.accounts.9b00106.

Wimmer, T.; Lorenz, B.; Stieger, K. (2016): Quantification of the vascular endothelial growth factor with a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) based single molecule biosensor. In: *Biosensors & bioelectronics* 86, S. 609–615. DOI: 10.1016/j.bios.2016.07.058.

Wimmer, Tobias; Bonthu, Dileep; Moeschl, Vincent; Kleekamp, Philip; Thiel, Christian; Lytvynchuk, Lyubomyr et al. (2021): A Bioluminescence Resonance Energy Transfer-Based Reporter System: Characterization and Applications. In: *The CRISPR journal* 4 (6), S. 884–895. DOI: 10.1089/crispr.2021.0023.

Wimmer, Tobias; Schroeter, Eva; Lorenz, Birgit; Stieger, Knut (2017): Detection of the Vascular Endothelial Growth Factor with a Novel Bioluminescence Resonance Energy Transfer Pair Using a Two-Component System. In: *Sensors (Basel, Switzerland)* 17 (1). DOI: 10.3390/s17010145.

Xu, Yuanyuan; Li, Zhanjun (2020): CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. In: *Computational and structural biotechnology journal* 18, S. 2401–2415. DOI: 10.1016/j.csbj.2020.08.031.

Xue, Chaoyou; Greene, Eric C. (2021): DNA Repair Pathway Choices in CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. In: *Trends in genetics : TIG* 37 (7), S. 639–656. DOI: 10.1016/j.tig.2021.02.008.

Yamoah, Megan A.; Moshref, Maryam; Sharma, Janhavi; Chen, Wei Chun; Ledford, Hannah A.; Lee, Jeong Han et al. (2018): Highly efficient transfection of human induced pluripotent stem cells using magnetic nanoparticles. In: *International journal of nanomedicine* 13, S. 6073–6078. DOI: 10.2147/IJN.S172254.

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

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

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.

Ye, Lei; Swingen, Cory; Zhang, Jianyi (2013): Induced Pluripotent Stem Cells and Their Potential for Basic and Clinical Sciences. In: *Current Cardiology Reviews* 9 (1), S. 63–72. DOI: 10.2174/157340313805076278.

Zetsche, Bernd; Volz, Sara E.; Zhang, Feng (2015): A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. In: *Nature biotechnology* 33 (2), S. 139–142. DOI: 10.1038/nbt.3149.

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.

Zhao, Chen; Zhao, Yingze; Zhang, Jingfang; Lu, Jia; Chen, Li; Zhang, Yue et al. (2018): HIT-Cas9: A CRISPR/Cas9 Genome-Editing Device under Tight and Effective Drug Control. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 13, S. 208–219. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.08.022.

11. Publikationsverzeichnis

Wimmer, Tobias; Schneider, Judith; Alabudeeb, Fatimah; Türk, Franziska M.; Lytvynchuk, Lyubomyr; Stieger, Knut (2025): Influence of PARP1 on CRISPR/Cas9 induced double strand break repair in proliferating cells. In: Computational and Structural Biotechnology Journal 27, S. 4282–4289. DOI: 10.1016/j.csbj.2025.10.001

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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Augsburg, 01.02.2025

Ort, Datum

Unterschrift

13. Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger bedanken für die Möglichkeit dieser experimentellen Dissertation sowie für die Betreuung während der praktischen Phase. Auch für das Korrekturlesen, den wissenschaftlichen Austausch und die Unterstützung während der kompletten Dissertationsphase möchte ich mich bedanken.

Herzlichst möchte ich mich auch bei Dr. Tobias Wimmer für das Einführen in die Laborarbeit und den stetigen Austausch in Bezug auf Planung, Durchführung und Auswertung sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Annabella Janise bedanken für die zuverlässige Betreuung im Labor, Hilfe in jeder Lage und die sehr interessanten Gespräche. Bedanken möchte ich mich herzlich auch bei Maria Weller, die mich in jeder Phase dieser Dissertation begleitet und unterstützt hat und ein immer offenes Ohr für meine Fragen hatte.

Herrn Prof. Dr. Matus Rehak und Herrn PD Dr. Lytvynchuk danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und die Ermöglichung dieses Projektes. Bei Dr. Brigitte Müller und PD Dr. Markus Preising möchte ich mich für den wissenschaftlichen Austausch und die Anregungen bezüglich meines Projektes bedanken.

Ich möchte mich auch bei allen Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe Experimentelle Ophthalmologie bedanken. Durch die angenehme Atmosphäre und Hilfsbereitschaft war es eine sehr positive Erfahrung im Bereich des experimentellen wissenschaftlichen Arbeitens. Eine Freude war es mir auch, mit meinen Mitdoktorand:innen zusammen zu arbeiten.

Bei Anna-Lena Ament, Hannah Brill und Emil Kramer möchte ich mich ganz herzlich für das Korrekturlesen bedanken. Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir durch ihre stetige Unterstützung das Studium der Humanmedizin und diese Promotion ermöglicht haben.