Korrektur einer Insertionsmutation im porcinen ABCA4-Gen mit Hilfe des Prime Edit Systems

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von **Urban, Anne Maria**
aus Ulm

Gießen, 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Gutachter: PD Dr. Axel Weber

Tag der Disputation: 17.04.2024

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Der Aufbau der Netzhaut 1

1.1.1 Photorezeptoren und RPE 1

1.2 Der visuelle Zyklus 3

1.2.1 Die Rolle des ABCA4-Proteins 4

1.2.2 Pathophysiologie und Klinik des Morbus Stargardt 5

1.3 Therapieoptionen 5

1.4 Tierische Modellsysteme 6

1.5 Genomeditierung 7

1.5.1 Das CRISPR/Cas-System 7

1.5.2 Zelleigene Reparaturmechanismen 9

1.6 Neue Genomeditierungsmethoden 11

1.6.1 Base Editors 12

1.6.2 Prime Editors 13

1.7 DNA-Quantifizierungsmethoden 15

1.8 Zielsetzung 16

2. Material und Methoden 17

2.1 Material 17

2.1.1 Geräte 17

2.1.2 Verbrauchsmaterialien 19

2.1.3 Chemikalien 20

2.1.4 Puffer und Lösungen 21

2.1.5 DNA Größenstandard 22

2.1.6 Enzyme 22

2.1.7 Antibiotika 23

2.1.8 Software 23

2.1.9 Plasmide 24

2.1.10 Oligonukleotide und Primer 28

2.1.11 Medien für Bakterienkulturen 32
2.1.12 Medien für Zellkulturen 33
2.1.13 Bakterienstämme 33
2.1.14 Zelllinien 33
2.1.15 Kits 34
2.2 Methoden 35
2.2.1 Molekularbiologische Methoden 35
2.2.1.1 Oligohybridisierung der pegRNA- und ngRNA-Sequenzanteile 35
2.2.1.2 Restriktionsverdau 36
2.2.1.3 Klonierung 38
2.2.1.4 Ligation 39
2.2.1.5 Herstellung elektrokompetenter top10 - E.coli 40
2.2.1.6 Herstellung von Agarplatten 41
2.2.1.7 Transformation durch Elektroporation 41
2.2.1.8 Plasmidisolation 42
2.2.1.9 DNA-Sequenzierung 43
2.2.1.10 Anlegen eines Glycerolstocks 43
2.2.1.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR) 43
2.2.1.12 Agarose-Gelelektrophorese 45
2.2.1.13 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen 46
2.2.1.14 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration 46
2.2.2 Zellbiologische Methoden 47
2.2.2.1 Kryokonservierung der HEK293T-Zellen 47
2.2.2.2 Auftauen von HEK293T-Zellen 47
2.2.2.3 Kultivierung von HEK293T-Zellen 47
2.2.2.4 Auszählen der Zellen 48
2.2.2.5 Transfektion von HEK293T-Zellen 48
2.2.3 Proteinchemische Methoden 51
2.2.3.1 Proteinextraktion aus HEK 293-T Zellen 51

2.2.3.2 BRET Assay 52
2.2.4 Statistische Auswertung 54
3. Ergebnisse 55
3.1 Experimentelles Design: PE2-System 55
3.1.1 Design der pegRNAs 56
3.1.2 Klonierung der pegRNAs 57
3.1.3 Generierung des Wildtyp BRET-Sensorplasmids 59
3.1.4 Dreifach-Transfektion in HEK293T-Zellen 60
3.1.5 Editierungseffizienz des PE2-Systems 61
3.2 Experimentelles Design: PE3/3b-System 65
3.2.1 Design der ngRNAs 65
3.2.2. Klonierung der ngRNAs 66
3.2.3 Vierfach-Transfektion in HEK293T-Zellen 68
3.2.4 Editierungseffizienz des PE3- und PE3b-Systems 69
4. Diskussion 79
5. Zusammenfassung 86
6. Summary 87
7. Abkürzungsverzeichnis 88
8. Abbildungsverzeichnis 90
9. Tabellenverzeichnis 93
10. Literaturverzeichnis 94
11. Anhang 100
12. Publikationsverzeichnis 102
13. Ehrenwörtliche Erklärung 103
14. Danksagung 104

1. Einleitung

1.1 Der Aufbau der Netzhaut

Die Netzhaut (Retina) bildet den Augenhintergrund und den rezeptiven Anteil des Auges. Embryogenetisch entsteht sie aus dem Neuroektoderm, aus dem auch andere Teile des zentralen Nervensystems hervorgehen (Lamb et al. 2007). Die Retina besteht aus sechs Haupttypen von Neuronen, welche in verschiedenen Zellschichten angeordnet sind (siehe Abb. 1.1 A). Die äußere Kernschicht (ONL) enthält die Zellkörper der Photorezeptorzellen, von denen sich das innere Segment (IS) und das äußere Segment (OS) zum retinalen Pigmentepithel (RPE) hin erstrecken. Die innere Kernschicht (INL) enthält Amakrin-, Bipolar-, Müller- und Horizontalzellen. Ganglienzellen, deren Axone den Sehnerv bilden, liegen in der Ganglienzellschicht (GCL). Äußere und innere plexiforme Schichten (OPL bzw. IPL) enthalten synaptische Regionen (Veleri et al. 2015).

1.1.1 Photorezeptoren und RPE

Die Photorezeptoren sind die lichtempfindlichen Zellen in der Netzhaut, mit zwei verschiedenen Untertypen: Stäbchen und Zapfen. Die Stäbchen-Photorezeptoren ermöglichen das Sehen bei schwachem Licht, während die Zapfen-Photorezeptoren das Farbensehen und eine hohe Sehschärfe bei helleren Lichtverhältnissen vermitteln. Der zentrale Teil der Makula (gelber Fleck) wird durch die Fovea centralis gebildet und ist der Bereich des schärfsten Sehens. Daher besteht dieser Bereich ausschließlich aus Zapfen, um eine hohe Bildschärfe zu erzielen. Die Photorezeptorzellen enthalten Sehpigmente, welche jeweils aus einem Opsin und einem Chromophor (Retinal) bestehen. Rhodopsin bildet das Sehpigment der Stäbchen, Iodopsin das der Zapfen. Verhältnismäßig überwiegt bei den meisten Säugetieren die Anzahl der Stäbchen. Die menschliche Retina besitzt beispielsweise ungefähr 105 Millionen Stäbchen und 6 Millionen Zapfen (Veleri et al. 2015).

Die Photorezeptoren selbst sind in vier verschiedenen Anteilen organisiert (siehe Abb. 1.1 B): dem Zellkörper, der den Kern enthält, dem inneren Segment (IS), dem äußeren Segment (OS) und der synaptischen Region (Lamb 2013). Das OS enthält Hunderte von

gestapelten Membranscheiben (discs), die die mit der Phototransduktion (Umwandlung von Licht in Aktionspotentiale) assoziierten Proteine tragen.

Fast 10 % der OS-Scheiben am distalen Ende werden täglich abgestoßen und vom retinalen Pigmentepithel (RPE) phagozytiert, wobei an deren proximalen Ende stets neue Scheiben hinzukommen. Dadurch erneuert sich das komplette OS innerhalb von 10-15 Tagen. Das RPE liegt unterhalb der Netzhaut und dient als Barriere zwischen den Photorezeptoren und der Blutversorgung der Aderhaut (Choroidea). Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Unterstützung der Photorezeptorfunktion, einschließlich des Transports von Nährstoffen und Abfallprodukten und des Retinoid-Recyclings (Veleri et al. 2015).

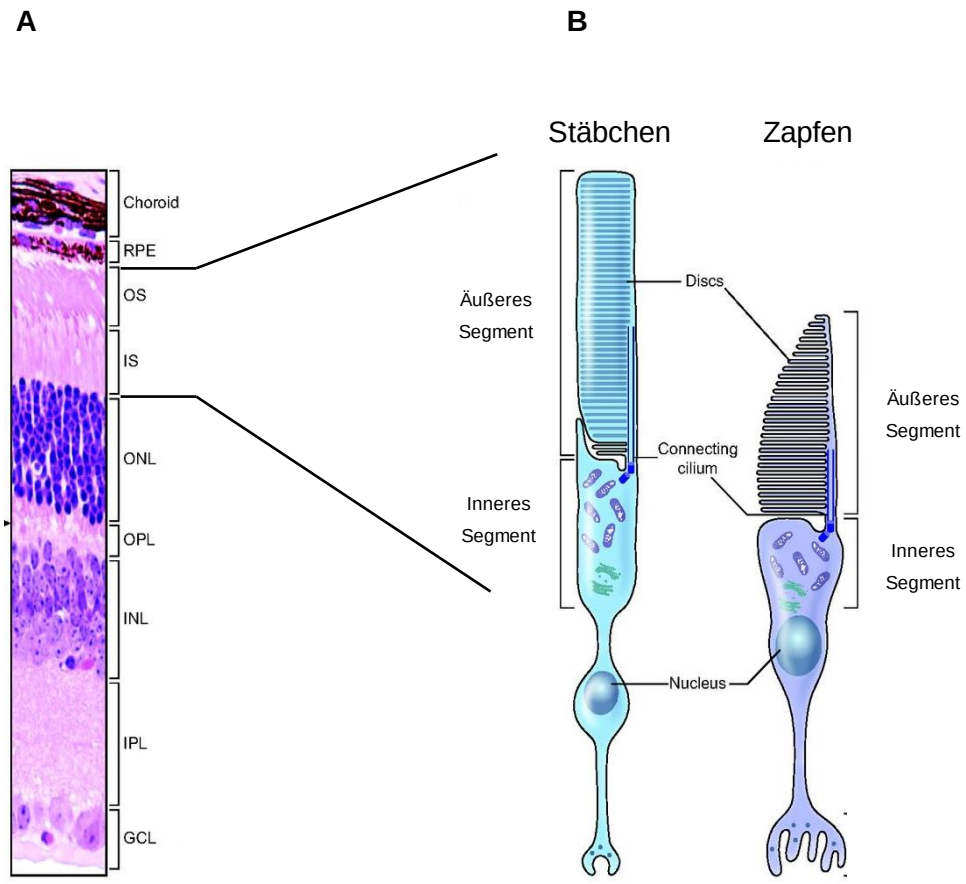


Abbildung 1.1 A: Die Schichten der Retina. HE-Färbung eines Retinaschnitts einer Maus. RPE: retinales Pigmentepithel. OS: Außensegment. IS: Innensegment. ONL: äußere Körnerschicht. OPL: äußere plexiforme Schicht. INL: innere nukleäre Schicht. IPL: innere plexiforme Schicht. GCL: Ganglienzellschicht (Veleri et al. 2015).

Abbildung 1.1 B: Schematische Darstellung der Stäbchen- und Zapfenphotorezeptoren. Die kompartimentierte Morphologie des äußeren Segments ist gut erkennbar (verändert nach Veleri et al. 2015).

1.2 Der visuelle Zyklus

Der Sehprozess des menschlichen Auges beginnt durch Lichtabsorption des Chromophors 11-cis-Retinal (Anteil des Rhodopsins) im Außensegment der Photorezeptorzellen. Durch Lichtreiz photoisomerisiert 11-cis-Retinal in all-trans-Retinal. All-trans-Retinal wird über eine Enzymkaskade innerhalb des RPE über 11-cis Retinol wieder in 11-cis Retinal rücktransformiert und so wieder für eine erneute Lichtabsorption in den Photorezeptorzellen zugänglich gemacht (Kiser et al. 2014). Im Rahmen des Phototransduktionsprozesses fällt somit in den Außensegmenten regelmäßig all-trans Retinal an, welches zunächst mit Phosphatidylethanolamine (PE) einen Komplex zu N-Retinylidene-Phosphatidylethanolamin (N-ret-PE, auch ABE genannt) bildet und anschließend über die Diskmembranen in das Zytoplasma transportiert wird. Diesen Transport übernimmt unter anderem das ABCA4-Protein (ABCR), welches sich innerhalb der Diskmembranen befindet (siehe Abb. 1.2) (Tanna et al. 2017).

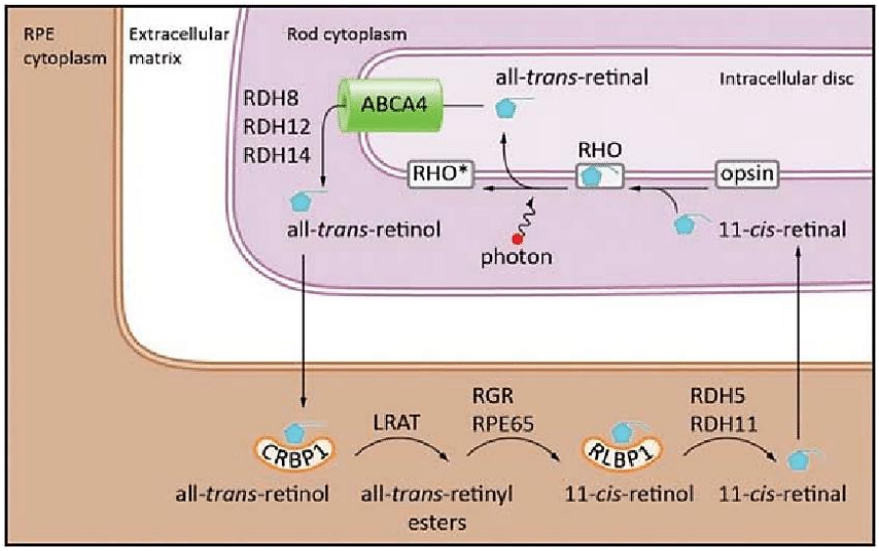


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des visuellen Zyklus. Braun: RPE-Zytoplasma. Weiß: extrazelluläre Matrix. Lila: Außensegment einer Zapfenzelle. CRBP1: zelluläres Retinol-bindendes Protein. LRAT: Lecithin-Retinol-Acyltransferase. RGR: retinaler G-Protein-gekoppelter Rezeptor. RPE65: Retinoid-Isomerohydrolase. RLBP1: zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein. RDH 5,11: 11-cis-Retinol-Dehydrogenasen. RDH 8,12,14: All-Trans-Retinal-Dehydrogenasen. ABCA4: ATP-binding cassette Transporter (Gregori et al. 2019).

1.2.1 Die Rolle des ABCA4-Proteins

Das ABCA4-Gen ist ein großes und polymorphes Gen, welches aus 50 Exons besteht und über das bislang über 900 Erkrankungs-assoziierte Varianten bekannt sind. Das aus dem Genabschnitt resultierende, retinaspezifische ABCA4-Protein (ABCR) gehört zur großen Gruppe der ABC-Transportproteine (Tanna et al. 2017). Durch die Funktionslosigkeit des ABCR kann ein Transport von in 1.2 genanntem ABE nicht mehr ordnungsgemäß erfolgen. Es existieren zahlreiche ABCR-Mutationen, welche die sogenannte Stargardt-Krankheit (Morbus Stargardt) verursachen können (siehe 1.2.2). In dieser Arbeit wurde zur Entwicklung eines Mutationsmodells für nachfolgende Korrekturversuche eine Insertionsmutation im porcinen Genom auf cDNA-Ebene in Exon 43 des ABCA4-Gens generiert. Hier erfolgte die Insertion einer Base (Adenin) zwischen Position 5918 und 5919 der porcinen DNA. Diese c.5918_5919insA-Mutation führt durch Verschiebung des Leserahmens (frame shift) einerseits zu einer abweichenden Aminosäure-Sequenz und andererseits in Exon 44 zu Stop-Codons und damit zu einem frühzeitigen Translationsabbruch des ABCR (siehe Abb. 1.3). Die bei den Korrekturversuchen generierten Daten stellen die Grundlage für spätere Therapieversuche bei mutationstragenden Schweinen dar, welche innerhalb einer internationalen Arbeitsgruppe gezüchtet werden.

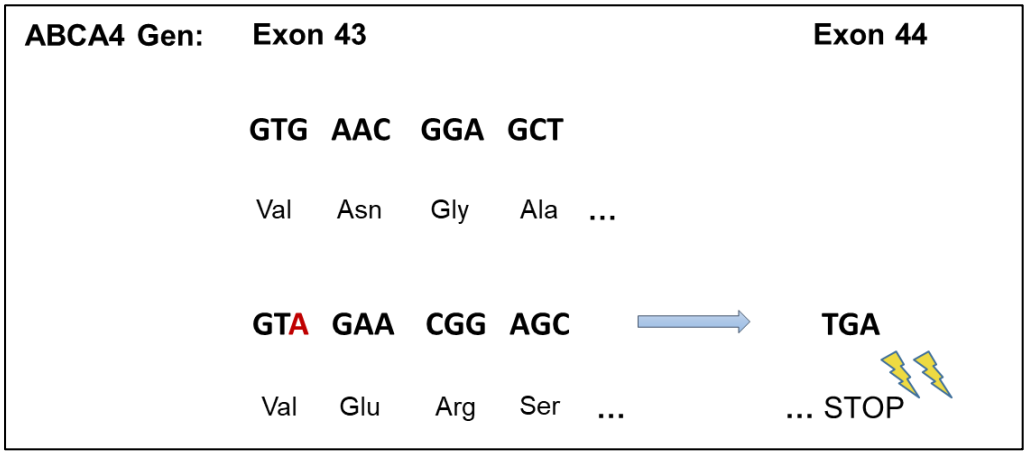


Abbildung 1.3: Pathomechanismus der Insertionsmutation (c.5918_5919insA -Mutation). Dargestellt ist die Aminosäure-Sequenz, welche durch das jeweils darüberliegende Basen-Triplet (Codon) codiert wird. Oben: Ausschnitt der porcinen Wildtyp-Sequenz im Exon 43. Unten: Ausschnitt der mutierten Sequenz im Exon 43 (rot: Insertionsmutation), welche in Exon 44 zu Stop-Codons und einem Abbruch der Translation führt.

1.2.2 Pathophysiologie und Klinik des Morbus Stargardt

Eine im Rahmen von Morbus Stargardt erhöhte Ansammlung von ABE und all-trans Retinal und deren Kondensation zu N-Retinylidene-N-Retinyl-Phosphatidylethanolamin (A2PE) konnte bereits im ABCR-defizienten Mausmodell nachgewiesen werden. A2PE für sich allein betrachtet, scheint nicht toxisch auf die Photorezeptorzellen zu wirken. Die Toxizität ergibt sich durch die tägliche Phagozytose der Außensegmente durch das RPE im Rahmen des Disk-Erneuerungsprozesses, da das A2PE dort zum zelltoxischen N-Retinyliden-N-Retinylethanolamin (A2E) hydrolysiert. Das A2E führt durch Akkumulation als Komponente von Lipofuszin (lipidhaltiges Pigment) zu einer progredienten Dysfunktion des RPE bis hin zum Funktionsverlust, welcher schließlich auch eine Degeneration der Photorezeptoren nach sich zieht (Travis et al. 2007).

Klinisch gesehen ist der Morbus Stargardt (STGD1), auch Fundus flavimaculatus genannt, eine seltene autosomal-rezessiv vererbbare Erkrankung, die phänotypisch in drei Formen unterschieden wird: early-onset STGD1, intermediate STGD1 und late-onset STGD1. Der early-onset M.Stargardt, der meist vor der Pubertät auftritt, ähnelt klinisch einer schweren Zapfen-Stäbchen-Dystrophie und wird auch als juvenile Makuladegeneration bezeichnet, da häufig zunächst eine Zapfendegeneration innerhalb der Makula beobachtet wird (Khan und Cremers 2020). Mit einer Prävalenz von 1:8000 bis 1:10000 handelt es sich um die häufigste erbliche Makuladystrophie bei Kindern und Erwachsenen. Je nach Genvariante und Schweregrad leiden die Patienten unter einer bilateralen, zentralen Visusminderung bis zum fast vollständigen Visusverlust. Besonders die early-onset STGD1 ist durch einen relativ raschen Verlauf charakterisiert (Tanna et al. 2017). In der Funduskopie ist bei den Patienten im Verlauf eine gelbliche, unregelmäßige Fleckung um die Makula herum und in der Peripherie zu erkennen (daher Fundus flavimaculatus) (Stargardt 1909). Dies ist durch die Ablagerung von Lipofuszin bedingt, welches wie oben beschrieben beim Sehvorgang in den Pigmentepithelzellen als Abbauprodukt entsteht und bei Morbus Stargardt vermehrt gebildet wird.

1.3 Therapieoptionen

Für STGD1 besteht bisher keine kausale Therapie zur Verfügung. Als Therapieoption erscheint zunächst eine klassische Gentherapie des ABCA4-Gens mittels viraler Vektoren denkbar. Limitierend für den Vektortransfer ist mit ca. 6,8 kb allerdings die Größe der

codierenden Sequenz des ABCA4-Gens (Allikmets et al. 1998; Dhooge et al. 2019). In der retinalen Gentherapie werden bevorzugt Adeno-assoziierte Virusvektoren (AAVs) verwendet, da sie ein gutes Sicherheitsprofil besitzen und bereits gut erforscht sind. Allerdings besitzen AAVs eine sehr limitierte Ladekapazität von weniger als 5 kb, welche den Transfer eines großen Gens wie des ABCA4-Gens unmöglich macht. Lentivirale Vektoren (LVs) besitzen zwar eine etwas größere Ladekapazität von ca. 8 kb, haben aber ein geringeres Sicherheitspotenzial, da eine Integration des Vektorgenoms in das Zielgenom möglich ist (Thomas et al. 2003). Aufgrund dieser Gegebenheiten erscheint eine Therapie mittels Genomeditierung sinnvoll, bei der die Ziel-DNA direkt modifiziert werden kann. Aufgrund der vielfältigen Modifizierungsmöglichkeiten bietet sich besonders Prime Editing (siehe 1.6.2) als eine neue Genomeditierungsmethode für die Korrektur an.

1.4 Tierische Modellsysteme

In dieser Arbeit wurde für den Korrekturversuch der, in 1.2.1 genannten, Insertionsmutation das porcine (lat. vom Schwein stammende) Modellsystem gewählt. Neben dem Schweine-Modell wird u.a. häufig das murine (lat. von der Maus stammende) Modell in der ophthalmologischen Forschung gewählt (Pereiro et al. 2020).

Im Vergleich zum Nagetiermodell sind sich die humane und porcine Retina in Anatomie, Histologie sowie der Blutversorgung ähnlicher, sodass letzteres Gewebe immer mehr Bedeutung in der Erforschung von Photorezeptoren und RPE findet. Zwar fehlt im Schweineauge die beim Menschen vorkommende Makula-Region, jedoch besitzt die porcine im Vergleich zur humanen Netzhaut (siehe 1.1.1) einen sehr großen Anteil an Zapfen-Zellen (17-20 Millionen) bei annähernd gleicher Netzhautgröße. Die Zapfen sind hier nicht auf einen bestimmten Bereich der Retina begrenzt, sondern erstrecken sich in Form von visuellen Streifen über die gesamte Retina. Im Gegensatz dazu besitzt die Maus als nachtaktives Tier eine stäbchendominierte Netzhaut mit einem sehr geringen Anteil an Zapfen (Hendrickson und Hicks 2002; Ruiz-Ederra et al. 2004; Cangiano et al. 2012).

Da der Morbus Stargardt zu Beginn vor allem zu einer Zapfendegeneration führt, bietet sich die porcine Retina als Modellsystem zur Erforschung der Pathogenese von ABCA4-Mutationen sowie der therapeutischen Testung sehr gut an.

1.5 Genomeditierung

Der Begriff Genomeditierung fasst alle molekularbiologischen Methoden zur gezielten Veränderung von DNA zusammen. Der erste Genom-Veränderungsversuch wurde bereits 1979 in Hefezellen unternommen und die erstmalige Beschreibung der heute am häufigsten verwendeten Genomeditierungsmethode CRISPR-Cas (siehe 1.5.1) erfolgte 1987 durch ein japanisches Forscherteam (Doudna und Charpentier 2014). Mittlerweile haben sich die Technologien mit Hilfe von designten Nukleasen rasant entwickelt und finden in Forschung, Medizin und Biotechnologie breite Anwendung, sodass eine teilweise sehr präzise Modifikation von DNA-Sequenzen in kultivierten Zellen (in vitro) sowie in Tieren und Pflanzen (in vivo) möglich ist. Prinzipiell basiert die Genomeditierung auf der Erzeugung von Doppelstrangbrüchen (DSBs) der DNA, welche durch verschiedene Mechanismen des zelleigenen Reparatursystems modifiziert werden. Neben der Nutzung von CRISPR-Cas9, können DSBs auch durch den Einsatz anderer Genomeditierungs-Tools wie Zink-Finger-Nukleasen oder TALEN (engl. transcription activator-like effector nucleases) induziert werden (Lee et al. 2016).

Seit einigen Jahren ist allerdings auch die Erzeugung von Einzelstrangbrüchen (engl. nicks) mit Hilfe von sogenannten Nickasen möglich. Dabei handelt es sich um modifizierte Endonukleasen, welche nur noch eine aktive Schneidedomäne besitzen, sodass die Spaltung von nur einem der beiden DNA-Stränge erfolgt. Zu diesen neuen, vielversprechenden Genomeditierungs-Tools zählen unter anderem die Base Editors und die Prime Editors (Anzalone et al. 2020). Vor allem auf letztere soll in dieser Arbeit besonders eingegangen werden. Durch die therapeutische Nutzung der neuen Genomeditierungs-Methoden scheint es möglich zu sein, krankheitsauslösende Mutationen kausal, spezifischer und effizienter zu korrigieren.

1.5.1 Das CRISPR/Cas-System

Beim CRISPR/Cas System handelt es sich um eine relativ unkomplizierte molekularbiologische Technik, um DNA gezielt zu schneiden bzw. zu verändern. Ursprünglich stellen Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (kurz CRISPR) dabei die essentielle Komponente des Nukleinsäure-basierten adaptiven Immunsystems dar, welches in Bakterien und Archaeen weit verbreitet ist (Wiedenheft et al. 2012). Dieses Abwehrsystem beruht auf kleinen RNAs zur sequenzspezifischen Erkennung und

Inaktivierung von fremden Nukleinsäuren wie beispielsweise von Viren oder Bakteriophagen (Jinek et al. 2012). Dabei integrieren Bakterien und Archaeen im Falle einer Infektion kurze Fragmente der fremden Nukleinsäure (Spacer) zwischen kurze, palindromische Wiederholungen in deren Wirtschromosom (Repeats im CRISPR-Array). Gemeinsam bilden Repeat- und Spaceranteile durch Transkription die CRISPR-RNA (crRNA), die jeweils eine Sequenz enthält, die komplementär zu der zuvor eingedrungenen Nukleinsäure ist (Wiedenheft et al. 2012). Die crRNA wird dann mit Hilfe einer bakteriellen trans-aktivierenden crRNA (tracrRNA) mit einer Endonuklease (Cas9, bei CRISPR-System II) verknüpft und kann so fremde DNA spalten. Diese Cas9-Endonuklease (von engl. CRISPR-associated) wurde erstmals in Streptokokkus pyogenes entdeckt und besitzt zwei Schneidedomänen, RuvC und HNH, welche einen stumpfen Doppelstrangbruch (blunt ends) herbeiführen (siehe Abb. 1.4). Die aktivierte Cas9-Endonuklease spaltet die zur crRNA komplementäre Sequenz allerdings nur, wenn an deren 3' Ende eine zusätzliche 3-5 bp kurze Sequenz, das PAM (protospacer adjacent motif), vorhanden ist. Da dieses nicht im CRISPR-Array des Bakteriums enthalten ist, wird eine Spaltung des eigenen, bakteriellen Genoms verhindert (Yanik et al. 2017).

Seit einigen Jahren wird das CRISPR/Cas9-System weltweit als Genomeditierungs-Tool zur gezielten Veränderung von DNA-Sequenzen genutzt. Hierbei wurde das RNA-Duplex, bestehend aus crRNA und tracrRNA, zu einer single guide RNA (sgRNA) fusioniert, deren 5' Ende die DNA-Zielstelle durch Watson-Crick-Basenpaarung bestimmt und deren 3' Ende sich an das Cas9 bindet. Der Cas9-sgRNA-Komplex verursacht dann in der Ziel-DNA einen Doppelstrangbruch, der zur Aktivierung von zelleigenen Reparaturmechanismen führt. Diese Mechanismen können für verschiedene Genomeditierungen wie beispielsweise Deletionen oder Insertionen oder ganze Knock-Outs von DNA-Abschnitten genutzt werden. Das CRISPR/Cas9-System bietet damit durch seine variable Programmierbarkeit sowie durch dessen kostengünstigen Faktor eine vielversprechende Möglichkeit für die Gentherapie verschiedenster Erkrankungen (Doudna und Charpentier 2014).

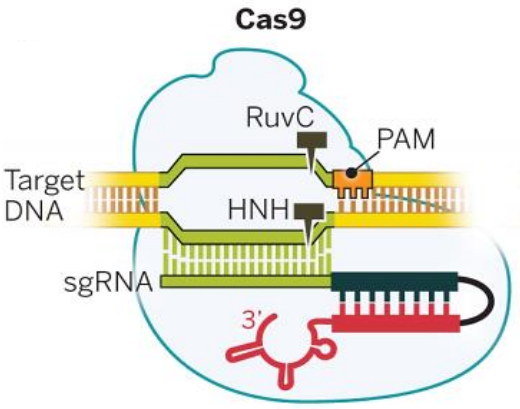


Abbildung 1.4: Schematischer Aufbau des CRISPR-Cas9 Komplex. Die crRNA (schwarz) und die tracrRNA (rot) bilden gemeinsam die sgRNA. Diese ist angegliedert an das Cas9-Enzym (blau), welches zwei Schneidedomänen (RuvC, HNH) besitzt (verändert nach Doudna und Charpentier 2014. Reprinted with permission from AAAS).

1.5.2 Zelleigene Reparaturmechanismen

Doppelstrangbrüche (DSBs) der DNA können intern im Rahmen der Zellteilung, aber auch extern durch Noxen der Umgebung entstehen. Zur Erhaltung der genomischen Integrität müssen diese möglichst zügig korrigiert werden. Der Zelle stehen dabei verschiedene Korrekturmöglichkeiten zur Verfügung, wobei DSBs prinzipiell durch homologe oder durch nicht-homologe Mechanismen repariert werden können (Lee et al. 2016). Die nicht-homologe Reparatur erfolgt durch non-homologous end joining (NHEJ) oder durch alternatives NHEJ, auch microhomology-mediated end joining (MMEJ) genannt. Die homologe Reparatur erfolgt durch homology directed repair (HDR) (siehe Abb. 1.5).

NHEJ findet dabei unabhängig des Zellzyklus in allen Zyklusphasen statt und ist damit der dominierende Reparaturmechanismus. Die stetige Aktivität von NHEJ sorgt für eine rasche DSB-Reparatur, indem die Strang-Enden der DNA direkt ligiert werden. Allerdings führt dies am Ort der Reparatur zu kleinen Insertionen und Deletionen (kurz Indels) sowie zu Substitutionen, wodurch die NHEJ-Reparatur als sehr fehleranfällig zu charakterisieren ist (Yanik et al. 2017). Indels können im Genom das Leseraster für die Transkription verschieben (frame shift) und somit zu funktionslosen Proteinen oder auch Gen-Knockouts führen, indem ein Stopcodon generiert wird. Letzteres kann allerdings auch therapeutisch genutzt werden, denn bei Mutation eines Introns (nicht-codierender Genabschnitt) kann so der mutierte Genbereich durch NHEJ-basierte Gentherapie ausgeschaltet werden (Yoshimi et al. 2021).

Handelt es sich allerdings um eine Mutation eines Exons (codierender Genabschnitt), sollte eine therapeutische Korrektur mittels MMEJ oder besser HDR angestrebt werden, da hier aufgrund von einer vorhandenen DNA-Vorlage eine weniger fehlerhafte Reparatur stattfindet. Die Reparatur durch MMEJ findet vor allem in der S-Phase des Zellzyklus statt und beruht auf mikrohomologen DNA-Bereichen (je 5-25 Nukleotide), die den DSB flankieren. Durch die Ligation dieser Bereiche führt MMEJ allerdings auch wie NHEJ zu Basen-Deletionen im reparierten DNA-Abschnitt (Yanik et al. 2017; Deng et al. 2014).

Die Reparatur durch HDR funktioniert im Vergleich zu den anderen beiden Mechanismen weitgehend fehlerfrei, da die Zelle in der S-Phase das Schwesterchromatid als direkte Reparaturvorlage für den DSB nutzen kann. Die Anwendung einer HDR-basierten Gentherapie scheint sich somit für eine präzise Modifikation der Ziel-DNA anzubieten. Allerdings weist HDR auf Kosten der spezifischeren Korrektur im Vergleich zu NHEJ eine geringere Effizienz auf. So muss HDR bei therapeutischer Nutzung also meist zusätzlich exogen stimuliert oder der Einfluss von NHEJ herunterreguliert werden, um die Effizienz zu erhöhen (Nambiar et al. 2019). Zudem konkurriert HDR während der S- und G2-Phase mit MMEJ, sodass der Anteil an NHEJ-Reparaturen in der Zelle deutlich überwiegt (Yanik et al. 2017).

Die Reparatur durch HDR ist wie bereits erwähnt nur in mitotisch aktiven Zellen möglich, weshalb der therapeutische Einsatz in postmitotischen Zellen wie Photorezeptoren oder neuronalen Zellen deutlich erschwert ist. Eine weitere Einschränkung für eine HDR-basierte Gentherapie stellt die stets notwendige Einbringung einer DNA-Vorlage dar.

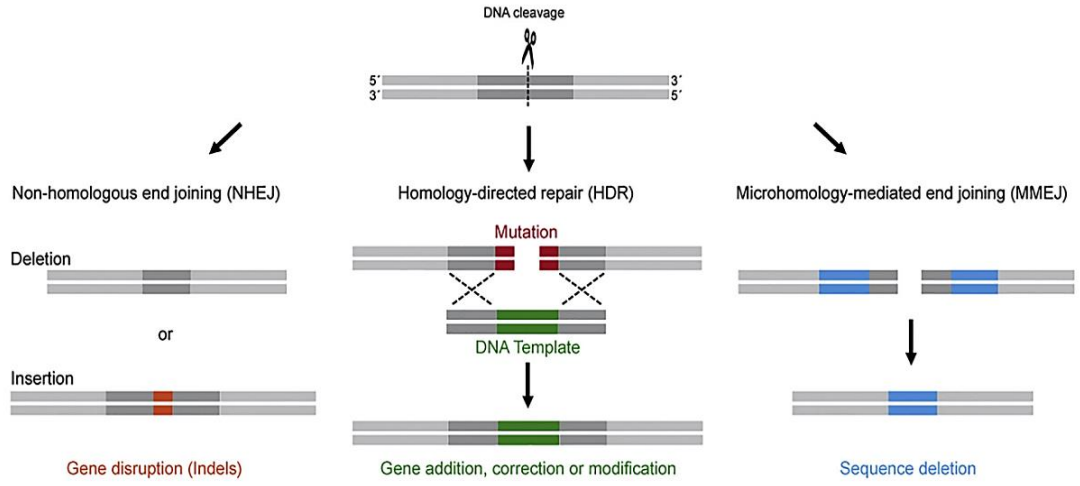


Abbildung 1.5: Schematische Übersicht über die zelleigenen Reparaturmechanismen. Dargestellt sind die drei Reparaturwege NHEJ, HDR und MMEJ zur Reparatur eines DSB (Yanik et al. 2017).

1.6 Neue Genomeditierungsmethoden

Für eine effiziente Anwendung von Genomeditierungsmethoden sollte die Bildung von DSBs und off-target Effekten vermieden werden. Off-target Effekte beschreiben ungewollte Veränderungen/Editierungen von DNA-Bereichen abseits der Zielregion. Diese können durch eine unspezifische Bindung der jeweiligen guide RNA entstehen.

Die Generierung von DSBs ist für die meisten gentherapeutischen Fragestellungen nicht unbedingt erforderlich, da genetisch betrachtet die große Mehrheit aller krankheitsassoziierten Varianten des Menschen auf Punktmutationen wie kleinen Insertionen, Deletionen und Substitutionen (Transitionen und Transversionen) beruhen (siehe Abb. 1.6). Es wird also ein präzises Reparatursystem für diese kleinen Veränderungen benötigt, welches im besten Fall nicht auf die Bildung von DSBs angewiesen ist und geringe off-target Effekte erzeugt (Anzalone et al. 2019).

Neue CRSIPR-Cas assoziierte Genomeditierungs-Tools wie Base Editors und Prime Editors (siehe 1.6.1 und 1.6.2) erfüllen dieses Kriterium, da sie durch Nutzung einer Nickase anstatt eines DSB einen Einzelstrangbruch der DNA (engl. nick) generieren. Durch Erzeugung des Nicks wird eine Reparatur durch NHEJ nahezu vollständig vermieden und damit eine präzisere Genomeditierung mit weniger Indel-Formation und geringeren off-target Effekten möglich. Durch die neuen Tools können Korrekturen in jeder Zellzyklusphase erfolgen, da auf den Einsatz von DNA-Vorlagen und damit eine HDR-assoziierte Korrektur verzichtet werden kann (Anzalone et al. 2020). Neben Photorezeptorzellen ist ein Großteil der Zellen im Körper nicht mehr mitotisch aktiv und somit solch eine Reparaturmethode unabhängig vom Zellzyklus zur Korrektur verschiedenster Mutationen notwendig.

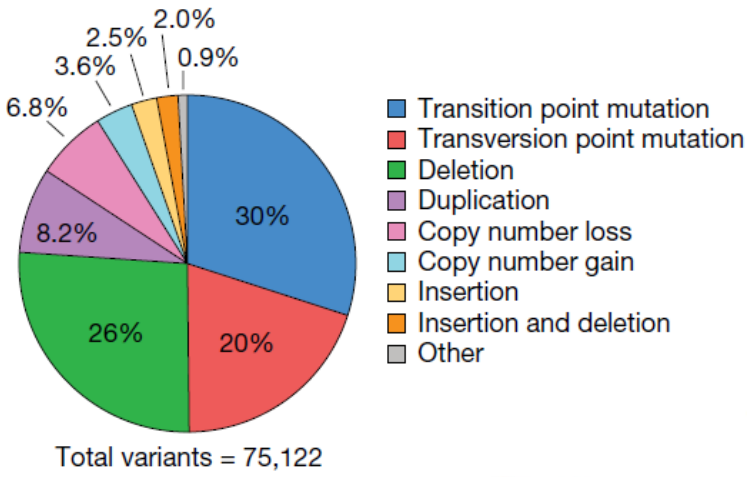


Abbildung 1.6: Prozentuale Anteile der genetischen Mutationsvarianten des Menschen. Dargestellt anhand der Daten des ClinVar-Registers (Datenzugriff Juli 2019, verändert nach Anzalone et al. 2019).

1.6.1 Base Editors

Base Editors (BEs) sind in der Lage eine direkte Base-zu-Base-Konversion der Ziel-DNA ohne Generierung eines DSB herbeizuführen. Hierfür besitzen frühere Generationen eine katalytisch inaktive Cas9-Nuklease (engl. dCas9), die durch gezielte Mutationen der Schneidedomänen entwickelt wurde (Komor et al. 2016). Mittlerweile werden allerdings hauptsächlich Cas9-Nickasen verwendet (Kantor et al. 2020).

Grundsätzlich werden zwei Klassen von Base Editors unterschieden: Cytosin-Base Editors (CBEs) (siehe Abb. 1.7) und Adenosin-Base Editors (ABEs), die prinzipiell dem Komplex des CRISPR-Cas Systems entsprechen. Die Besonderheit liegt hierbei in einer über ein Linker-Protein verknüpfte ssDNA-Deaminase, welche, geführt durch eine sgRNA, an die Ziel-DNA bindet und die Base-zu-Base-Konversion initiiert. Nach Bindung der Cas9-Domäne und Hybridisierung der sgRNA mit der DNA ist die Deaminase in der Lage die PAM-distalen Nukleotide zu deaminieren. CBEs nutzen dabei Cytosin-Deaminasen, um Cytosin in Uracil zu transformieren, welches nachfolgend von den DNA-Polymerasen während der Zellreparatur als Thymin abgelesen wird. Damit das gebildete Intermediär Uracil nicht zügig wieder von der zelleigenen Uracil-N-Glykosylase ausgeschnitten wird, sind CBEs zusätzlich über ein Linker-Protein mit Uracil-N-Glykosylase-Inhibitor Domänen (UGIs) verbunden, welche dies weitgehend verhindern. Die Editierungseffizienz der CBEs konnte dadurch deutlich gesteigert werden (Anzalone et al.

2020). ABEs nutzen hingegen künstlich entwickelte Desoxyadenosin-Deaminasen, um Adenosin in das Intermediär Inosin zu konvertieren, welches von den Polymerasen als Guanin abgelesen wird (Gaudelli et al. 2017).

Durch die Anwendung von Base Editors sind somit alle vier Transitionsmutationen (C→T, T→C, G→A und A→G) und damit potenziell 30% aller genetischen Mutationsvarianten des Menschen korrigierbar (vgl. Abb. 1.6).

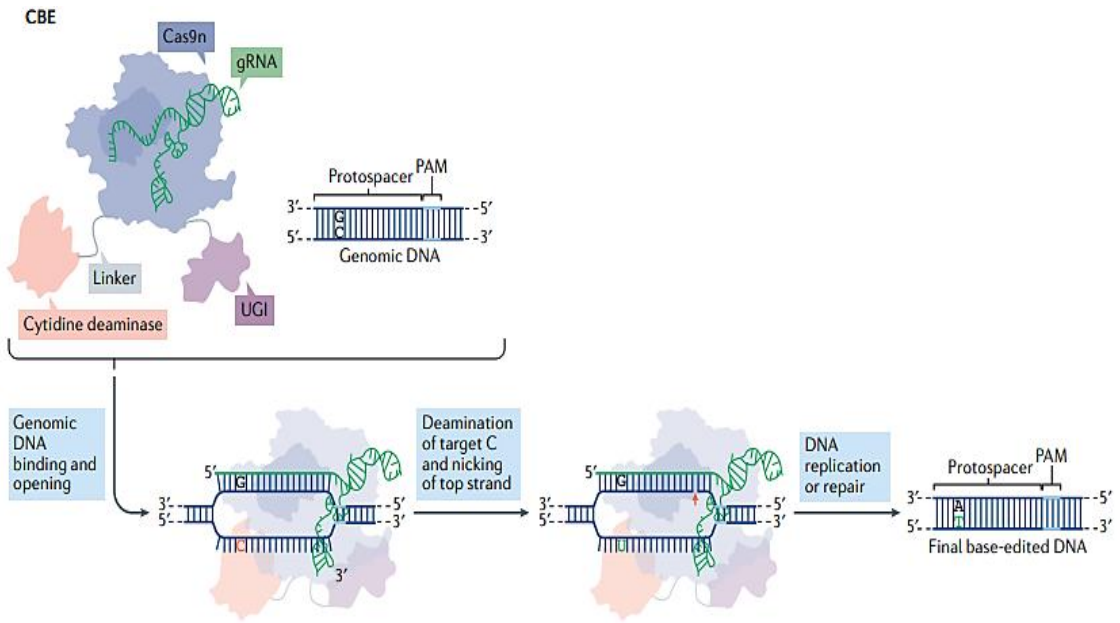


Abbildung 1.7: Exemplarische Darstellung des Editierungsmechanismus durch den Cytosin Base Editor (CBE). Protospacer = DNA-Abschnitt vor einer PAM (Porto et al. 2020).

1.6.2 Prime Editors

Prime Editors (PEs) schließen die Editierungslücke der BEs, indem sie zusätzlich in der Lage sind, alle Transversionsmutationen (C→A, C→G, G→C, G→T, A→C, A→T, T→A und T→G) sowie kleine Insertionen und Deletionen und deren Kombination zu beheben. Dadurch ist das Spektrum der Editierungsmöglichkeiten um ein Vielfaches erweitert und durch Prime Editing können potenziell knapp 90% aller humanen genetischen Mutationsvarianten korrigiert werden (vgl. Abb. 1.6). Dies ist möglich durch den speziellen Aufbau der PEs, da sie neben einer Cas9-Nickase eine fusionierte Reverse-Transkriptase (RT) Domäne besitzen, welche RNA in DNA transkribieren kann. Zusammen mit einer prime editing guide RNA (pegRNA) werden diese drei Komponenten als Prime Editing-Komplex bezeichnet. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit wurden drei Generationen von PE-

Komplexen in der Literatur erwähnt. Im Folgenden wird die zweite Generation, der sogenannte PE2-Komplex, beschrieben (siehe Abb. 1.8).

Dieser PE-Komplex wird von der pegRNA zur PAM-tragenden Ziel-Sequenz geführt. Die pegRNA besteht dabei in 5‘ → 3‘ Richtung aus drei verschiedenen Anteilen: der Spacer-Sequenz (auch gRNA-Sequenz), der Scaffold-Sequenz und der 3‘-Extension-Sequenz, welche Primer-binding site (PBS) und RT-template (mit gewünschtem Edit) beinhaltet.

Die Spacer-Sequenz bindet dabei an die nicht zu editierende DNA und dient als „Platzhalter“ für die Editierung des Ziel-DNA-Stranges. Über die Scaffold-Sequenz (engl. Gerüst) ist dieser Abschnitt mit der 3’-Extension verbunden. Die Cas9-Nickase schneidet die Ziel-DNA-Sequenz ein paar Basenpaare aufwärts der PAM, was der PBS der pegRNA ermöglicht, mit der Ziel-DNA zu hybridisieren. Nun wird anschließend an die PBS und ausgehend vom RT-template die RNA in DNA durch die RT transkribiert. Dadurch soll die gewünschte Modifikation (engl. Edit), beispielsweise eine Insertion oder Deletion, in die DNA integriert werden. Mit der Editierung wird folglich ein 3‘-Flap (Überhang) generiert, der mit dem übriggebliebenen 5‘-Flap der Ziel-DNA konkurriert. Wird nun der 5‘-Flap von zelleigenen Endonukleasen wie FEN1 entfernt und der 3‘-Flap mit Hilfe einer zelleigenen DNA-Ligase ligiert, entsteht ein sogenanntes Heteroduplex-Intermediär mit dem gegenüberliegenden DNA-Strang, da die DNA-Abschnitte nun nicht mehr komplett komplementär sind (engl. mismatch). Im besten Fall wird nun der editierte Strang vom zelleigenen Reparatursystem als Reparaturvorlage genutzt und der nicht-editierte Strang dementsprechend angepasst. Allerdings geschieht auch häufig der ungewollte Fall, dass der editierte Bereich wieder entfernt wird.

Die Mismatch-Reparatur kann beeinflusst werden, indem der nicht-editierte Strang zusätzlich durch eine weitere guide RNA, eine sogenannte nicking guide RNA (ngRNA), geschnitten wird. Dadurch nutzt das Reparatursystem bevorzugt den nicht-editierten DNA-Strang als Vorlage. Das gewünschte Edit im editierten Strang bleibt somit mit einer höheren Wahrscheinlichkeit bestehen und wird nicht ausgeschnitten. Dieser erweiterte Komplex durch die ngRNA wird als PE3-Komplex bezeichnet. Wählt man dabei die ngRNA so, dass der nicht-editierte Strang erst genicked wird, wenn das Edit installiert wurde, bezeichnet man dieses System als PE3b-Komplex. Durch diese Detektion der erfolgreichen Edit-Insertion kann die Editierungseffizienz vor allem im Vergleich zum PE2-Komplex deutlich gesteigert werden (Anzalone et al. 2019).

Aufgrund der Eigenschaft auch kleine Deletionen ohne DSB-Bildung herbeiführen zu können, wurden Prime Editors in dieser Arbeit zur Korrektur der beschriebenen Insertionsmutation (siehe 1.2.1) verwendet.

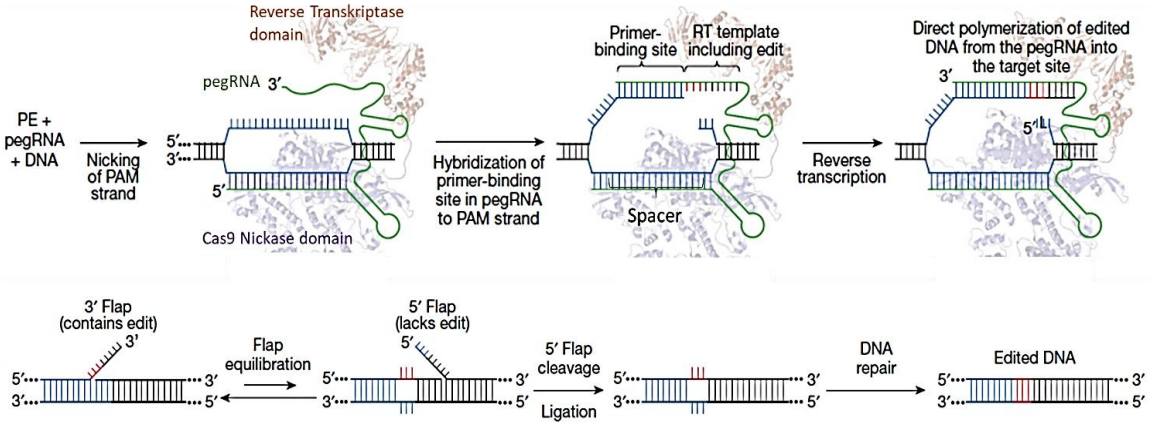


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des Editierungsmechanismus durch den PE2-Komplex. Der PE2-Komplex wird gebildet durch pegRNA, Reverse Transkriptase- und Cas9 Nickase - Domäne (verändert nach Anzalone et al. 2019).

1.7 DNA-Quantifizierungsmethoden

In dieser Arbeit wurde für die spätere Quantifizierung der Reparaturerfolge durch die pegRNAs ein BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer) - Reportersystem verwendet. Dieses System basiert im Wesentlichen auf einer Dipol-Dipol-vermittelten Übertragung von Energie. Ein lumineszierendes Donor-Enzym emittiert nach der Umwandlung seines Substrats Licht einer bestimmten Wellenlänge, welches ein fluoreszierendes Akzeptormolekül zur Lichtemission eines anderen Wellenbereichs anregt. Dieser Emissionsquotient (BRET-Ratio) kann mittels BRET Assay (siehe 2.2.3.2) gemessen werden (Wimmer et al. 2021). Neben einer Fluoreszenz-basierten Quantifizierungsmethode wie dem BRET-Reportersystem sind auch einige Sequenzierungs-basierte Analyse-Tools wie beispielsweise TIDE (Tracking of Indels by DEcomposition), TIDER (Tracking of Insertions, Deletions and Recombination events) oder ICE (Interference of CRISPR Edits) verfügbar (Brinkman und van Steensel 2019; Robb 2019). Diese Methoden können Insertionen und Deletionen (kurz Indels) innerhalb der Ziel-DNA zwar genauer detektieren und spezifizieren, sind allerdings u.a. auch mit höherem zeitlichem Aufwand verbunden.

Vor allem für in vitro Experimente bietet das BRET-Reportersystem daher eine relativ schnelle und sensitive Möglichkeit Veränderungen innerhalb der Ziel-DNA, welche sich innerhalb eines BRET-Sensorplasmids zwischen Donor- und Akzeptor-Domäne befindet, zu detektieren. Außerdem ist mit genanntem Reportersystem eine Unabhängigkeit

von Zellzahl und Konzentration gegeben und somit auch bei schwankender Zellzahl/Zelldichte in den Zellkulturen ein Vergleich der gemessenen BRET-Ratios möglich (Wimmer et al. 2021).

1.8 Zielsetzung

Die Genadditionstherapie mithilfe viraler Vektoren ist bei Morbus Stargardt aufgrund der Größe des ABCA4-Gens nicht möglich (siehe 1.3). Zudem handelt es sich bei Photorezeptoren um postmitotische Zellen, wodurch eine HDR-basierte Reparatur nur schwer realisierbar ist. Ziel der Arbeit ist es daher, die beschriebene Insertionsmutation im porcinen ABCA4-Gen mittels Prime Editing zu korrigieren, indem durch Deletion des pathogenen Adenins der ursprüngliche Leserahmen wiederhergestellt wird (siehe 1.2.1). Hierfür wird der erstmals von Liu et al. beschriebene Prime Editor 2 sowie dessen Weiterentwicklung Prime Editor 3 bzw. 3b eingesetzt. Dadurch könnte die Bildung von DSBs, damit einhergehende Indels sowie off-target Effekte weitgehend verhindert werden. Die Quantifizierung des Reparaturerfolgs der verschiedenen pegRNAs soll mittels BRET-Assay (siehe 2.2.3.2) analysiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller, Ort
Autoklav	DX-65	Systec, Linden
Dest. H_2O Anlage	Arium 611DI	Sartorius, Göttingen
Drucker für das Photometer		Seiko, Neu-Isenburg
Eismaschine	AF 80 Ice Flaker	Scotsman, Berlin
Elektroporator	2510	Eppendorf, Köln
Fluoreszenz-Mikroskop	BioZero	Keyence, Essen
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr Premium	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank (-80 °C)	Hera Freeze	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Gelkammer für Agarosegele mit Gelkamm	Biometra Compact XS/S und M	Biometra, Göttingen
Heizblock	Biometra TB2	Biometra, Göttingen
Inkubator für eukaryotische Zellen	C150	Binder, Tuttlingen
Inkubator für prokaryotische Zellen	BD115	Binder, Tuttlingen
Kühlschrank (+4 °C)	-	Bosch, Gerlingen
Kühlschrank (+4 °C)	-	Liebherr, Ochsenhausen
Kühlschrank (+4 °C)	-	VWR, Darmstadt
Küvetten (Elektroporation)	71-2010	Peqlab, Erlangen
Magnetrührer	IKA RCT classic	IKA, Staufen
Mikroskop	VWRI 630	VWR, Darmstadt

Multimode Platereader	Tecan Infinite M1000Pro	Tecan Austria, Grödig
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipette	0,5-10 µl/ 2-20 µl/ 20-200 µl/ 100-1000 µl/0,5-5,0 ml	Brand, Wertheim
Pipette	Eppendorf Reference 0,5-10 µl/ 2-20 µl/10-100 µl/ 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipette	Eppendorf Research Plus 20-200 µl/ 100-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Power-Supply für Elektrophoresen	PS305T	Whatman-Biometra, Göttingen
Schüttler	Centromat H/MOII	Sartorius, Göttingen
Spülmaschine	Miele Professional	Miele, Gütersloh
Sterilbank	MSC-Advantage	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Stickstofftonne (-196 °C)	Thermolyne Locator Plus 6	Thermolyne, Pfullingen
Thermoblock	TB2 Thermoblock	Biometra, Göttingen
Trockenschrank	-	Binder, Tuttlingen
UV-Transilluminator	BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen
Vortexer	Digital Vortex Mixer	VWR International, Darmstadt
Vortexer	Q04	VWR International, Darmstadt
Vortexer	uniTexerl	LLG Labware, Meckenheim
Waage	Pioneer	Ohaus, Naenikon
Wasseraufbereitungssys-tem	Milli-Q Synthesis	Millipore, Schwalbach
Wasserbad	Julabo TW12	Julabo, Seelbach
Zentrifuge	Mikro200	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge	MiniStar silverline	VWR International, Darmstadt
Zentrifuge	1-15 PK	Sigma, München
Zentrifuge	4K15	Sigma, München

Zählkammer	Neubauer improved	Roth Chemie, Karlsruhe

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	**Typ**	**Hersteller, Ort**
Bakterienkulturplatte	Petri Dish 100 x 15	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Filteraufsatz	Rapid-Filtermax	TPP, Trasadingen
Filterpipettenspitzen	10 µl/ 200 µl/ 1250 µl	Nerbe plus, Winsen
Glaspipetten	5 ml/10 ml/ 20 ml	Brand, Wertheim
Kryoröhrchen	MX 500	LVL Technologies, Crailsheim
Multipipettenspitzen	PD-Tips 5 ml	Brand, Wertheim
Paraffinfilm	Laboratory Film	Bemis, Braine L'Alleud
PCR Soft Tubes	0,2 ml	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen	1-10 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen	1-10 µl	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	2-200 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	100-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	0,5-5,0 ml	Brand, Wertheim
Reaktionsgefäße	1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	15 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße	50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte	Cell culture dishes 100 x 20 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Cell Scraper 16 cm	Sarstedt, Nümbrecht

6-Well Platte	Cellstar	Greiner Bio-One, Frickenhausen
96-Well Platte	Costar 96 Flat White	Corning, Wiesbaden

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	**Hersteller, Ort**
Agar	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Agarose LE	Genaxxon Bioscience, Ulm
Coelenterazine 400a	Nanolight Technology, Pinetop
DMEM ---	PAA Laboratories, Cölbe
dNTPs (10mM)	NEB, Frankfurt a. Main
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FKS	Anprotec, Bruckberg
Glycerin	Merck, Darmstadt
HEPES	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Darmstadt
L-Glutamin	Anprotec, Bruckberg
Luria Broth (LB)	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Magnesiumchlorid (50mM)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
PEI (Polyethylenimin)	Polysciences Europe GmbH, Hirschberg an der Bergstraße
Tris	Roth, Karlsruhe

2.1.4 Puffer und Lösungen

Allgemeine Puffer:

PBS (10x Phosphatpuffer):

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na_2HPO_4	14,4 g
KH_2PO_4	2,4 g
ddH_2O	ad 1000 ml, pH 7,4 mit HCl

Puffer für die Agarosegelelektrophorese:

TBE (10x):

Tris-NH_3	121,0 g
Borsäure	51,5 g
EDTA	3,5 g
ddH_2O	ad 1000 ml

Lösungen für die Transfektion:

PEI-Mix:

PEI (MW: 26 kDa)	0,1 g/l
NaCl (autoklaviert)	150 mM

Weitere verwendete Puffer und Lösungen:

Bezeichnung	**Hersteller, Ort**
Buffer AE	Qiagen, Hilden
Cut Smart Buffer (10x)	NEB, Frankfurt a.M.
DNA Loading Dye (6x)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

Ligase-Puffer (10x)	NEB, Frankfurt a.M.
Phusion HF Buffer (5x)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Serva DNA Stain Clear G	SERVA Electrophoresis, Heidelberg
S1-Resuspension Buffer	Macherey-Nagel, Düren
S2-Lysis Buffer	Macherey-Nagel, Düren
S3-Neutralization Buffer	Macherey-Nagel, Düren

2.1.5 DNA Größenstandard

Bezeichnung	**Hersteller, Ort**
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Life Technologies/ Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

2.1.6 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden mit den mitgelieferten Puffern nach Herstellerangaben verwendet. Die jeweiligen Schnittstellen sind durch Pfeile markiert. Alle anderen verwendeten Enzyme wurden ebenfalls nach Herstellerangaben verwendet.

Verwendete Restriktionsenzyme:

Bezeichnung	**Erkennungssequenz**	**Hersteller, Ort**
BbsI-HF	5'…GAAGAC$(N)_2$↓…3' 3'…CTTCTG$(N)_6$↑…5'	NEB, Frankfurt a.M.
BsaI-HFv2	5'...GGTCTC$(N)_1$↓...3' 3'...CCAGAG$(N)_5$↑...5'	NEB, Frankfurt a.M.
EcoRI-HF	5'...G↓AATTC...3' 3'...GTTAA↑G…5'	NEB, Frankfurt a.M.

EcoRV-HF	5‘…GAT↓ATC…3‘ 3‘…CTA↑TAG…5‘	NEB, Frankfurt a.M.
NdeI	5'...CA↓TATG…3' 3'...GTAT↑AC…5'	NEB, Frankfurt a.M.

Weitere verwendete Enzyme:

Bezeichnung	**Hersteller, Ort**
Accutase	Anprotec, Bruckberg
T4 DNA-Ligase	NEB, Frankfurt a.M.
Phusion DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

2.1.7 Antibiotika

Bezeichnung	**Konzentration**	**Hersteller, Ort**
Ampicillin	100 µg/µl	Sigma-Aldrich, Darmstadt

2.1.8 Software

Die verwendete Software wurde zur Bearbeitung und Auswertung von Bildmaterial sowie zur statistischen Auswertung von Messergebnissen eingesetzt.

Bezeichnung	**Hersteller, Ort**
FinchTV	Perkin Elmer, Rodgau
icontrol	Tecan, Gröding
SigmaPlot	Systat, Erkrath
SnapGene	Insightful Science, San Diego (USA)

2.1.9 Plasmide

Plasmid	Bezugsquelle
pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmid	Addgene #132777
pCMV-PE2 Plasmid	Addgene #132775
pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0, kurz px459 Plasmid	Addgene #62988
BRET-Sensorplasmid (In6T2) mit ABCA4-Ziel-DNA	Eigene Herstellung
pcDNA-RLuc8	Addgene #87121
pTagGFP2-N	Evrogen, Heidelberg

pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmid

Das pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmid (Addgene: #132777) wurde in dieser Arbeit zur Integration und Klonierung der pegRNA-Sequenzen verwendet. Die Expression wird durch einen U6-Promotor reguliert. Das Plasmid enthält neben einem Ampicillin-Resistenzgen eine mRFP (red fluorescence protein) Dropout Cassette (siehe Abb. 2.1) (Anzalone et al. 2019).

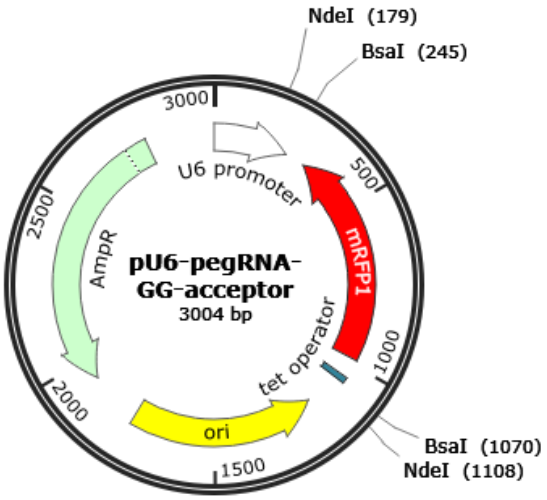


Abbildung 2.1: Vektorkarte des pU6-pegRNA-GG-Acceptor-Plasmids mit Schnittstellen von NdeI und BsaI (erstellt mit SnapGene©)**.**

pCMV-PE2 Plasmid

Das pCMV-PE2 Plasmid (Addgene: #132775) enthält den Prime Editor 2 Komplex, welcher aus der Cas9 Nickase (H840A) Domäne sowie der Reverse Transkriptase (M-MLV) Domäne besteht. Die Expression wird durch einen CMV-Promotor reguliert. Das Plasmid enthält zudem ein Ampicillin-Resistenzgen (siehe Abb. 2.2) (Anzalone et al. 2019).

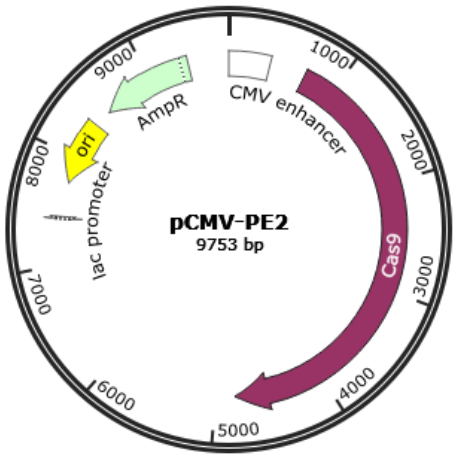


Abbildung 2.2: Vektorkarte des pCMV-PE2 Plasmids (erstellt mit SnapGene©)**.**

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

Das pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0 Plasmid (Addgene: #62988), kurz px459 Plasmid, wurde in dieser Arbeit zur Klonierung der ngRNAs verwendet. Das Plasmid enthält ein Puromycin- und Ampicillin-Resistenzgen. Die Expression wird durch einen U6-Promotor reguliert (siehe Abb. 2.3) (Ran et al. 2013).

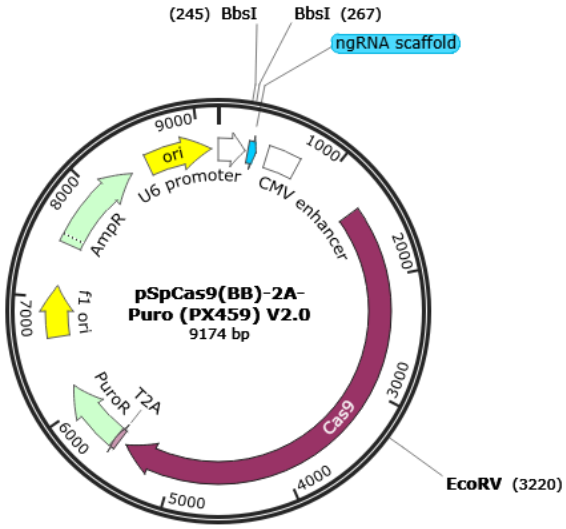


Abbildung 2.3: Vektorkarte des pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0 Plasmids. Die Schnittstellen von BbsI und EcoRV sowie der Klonierungsbereich der ngRNA (blau) sind eingezeichnet (erstellt mit SnapGene©).

BRET-Sensorplasmid (In6T2)

Das BRET-Sensorplasmid wurde innerhalb der Arbeitsgruppe hergestellt und in dieser Arbeit zur Quantifizierung des Reparaturerfolgs der pegRNAs via BRET Assay verwendet. Es beinhaltet die zu korrigierende porcine ABCA4 Ziel-DNA-Sequenz, welche von einer RLuc8 (Renilla Luciferase) und GFP2 (green fluorescence protein) Domäne flankiert ist. Die Expression der Ziel-DNA-Sequenz wird durch einen CMV-Promotor reguliert (siehe Abb. 2.4).

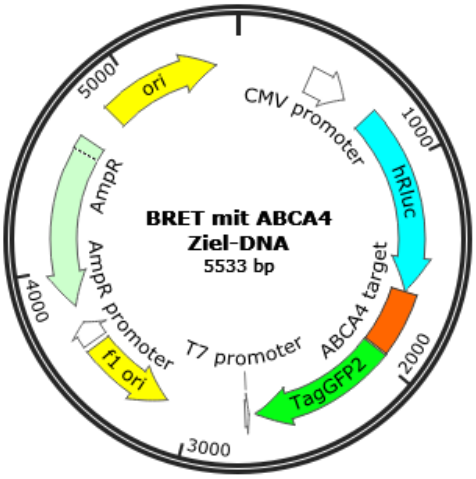


Abbildung 2.4: Vektorkarte des BRET-Sensorplasmids (In6T2) mit ABCA4-Ziel-DNA (erstellt mit SnapGene©)**.**

pcDNA-RLuc8

Das pcDNA-RLuc8 Plasmid (Addgene: #87121) exprimiert das Luciferase-Protein und wurde im BRET Assay als Negativkontrolle verwendet. Die Expression ist durch einen CMV-Promotor reguliert (siehe Abb. 2.5) (Loening et al. 2006).

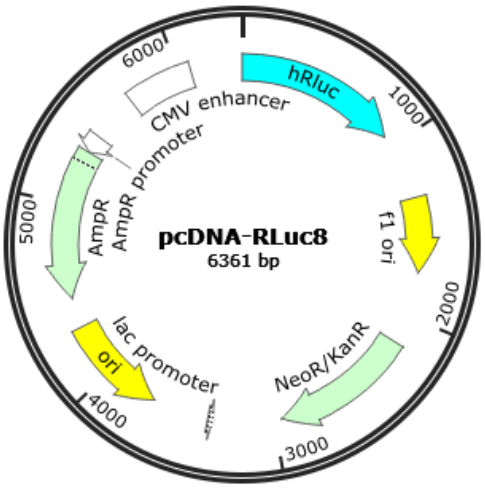


Abbildung 2.5: Vektorkarte des pcDNA-RLuc8 Plasmids (erstellt mit SnapGene©)**.**

pTagGFP2-N

Das pTagGFP2-N Plasmid (http://evrogen.com/products/vectors/pTagGFP2-N/pTagGFP2-N.shtm) wurde durch die enthaltene GFP2-Sequenz als Maß für die Transfektionseffizienz verwendet. Die GFP-Expression wird durch einen CMV-Promotor reguliert. Das Plasmid enthält ein Ampicillin- sowie Kanamycin-Resistenzgen (siehe Abb. 2.6).

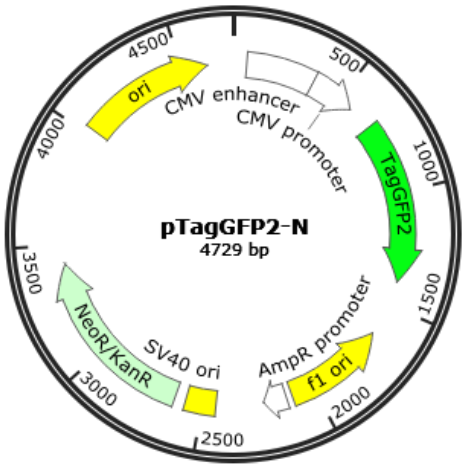


Abbildung 2.6: Vektorkarte des pTagGFP2-N Plasmids (erstellt mit SnapGene©)**.**

2.1.10 Oligonukleotide und Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (siehe Tab. 2.1) wurden über das Online-Tool „PrimeDesign“ von Pinellolab generiert und extern von Metabion (Planegg) synthetisiert. Die pegRNA- sowie ngRNA-Oligosequenzen wurden für die spätere Klonierung mit spezifischen Überhängen (sticky-ends) versehen. Aus dem selbem Grund wurden manche Sequenzen und Primer (siehe Tab. 2.2) phosphoriliert (P). Da in der Arbeitsgruppe bereits sechs pegRNAs in Verwendung waren, beginnt die Probenbezeichnung der ersten pegRNA in dieser Arbeit mit der Zahl 7.

Tabelle 2.1: verwendete pegRNA- und ngRNA Oligo-Sequenzen.

(1): Spacer top, (2): Spacer bottom, (3): 3‘Extension top, (4): 3‘Extension bottom

Bezeichnung	**Oligo-Sequenz (5‘ → 3‘)**
pegRNA Scaffold-Sequenz top	P-AGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAA CTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG
pegRNA Scaffold-Sequenz bottom	P-GCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCC TTATTTTAACTTGCTATTTCTAG
pegRNA 7	(1) caccGCGGAGAGTGCTTTGGCCTCCgtttt (2) ctctaaaacGGAGGCCAAAGCACTCTCCGC (3) gtgcTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACT (4) aaaaAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGA
pegRNA 8	(1) caccGCGGAGAGTGCTTTGGCCTCCgtttt (2) ctctaaaacGGAGGCCAAAGCACTCTCCGC (3) gtgcTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTC (4) aaaaGAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGA
pegRNA 9	(1) caccGCGGAGAGTGCTTTGGCCTCCgtttt (2) ctctaaaacGGAGGCCAAAGCACTCTCCGC (3) gtgcTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTCT (4) aaaaAGAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGA
pegRNA 10	(1) caccGCGGAGAGTGCTTTGGCCTCCgtttt (2) ctctaaaacGGAGGCCAAAGCACTCTCCGC (3) gtgcGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACT (4) aaaaAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAAC
pegRNA 11	(1) caccGCGGAGAGTGCTTTGGCCTCCgtttt (2) ctctaaaacGGAGGCCAAAGCACTCTCCGC (3) gtgcGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTC (4) aaaaGAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAAC
pegRNA 12	(1) caccGCGGAGAGTGCTTTGGCCTCCgtttt (2) ctctaaaacGGAGGCCAAAGCACTCTCCGC (3) gtgcGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTCT (4) aaaaAGAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAAC
pegRNA 13	(1) caccGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTgtttt (2) ctctaaaacAGGAGGCCAAAGCACTCTCC (3) gtgcTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCAC (4) aaaaGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGA
pegRNA 14	(1) caccGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTgtttt (2) ctctaaaacAGGAGGCCAAAGCACTCTCC (3) gtgcTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACT

	(4) aaaaAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGA
pegRNA 15	(1) caccGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTgtttt (2) ctctaaaacAGGAGGCCAAAGCACTCTCC (3) gtgcTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTC (4) aaaaGAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGA
pegRNA 16	(1) caccGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTgtttt (2) ctctaaaacAGGAGGCCAAAGCACTCTCC (3) gtgcTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCAC (4) aaaaGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAA
pegRNA 17	(1) caccGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTgtttt (2) ctctaaaacAGGAGGCCAAAGCACTCTCC (3) gtgcTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACT (4) aaaaAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAA
pegRNA 18	(1) caccGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTgtttt (2) ctctaaaacAGGAGGCCAAAGCACTCTCC (3) gtgcTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTC (4) aaaaGAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAA
pegRNA 19	(1) caccGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTgtttt (2) ctctaaaacAGGAGGCCAAAGCACTCTCC (3) gtgcTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCAC (4) aaaaGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAACGGA
pegRNA 20	(1) caccGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTgtttt (2) ctctaaaacAGGAGGCCAAAGCACTCTCC (3) gtgcTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACT (4) aaaaAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAACGGA
pegRNA 21	(1) caccGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTgtttt (2) ctctaaaacAGGAGGCCAAAGCACTCTCC (3) gtgcTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTC (4) aaaaGAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAACGGA
pegRNA 22	(1) caccGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTgtttt (2) ctctaaaacAGGAGGCCAAAGCACTCTCC (3) gtgcGCTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCAC (4) aaaaGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAACGGAGC
pegRNA 23	(1) caccGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTgtttt (2) ctctaaaacAGGAGGCCAAAGCACTCTCC (3) gtgcGCTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACT (4) aaaaAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAACGGAGC
pegRNA 24	(1) caccGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTgtttt (2) ctctaaaacAGGAGGCCAAAGCACTCTCC (3) gtgcGCTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTC

	(4) aaaaGAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAACGGAGC
pegRNA 25	(1) caccGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTgtttt (2) ctctaaaacAGGAGGCCAAAGCACTCTCC (3) gtgcAGCTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCAC (4) aaaaGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAACGGAGCT
pegRNA 26	(1) caccGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTgtttt (2) ctctaaaacAGGAGGCCAAAGCACTCTCC (3) gtgcAGCTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACT (4) aaaaAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAACGGAGCT
pegRNA 27	(1) caccGGAGAGTGCTTTGGCCTCCTgtttt (2) ctctaaaacAGGAGGCCAAAGCACTCTCC (3) gtgcAGCTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTC (4) aaaaGAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAACGGAGCT
ngRNA 1	(1) caccGGCCAAAGCACTCTCCGGGC (2) aaacGCCCGGAGAGTGCTTTGGCC
ngRNA 2	(1) caccGCAGGAGGCCAAAGCACTCTC (2) aaacGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGC
ngRNA 3	(1) caccGCAGCTCCGTTCACTCCCAGG (2) aaacCCTGGGAGTGAACGGAGCTGC
ngRNA 4	(1) caccGTGCCAGCTCCGTTCACTCCC (2) aaacGGGAGTGAACGGAGCTGGCAC

Tabelle 2.2: verwendete Primer.

Bezeichnung	**Primer-Sequenz (5‘ → 3‘)**	**Anmerkung**
DelCasf	P-GGTACCTCTAGAGCCATTTGTC	Mutagenese-PCR Primer für px459-Plasmid
DelCasr	P-GAATTCTAACTAGAGCTCGCTGAT	
MutaPCRf	P-ACTCCCAGGAGGCCAAAGCAC	Mutagenese-PCR Primer für WT BRET-Sensorplasmid
MutaPCRr	P-GAACGGAGCTGGCAAAACGACC	
SeqKas	AGCCCGACGTCGTCCAGATTG	Sequenzierprimer WT BRET-Sensorplasmid

Wolle 610	GACTATCATATGCTTACCGT	Sequenzierprimer px459 Plasmid und pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmid

Die verwendeten Primer wurden ebenfalls extern durch Metabion (Planegg) synthetisiert.

2.1.11 Medien für Bakterienkulturen

LB-Medium:

Luria-Broth Base	25 g
ddH_2O	Ad 1000 ml

LB-Agar mit Ampicillin:

Luria-Broth Base	12,5 g
Agar	7,5 g
Ampicillin	1%
ddH_2O	Ad 500 ml

SOC-Medium (Super Optimal Broth Medium):

Trypton	2%
Hefeextrakt	0,5%
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
$MgCl_2$	10 mM
$MgSO_4$	10 mM
Glukose	20 mM
ddH_2O	Ad 1000 ml

2.1.12 Medien für Zellkulturen

DMEM +++:

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

Einfriermedium:

DMSO	10%
FKS	90%

Das Einfriermedium wurde genutzt, um eukaryotische Zellen bei -80°C zu lagern.

2.1.13 Bakterienstämme

E.coli	**Genetische Eigenschaften**	**Hersteller, Ort**
One Shot TOP10 Electro-competent Cells	hsdR mcrA lacZ∆M15 endA1 recA1	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

2.1.14 Zelllinien

HEK 293T-Zelllinie

Die HEK 293T-Zelllinie ist eine humane, embryonale Nierenzelllinie. Sie wurde 1973 generiert, indem HEK-Zellen mit einem Adenovirus Serotyp 5 transfiziert wurden. Die Epithelzellen weisen einen adhärenten Charakter auf und gelten als gut kultivierbar und transfizierbar (Graham et al. 1977).

Zelllinie	**Bezugsquelle**
HEK293-T (ATCC® CRL-3216™)	LGC Standards GmbH, Wesel

2.1.15 Kits

Bezeichnung	Hersteller, Ort
NucleoSpin Plasmid QuickPure™	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Oligohybridisierung der pegRNA- und ngRNA-Sequenzanteile

Die Hybridisierung der jeweiligen pegRNA-Oligonukleotide (siehe 2.1.10) erfolgte nach dem Protokoll der Arbeitsgruppe Anzalone und Liu (Anzalone et al. 2019). Die drei pegRNA-Anteile: Spacer-, Scaffold- sowie 3' Extension-Oligonukleotide wurden so zu doppelsträngiger DNA hybridisiert.

Es wurde folgender Ansatz durchgeführt:

Komponenten	**Menge**
Buffer AE	23 µl
„top oligonukleotid“	1,0 µl
„bottom oligonukleotid“	1,0 µl
Gesamtvolumen	**25 µl**

Die Reaktionsansätze wurden für 3 min im Heizblock bei 95°C erhitzt, um die enthaltene DNA kurz zu denaturieren. Danach kühlten die Ansätze auf RT (Raumtemperatur) ab und wurden im Verhältnis 1:4 mit ddH_2O aufgefüllt und gevortext.

Die Hybridisierung der jeweiligen ngRNA-Oligonukleotide (siehe 2.1.10) erfolgte durch folgenden Ansatz:

Komponenten	**Menge**
„top oligonukleotid“	8,0 µl
„bottom oligonukleotid“	8,0 µl
ddH_2O	4,0 µl
Gesamtvolumen	**20 µl**

Die Reaktionsansätze wurden für 10 min bei 98°C im Heizblock erhitzt und daraufhin 30 min bei RT inkubiert.

2.2.1.2 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme wurden als Abwehrmechanismus von Bakterien gegen eindringende Fremd-DNA entdeckt. Jedes besitzt dabei eine spezifische Nukleotid-Erkennungssequenz, anhand der es die DNA spalten kann. Durch die DNA-Spaltung entstehen je nach verwendetem Enzym unterschiedliche Strangbrüche: Bei Spaltung an unterschiedlichen Positionen werden einzelsträngige Überhänge („sticky ends“) generiert. Beim Schneiden beider Stränge an gleicher Position entstehen gerade Enden („blunt ends“). In dieser Arbeit wurden verschiedene Restriktionsenzyme (siehe 2.1.6) nach Herstellerangaben verwendet, um Klonierungen oder Analyse-Verdaus durchführen zu können.

Restriktionsverdau des pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmids

Der Verdau des pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmids (siehe 2.1.9) erfolgte mithilfe des Restriktionsenzyms BsaI-HFv2 (Anzalone et al. 2019).

Es wurde folgender Ansatz durchgeführt:

Komponenten	**Menge**
pU6-pegRNA-GG-Acceptor (2000 ng)	x µl
CutSmart Buffer (10x)	3,0 µl
BsaI-HFv2	1,0 µl
ddH_2O	y µl
Gesamtvolumen	**30 µl**

Die Reaktionsansätze wurden im Wasserbad bei 37°C für 3 – 4 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Enzyminaktivierung bei 65°C für 20 min im Heizblock.

Analyse-Verdau des pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmids

Der Analyse-Verdau des pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmids wurde mittels NdeI nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Komponenten	**Menge**
pU6-pegRNA-GG-Acceptor mit pegRNA (~1000 ng)	8 µl
CutSmart Buffer (10x)	1,0 µl
NdeI	1,0 µl
Gesamtvolumen	**10 µl**

Die Reaktionsansätze wurden im Wasserbad bei 37°C für 3-4 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Enzyminaktivierung bei 65°C für 20 min im Heizblock.

Analyse-Verdau des px459 Plasmids

Zur Optimierung der Prime Editierung wurde aus dem Prime Editor 2 der Prime Editor 3 bzw. 3b mit Hilfe einer zusätzlichen ngRNA hergestellt. Als Klonierungsvektor war hierfür das px459 Plasmid (siehe 2.1.9) vorgesehen. Dessen Analyse-Verdau wurde mittels BbsI und EcoRV nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Komponenten	**Menge**
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 deletiert (~1000 ng)	8,0 µl
CutSmart Buffer (10x)	2,0 µl
BbsI-HF	1,0 µl
EcoRV-HF	1,0 µl
ddH_2O	8,0 µl
Gesamtvolumen	**20 µl**

Die Reaktionsansätze wurden im Wasserbad bei 37°C für 3-4 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Enzyminaktivierung bei 65°C für 20 min im Heizblock.

Restriktionsverdau des deletierten px459 Plasmids

Für die Klonierung der ngRNAs wurde das deletierte px459 Plasmid mit BbsI-HF verdaut.

Es wurde folgender Restriktionsansatz durchgeführt:

Komponenten	**Menge**
pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 deletiert (1000 ng)	x µl
CutSmart Buffer (10x)	2,0 µl
BbsI-HF	1,5 µl
ddH_2O	y µl
Gesamtvolumen	**20 µl**

Die Reaktionsansätze wurden im Wasserbad bei 37°C für 3-4 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Enzyminaktivierung bei 65°C für 20 min im Heizblock.

Die jeweilige nRNA wurde dann mit dem deletierten px459-Plasmid ligiert (siehe 2.2.1.4).

2.2.1.3 Klonierung

Die Klonierung hat das Ziel, DNA zu gewinnen und identisch zu vervielfältigen. Dabei wird ein DNA-Fragment in einen Vektor integriert, welcher als Transportmittel in den Empfängerorganismus, beispielsweise E.coli, dient.

Klonierung der hybridisierten pegRNA

Die Klonierung der drei hybridisierten pegRNA-Anteile (siehe 2.2.1.1) in das verdaute pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmid erfolgte anhand einer Golden Gate - Klonierung (Anzalone et al. 2019).

Bei der Golden Gate - Klonierung wird ein Restriktionsenzym (wie BsaI) verwendet, das außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet (siehe 2.1.6). Die Restriktionsschnittstellen sind somit außerhalb des Konstrukts und ermöglichen so eine gleichzeitige Ligation der Überhänge durch die T_4-DNA-Ligase (siehe 2.1.6). Durch diese Klonierungsmethode können Restriktion und Ligation simultan innerhalb eines Ansatzes erfolgen.

Es wurde folgender Golden Gate - Klonierungsansatz durchgeführt:

Komponenten	**Menge**
Verdautes pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmid (30 ng)	x µl
Hybridisierte Spacer-Sequenz	1,0 µl
Hybridisierte 3'Extension-Sequenz	1,0 µl
Hybridisierte Scaffold-Sequenz	1,0 µl
BsaI-HFv2	0,25 µl
T_4-DNA-Ligase	0,5 µl
T_4-DNA-Ligase Buffer	1,0 µl
ddH_2O	y µl
Gesamtvolumen	**10 µl**

Die Reaktionsansätze wurden gevortext und für 10 min bei RT inkubiert.

2.2.1.4 Ligation

Die T_4-DNA-Ligase katalysiert die Verknüpfung des 5´ - Phosphatendes mit dem 3' - Hydroxylende von doppelsträngiger DNA durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung und wurde zur Ligation von DNA-Fragmenten verwendet.

Die Ligation von pegRNA und pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmid erfolgte im Rahmen der Golden Gate - Klonierung durch die T_4-DNA-Ligase im Thermocycler.

Folgendes Thermocycler-Programm wurde verwendet:

Temperatur	**Dauer**	**Anzahl Zyklen**
16°C	5 min	8
37°C	5 min	8
37°C	15 min	1
80°C	15 min	1
12°C	15 min	1

Die Ligation von ngRNAs und px459 Plasmid sowie alle weiteren Ligationen wurden nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Komponenten	**Menge**
Linearisierter Vektor (10 ng)	x µl
Hybridisiertes Insert (800 pmol)	y µl
10x T_4-DNA-Ligase Puffer	2,0 µl
T_4-DNA-Ligase	1,0 µl
ddH_2O	z µl
Gesamtvolumen	**20 µl**

Im Allgemeinen wurden die Ligationsansätze über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.2.1.5 Herstellung elektrokompetenter top10 - E.coli

Zunächst wurde ein Verdünnungsstrich der E.coli (siehe 2.1.13) auf einer Agarplatte ohne Antibiotika hergestellt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden zwei Kolonien zum Animpfen gepickt. Hierfür war es nötig die Bakterien in 50 ml Falcons mit je 5 ml LB-Medium ohne Antibiotikum für 16 bis 18 h bei 37°C im Schüttler zu inkubieren. Um die Hauptkultur anzuimpfen, wurden 200 ml LB-Medium (37°C) in je einen Kolben überführt und die beiden inkubierten Falcons hinzugegeben. Die Hauptkulturen inkubierten im Schüttler bei 37°C bis eine optischen Dichte bei λ = 600 nm (OD_{600}) zwischen 0,6 und 0,8 mittels Photometer gemessen werden konnte. Daraufhin folgte die Aufteilung beider Kolben auf vier 50 ml Falcons und die Inkubation für 30 min auf Eis, um sie danach zu zentrifugieren (5000 rpm, 10min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und je 10 ml steriler HEPES Puffer (1mM) auf das Bakterienpellet gegeben und mittels Vortexer resuspendiert.

Die Bakteriensuspension wurde zur einfacheren Handhabung der folgenden Schritte in einem der Falcons zusammengeführt, das Falcon danach auf 50 ml mit sterilem HEPES Puffer aufgefüllt und wiederum wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands konnte das Pellet erneut mit 10 ml sterilem HEPES Puffer resuspendiert und auf 25 ml aufgefüllt werden. Durch Zentrifugation wurde der Überstand wieder verworfen und je 10 ml 10%-iges Glycerin auf das Pellet zur Resuspension gegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation und Verwerfen des Überstands konnte das Pellet mit 5 ml 10%-igen Glycerin resuspendiert und zentrifugiert werden, der Überstand verworfen und das Pellet dann mit 750 µl 10%-igem Glycerin resuspendiert und je 50 µl der Suspension in eisgekühlte Tubes überführt werden.

Die Inkubation der Falcons fand zwischen den Zentrifugationsschritten stets auf Eis statt.

Abschließend erfolgte ein Einfrieren der Aliquots in -80°C kaltem Stickstoff zur langfristigen Lagerung.

2.2.1.6 Herstellung von Agarplatten

Ampicillinhaltige Agarplatten dienten als Nährböden für die Bakterien. Für die Herstellung wurde 1 l ddH_2O mit 25 g Lurica Broth und 15 g Select Agar gemischt und durch Autoklavieren vollständig gelöst. Nach Abkühlen im Wasserbad auf 48°C wurden 1000 µl Ampicillin zugegeben (Endkonzentration: 100 µg/ml) und gut gemischt. Die Lösung wurde unter der Sterilbank in vorbereitete Bakterienkulturplatten überführt, bis deren Boden bedeckt war. Nach 15 – 20 min Trocknungszeit lagerten die Agarplatten bei + 4°C bis zum Gebrauch.

2.2.1.7 Transformation durch Elektroporation

Für eine Vervielfältigung des Vektors mit dem gewünschten Insert wurde dieser nach erfolgter Ligation in Bakterien eingebracht. Das Vektorkonstrukt wurde hierfür in eine Suspension aus elektrokompetenten Bakterien überführt und einem kurzen elektrischen Stromstoß ausgesetzt. Die kurzzeitig entstehenden Poren in der Bakterienwand ermöglichen den Vektortransfer in das Bakterieninnere (Neumann et al. 1982).

Diese Transformation der elektrokompetenten Bakterien erfolgte mittels Multiporator von Eppendorf (siehe 2.1.1). Vor der Elektroporation wurden die Bakterien, die Küvetten und der zu transformierende Vektor auf Eis inkubiert. Das SOC-Medium sowie die Agarplatten waren bei 37°C vorgewärmt.

Zu je 50 µl elektrokompetenten Bakterien wurde 5 µl ligierter Vektor zugegeben, kurz gemischt und ca. 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension konnte luftblasenfrei in die Küvette pipettiert werden und direkt nach der Elektroporation folgte die Zugabe von 1000 µl SOC-Medium zu den elektroporierten Bakterien. Anschließend erfolgte die Inkubation der Suspension in einem 2 ml Tube im Schüttler (1 h, 37°C). Diese Inkubationszeit ermöglicht eine zügige Teilung der Bakterien und eine Expression der eingebrachten Vektor-DNA mit entsprechendem Ampicillin-Resistenzgen. Anschließend wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf einer Agarplatte, welche Ampicillin zur

Selektion enthält [100 µg/ml], ausplattiert. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte bei 37°C für 16 bis 18 h.

2.2.1.8 Plasmidisolation

Midi- und Maxi-Plasmidpreparation mittels Kit:

Größere Mengen an Plasmid-DNA konnten mithilfe des QIAGEN Plasmid Midi bzw. Maxi Kits (siehe 2.1.15) gewonnen werden. Diese wurden nach Herstellerangaben angewendet.

Mini-Plasmidpreparation mit Puffern:

Alternativ zum Gebrauch eines Kits erfolgte die Gewinnung kleiner Plasmid-Mengen mittels Puffermethode. Dazu wurden einzelne Bakterienkolonien nach der Inkubation der Agarplatten mittels Pipettenspitze entnommen und in 5 ml Flüssigkultur überführt.

Hierzu waren je nach Kolonieanzahl 50 ml Falcons mit je 5 ml LB-Medium (37°C) und je 5 µl Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) vorbereitet. Die Kolonien wurden einzeln gepickt, in das jeweilige Falcon überführt und diese anschließend im Schüttler inkubiert (16-18 h, 37°C).

Am folgenden Tag wurden 2 ml der Bakteriensuspension in ein Tube pipettiert und zentrifugiert (10000 rpm, 5 min), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet mit 100 µl Resuspension Buffer S1 (4°C) resuspendiert, bis dieses vollständig aufgelöst war. Es folgte nun die Zugabe von 100 µl Lysis Buffer S2, um die Bakterienwand aufzulösen. Anschließend wurden die Tubes einmal vorsichtig invertiert und 100 µl Neutralization Buffer S3 hinzugefügt. Nach erneuter Inversion schloss sich die Zentrifugation der Ansätze (10000 rpm, 10 min) und die Überführung des Überstands in neue Tubes an. Zugegeben wurden nun jeweils 700 µl Ethanol (100%, - 20°C).

Das Ausfällen der DNA erfolgte dann während eines längeren Zentrifugationsschritts (14000 rpm, 40 min, 4°C). Nach Verwerfen des Überstands wurden für den Wasch-Schritt jeweils 200 µl Ethanol (70%) zum DNA-Pellet hinzugegeben und erneut zentrifugiert (14000 rpm, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde wieder verworfen und das verbliebene DNA-Pellet für 5 bis 10 min bei RT luftgetrocknet. Abschließend konnte das Pellet mit je 27 µl ddH_2O durch Vortexen resuspendiert werden.

2.2.1.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen führte im Allgemeinen das externe Labor Microsynth SeqLab (Göttingen) durch, die Auswertung der resultierenden Chromatogramme erfolgte mittels FinchTV (siehe 2.1.8).

Folgender Sequenzieransatz kam zur Anwendung:

Komponenten	**Menge**
Rekombinantes Plasmid (1200 ng)	x µl
Sequenzierprimer (1:10 verdünnt)	3,0 µl (30 pmol)
ddH_2O	y µl
Gesamtvolumen	**15 µl**

2.2.1.10 Anlegen eines Glycerolstocks

Um DNA für längere Zeit aufbewahren zu können, wurden von den gewünschten rekombinanten Bakterien Glycerolstocks hergestellt und bei -80°C gelagert. Hierfür wurden 500 µl Kryoröhrchen mit 200 µl Bakteriensuspension sowie 200 µl Glycerin befüllt und die Suspensionen mittels Vortexer homogenisiert. Das enthaltene Glycerin sorgte für eine kontinuierliche und langsame Abkühlung der Suspension und verhinderte somit das Schockgefrieren und Platzen der Bakterien.

2.2.1.11 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction) ist ein zügiges Verfahren zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-Fragmenten und wird im Thermocycler durchgeführt. Als Komponenten werden neben der zu vervielfältigenden DNA eine hitzestabile Polymerase mit zugehörigem Puffer sowie passende Oligonukleotidprimer gebraucht. Außerdem werden $MgCl_2$ sowie freie Nukleotide benötigt, um die DNA zu amplifizieren. Grundlegend erfolgt die PCR in drei Schritten. In einem ersten Schritt erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA in Einzelstränge durch Erhitzen der Reaktionsansätze auf 95°C. Im darauffolgenden Schritt werden die Reaktionsansätze auf die primerspezifische Annealing-Temperatur abgekühlt, wodurch die Anlagerung der Primer

ermöglicht wird. Im letzten Schritt werden die Reaktionsansätze auf das Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase erhitzt. Diese bindet an die angelagerten Primer und elongiert die DNA mittels der freien Nukleotide in 5‘ – 3‘ Richtung zu Doppelsträngen. Nach mehrfacher Wiederholung der oben genannten Schritte kommt es schließlich zur exponentiellen Amplifikation des DNA-Abschnitts (G. Krause et al. 2012). In dieser Arbeit kam eine Phusion-Polymerase mit „proof-reading“ Aktivität zur Anwendung.

Sonderform: Mutagenese-PCR

In dieser Arbeit wurden Mutagenese-PCRs durchgeführt, wodurch eine bestehende Sequenz gezielt modifiziert werden kann. Hierfür wurden passende Mutagenese-Primer (siehe 2.1.10) gewählt, die die Elongation der Ziel-DNA, anders als bei einer PCR, in entgegengesetzte Richtung ermöglichen. Bei einer Mutagenese-PCR wird somit das gesamte Plasmid amplifiziert, wobei Modifikationen in Form von Insertionen oder Deletionen generiert werden können.

Es wurde jeweils folgender Ansatz durchgeführt:

Komponente	**Menge**
DNA (5 ng)	1 µl
Primer 1 (1:10 verd.)	1 µl
Primer 2 (1:10 verd.)	1 µl
$MgCl_2$	0,3 µl
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
Phusion HF Buffer (5x)	4 µl
Phusion DNA-Polymerase	0,2 µl
ddH_2O	12,1 µl
Gesamtvolumen	**20 µl**

Anschließend kam folgendes Thermocycler-Programm in Form einer Gradienten-PCR zur Anwendung:

Schritt	**Temperatur**	**Zeit**	
Initiale Denaturierung	98°C	30 s	
Denaturierung	98°C	7 s	34 x
Primer-Annealing (Gradient)	60 - 71,6°C	20 s	
Elongation	72°C	180 s	
Finale Elongation	72°C	1200 s	
Haltezeit	10°C	600 s	

Nach erfolgter Mutagenese-PCR wurden die Ansätze ligiert (siehe 2.2.1.4).

2.2.1.12 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von genomischer DNA. Einerseits ist durch die Gelelektrophorese eine reine Analyse möglich, andererseits erlaubt die Auftrennung im Gel ein Ausstechen der gewünschten DNA-Fragmente. Diese können dann in einem späteren Schritt aus dem Gel aufgereinigt und weiterverarbeitet werden. Die Elektrophorese aller verwendeten Proben erfolgte in einem 1%-igen Agarose-Gel. Dazu wurde in verschiedenen Volumina TBE-Puffer (1x) und 1%-iges Agarose LE-Pulver in einem Kolben gemischt. Dieser Ansatz wurde in der Mikrowelle aufgekocht (600 W, 2 min), sodass sich das Pulver vollständig löste. Die verdampfte Flüssigkeit wurde durch ddH_2O ausgeglichen und der Ansatz auf Handwärme abgekühlt. Als DNA-Farbstoff wurden 3 - 5 µl Serva DNA Stain Clear G (siehe 2.1.4) zugegeben und das flüssige, klare Gel ohne Luftblasen in den Schlitten gegossen. Nach Einsatz des Probenkamms und Verfestigung des Gels wurde dieses in eine mit TBE-Puffer (1x) gefüllte Elektrophorese-Kammer überführt. Um den Fortschritt der Auftrennung zu überprüfen, kam je nach Ausgangsvolumen DNA Loading Dye Purple (6x) zu jeder Probe hinzu. Als Größenstandard dienten rechts und links der Proben 7 µl GeneRuler 1kb DNA Ladder. Die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgte bei 120 V für 45 min. Abschließend konnten die aufgetrennten DNA-Fragmente mittels UV-Transilluminator analysiert werden.

2.2.1.13 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Im UV-Transilluminator (siehe 2.1.1) konnten die DNA-Fragmente sichtbar gemacht und die gewünschten Banden mittels Skalpell ausgestochen werden. Die anschließende Reinigung der DNA gelang nach Herstellerangaben mit dem NukleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (siehe 2.1.15). Folgend wurde die DNA mit 27 µl ddH_2O eluiert und bei RT für 1 min inkubiert. Abschließend erfolgte eine photometrische Konzentrationsmessung der DNA.

2.2.1.14 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Quantifizierung der DNA-Konzentration wurde eine photometrische Absorptionsmessung mittels BioPhotometer (Eppendorf) durchgeführt. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm, sodass die Lichtabsorption bei einer optischen Dichte von λ = 260 nm (OD_{260}) gemessen wird. Mithilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes kann aus der Absorption die Konzentration einer Lösung ermittelt werden:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \text{bzw.} \quad c = \frac{A}{d \cdot \varepsilon}$$

A = Absorption, ε = Absorptionskoeffizient [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$], c = Konzentration [$mol \cdot l^{-1}$], d = Schichtdicke [cm]

Der durch die Absorption bedingte Verlust an Licht wird auch als Extinktion bezeichnet. Ein OD_{260} Wert von 1 entspricht dabei 50 ng DNA / µl (Hauk 2013).

Als Leerprobe für die Messungen diente ddH_2O. Überschritten die gemessenen Absorptionswerte der Proben den linearen Bereich von 0,1 bis 1,0, wurden sie entsprechend verdünnt und erneut gemessen.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kryokonservierung der HEK293T-Zellen

Zur längeren Konservierung wurden die HEK293T-Zellen (siehe 2.1.14) in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Dafür musste zunächst das Zellmedium entfernt und die Zellen mit 5 ml PBS (1x, steril) gewaschen werden. Durch Ablösung mittels 1 ml Accutase konnte mit 5 ml DMEM+++ eine Zellsuspension hergestellt werden. Der Überstand wurde nach Zentrifugation der Ansätze (300 x g, 10 min, 4°C) verworfen und das Zellpellet in 500 µl Einfriermedium resuspendiert. Abschließend erfolgte die Überführung der Zellsuspension in Kryoröhrchen und das Einfrieren in flüssigem Stickstoff.

2.2.2.2 Auftauen von HEK293T-Zellen

Zur Verwendung der Zellen wurde 1 ml der kryokonservierten HEK293T-Zellen aufgetaut und mit 9 ml DMEM +++ in einer 10 cm Zellkulturplatte zu einer Suspension gemischt und bis zu einer Konfluenz von 80-90% im Brutschrank kultiviert. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um restliches Einfriermedium zu entfernen.

2.2.2.3 Kultivierung von HEK293T-Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter der Sterilbank. Hierzu fand als Medium DMEM +++ (37°C) Verwendung und die Zellkulturen wurden bei 37°C, 5% CO_2 und mindestens 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zur Teilung der Zellen musste zuerst das alte Medium verworfen und die Medium-Rückstände mittels 5 ml sterilem PBS-Puffer (1x, 37°C) vom Zellrasen gewaschen werden. Zur Ablösung der Zellen wurde 1 ml Accutase (siehe 2.1.6) appliziert und die Zellkulturplatte inkubiert (5-10 min, 37°C). Durch Zugabe von 9 ml DMEM +++ (37°C) konnte erneut eine Zellsuspension hergestellt und davon jeweils 1 ml in neue Zellkulturplatten überführt werden. Abschließend wurde die Zellsuspension mit 9 ml DMEM +++ aufgefüllt, gemischt und bis zur nächsten Teilung kultiviert.

2.2.2.4 Auszählen der Zellen

Für das Auszählen der Zellen unter dem Mikroskop kam eine Neubauer-Zählkammer zur Anwendung. Die Zählkammer weist eine Kammertiefe von 0,1 mm auf und enthält 4 Großquadrate à 1 mm^2, welche wiederum aus je 16 kleineren Zählquadraten bestehen. Hierzu wurde wie in 2.2.2.1 beschrieben, eine Zellsuspension der kultivierten HEK293T-Zellen hergestellt und ein Teil davon im Verhältnis 1:2 mit DMEM +++ verdünnt. Von dieser Zellsuspension wurden 20 µl zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert. Die Zellzahl ermittelte sich pro Großquadrat und konnte durch folgende Formel hochgerechnet werden:

$[(G1+G2+G3+G4):4] \times V \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$

G = Großquadrat, V = Verdünnungsfaktor

Es wurden für die spätere Transfektion jeweils 250.000 Zellen pro Well in eine 6-Well Platte überführt und mit je 2 ml DMEM +++ kultiviert.

2.2.2.5 Transfektion von HEK293T-Zellen

Als Transfektion wird das Einbringung von Fremd-DNA oder -RNA in eukaryotische Zellen bezeichnet. Das Verfahren entspricht im Wesentlichen dem der bakteriellen Transformation. Für die Transfektion wurden die HEK293T-Zellen (siehe 2.1.14) von der Zellkulturplatte in eine 6-Well-Platte überführt und inkubiert (5% CO_2, 24 h, 37°C). 30 bis 60 min vor Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel, um die Zellteilung anzuregen. Die Transfektion der Zellen erfolgte mittels Polyethylenimin (PEI) (siehe 2.1.4). Bei PEI handelt es sich um ein kationisches Makromolekül, welches einen Komplex mit der DNA bildet, sodass diese durch die Zellmembran in den Zellkern diffundieren kann. Damit eignet sich PEI gut für die Transfektion eukaryotischer Zellen und besitzt durch seine zahlreichen NH_2-Gruppen zusätzlich eine puffernde und pH-stabilisierende Komponente (Boussif et al. 1995).

Der DNA-Gehalt der einzubringenden Plasmide wurde an das 6-Well Format angepasst (Anzalone et al. 2019). Eine ausreichende Transfektionseffizienz wurde durch Verwendung einer GFP-Kontrolle geprüft.

Die Transfektionsansätze für das PE2-System sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3: Transfektionsansätze für den Reparaturversuch mittels PE2-Komplexes.

Komponenten	Transfektionsansätze PE2				
	GFP-Kontrolle	Luc-Kontrolle	GG-Kontrolle	WT-Kontrolle	pegRNA
NaCl (150 mM)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
PEI-Mix (0,1 mg/ml)	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
Plasmid 1 (790 ng)	/	/	/	/	X
Plasmid 1 leer (790 ng)	/	X	X	/	/
Plasmid 2 (2000 ng)	/	/	X	/	X
Plasmid 3 (2370 ng)	/	X	X	/	X
Plasmid 4 (2000 ng)	/	X	/	/	/
Plasmid 5 (5000 ng)	X	/	/	/	/
Plasmid 6 (2000 ng)	/	/	/	X	/

Legende:

X = enthalten; / = nicht enthalten

Wildtyp-Kontrolle (WT-Kontrolle) = Positivkontrolle

Luciferase- und pU6-pegRNA-GG-Acceptor-Kontrolle (Luc- und GG-Kontrolle) = Negativkontrollen

Plasmid 1: pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmid mit pegRNA (leer: ohne pegRNA)

Plasmid 2: BRET-Sensorplasmid (ln6T2)

Plasmid 3: pCMV-PE2 Plasmid

Plasmid 4: pcDNA-RLuc8 Plasmid

Plasmid 5: pTagGFP2-N Plasmid

Plasmid 6: Wildtyp BRET-Sensorplasmid

Die Herstellung des PE3- bzw. PE3b-Komplexes gelang durch Hinzufügen eines px459 Plasmids mit enthaltener ngRNA (siehe 2.1.9 und 2.1.10). Der DNA-Gehalt wurde analog an das 6 Well-Format angepasst (Anzalone et al. 2019).

Die Transfektionsansätze für das PE3/3b-System sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Transfektionsansätze für den Reparaturversuch mittels PE3/PE3b-Komplexes.

Komponenten	**Transfektionsansätze PE3 bzw. PE3b**					
	GFP-Kontrolle	Luc-Kontrolle	GG-Kontrolle	WT-Kontrolle	pegRNA	pegRNA+ ngRNA
NaCl (150 mM)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
PEI-Mix (0,1 mg/ml)	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
Plasmid 1 (790 ng)	/	/	/	/	X	X
Plasmid 1 leer (790 ng)	/	X	X	/	/	/
Plasmid 2 (2000 ng)	/	/	X	/	X	X
Plasmid 3 (2370 ng)	/	X	X	/	X	X
Plasmid 4 (2000 ng)	/	X	/	/	/	/
Plasmid 5 (5263 ng)	X	/	/	/	/	/
Plasmid 6 (2263 ng)	/	/	/	X	/	/
Plasmid 7 (263 ng)	/	/	/	/	/	X
Plasmid 7 leer (263 ng)	/	X	X	/	X	/

Legende:

X = enthalten; / = nicht enthalten

Plasmide 1-6 und Kontrollen siehe oben.

Plasmid 7: pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0, kurz px459 Plasmid mit ngRNA (leer: ohne ngRNA)

Den Transfektionsansätzen in 2 ml Tubes wurden zuerst NaCl vorgelegt und nacheinander die jeweilige plasmidische DNA zugegeben. Nach jeder DNA-Zugabe wurde der Ansatz gevortext und das PEI als letzte Komponente hinzugegeben. Nach erneutem Vortexen inkubierten die Ansätze bei RT für 10 min.

Die Transfektionsansätze wurden unter der Sterilbank gleichmäßig tropfenweise mittels 200 µl-Pipette auf den Zellen verteilt und diese für insgesamt 4 Tage bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Ein Mediumwechsel erfolgte 4 - 6 h nach Transfektion und nachfolgend einmal täglich, um den Zellstress zu mindern.

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Proteinextraktion aus HEK 293-T Zellen

Für die später folgende Messung via BRET-Assay mussten die Proteine zunächst aus der transfizierten Zellkultur extrahiert werden. Dazu wurde das Zellmedium abpipettiert und verworfen und die verbliebenen Zellen mit 1 ml PBS (1x, steril) pro Well gewaschen. Anschließend wurden zu jedem Well 100 µl PBS (1x, steril) gegeben, die Zellen mittels Zellschaber (siehe 2.1.2) abgetragen und so eine Suspension hergestellt. Die Zellsuspension konnte daraufhin in 2 ml Tubes überführt und kurz in flüssigen Stickstoff getaucht werden. Nach dem Auftauen bei RT mussten die Ansätze gevortext und erneut in Stickstoff gefroren werden. Durch dieses Schockgefrieren entstehen Eiskristalle, die die Zellen anschwellen und schließlich platzen lassen, sodass die Proteine in einem nächsten Schritt isoliert werden konnten. Abschließend erfolgte nach erneutem Auftauen und Vortexen eine Zentrifugation zur Generierung eines Zellpellets (17968 x g, 10 min, 4°C). Der proteinenthaltende Überstand konnte in je ein neues Tube überführt werden.

2.2.3.2 BRET Assay

Der Bioluminescence resonance energy transfer (BRET) beruht auf dem geringen molekularen Abstand (<10 nm) zwischen einem Energie-Donor und einem Energie-Akzeptor, sodass durch Dipol-Dipol Interaktion eine Energie-Emission entstehen kann (Pfleger und Eidne 2006).

In dieser Arbeit kam als Donorenzym die Renilla Luziferase 8 (RLuc8) und als Akzeptormolekül das GFP2 zum Einsatz, deren Domänen die ABCA4 Ziel-Sequenz innerhalb des BRET-Sensorplasmids (siehe 2.1.9) flankierten. Als Substrat für die Luziferase wurde Coelenterazin 400a (siehe 2.1.3) verwendet, durch dessen Umsatz RLuc8 Licht bei λmax ~ 415 nm emittiert. Der Emissionswellenlängenbereich der Luciferase fällt dabei zu großem Anteil in den Anregungswellenlängenbereich des GFP2-Moleküls, welches daraufhin Licht bei λmax ~ 513 nm emittiert (siehe Abb. 2.7). Bildet man nun den Quotienten der Intensität der Lichtemission von GFP2 und von RLuc8, ergibt sich die BRET-Ratio (Wimmer et al. 2016):

$$BRET\ Ratio = \frac{Intensität\ Lichtemission\ GFP}{Intensität\ Lichtemission\ Luciferase}$$

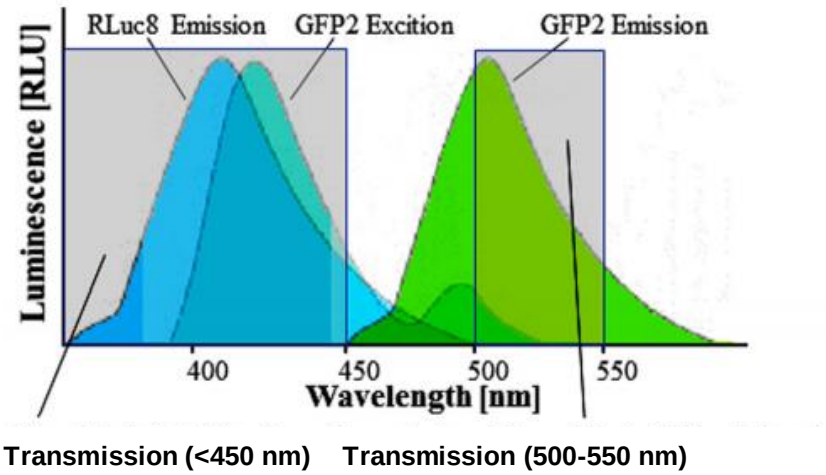


Abbildung 2.7: Emissions- und Erregungsspektren der RLuc8 und des GFP2.

Blau: Emissionswellenlängenbereich der RLuc8. Türkis: Anregungswellenlängenbereich des GFP2. Hellgrün: Emissionswellenlängenbereich des GFP2 (verändert nach Wimmer et al. 2016).

Durchführung des BRET Assays:

Für die Messungen im Multimode Platereader (siehe 2.1.1) fanden eine 96 Well Platte (siehe 2.1.2) und die dazugehörige Software „icontrol“ (siehe 2.1.8) Verwendung. Das Luciferase-Substrat Coelenterazin 400a (siehe 2.1.3) wurde entsprechend der Menge an zu messenden Proben in PBS (1x, steril) im Verhältnis 1:100 verdünnt und lichtgeschützt für 20 min inkubiert, um das Substrat zu stabilisieren. Nach dem Pipettieren von 5 µl Probe in je 4 Wells erfolgte die viermalige Messung im Platereader. Hier wurden je 100 µl des verdünnten Coelenterazin-Ansatzes pro Well injiziert und die Lichtemission von Luciferase und GFP2 gemessen.

Auf Basis des beschriebenen Mechanismus konnte die Reparatur der ABCA4 Ziel-Sequenz durch die jeweilige pegRNA innerhalb des Prime Editors Komplexes gemessen und quantifiziert werden.

2.2.4 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse dieser Arbeit erfolgten durch Messung von Triplikaten. Zur statistischen Auswertung wurde der in SigmaPlot enthaltene paired t-Test sowie der One Way ANOVA Test herangezogen. P-Werte unter 0,05 gelten als statistisch signifikant, p-Werte unter 0,01 als hochsignifikant.

Generierung der Diagramme:

Um die Reparatureffizienz durch den PE2- und PE3- bzw. PE3b-Komplex vergleichen zu können, fanden in jeder Versuchsreihe Positiv- und Negativkontrollen statt. Als Positivkontrolle diente die WT-Kontrolle (siehe Ansatz in 2.2.2.5) als Maß für maximalen Reparaturerfolg (max. BRET-Ratio bzw. 100%). Als Negativkontrollen wurden die GG-Kontrolle sowie die Luc-Kontrolle gewählt (siehe Ansätze in 2.2.2.5), wobei letztere die untere Editierungsgrenze festlegte (min. BRET-Ratio bzw. 0%). Auf diese Weise konnte eine Skala entwickelt werden, in die sich die BRET-Ratio bzw. die prozentuale Editierungseffizienz der einzelnen pegRNAs einordnen ließ.

Die durch den BRET Assay gemessene BRET-Ratio führt durch folgende Formel zur prozentualen Editierungseffizienz:

$$Editierungseffizienz\ (\%) = \frac{MW(pegRNA) - MW(Luc)}{MW(WT) - MW(Luc)}\ x\ 100$$

MW = Mittelwert der BRET-Ratios

3. Ergebnisse

3.1 Experimentelles Design: PE2-System

Der Korrekturversuch der genannten Insertionsmutation (siehe 1.2.1) innerhalb des BRET-Sensorplasmids (siehe 2.1.9) erfolgte zunächst durch Verwendung des PE2-Systems. Hierzu wurden 21 pegRNAs mittels PrimeDesign Online-Tool ausgewählt und jeweils in ein pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmid kloniert. Gemeinsam mit einem pCMV-PE2 Plasmid, welches den PE2-Komplex enthält, erfolgte eine Dreifach-Transfektion in HEK293T-Zellen. Die Auswertung und Quantifizierung des Reparaturerfolgs durch die pegRNAs wurde mittels BRET-Assay durchgeführt. Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

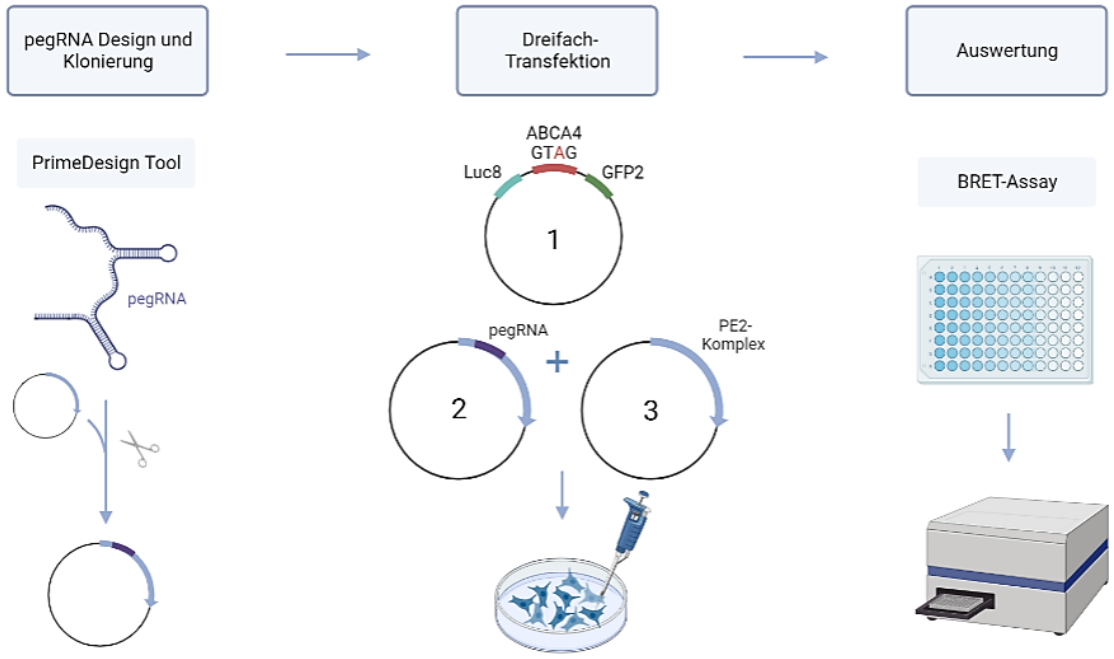


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des experimentellen Designs bei Verwendung des PE2-Systems. 1 = BRET-Sensorplasmid, enthält die mutierte ABCA4-Sequenz (GTAG). Luc8 = Luciferase-Domäne. GFP2 = GFP-Domäne. 2 = pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmid, enthält die pegRNA. 3 = pCMV-PE2 Plasmid, enthält den PE2-Komplex (erstellt mit BioRender.com).

3.1.1 Design der pegRNAs

Die pegRNA-Sequenzen wurden über das Online-Tool „PrimeDesign“ von Pinellolab ausgewählt. Hier wurde die ABCA4-Zielsequenz mit der gewünschten Modifikation (Deletion von A) eingefügt und das Tool generierte u.a. eine Excel-Tabelle mit einer Reihe von Vorschlägen für mögliche pegRNAs. Ausgehend von dieser Tabelle wurden 21 pegRNAs ausgewählt, welche das Edit relativ nahe bezüglich des pegRNA Nicks besitzen (peg-to-edit distance +9 bzw. +10, siehe Tabelle 3.1).

In Tabelle 11.1 (Anhang) sind die anhand des Online-Tools gewählten pegRNAs mit ihren verschiedenen Anteilen farbig markiert.

In Abbildung 3.2 ist exemplarisch eine pegRNA innerhalb des PE2-Systems in Bezug auf die Korrektur der Insertionsmutation (siehe 1.2.1) dargestellt. Die einzelnen Anteile der pegRNA sind gut erkennbar: Primer Binding Site (PBS), Reverse Transkriptase (RT) Template (gemeinsam als 3‘ Extension bezeichnet) und Spacer-Sequenz (gRNA).

Neben der peg-to-edit distance sind die Unterschiede bezüglich Spacer-Sequenz, Länge von PBS und RT-Template für die einzelnen pegRNAs in Tabelle 3.1 aufgeführt.

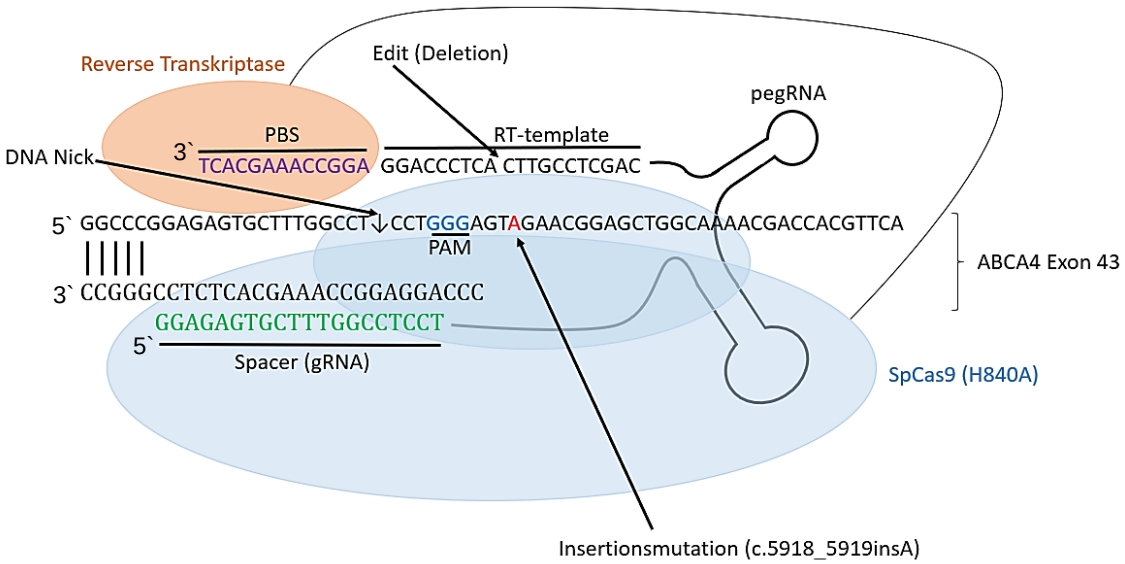


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Korrektur der Insertionsmutation. Dargestellt ist der Teil des Exon 43 im ABCA4-Gen, welcher die Insertionsmutation enthält. Diese wird durch den PE2-Komplex (eine pegRNA-Sequenz exemplarisch ausgewählt) korrigiert. PBS = Primer binding site. RT = Reverse Transkriptase. Edit = Deletion von Adenin.

Tabelle 3.1: Übersicht über die Spacer-Sequenzen sowie Längen der pegRNA-Anteile und deren peg-to-edit distance in Nukleotiden (nt).

			3‘ extension	
	pegRNA	Spacer	PBS (nt)	RT-Template (nt)
peg-to-edit distance: +10 (nt)	7	GCGGAGAGTGCTTTGGCCTCC	12	12
	8	---II---	13	12
	9	---II---	14	12
	10	---II---	12	14
	11	---II---	13	14
	12	---II---	14	14
	13	GGAGAGTGCTTTGGCCTCCT	12	11
	14	---II---	13	11
	15	---II---	14	11
	16	---II---	12	12
	17	---II---	13	12
	18	---II---	14	12
peg-to-edit distance: +9 (nt)	19	---II---	12	16
	20	---II---	13	16
	21	---II---	14	16
	22	---II---	12	18
	23	---II---	13	18
	24	---II---	14	18
	25	---II---	12	19
	26	---II---	13	19
	27	---II---	14	19

3.1.2 Klonierung der pegRNAs

Für die spätere Transfektion der pegRNAs wurde als Vektor das pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmid (siehe 2.1.9) verwendet. Vor der Klonierung der pegRNAs wurde dieses mittels BsaI verdaut (siehe 2.2.1.2), wobei die im Plasmid enthaltene mRFP-Dropout Cassette ausgeschnitten wurde. Die anschließende Auftrennung via Gelelektrophorese (siehe 2.2.1.12) zeigte die erwarteten DNA-Fragmentlängen von ca. 2200 bp und 825 bp ohne Nebenbanden (siehe Abb. 3.3). Das 2,2 kb – Fragment wurde daraufhin ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe 2.2.1.13).

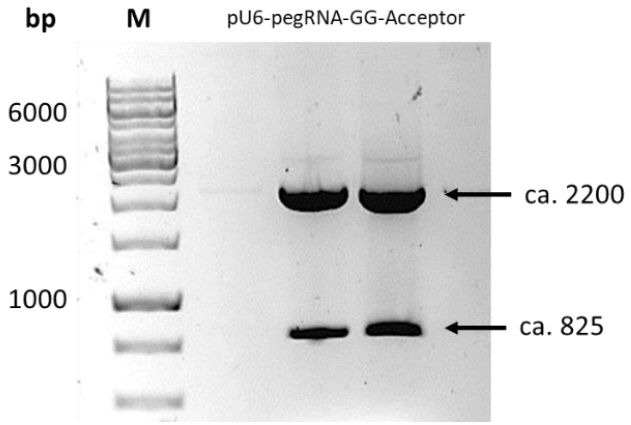


Abbildung 3.3: Gelelektrophorese des verdauten pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmids. M: Marker (GeneRuler 1 kb DNA-Ladder, siehe 2.1.5).

Durch Hybridisierung der Oligosequenzen (siehe 2.2.1.1) wurden die doppelsträngigen pegRNAs generiert. Daraufhin folgte eine Golden Gate - Klonierung (siehe 2.2.1.3), bei der die jeweilige pegRNA in das 2,2 kb – Fragment des pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmids integriert und anschließend via Thermocycler ligiert wurde (siehe 2.2.1.4). Zur Kontrolle der Klonierung erfolgte ein Analyse-Verdau mittels NdeI (siehe 2.2.1.2). Es zeigten sich bei fast allen Proben die erwarteten DNA-Fragmentlängen von ca. 2075 bp und ca. 230 bp (siehe Abb. 3.4).

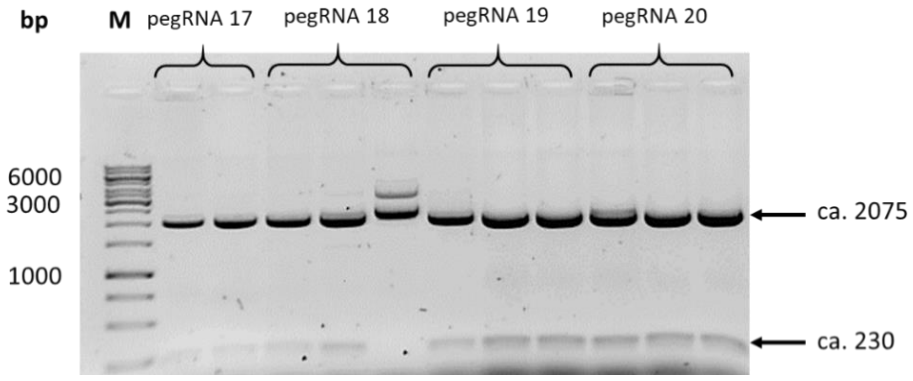


Abbildung 3.4: Analyse-Verdau der klonierten pegRNAs 17-20. Hier exemplarisch pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmid mit pegRNA 17-20. M: Marker (GeneRuler 1 kb DNA-Ladder).

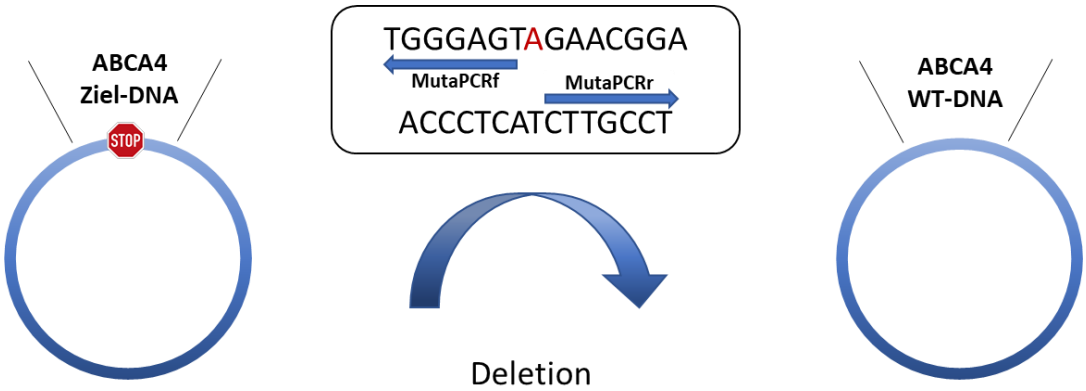
Die Proben, die die erwarteten Längen zeigten, wurden durch Sequenzierung (siehe 2.2.1.9) mittels Sequenzierprimer Wolle 610 (siehe 2.1.10) auf die Richtigkeit der pegRNA-Sequenzen überprüft. Danach erfolgte eine Maxi-Plasmidisolation (siehe 2.2.1.8).

3.1.3 Generierung des Wildtyp BRET-Sensorplasmids

Das Wildtyp BRET-Sensorplasmid wurde mittels Mutagenese-PCR (siehe 2.2.1.11) aus dem BRET-Sensorplasmid, welches die ABCA4 Ziel-DNA enthält, generiert. Die porcine ABCA4-Ziel-DNA entstand zu einem früheren Zeitpunkt innerhalb der Arbeitsgruppe mithilfe des GeneArt Gene Synthesis Kit anhand eines angepassten Protokolls. Hierbei wurden sich überlappende ABCA4-Oligonukleotide hybridisiert und mittels PCR amplifiziert. Die Klonierung erfolgte in HEK293T-Zellen.

Für die genannte Mutagenese-PCR fanden die Primer MutaPCRf und MutaPCRr (siehe 2.1.10) Verwendung. Die Primer konnten hierbei so gewählt werden, dass eine Deletion des pathologisch-inserierten Adenins erfolgte und so eine Wiederherstellung der Wildtypsequenz innerhalb des BRET-Sensorplasmids möglich war (siehe Abb. 3.5 A). In der nachfolgenden Gelelektrophorese zeigte sich die erwartete DNA-Fragmentlänge von ca. 5500 bp (siehe Abb. 3.5 B).

A



B

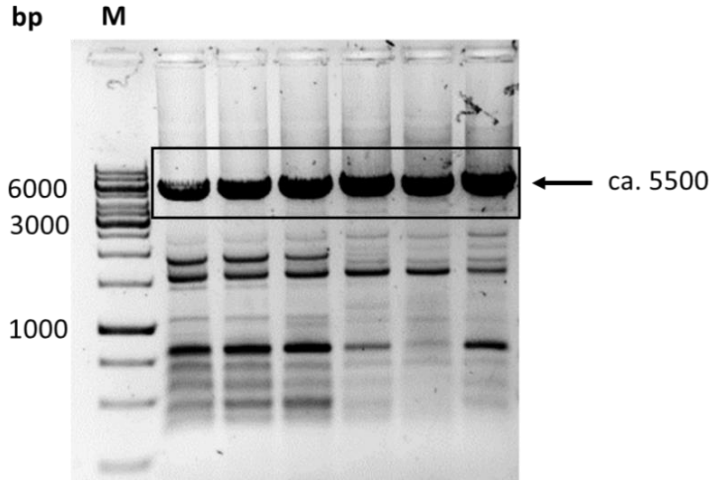


Abbildung 3.5 A: Schematische Darstellung der Mutagenese-PCR zur Generierung des Wildtyp BRET-Sensorplasmids. Der Wildtyp wurde durch Deletion des pathologischen Adenins hergestellt. MutaPCRf bzw. MutaPCRr = Mutagenese-Primer (siehe 2.1.10). WT-DNA = Wildtyp-DNA.

Abbildung 3.5 B: Gelelektrophorese des Wildtyp BRET-Sensorplasmids nach Mutagenese-PCR mit Temperaturgradienten (60 – 71,6 °C). Die markierten (→) Banden wurden ausgeschnitten.

M: Marker (GeneRuler 1 kb DNA-Ladder).

Die erwarteten Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe 2.2.1.13) und mit der gewonnenen DNA eine Transformation in E.coli (siehe 2.2.1.7) durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Mini-Plasmidisolation mittels Puffer (siehe 2.2.1.8). Um den Erfolg der Mutagenese-PCR zu prüfen, erfolgte eine Sequenzierung (siehe 2.2.1.9) des Plasmids mittels Sequenzierprimer SeqKas (siehe 2.1.10) und eine anschließende Maxi-Plasmidisolation (siehe 2.2.1.8).

3.1.4 Dreifach-Transfektion in HEK293T-Zellen

Nach Herstellung der notwendigen Plasmide erfolgte die Transfektion in HEK293T-Zellen als Dreifach-Transfektion (siehe Abb. 3.6). Die verwendeten Transfektionsansätze bei Verwendung des PE2-Komplexes werden in 2.2.2.5 beschrieben. Eine ausreichende Transfektionseffizienz wurde durch Verwendung des pTagGFP2-N Plasmids (siehe 2.1.9) als GFP-Kontrolle geprüft.

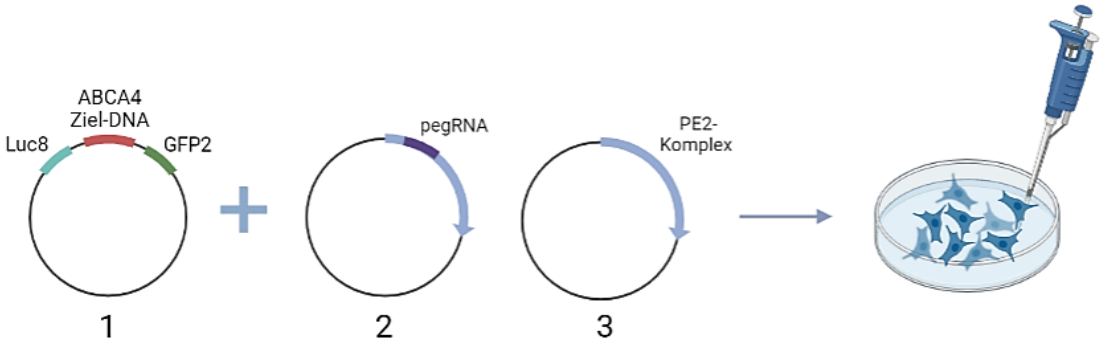
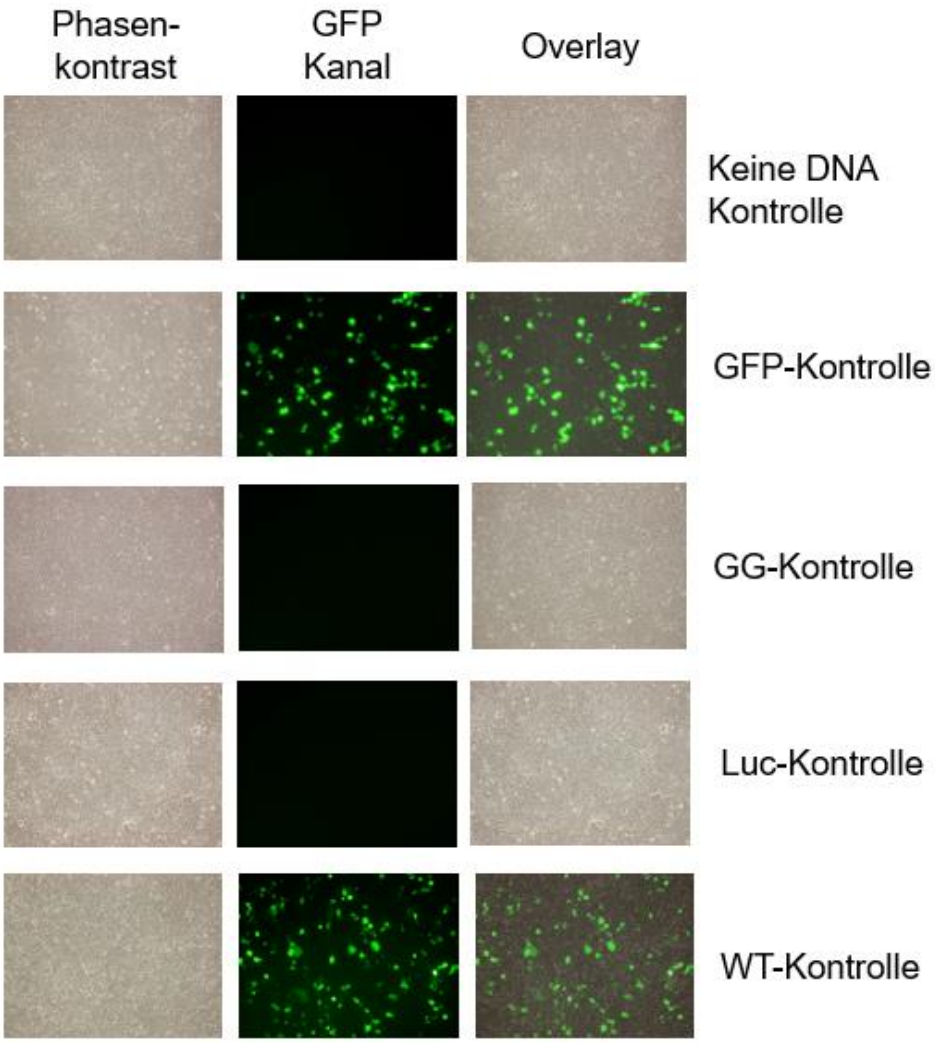


Abbildung 3.6: Übersicht über das Transfektionsschema bei Verwendung des PE2-Systems. 1 = BRET Sensorplasmid, enthält die mutierte Ziel-DNA. Luc8 = Luciferase-Domäne. GFP2 = GFP-Domäne. 2 = pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmid, enthält die pegRNA. 3 = pCMV-PE2 Plasmid, enthält den PE2-Komplex (erstellt mit BioRender.com).

3.1.5 Editierungseffizienz des PE2-Systems

Nach genannter Dreifach-Transfektion schloss sich nach 4-tägiger Kultivierung der HEK293T-Zellen die Inspektion der Fluoreszenz der Zellen mittels Fluoreszenz-Mikroskop an (siehe 2.1.1). Eine ausreichende Transfektionseffizienz konnte durch die GFP-Kontrolle bei allen Versuchsreihen überprüft werden. Die Negativkontrollen (GG- und Luc-Kontrolle) ergaben wie erwartet keine Fluoreszenz, die Positivkontrolle (WT-Kontrolle) wie erwartet eine deutliche Fluoreszenz. Bei den Zellen, die mit den pegRNA-enthaltenden Ansätzen transfiziert wurden (siehe 2.2.2.5), war nur bei wenigen pegRNAs eine vereinzelte und schwache Fluoreszenz sichtbar (siehe Abb. 3.7).



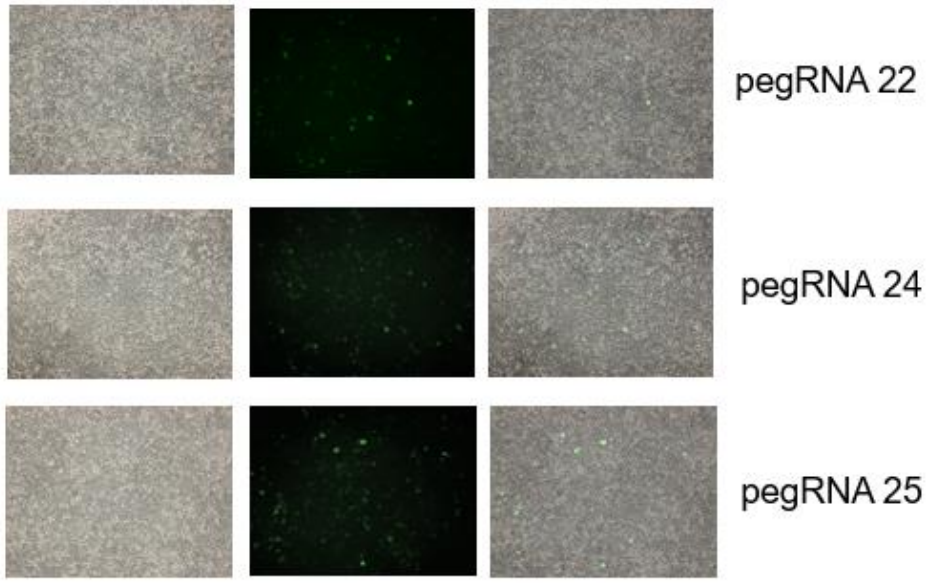


Abbildung 3.7: Fluoreszenzbilder von GFP-Kontrolle, Positivkontrolle (WT), Negativkontrollen (GG, Luc) sowie exemplarisch ausgewählten pegRNAs (22, 24 und 25) 4 Tage nach Transfektion. Die GFP-Kontrolle ergab eine ausreichende Transfektionseffizienz und die WT-Kontrolle eine deutlich sichtbare Fluoreszenz. PegRNAs 22, 24 und 25 fluoreszierten nach Transfektion vereinzelt gering.

Nach der Fluoreszenzüberprüfung erfolgte die Proteinextraktion aus den Zellen (siehe 2.2.3.1) für den nachfolgenden BRET-Assay (siehe 2.2.3.2). Das Prinzip des BRET-Assays wurde genutzt, um den Reparaturerfolg durch die pegRNAs messen und quantifizieren zu können. Durch die im BRET-Sensorplasmid mutierte ABCA4-Sequenz und die daraus resultierende Leserahmenverschiebung (+2) (siehe 1.2.1) ist eine korrekte Expression des GFP2-Gens nicht möglich, woraus sich eine geringe BRET-Ratio ergibt. Durch den Prime Editing Komplex soll nun die ABCA4-Ziel-Sequenz spezifisch durch die Cas9-Nickase geschnitten und mittels pegRNA und Reverse Transkriptase wieder in die Wildtyp-Sequenz transformiert werden. Eine erfolgreiche Korrektur ermöglicht, dass sich das GFP2-Gen wieder im selben Leserahmen wie das Luciferase-Gen (+1) befindet und es somit ordnungsgemäß exprimiert werden kann (siehe Abb. 3.8). Daraus resultiert eine gemäß der Reparatureffizienz der pegRNAs höhere BRET-Ratio.

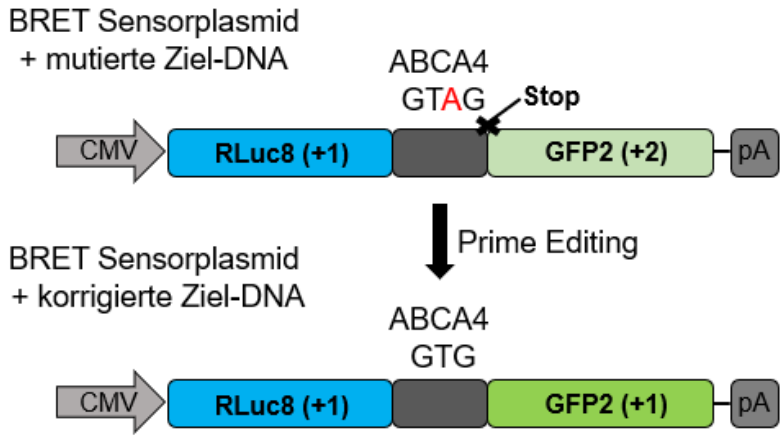


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Leserahmenverschiebung innerhalb des BRET Sensorplasmids durch die Mutation im ABCA4-Gen und deren Korrektur durch den Prime Editing Komplex. Das GFP-Gen befindet sich durch die Mutation in einem anderen Frame (+2) als das Luciferase-Gen (+1). Durch die Korrektur verschiebt sich das Leseraster so, dass sich das GFP-Gen wieder im selben Leserahmen befindet und ordnungsgemäß exprimiert werden kann (verändert nach Wimmer et al. 2023).

Die mittlere BRET-Ratio zeigte für die WT-Kontrolle einen Wert von 128,0 ± 1,0 milli BRET-Units [mBU]. Die Messung der GG-Kontrolle wies eine BRET-Ratio von 22,5 ± 0,7 mBU auf und die der Luc-Kontrolle eine BRET-Ratio von 23,0 ± 0,7 mBU. Die gemessene BRET-Ratio der pegRNAs wurde in die prozentuale Editierungseffizienz umgerechnet (siehe 2.2.4).

Die WT-Kontrolle diente hier und in allen folgenden Versuchsreihen als Referenz für 100%-ige Reparatur, die Luc-Kontrolle als Referenz für 0%-ige Reparatur. Die berechneten Editierungseffizienzen der pegRNAs konnten dementsprechend in die Skala eingeordnet werden.

Die pegRNAs 7 – 18 wiesen nach Transfektion des PE2-Systems eine nicht signifikant erhöhte BRET-Ratio im Vergleich zur Luc-Kontrolle (0%) auf. Bei den pegRNAs 19 – 27 hatten wenige pegRNAs eine signifikant höhere BRET-Ratio (siehe Abb. 3.9 A), woraus sich eine Editierungseffizienz von durchschnittlich 1,7 ± 0,09 % ergab (siehe Abb. 3.9 B). Die höchste Editierungseffizienz zeigte hierbei pegRNA 26 mit 2,6 % (25,7 ± 0,5 mBU). Da nur die pegRNAs 19 – 27 eine (zwar geringe) Reparatur aufwiesen, wurde für den Reparaturversuch mittels PE3- bzw. PE3b-Komplexes lediglich mit den genannten pegRNAs weitergearbeitet und die pegRNAs 7 – 18 hierfür vernachlässigt.

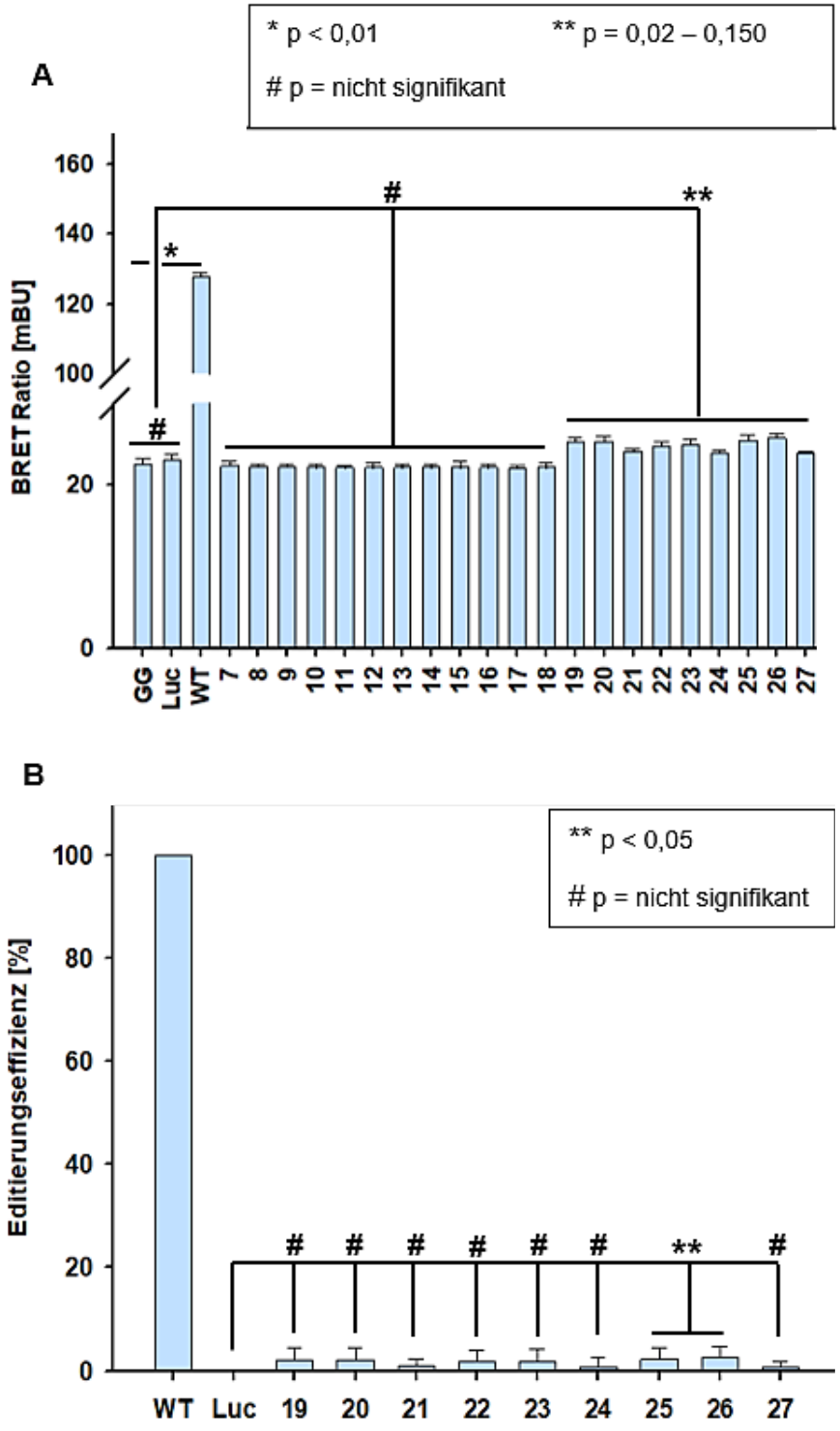


Abbildung 3.9 A: BRET-Ratio der Negativ- (GG, Luc) und Positivkontrolle (WT) sowie der pegRNAs 7-27 nach Transfektion mit dem PE2-System.

Abbildung 3.9 B: Editierungseffizienz der pegRNAs 19-27 innerhalb der Skala von 0-100%. Die Luc-Kontrolle entspricht 0 % Editierungserfolg, die WT-Kontrolle entspricht 100 % Editierungserfolg.

3.2 Experimentelles Design: PE3/3b-System

Um die Editierungseffizienz der pegRNAs zu steigern, wurden insgesamt vier ngRNAs über das PrimeDesign Online-Tool designt und jeweils in das pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0 Plasmid, kurz px459 Plasmid, kloniert. Dieses wurde dem Versuchsaufbau des PE2-Systems hinzugefügt, sodass eine Vierfach-Transfektion in HEK293T-Zellen erfolgte. Die Auswertung des Reparaturerfolgs folgte mittels BRET-Assay. Der experimentelle Aufbau ist in Abbildung 3.10 dargestellt.

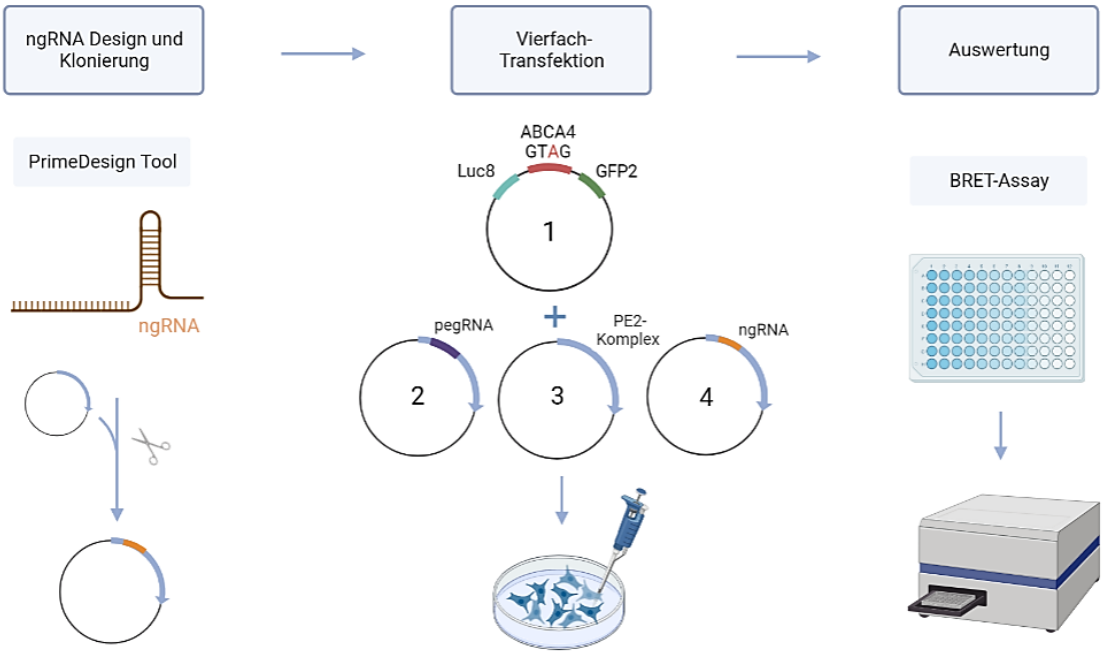


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung des experimentellen Designs bei Verwendung des PE3/3b-Systems. 1 = BRET-Sensorplasmid, enthält die mutierte ABCA4-Sequenz (GTAG). Luc8 = Luciferase-Domäne, GFP2 = GFP-Domäne. 2 = pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmid, enthält die pegRNA. 3 = pCMV-PE2 Plasmid, enthält den PE2-Komplex. 4 = pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 Plasmid, kurz px459 Plasmid, enthält die ngRNA (erstellt mit BioRender.com).

3.2.1 Design der ngRNAs

Das Design der ngRNAs erfolgte analog zu dem der pegRNAs über das PrimeDesign Online-Tool. Es wurden vier ngRNAs ausgewählt, die den komplementären (nicht-editierten) Strang in geringer Distanz zum pegRNA Nick schneiden. NgRNA 1 und 2 sind dabei dem PE3-System zugeordnet, während ngRNA 3 und 4 als PE3b-System

bezeichnet werden. Das PE3b-System hat den Vorteil, dass der nicht-editierte Strang erst genickt wird, wenn das Edit bereits installiert wurde und vermeidet so die Bildung von DSBs.

In Abbildung 3.11 sind die Nicking-Positionen der ngRNAs 1-4 in Bezug zum pegRNA Nick dargestellt.

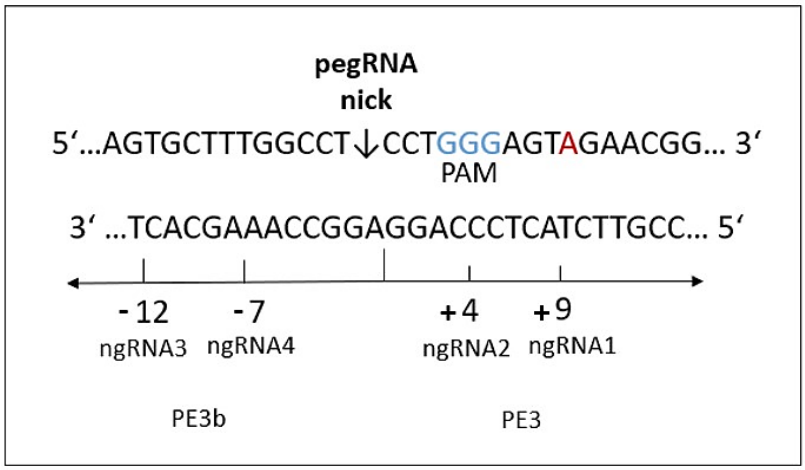


Abbildung 3.11: Übersicht über die Nicking-Positionen der verwendeten ngRNAs im nicht-editierten Strang, ausgehend vom pegRNA Nick. NgRNA 1 und 2 sind dem PE3-Komplex, ngRNA 3 und 4 dem PE3b-Komplex zugeordnet. PAM = protospacer adjacent motif (blau). Adenin (rot) = Mutation.

3.2.2. Klonierung der ngRNAs

Zur späteren Transfektion der ngRNAs wurde das px459 Plasmid (siehe 2.1.9) als Vektor verwendet. Vor Klonierung der ngRNAs konnte das Cas9-Gen, der CMV-Promotor sowie das Puromycin-Resistenzgen des Plasmids zur Größenverringerung mittels Mutagenese-PCR (siehe 2.2.1.11) deletiert werden. Hierzu wurden die Primer DelCasf und DelCasr (siehe 2.1.10) verwendet. In der Gelelektrophorese zeigte sich die erwartete Fragmentlänge von ca. 3400 bp (siehe Abb. 3.12).

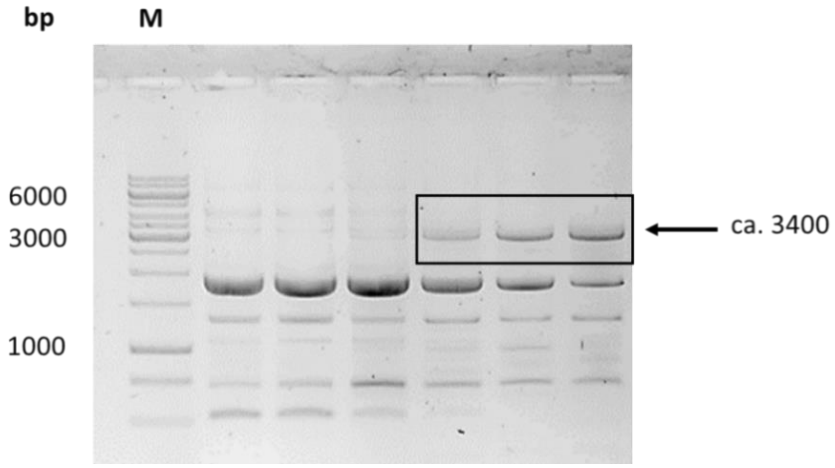


Abbildung 3.12: Gelelektrophorese nach Deletion des px459 Plasmids mittels Mutagenese-PCR mit Temperaturgradienten (60 – 71,6 °C). Die markierten (→) Banden wurden ausgeschnitten. M: Marker (GeneRuler 1 kb DNA-Ladder).

Diese Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe 2.2.1.13) und mit der gewonnenen DNA eine Transformation in E.coli (siehe 2.2.1.7) durchgeführt. Anschließend erfolgte eine Mini-Plasmidisolation mittels Puffer (siehe 2.2.1.8). Zur Überprüfung der erfolgreichen Deletion des Cas9-Gens wurde ein Analyse-Verdau mit EcoRV und BbsI durchgeführt (siehe 2.2.1.2). Hierbei führt der Verdau mittels BbsI zu einer Linearisierung des Plasmids, wobei EcoRV eine Schnittstelle innerhalb des Cas9-Gens besitzt, sodass bei nicht erfolgter Deletion eine Doppelbande entsteht. Es zeigte sich bei fast allen Proben die erwartete Einzelbande mit einer DNA-Fragmentlänge von 3400 bp (siehe Abb. 3.13).

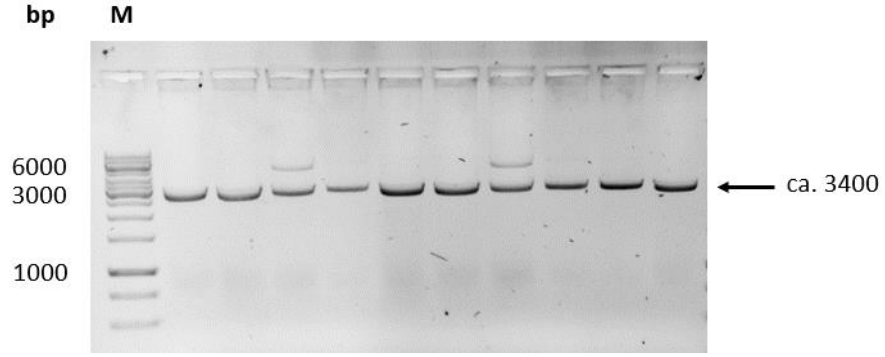


Abbildung 3.13: Analyse-Verdau des px459 Plasmids nach Deletion. Bei den Proben, die eine Doppelbande zeigten, war die Deletion nicht erfolgreich. M: Marker (GeneRuler 1kb DNA-Ladder).

Die Proben, welche die erwarteten Fragmente zeigten, wurden mittels Sequenzierung auf ihre Richtigkeit überprüft. Hierzu kam als Sequenzierprimer Wolle 610 (siehe 2.1.10) zur Anwendung. Die Plasmidaufreinigung erfolgte mittels Midi-Plasmidisolation (siehe 2.2.1.8).

Die Oligonukleotide für die ngRNAs (siehe 2.1.10) wurden genauso mittels „PrimeDesign“ Online-Tool ausgewählt und anschließend hybridisiert (siehe 2.2.1.1). Zur Klonierung wurde das deletierte px459 Plasmid mit BbsI verdaut (siehe 2.2.1.2) und die jeweilige, hybridisierte ngRNA ligiert (siehe 2.2.1.4). Nach Transformation in E.coli (siehe 2.2.1.7) erfolgte eine Mini-Plasmidisolation mittels Puffer (siehe 2.2.1.8). Die erfolgreiche Klonierung wurde mittels Primer Wolle 610 (siehe 2.1.10) durch Sequenzierung (siehe 2.2.1.9) überprüft und anschließend eine Maxi-Plasmidisolation (siehe 2.2.1.8) durchgeführt.

3.2.3 Vierfach-Transfektion in HEK293T-Zellen

Durch Zugabe des px459 Plasmids, welches die ngRNA enthält, erfolgte die Transfektion in HEK293T-Zellen als Vierfach-Transfektion (siehe Abb. 3.14). Die Transfektionsansätze bei Verwendung des PE3/3b-Komplexes sind in 2.2.2.5 beschrieben. Eine ausreichende Transfektionseffizienz wurde durch Nutzung des pTagGFP2-N Plasmids (siehe 2.1.9) als GFP-Kontrolle geprüft.

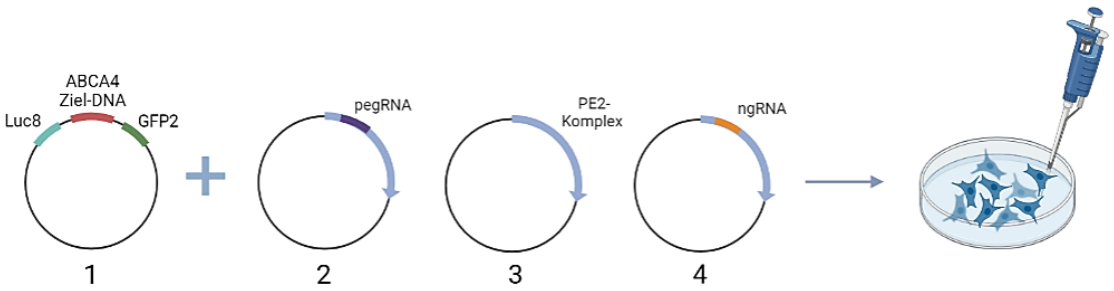
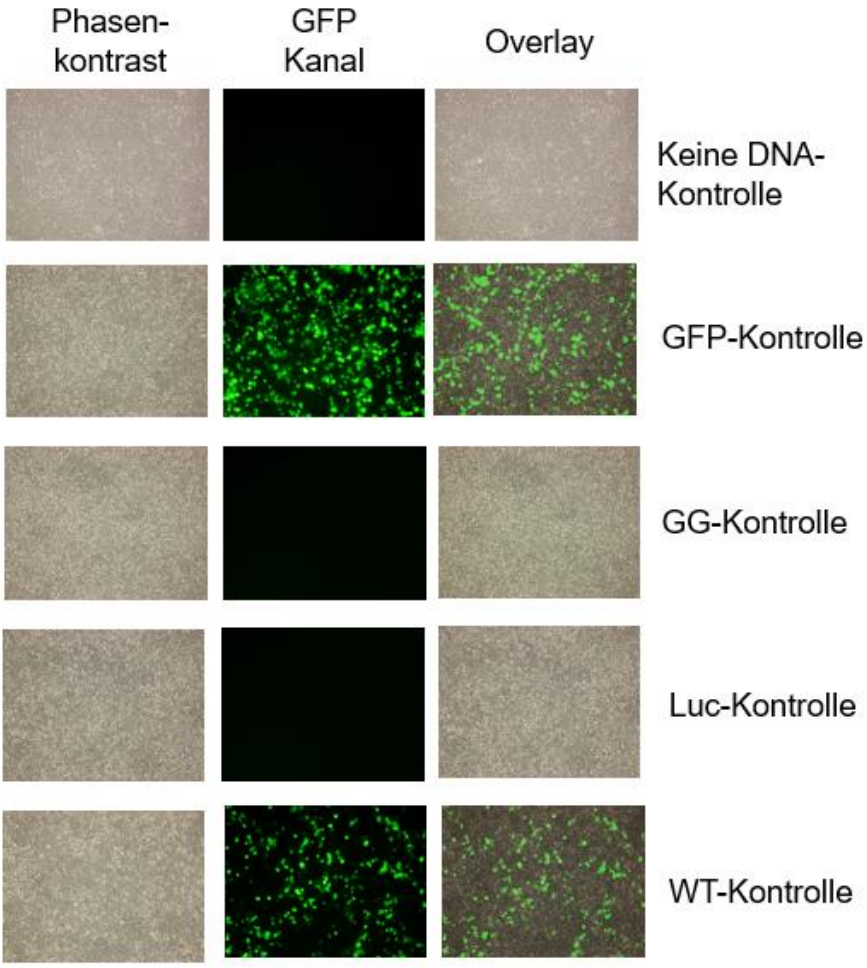


Abbildung 3.14: Übersicht über das Transfektionsschema bei Verwendung des PE3/3b-Systems. 1 = BRET Sensorplasmid, enthält die mutierte Ziel-DNA. Luc8 = Luciferase-Domäne. GFP2 = GFP-Domäne. 2 = pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmid, enthält die pegRNA. 3 = pCMV-PE2 Plasmid, enthält den PE2-Komplex. 4 = pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 Plasmid, kurz px459 Plasmid, enthält die ngRNA (erstellt mit BioRender.com).

3.2.4 Editierungseffizienz des PE3- und PE3b-Systems

Zusätzlich zu oben genanntem Transfektionsschema für das PE2-System wurde für den Reparaturversuch durch den PE3- bzw. PE3b-Komplex das px459 Plasmid mit enthaltener ngRNA hinzugefügt (siehe 2.2.2.5), sodass eine Vierfach-Transfektion erfolgte (siehe Abb. 3.6). Nach 4-tägiger Inkubation folgte eine Fluoreszenz-Mikroskopie der Zellen. Die GFP-Kontrolle zeigte hier ebenfalls eine ausreichende Transfektionseffizienz. Die Negativkontrollen (GG- und Luc-Kontrolle) wiesen auch hier wie erwartet keine Fluoreszenz auf, wobei die Positivkontrolle (WT-Kontrolle) deutlich fluoreszierte (siehe Abb. 3.15). Die mit pegRNA und zusätzlich ngRNA transfizierten Zellen (siehe 2.2.2.5) zeigten eine sichtbare Fluoreszenz. Hierbei fluoreszierten die Zellen, die mit pegRNA und ngRNA 3 oder ngRNA 4 transfiziert wurden, besonders deutlich (siehe Abb. 3.15).



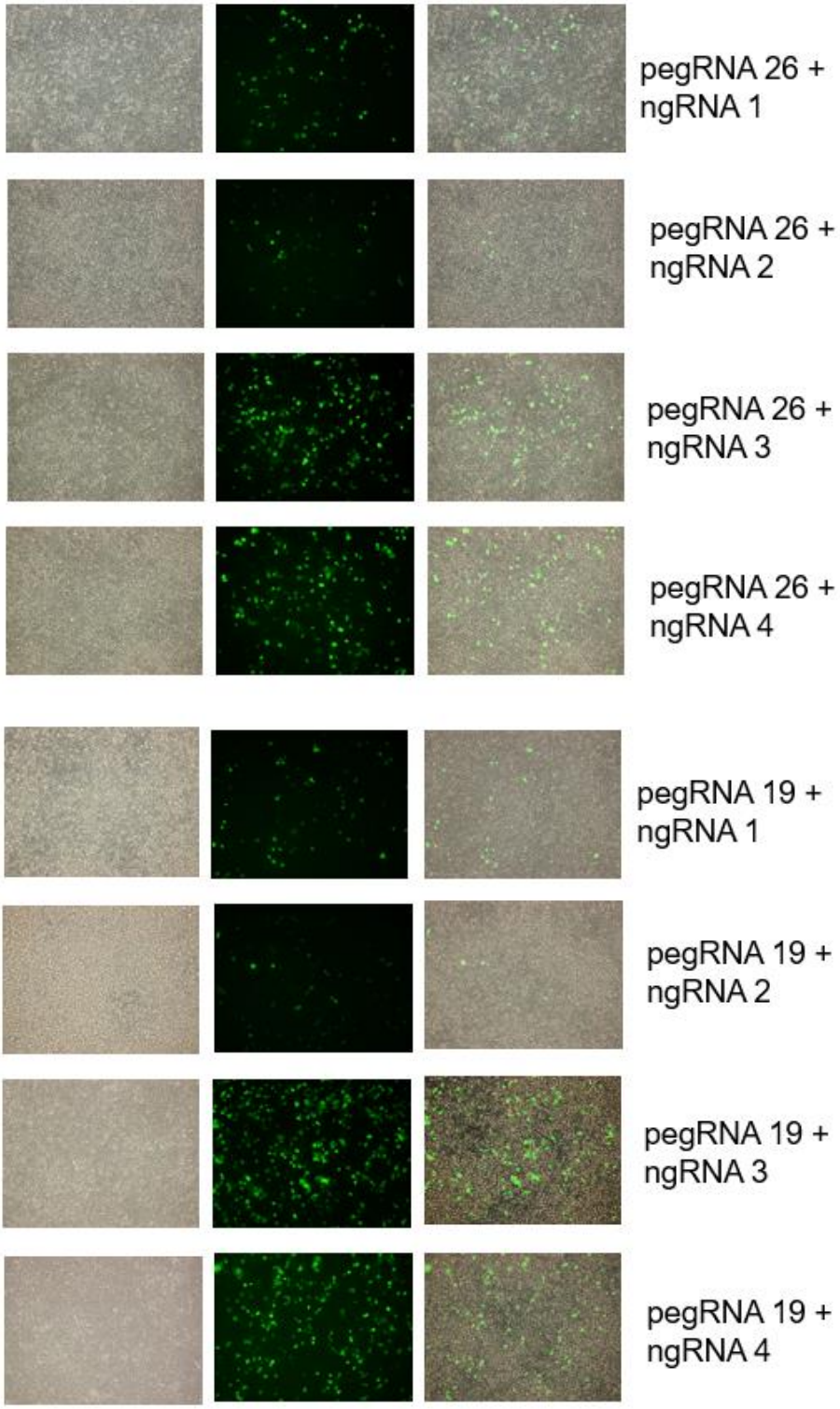


Abbildung 3.15: Fluoreszenzbilder von GFP-Kontrolle, Positivkontrolle (WT), Negativkontrollen (GG, Luc) sowie exemplarischen pegRNAs (19 und 26) Co-transfiziert mit ngRNA 1-4 (PE3- bzw. PE3b-System) vier Tage nach Transfektion. Die GFP-Kontrolle zeigte eine ausreichende Transfektionseffizienz, die WT-Kontrolle fluoreszierte deutlich sichtbar. PegRNAs 19 und 26 wiesen vor allem nach Co-Transfektion mit ngRNA 3 bzw. 4 eine gut sichtbare Fluoreszenz auf.

Nach Fluoreszenzüberprüfung erfolgte analog die Proteinextraktion aus den Zellen (siehe 2.2.3.1) für den folgenden BRET-Assay (siehe 2.2.3.2). Durch die zusätzlichen ngRNAs konnte die BRET-Ratio im Vergleich zum PE2-System signifikant gesteigert werden.

Im Falle der Transfektion der pegRNAs 19 – 27 mit ngRNA 1 zeigte die WT-Kontrolle eine BRET-Ratio von 157,2 ± 8,0 mBU, die GG-Kontrolle eine BRET-Ratio von 24,4 ± 1,6 mBU und die Luc-Kontrolle eine BRET-Ratio von ebenso 24,4 ± 1,1 mBU. Im Vergleich zu den pegRNAs ohne ngRNA wiesen die pegRNAs, die mit ngRNA 1 transfiziert wurden, eine signifikant höhere BRET-Ratio zwischen 83,7 und 101,8 mBU auf (siehe Abb. 3.16 A). Dies entsprach einer durchschnittlichen Editierungseffizienz von 50,8 ± 7,5 %. Die Kombination aus pegRNA 19 und ngRNA 1 erzielte hierbei mit 58,3 % (101,8 ± 3,4 mBU) den höchsten Reparaturerfolg (siehe Abb. 3.16 B).

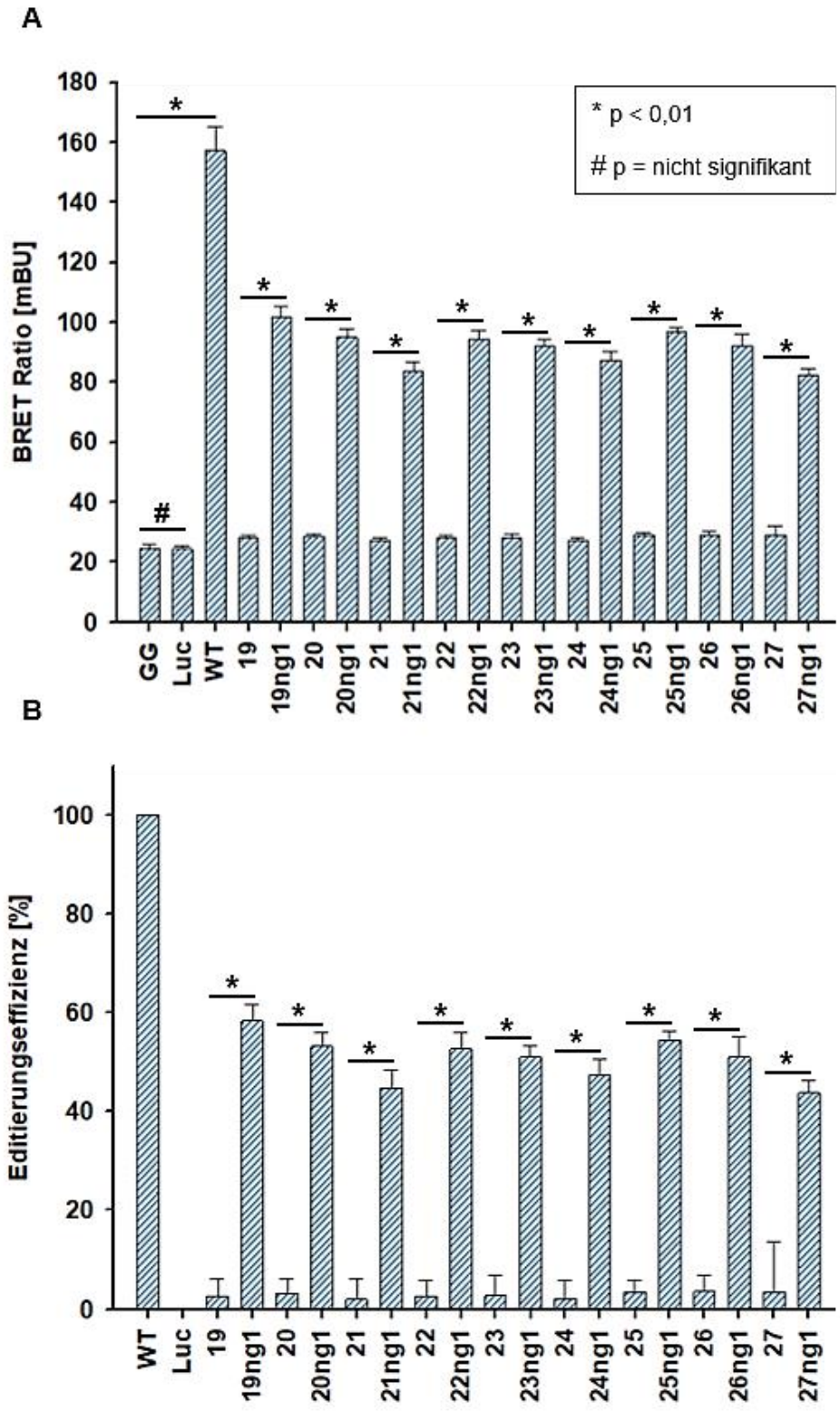


Abbildung 3.16 A: BRET-Ratio der Negativ- (Luc) und Positivkontrolle (WT) sowie der pegRNAs 19-27 nach Transfektion mit bzw. ohne ngRNA1 (PE3-System).

Abbildung 3.16 B: Editierungseffizienz der pegRNAs 19-27 mit bzw. ohne ngRNA1 innerhalb der Skala von 0-100%. Die Luc-Kontrolle entspricht 0 % Editierungserfolg, die WT-Kontrolle entspricht 100 % Editierungserfolg.

Bei der Transfektion der pegRNAs 19-27 mit ngRNA 2, 3 und 4 wurde die WT-Kontrolle mit einer BRET-Ratio von 136,5 ± 5,0 mBU gemessen. Die BRET-Ratio der GG-Kontrolle betrug 24,2 ± 0,7 mBU, die der Luc-Kontrolle 24,3 ± 0,6 mBU.

Die pegRNAs, die mit ngRNA 2 transfiziert wurden, wiesen im Vergleich zu den pegRNAs ohne ngRNA eine ebenfalls signifikant höhere BRET-Ratio auf. Allerdings zeigten sie im Vergleich zum Versuch mit ngRNA 1 eine geringere BRET-Ratio zwischen 42,6 und 51,0 mBU (siehe Abb. 3.17 A). Die Editierungseffizienz betrug somit durchschnittlich 20,1 ± 3,7 %, wobei pegRNA 19 zusammen mit ngRNA 2 mit 23,8 % (51,0 ± 2,2 mBU) noch den höchsten Reparaturerfolg erzielte (siehe Abb. 3.17 B).

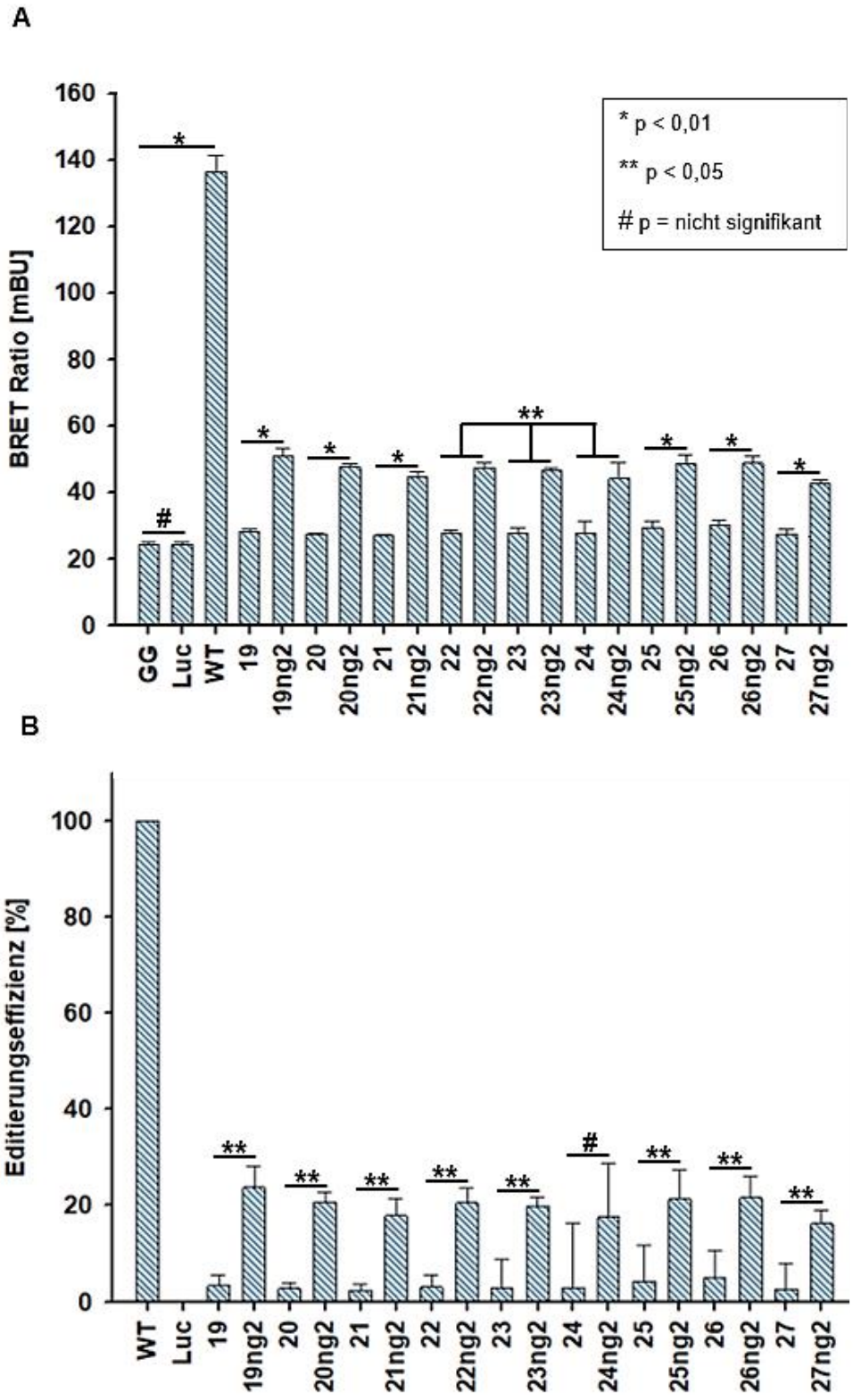


Abbildung 3.17 A: BRET-Ratio der Negativ- (Luc) und Positivkontrolle (WT) sowie der pegRNAs 19-27 nach Transfektion mit bzw. ohne ngRNA2 (PE3-System).

Abbildung 3.17 B: Editierungseffizienz der pegRNAs 19-27 mit bzw. ohne ngRNA2 innerhalb der Skala von 0-100%. Die Luc-Kontrolle entspricht 0 % Editierungserfolg, die WT-Kontrolle entspricht 100 % Editierungserfolg.

Nach der Transfektion der pegRNAs mit ngRNA 3, zeigte sich im BRET-Assay eine hoch signifikante BRET-Ratio zwischen 107,4 und 119,0 mBU im Vergleich zu den pegRNAs ohne ngRNA (siehe Abb. 3.18 A). Dies entsprach einer Editierungseffizienz von durchschnittlich 79,4 ± 5 %. Den höchsten Reparaturerfolg erzielte hierbei mit 84,4 % (119,0 ± 8,9 mBU) die Kombination aus pegRNA 25 und ngRNA 3 (siehe Abb. 3.18 B).

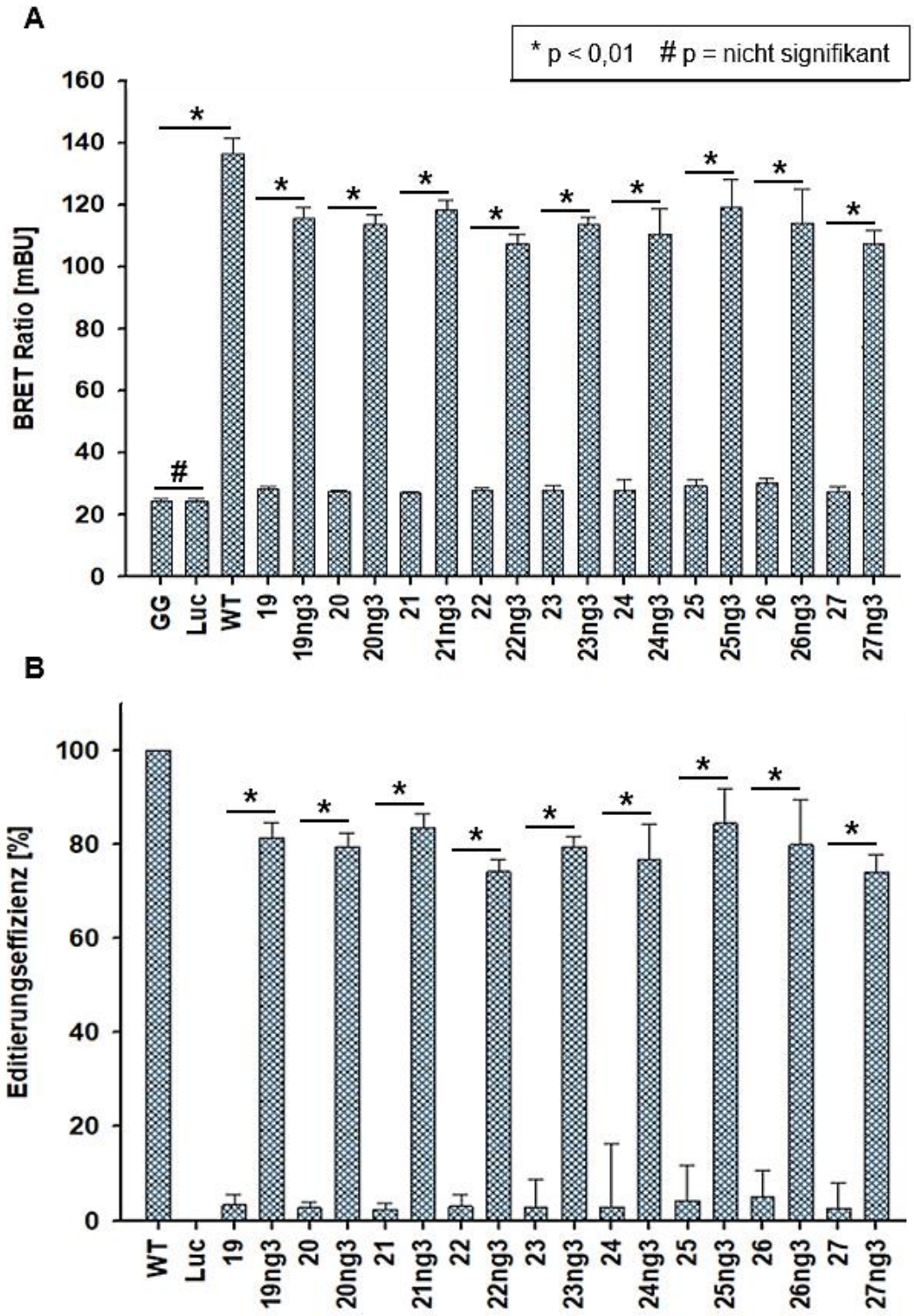


Abbildung 3.18 A: BRET-Ratio der Negativ- (Luc) und Positivkontrolle (WT) sowie der pegRNAs 19-27 nach Transfektion mit bzw. ohne ngRNA3 (PE3b-System).

Abbildung 3.18 B: **Editierungseffizienz der pegRNAs 19-27 mit bzw. ohne ngRNA3 innerhalb der Skala von 0-100%.** Die Luc-Kontrolle entspricht 0 % Editierungserfolg, die WT-Kontrolle entspricht 100 % Editierungserfolg.

Die pegRNAs, welche gemeinsam mit ngRNA 4 transfiziert wurden, zeigten ebenfalls eine hoch signifikante BRET-Ratio zwischen 113,7 und 126,6 mBU im Vergleich zu den pegRNAs ohne ngRNA (siehe Abb. 3.19 A). Die Editierungseffizienz betrug damit durchschnittlich 84,2 ± 7 %. Die Kombination aus pegRNA 26 und ngRNA 4 wies hierbei mit 91,2 % (126,6 ± 6,3 mBU) den prozentual höchsten Reparaturerfolg auf, bezogen auf alle in dieser Arbeit durchgeführten Prime Editing Versuchsreihen (siehe Abb. 3.19 B).

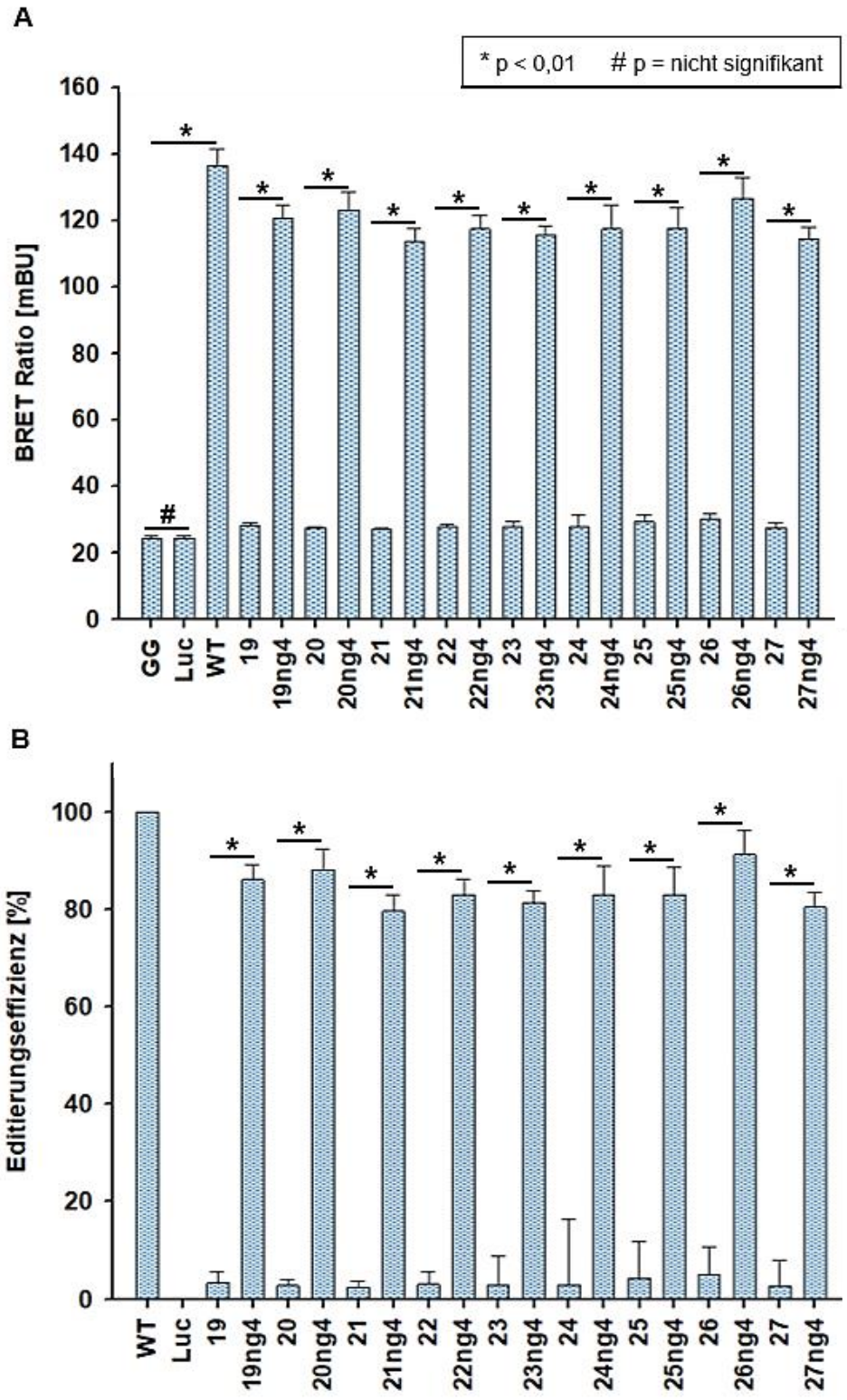


Abbildung 3.19 A: BRET-Ratio der Negativ- (Luc) und Positivkontrolle (WT) sowie der pegRNAs 19-27 nach Transfektion mit bzw. ohne ngRNA4 (PE3b-System).

Abbildung 3.19 B: Editierungseffizienz der pegRNAs 19-27 mit bzw. ohne ngRNA4 innerhalb der Skala von 0-100%. Die Luc-Kontrolle entspricht 0 % Editierungserfolg, die WT-Kontrolle entspricht 100 % Editierungserfolg

4. Diskussion

Anhand der dargestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass eine Korrektur der genannten Insertionsmutation (siehe 1.2.1) innerhalb des BRET-Sensorplasmids mittels Prime Editing möglich ist. Besonders die Korrektur mithilfe des PE3 bzw. PE3b-Systems wies aufgrund der zusätzlich verwendeten ngRNAs eine hohe Effizienz auf.

Die Entdeckung des Prime Editors als neues Genomeditierungs-Tool geht auf David Liu und seine Arbeitsgruppe zurück. Hier konnte bereits eine erfolgreiche Anwendung des PE2- und PE3-Systems in u.a. HEK293T-Zellen nachgewiesen werden. Im Vergleich zur ersten Prime Editor Generation PE1 (in dieser Arbeit nicht beschrieben) erzielte der PE2 je nach Ziel-Modifikation und Locus eine 1,6- bis 5,1-fache Effizienzsteigerung. Durch Anwendung des erweiterten PE3- bzw. PE3b-Systems verbesserte sich die Effizienz im Vergleich zum PE2-System um ein 1,5- bis 4,2-faches (Anzalone et al. 2019).

Diese Effizienzsteigerung konnte in dieser Arbeit reproduziert und bestätigt werden. Im gewählten Versuchsaufbau konnte für den PE2-Komplex eine durchschnittliche Editierungseffizienz von 1,70 % gemessen werden (siehe 3.2.4). Die Nutzung des PE3- bzw. PE3b-Systems steigerte diese je nach genutzter ngRNA deutlich auf durchschnittlich 50,73 % (ngRNA1), 20,0 % (ngRNA2), 79,27 % (ngRNA3) bzw. 83,97% (ngRNA4) (siehe 3.2.4).

Einfluss des pegRNA Designs auf die Editierungseffizienz

Mehrere Arbeitsgruppen untersuchten bereits den Einfluss von pegRNA Design und die Zugabe einer zusätzlichen ngRNA auf die Editierungseffizienz (Anzalone et al. 2019; Kim et al. 2021). Die pegRNAs sowie auch die ngRNAs wurden wie bereits genannt mithilfe des „PrimeDesign“ Online-Tools generiert, deren Sequenzen finden sich in Tabelle 11.1 (Anhang) aufgelistet. In Tabelle 3.1 sind die einzelnen pegRNA Anteile vergleichend aufgeführt sowie deren peg-to-edit distance.

Betrachtet man die Ergebnisse, scheint bezogen auf die pegRNAs besonders die peg-to-edit distance einen Einfluss auf die Effizienz zu haben. Die pegRNAs 19 - 27, welche eine peg-to-edit distance von 9 Nukleotiden (nt) besitzen, zeigten bereits bei Anwendung des PE2-Systems eine teils signifikant höhere BRET-Ratio bzw. Editierungseffizienz als die pegRNAs 7 – 18 mit einer peg-to-edit distance von 10 nt (siehe Tabelle 3.1). Auffallend ist außerdem, dass das RT-Template der pegRNAs 19-27 mit 16-18 nt länger war

als das der restlichen pegRNAs, wobei die PBS bei allen pegRNAs gleichbleibend zwischen 12 und 14 nt variierte. Man könnte daher vermuten, dass eine längere RT-Template zu einem größeren Editierungserfolg führt. Allerdings ist dies keine allgemeine Empfehlung, denn je nach Ziel-DNA und gewünschtem Edit variieren die Längen der pegRNA-Anteile stark. David Liu und seine Arbeitsgruppe empfehlen mit einer PBS von 13 nt und einem RT-Template von 10-16 nt zu beginnen und die Längen der einzelnen Anteile im Zuge der Optimierung leicht zu verändern (Anzalone et al. 2019; Kim et al. 2021).

Zu bedenken ist, dass sich bereits kleine Veränderungen im pegRNA Design entscheidend auf die Effizienz auswirken können und ein Ausprobieren verschiedener Designs sinnvoll ist.

Effizienzsteigerung durch ngRNAs

Neben der Wahl der pegRNAs ist die Auswahl der ngRNAs entscheidend für gute Editierungsergebnisse. Anzalone et al. konnten bei zusätzlicher Verwendung von verschiedenen ngRNAs eine ca. 2- bis 4-fache Steigerung der Reparatureffizienz im Vergleich zum PE2-System erzielen (Anzalone et al. 2019).

In dieser Arbeit wurden von den durch das PrimeDesign-Tool vorgeschlagenen ngRNAs vier ausgewählt. Es konnte reproduziert werden, dass der Einsatz der ngRNAs (hier 1-4) im Vergleich zum PE2-System zu einer erheblichen Steigerung der Effizienz führte. Die durchschnittlich höchsten Reparaturraten der pegRNAs wurden in Kombination mit ngRNA 4 erzielt (siehe 3.2.4).

Wie in Abbildung 3.11 gezeigt wird, unterscheiden sich die nicking Positionen der vier gewählten ngRNAs teilweise nur um wenige nt und befinden sich alle relativ nahe in Relation zum pegRNA nick. Die ngRNAs 1 und 2 sind dabei dem PE3-System zugeordnet, können also den nicht-editierten Strang an Position +4 bzw. +9 jederzeit nicken, auch wenn das Edit noch nicht erfolgreich in den komplementären Strang eingebaut wurde. Dadurch kann es zu simultanem Schneiden durch pegRNA und ngRNA und damit zu unerwünschten Doppelstrangbrüchen der DNA kommen. Es war zwar nachzuweisen, dass auch mit ngRNA 1 und 2 die Editierungseffizienz im Vergleich zum PE2-System deutlich gesteigert werden konnte, jedoch ist durch den DSB vermutlich auch die Indel-Rate höher als beim PE2-System.

Die ngRNAs 3 und 4 sind im Gegenzug dem PE3b-System zugeordnet und nicken den nicht-editierten Strang an Position -12 bzw. -7 erst, wenn der Ziel-Strang erfolgreich

editiert wurde. Durch diese zeitliche Verzögerung kann die Indel-Rate bei gleichbleibender oder höherer Editierungseffizienz, verglichen mit dem PE3-System, deutlich reduziert werden. Daher sollte das PE3b-System, wann immer möglich, dem PE3-System vorgezogen werden (Anzalone et al. 2019).

Allerdings wurde die Indel-Rate in dieser Arbeit nicht untersucht. Die Ergebnisse zeigten jedoch bei Anwendung des PE3b-Systems einen größeren Editierungserfolg als das PE3-System (siehe 3.2.4).

Weitere Einflussfaktoren

Im Zuge intensiver Forschung konnten weitere Einflussfaktoren identifiziert werden, die die Reparatureffizienz der PEs vermutlich weiter positiv beeinflussen.

Beispielsweise scheint eine Erhöhung der pegRNA Expression zu einer verbesserten Effizienz zu führen. Hierzu könnte einerseits die Zahl der pegRNA Expressionskassetten innerhalb des Vektors verdoppelt und andererseits zwei Promotor-Systeme anstatt eines verwendet werden. Durch dieses Vorgehen wurde in Mais-Zellen eine Prime Editing Effizienz von bis zu 53 % erzielt (Jiang et al. 2020).

Eine weitere Herangehensweise könnte den Einsatz von Cas9-Varianten beinhalten, die flexible Eigenschaften bezüglich PAM-Erkennung besitzen. Durch Modifizierung des häufig genutzten Cas-Enzyms (SpCas9) wäre es möglich, neben der klassischen NGG PAM, relativ variable PAM-Sequenzen zu erkennen und damit die Einsatzmöglichkeiten der Prime Editors weiter zu steigern. Kweon et al. konnten sechs verschiedene SpCas9 Varianten innerhalb des PE2 generieren und verglichen deren Editierungseffizienz in über 50 verschiedenen Mutationen mit der des Wildtyp SpCas9-PE2 in HEK293T-Zellen. Die klassische NGG PAM wurde vom Wildtyp SpCas9 besser erkannt als von den Varianten und die Zielregion konnte bis zu 10 % korrekt editiert werden. Die SpCas9 Varianten zeigten jedoch eine hohe Editierungseffizienz von bis zu 51,7 % bei nicht-kanonischen PAM-Sequenzen wie beispielsweise NGA oder NGC. Mit dieser Steigerung an Flexibilität könnten Prime Editors theoretisch bis zu 94,4 % aller humanen genetischen Mutationsvarianten (vgl. Abb. 1.6) korrigieren (Kweon et al. 2021).

Nutzung von Prime Editing Online-Tools

Mittlerweile sind mehrere Design-Tools entwickelt worden, die den teilweise komplexen Prime Editing Planungsprozess erheblich erleichtern können (Hwang et al. 2021). Das

verwendete PrimeDesign-Tool von Pinellolab generiert nach Eingabe der Zielsequenz und Definition der gewünschten Modifikation nicht nur eine größere Auswahl an vermeintlich erfolgsversprechenden pegRNAs und ngRNAs, sondern empfiehlt gezielt auch ein vermutlich optimales Design. Für die in dieser Arbeit gewünschte Modifikation der Ziel-DNA wurde durch das Online-Tool ein spezifisches pegRNA Design, bestehend aus 13 nt PBS und 19 nt RT-Template, vorgeschlagen. Dieser Empfehlung entspricht die in dieser Arbeit verwendete pegRNA 26, die gemeinsam mit ngRNA 4 mit 91,20 % Editierungseffizienz das beste Ergebnis von allen Kombinationen erzielte (siehe 3.2.4).

Dieses Ergebnis indiziert, dass Online-Tools wie PrimeDesign eine gute prädiktive Aussage über den tatsächlichen Reparaturerfolg der empfohlenen pegRNAs treffen können. Allerdings ist es auch hier entscheidend, welche Modifikation und welche Zielregion angestrebt wird, sodass die vorgeschlagenen pegRNA Designs oftmals nachträglich angepasst werden müssen. Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass Tools wie PrimeDesign eine umfassende und relativ einfach anwendbare Methode für die automatische Generierung von pegRNAs und ngRNAs darstellen. Durch den freien Zugang der Anwendung wird die Nutzung von Prime Editing in den verschiedensten Forschungsbereichen vereinfacht und verbessert (Hsu et al. 2021).

Vergleich mit HDR-basierten Ansätzen und Base Editors

Prime Editors bieten möglicherweise nicht nur aufgrund hoher Reparatureffizienz großes Potential für zukünftige therapeutische Genomeditierung. Auch die Indel-Rate erscheint deutlich niedriger als beispielsweise bei Reparaturversuchen mittels HDR (siehe 1.5.2). In vier Zelllinien wurde die Indel-Rate nach Installation von verschiedenen Transversions- und Insertionsmutationen durch PE3 bzw. durch HDR untersucht. Im Vergleich zu den HEK293T-Zellen, die mit HDR modifiziert wurden, war das Verhältnis von korrekter Modifikation zu Indels 270-fach höher bei den PE3- behandelten Zellen. In Bezug auf die Effizienz fiel die Reparatur durch HDR vergleichbar oder geringer als die von PE3 aus (Anzalone et al. 2019). Dieses Ergebnis impliziert, dass durch HDR womöglich eine ähnlich gute Editierungseffizienz erzielt werden könnte, wobei allerdings durch die Erzeugung eines Doppelstrangbruchs mit einer deutlich höheren Rate an unerwünschten Indels gerechnet werden muss.

Neben Prime Editors gehören u.a. die Base Editors (siehe 1.6.1) zu den neuen Genomeditierungsmethoden. Sie wurden ebenfalls durch David Liu und seine Arbeitsgruppe erstmalig beschrieben und weisen hohes therapeutisches Potenzial durch eine effiziente Reparatur von Transitionsmutationen auf. Hier übersteigt die Reparatureffizienz der

Base Editors die der Prime Editors, sodass BEs bei dieser Mutationsart noch bevorzugt genutzt werden sollten (Schene et al. 2020).

Allerdings bieten Base Editors zum jetzigen Zeitpunkt deutlich weniger vielfältige Einsatzmöglichkeiten als Prime Editors und können zudem durch ihre Funktionsweise vermehrt off-target Effekte (Modifikation einer oder mehrerer Basen außerhalb der Zielregion) hervorrufen. Besonders Cytosin Base Editors scheinen zu einer höheren Rate an off-target Effekten und Indels zu führen als Adenosin Base Editors. Dies resultiert in Sicherheitsbedenken bezüglich einer zukünftigen klinischen Anwendung und erfordert eingehendere Forschung (Zuo et al. 2019; Grünewald et al. 2019).

Die Anwendung von Prime Editors kann jedoch ebenfalls zu (geringen) off-target Effekten führen. In einer Vergleichsstudie wurde die Häufigkeit von off-target Effekten von PE2 bzw. PE3 und der von Cas9 (mit zugehörigen sgRNAs) in HEK293T-Zellen untersucht. Die mit PE2 transfizierten Zellen zeigten eine geringe off-target editing Rate von max. 3,5 % der untersuchten off-target Loci, wohingegen die von PE3 max. 0,1 % ergab. Die mit Cas9 und sgRNA transfizierten Zellen wiesen allerdings, je nach Locus und sgRNA, eine off-target editing Rate von bis zu 81,1 % auf (Anzalone et al. 2019). Durch das Schneiden von nur einem DNA-Strang durch den Prime Editor wird somit das Auftreten unerwünschter Editierung weitgehend minimiert. Trotz allem bleibt die vollständige Vermeidung von off-target Effekten weiterhin Gegenstand der Forschung.

Einsatz von Prime Editing in vivo

Eine erfolgreiche Anwendung des Prime Editing Systems in vitro lässt allerdings nur unzureichende Erkenntnisse hinsichtlich zukünftiger therapeutischer Anwendung zu, sodass die Forschung in vivo immer größeren Stellenwert erlangt.

Als eine der ersten Arbeitsgruppen nutzen Liu et al. das PE3-System, um gezielte Punktmutationen in zwei Genen (Ar- und Hoxd13-Gen) in Maus-Embryos zu erzeugen. Der PE3 zeigte in den injizierten Embryos eine Editierungseffizienz von bis zu 18,5 % bei geringer Indel-Rate. Jedoch wurden, abgesehen von den gewünschten Mutationen, weitere unerwünschte Modifikationen innerhalb der Zielregion detektiert. Die Embryos wurden folgend in Muttertiere transferiert. Es konnte beobachtet werden, dass post partum 10 von 49 Mäusen die gewünschten Mutationen trugen und dies bei niedriger Indel-Rate. Allerdings kam es wie bei den Embryos auch hier zu unerwünschten Mutationen innerhalb der Zielregion. Off-target Effekte konnten nicht nachgewiesen werden (Liu et al. 2020).

Schene et al. nutzten Prime Editing, um krankheitsauslösende Mutationen bezüglich DGAT1-Defizienz und Morbus Wilson in intestinalen Organoiden von erkrankten Personen zu korrigieren. Organoide weisen wichtige funktionelle Eigenschaften von Organen auf und tragen durch ihre 3D-Struktur dazu bei, die Modellierung von monogenen Krankheiten zu verbessern. Durch den Einsatz des PE3-Systems konnten 30-50 % der gewünschten Edits installiert werden, während unerwünschte Modifikationen in der Zielregion mit einer Rate von 1-4 % auftraten. Analog zur obigen Studie wurden keine off-target Effekte festgestellt (Schene et al. 2020).

Diese Ergebnisse unterstützen das Potential von Prime Editing für den klinisch-therapeutischen Einsatz. Zuvor müssen dennoch unerwünschte Modifikationen möglichst unterbunden werden, um die Sicherheit einer künftigen Therapie zu erhöhen.

Besonders in Bezug auf diese Arbeit ist anzumerken, dass Prime Editors vor allem für postmitotisches Gewebe wie neuronale oder retinale Zellen einen großen Vorteil gegenüber herkömmlichen gentherapeutischen Verfahren bieten, da sie unabhängig vom Zellzyklus agieren. Liu et al. transduzierten primäre kortikale Neuronen von E18.5 Mäusen mit einem lentiviralen Vektor (siehe 1.3), der das PE3-System beinhaltete. Die gewünschte Transversion wurde innerhalb des DNMT1-Gens mit einer Editierungseffizienz von 7,1 % und einer Indel-Rate von 0,58 % gemessen (Anzalone et al. 2019).

Eine in vivo Anwendung von Prime Editing in beispielsweise retinalen oder neuronalen Zellen erscheint also möglich und ist Bestandteil derzeitiger und zukünftiger Forschung.

Ausblick

Das therapeutische Potential der Prime Editors ist aufgrund hoher Effizienz und relativ niedriger Indel-Raten hoch und bietet vielfältige Einsatzmöglichkeiten in Bezug auf die Behandlung krankheitsauslösender Mutationen. Durch die flexible Gestaltung von peg- und ngRNAs erlaubt Prime Editing theoretisch bei nahezu jeder Mutation eine Korrektur und ist dementsprechend vielfältig anwendbar. Durch die Nutzung von Design-Online-Tools wird der Planungsprozess und die Durchführung zunehmend vereinfacht. Um eine zukünftig sichere Therapie beim Menschen möglich zu machen, muss allerdings noch weitere Forschungsarbeit in Bezug auf das Auftreten von Indels und off-target Effekten geleistet werden, um mögliche Risiken und eventuell ungewünschte Mutationen besser abschätzen zu können. Zudem ist im therapeutischen Kontext zu bedenken, dass durch das Einbringen des Prime Edit Komplex in vivo eine systemische Zellreaktion

hervorgerufen werden kann und Antikörper-Bildung sowie allergische Reaktionen auftreten könnten.

In dieser Arbeit wurden Indel-Raten und off-target Effekte nicht erfasst. Als weiterer Schritt wäre daher eine TIDE-Analyse (kurz für Tracking of Indels by DEcomposition) durchzuführen, um den Anteil an Indels innerhalb der Ziel-DNA bestimmen zu können. Um off-target Effekte sicher detektieren zu können, wäre außerdem eine Analyse des veränderten Genoms durch Next Generation Sequencing (NGS) nötig.

Bisher wurde die Therapie von großen Genen wie dem ABCA4- oder USH2A-Gen limitiert durch die Ladekapazität viraler Vektoren (siehe 1.3). Die Anwendung von Prime Editing als Gentherapie könnte durch die geringere Größe der Komponenten allerdings über einen AAV-basierten Transfer erfolgen. Die SpCas9-Nickase als eine der Komponenten benötigt eine Ladekapazität von ca. 4 kb, sodass entweder die Nutzung von zwei AAVs (dual AAV System) notwendig wäre oder ein kleineres Cas9-Enzym wie beispielweise CjCas9 verwendet werden müsste. Bei letzterem würde somit vermutlich ein einzelner AAV ausreichen (Kim et al. 2017). Da die Nutzung von AAV-basierten Gentherapien bereits gut erforscht ist, könnte sich nun auch eine Lösung für die kurative Therapie großer Gene ergeben und die Lebensqualität Betroffener zukünftig enorm verbessert werden.

5. Zusammenfassung

Morbus Stargardt ist eine seltene, autosomal-rezessive vererbbare Erkrankung der Makularegion, die durch verschiedene Mutationen im ABCA4-Gen verursacht wird. Die jeweilige Mutation führt zu einem frühzeitigen Translationsabbruch des ABCA4-Transportproteins, welches für den Abtransport von Stoffwechselendprodukten essenziell ist. Die Akkumulation dieser Abfallstoffe verursacht vor allem bei Zapfen-Zellen eine Degeneration, welche bei den Betroffenen häufig bereits im Jugendalter zu einer progredienten und starken Visusminderung führt.

In dieser Arbeit wurde die Korrektur einer Insertionsmutation (c.5918_5919insA) innerhalb des porcinen ABCA4-Gens mithilfe des Prime Edit Systems, einem modifizierten CRISPR-Cas System, versucht. Hierbei kam die 2. Generation des Prime Edit Systems (PE2) sowie dessen 3. Generation (PE3/PE3b) zum Einsatz.

Für das PE2-System wurden insgesamt 21 pegRNAs über das PrimeDesign Online-Tool ausgewählt und je in ein passendes Plasmid kloniert. Gemeinsam mit einem Plasmid, welches ein fusioniertes Enzym aus Cas9-Nickase und Reverse Transkriptase enthält und einem in der Arbeitsgruppe hergestellten BRET-Sensorplasmid, welches die mutierte Ziel-DNA enthält, erfolgte eine Dreifach-Transfektion in HEK293T-Zellen.

Zur Generierung des PE3/3b-Systems wurden vier ngRNAs über selbiges Online-Tool ausgewählt, in je ein weiteres Plasmid kloniert und dem Versuchsaufbau des PE2-Systems hinzugefügt, sodass eine Vierfach-Transfektion in HEK293T-Zellen erfolgte. Die Auswertung und Quantifizierung des Reparaturerfolgs durch die pegRNAs innerhalb des PE2- bzw. PE3/3b-Systems wurde jeweils mittels BRET-Assay durchgeführt.

Die Reparatureffizienz der pegRNAs konnte durch Verwendung des PE3/3b-Systems im Vergleich zum PE2-System enorm gesteigert werden. Hier zeigte die Kombination aus pegRNA 26 und ngRNA 4 mit 91,2 % den höchsten Reparaturerfolg von allen Prime Editing Versuchsreihen. Die erzielten Ergebnisse indizieren, dass eine Korrektur der Insertionsmutation innerhalb des verwendeten BRET-Sensorplasmids mittels Prime Editing möglich ist. Besonders durch Verwendung einer zusätzlichen ngRNAs (PE3/3b-System) konnte im BRET-Assay eine hohe Editierungseffizienz nachgewiesen werden.

Durch die flexible Gestaltung von pegRNAs sowie ngRNAs bietet Prime Editing bei nahezu jeder Mutation eine Korrekturmöglichkeit und ist anwendbar für verschiedenste Fragestellungen. Es zeigt großes Potenzial bei der Editierung großer Gene, welche nicht mittels klassischer Gentherapie durch virale Vektoren korrigiert werden können.

6. Summary

Stargardt disease is a rare, autosomal recessive inherited disease of the macular region caused by several mutations in the ABCA4 gene. The respective mutation leads to an early translational termination of the ABCA4 transport protein, which is essential for the removal of metabolic end products. Accumulation of these waste products causes degeneration, especially in cone cells, which often leads to progressive and severe visual loss in affected individuals already in adolescence.

In this thesis, correction of an insertional mutation (c.5918_5919insA) within the porcine ABCA4 gene was attempted using the Prime Edit system, a modified CRISPR-Cas system. The 2nd generation of the Prime Edit System (PE2) and its 3rd generation (PE3/PE3b) were used. For the PE2 system, a total of 21 pegRNAs were selected via the PrimeDesign online tool and each cloned into a suitable plasmid. Together with a plasmid containing a fused enzyme of Cas9 nickase and reverse transcriptase and a BRET sensor plasmid prepared in the research group containing the mutated target DNA, a triple transfection into HEK293T cells was performed. To generate the PE3/3b system, four ngRNAs were selected via the same online tool, cloned into one additional plasmid each, and added to the experimental setup of the PE2 system, resulting in a quadruple transfection into HEK293T cells. Evaluation and quantification of repair success by the pegRNAs within the PE2 and PE3/3b systems, respectively, were each performed by BRET assay.

The repair efficiency of the pegRNAs was enormously increased by using the PE3/3b system compared with the PE2 system. Here, the combination of pegRNA 26 and ngRNA 4 showed the highest repair success of all prime editing experiments with 91.2%. The results obtained indicate that correction of the insertional mutation within the BRET sensor plasmid used is possible by prime editing. Especially by using an additional ngRNAs (PE3/3b system), high editing efficiency was demonstrated in the BRET assay.

Due to the flexible design of pegRNAs as well as ngRNAs, prime editing offers a correction option for almost any mutation and is applicable for a wide variety of questions. In particular, it shows great potential in the editing of large genes that cannot be corrected by classical gene therapy using viral vectors.

7. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
Da	Dalton
ddH_2O	bi-destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
E.coli	Escherichia coli
et al.	und andere
FKS	fötales Kälberserum
G	Guanin
g	Gramm
GFP2	green fluorescent protein 2
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
h	Stunde
HCL	Salzsäure
HEK	Human Embryonic Kidney
HF	hPCRigh fidelity
ICE	Interference of CRISPR Edits
Indels	Insertionen und Deletionen
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Broth
m	milli
min	Minuten
ml	Milliliter

MW	Molekulargewicht
OD	Optische Dichte
p	piko
pH	potential hydrogenii
PBS (Puffer)	Phosphate Buffered Saline
pmol	Pikomol
RLuc8	Renilla Luciferase 8
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SOC	Super Optimal broth with catabolite repression
T	Thymin
TIDE	Tracking of Indels by DEcomposition
TIDER	Tracking of Insertions, Deletions and Recombination events
TBE	TRIS-Borat-EDTA
u.a.	unter anderem
V	Volt
Val	Valin
x g	mal Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
µ	mikro

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 A: Die Schichten der Retina. S. 2

Abbildung 1.1 B: Schematische Darstellung der Stäbchen- und Zapfenphotorezeptoren. S. 2

Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des visuellen Zyklus. S. 3

Abbildung 1.3: Pathomechanismus der Insertionsmutation (c.5918_5919insA-Mutation). S. 4

Abbildung 1.4: Schematischer Aufbau des CRISPR-Cas9 Komplex. S. 9

Abbildung 1.5: Schematische Übersicht über die zelleigenen Reparaturmechanismen. S. 10

Abbildung 1.6: Prozentuale Anteile der genetischen Mutationsvarianten des Menschen. S. 12

Abbildung 1.7: Exemplarische Darstellung des Editierungsmechanismus durch den Cytosin Base Editor (CBE). S. 13

Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des Editierungsmechanismus durch den PE2-Komplex. S. 15

Abbildung 2.1: Vektorkarte des pU6-pegRNA-GG-Acceptor-Plasmids mit Schnittstellen von NdeI und BsaI. S. 25

Abbildung 2.2: Vektorkarte des pCMV-PE2 Plasmids. S. 25

Abbildung 2.3: Vektorkarte des pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)V2.0 Plasmids. S. 26

Abbildung 2.4: Vektorkarte des BRET-Sensorplasmids (In6T2) mit ABCA4-Ziel-DNA. S. 27

Abbildung 2.5: Vektorkarte des pcDNA-RLuc8 Plasmids. S. 27

Abbildung 2.6: Vektorkarte des pTagGFP2-N Plasmids. S. 28

Abbildung 2.7: Emissions- und Erregungsspektren der RLuc8 und des GFP2. S. 52

Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des experimentellen Designs bei Verwendung des PE2-Systems. S. 55

Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Korrektur der Insertions-mutation. S. 56

Abbildung 3.3: Gelelektrophorese des verdauten pU6-pegRNA-GG-Acceptor Plasmids. S. 58

Abbildung 3.4: Analyse-Verdau der klonierten pegRNAs 17-20. S. 58

Abbildung 3.5 A: Schematische Darstellung der Mutagenese-PCR zur Generierung des Wildtyp BRET-Sensorplasmids. S. 59-60

Abbildung 3.5 B: Gelelektrophorese des Wildtyp BRET-Sensorplasmids nach Mutagenese-PCR mit Temperaturgradienten (60 – 71,6 °C). S. 59-60

Abbildung 3.6: Übersicht über das Transfektionsschema bei Verwendung des PE2-Systems. S. 60

Abbildung 3.7: Fluoreszenzbilder von GFP-Kontrolle, Positivkontrolle (WT), Negativkontrollen (GG, Luc) sowie exemplarisch ausgewählten pegRNAs (22, 24 und 25) 4 Tage nach Transfektion. S. 61-62

Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Leserahmenverschiebung innerhalb des BRET Sensorplasmids durch die Mutation im ABCA4-Gen und deren Korrektur durch den Prime Editing Komplex. S. 63

Abbildung 3.9 A: BRET-Ratio der Negativ- (GG, Luc) und Positivkontrolle (WT) sowie der pegRNAs 7-27 nach Transfektion mit dem PE2-System. S. 64

Abbildung 3.9 B: Editierungseffizienz der pegRNAs 19-27 innerhalb der Skala von 0-100%. S. 64

Abbildung 3.10: schematische Darstellung des experimentellen Designs bei Verwendung des PE3/3b-Systems. S. 65

Abbildung 3.11: Übersicht über die Nicking-Positionen der verwendeten ngRNAs im nicht-editierten Strang, ausgehend vom pegRNA Nick. S. 66

Abbildung 3.12: Gelelektrophorese nach Deletion des px459 Plasmids mittels Mutagenese-PCR mit Temperaturgradienten (60 – 71,6 °C). S. 67

Abbildung 3.13: Analyse-Verdau des px459 Plasmids nach Deletion. S. 67

Abbildung 3.14: Übersicht über das Transfektionsschema bei Verwendung des PE3/3b-Systems. S. 68

Abbildung 3.15: Fluoreszenzbilder von GFP-Kontrolle, Positivkontrolle (WT), Negativkontrollen (GG, Luc) sowie exemplarischen pegRNAs (19 und 26) Co-transfiziert mit ngRNA 1-4 (PE3- bzw. PE3b-System) vier Tage nach Transfektion. S. 69-70

Abbildung 3.16 A: BRET-Ratio der Negativ- (Luc) und Positivkontrolle (WT) sowie der pegRNAs 19-27 nach Transfektion mit bzw. ohne ngRNA1 (PE3-System). S. 72

Abbildung 3.16 B: Editierungseffizienz der pegRNAs 19-27 mit bzw. ohne ngRNA1 innerhalb der Skala von 0-100%. S. 72

Abbildung 3.17 A: BRET-Ratio der Negativ- (Luc) und Positivkontrolle (WT) sowie der pegRNAs 19-27 nach Transfektion mit bzw. ohne ngRNA2 (PE3-System). S. 74

Abbildung 3.17 B: Editierungseffizienz der pegRNAs 19-27 mit bzw. ohne ngRNA2 innerhalb der Skala von 0-100%. S. 74

Abbildung 3.18 A: BRET-Ratio der Negativ- (Luc) und Positivkontrolle (WT) sowie der pegRNAs 19-27 nach Transfektion mit bzw. ohne ngRNA3 (PE3b-System). S. 76

Abbildung 3.18 B: Editierungseffizienz der pegRNAs 19-27 mit bzw. ohne ngRNA3 innerhalb der Skala von 0-100%. S. 76

Abbildung 3.19 A: BRET-Ratio der Negativ- (Luc) und Positivkontrolle (WT) sowie der pegRNAs 19-27 nach Transfektion mit bzw. ohne ngRNA4 (PE3b-System). S. 78

Abbildung 3.19 B: Editierungseffizienz der pegRNAs 19-27 mit bzw. ohne ngRNA4 innerhalb der Skala von 0-100%. S. 78

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: verwendete pegRNA- und ngRNA Oligo-Sequenzen. S. 29-31

Tabelle 2.2: verwendete Primer. S. 31-32

Tabelle 2.3: Transfektionsansätze für den Reparaturversuch mittels PE2-Komplexes. S. 49

Tabelle 2.4: Transfektionsansätze für den Reparaturversuch mittels PE3/PE3b-Komplexes. S. 50

Tabelle 3.1: Übersicht über die Spacer-Sequenzen sowie Längen der pegRNA-Anteile und deren peg-to-edit distance in Nukleotiden (nt). S. 57

Tabelle 11.1: ausgewählte pegRNAs 7-27 und ngRNAs 1-4, jeweils in 5 ‘→ 3‘ Richtung. S. 100-101

10. Literaturverzeichnis

Allikmets, R.; Wasserman, W. W.; Hutchinson, A.; Smallwood, P.; Nathans, J.; Rogan, P. K. et al. (1998): Organization of the ABCR gene: analysis of promoter and splice junction sequences. In: *Gene* 215 (1), S. 111–122. DOI: 10.1016/s0378-1119(98)00269-8.

Anzalone, Andrew V.; Koblan, Luke W.; Liu, David R. (2020): Genome editing with CRISPR-Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. In: *Nature biotechnology* 38 (7), S. 824–844. DOI: 10.1038/s41587-020-0537-9.

Anzalone, Andrew V.; Randolph, Peyton B.; Davis, Jessie R.; Sousa, Alexander A.; Koblan, Luke W.; Levy, Jonathan M. et al. (2019): Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. In: *Nature* 576 (7785), S. 149–157. DOI: 10.1038/s41586-019-1711-4.

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

Brinkman, Eva Karina; van Steensel, Bas (2019): Rapid Quantitative Evaluation of CRISPR Genome Editing by TIDE and TIDER. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1961, S. 29–44. DOI: 10.1007/978-1-4939-9170-9_3.

Cangiano, Lorenzo; Asteriti, Sabrina; Cervetto, Luigi; Gargini, Claudia (2012): The photovoltage of rods and cones in the dark-adapted mouse retina. In: *The Journal of physiology* 590 (16), S. 3841–3855. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.226878.

Deng, Sarah K.; Gibb, Bryan; Almeida, Mariana Justino de; Greene, Eric C.; Symington, Lorraine S. (2014): RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks. In: *Nat Struct Mol Biol* 21 (4), S. 405–412. DOI: 10.1038/nsmb.2786.

Dhooge, Patty P.A.; Valkenburg, Dyon; Hoyng, Carel B. (2019): Chapter 16 - Gene therapy for inherited retinal diseases. In: Xiaoyi Raymond Gao (Hg.): Genetics and Genomics of Eye Disease: Advancing to Precision Medicine: Academic Press, S. 279–295. Online verfügbar unter https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128162224000174.

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.

G. Krause; G. Scherer; M. Müller; T. Weiß (2012): Grundlagen der Polymerasekettenreaktion (PCR) [Biomonitoring Methods in German language, 2004]. In: The MAK-Collection for Occupational Health and Safety: American Cancer Society, S. 321–355. Online verfügbar unter https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/3527600418.bipcrbasicd0016.

Gaudelli, Nicole M.; Komor, Alexis C.; Rees, Holly A.; Packer, Michael S.; Badran, Ahmed H.; Bryson, David I.; Liu, David R. (2017): Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. In: *Nature* 551 (7681), S. 464–471. DOI: 10.1038/nature24644.

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

Gregori, Ninel Z.; Hussain, Rehan M.; Kay, Christine N.; Lam, Byron L.; Dermer, Harrison; Davis, Janet L. (2019): Current Concepts and Emerging Gene Therapies for Inherited Retinal Diseases. In: *International Ophthalmology Clinics* 59 (1), S. 83–110. DOI: 10.1097/IIO.0000000000000259.

Grünewald, Julian; Zhou, Ronghao; Garcia, Sara P.; Iyer, Sowmya; Lareau, Caleb A.; Aryee, Martin J.; Joung, J. Keith (2019): Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors. In: *Nature* 569 (7756), S. 433–437. DOI: 10.1038/s41586-019-1161-z.

Hauk, Andrea (2013): Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. In: *Biologie in unserer Zeit* 43 (5), S. 278. DOI: 10.1002/biuz.201390093.

Hendrickson, Anita; Hicks, David (2002): Distribution and density of medium- and short-wavelength selective cones in the domestic pig retina. In: *Experimental eye research* 74 (4), S. 435–444. DOI: 10.1006/exer.2002.1181.

Hsu, Jonathan Y.; Grünewald, Julian; Szalay, Regan; Shih, Justine; Anzalone, Andrew V.; Lam, Kin Chung et al. (2021): PrimeDesign software for rapid and simplified design of prime editing guide RNAs. In: *Nat Commun* 12 (1), S. 1034. DOI: 10.1038/s41467-021-21337-7.

Hwang, Gue-Ho; Jeong, You Kyeong; Habib, Omer; Hong, Sung-Ah; Lim, Kayeong; Kim, Jin-Soo; Bae, Sangsu (2021): PE-Designer and PE-Analyzer: web-based design

and analysis tools for CRISPR prime editing. In: *Nucleic acids research* 49 (W1), W499-W504. DOI: 10.1093/nar/gkab319.

Jiang, Yuan-Yuan; Chai, Yi-Ping; Lu, Min-Hui; Han, Xiu-Li; Lin, Qiupeng; Zhang, Yu et al. (2020): Prime editing efficiently generates W542L and S621I double mutations in two ALS genes in maize. In: *Genome Biol* 21 (1), S. 257. DOI: 10.1186/s13059-020-02170-5.

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* 337 (6096), S. 816–821. DOI: 10.1126/science.1225829.

Kantor, Ariel; McClements, Michelle E.; MacLaren, Robert E. (2020): CRISPR-Cas9 DNA Base-Editing and Prime-Editing. In: *International journal of molecular sciences* 21 (17). DOI: 10.3390/ijms21176240.

Khan, Mubeen; Cremers, Frans P. M. (2020): ABCA4-assoziierter Morbus Stargardt. In: *Klinische Monatsblatter fur Augenheilkunde* 237 (3), S. 267–274. DOI: 10.1055/a-1057-9939.

Kim, Eunji; Koo, Taeyoung; Park, Sung Wook; Kim, Daesik; Kim, Kyoungmi; Cho, Hee-Yeon et al. (2017): In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from Campylobacter jejuni. In: *Nat Commun* 8 (1), S. 14500. DOI: 10.1038/ncomms14500.

Kim, Hui Kwon; Yu, Goosang; Park, Jinman; Min, Seonwoo; Lee, Sungtae; Yoon, Sungroh; Kim, Hyongbum Henry (2021): Predicting the efficiency of prime editing guide RNAs in human cells. In: *Nature biotechnology* 39 (2), S. 198–206. DOI: 10.1038/s41587-020-0677-y.

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

Komor, Alexis C.; Kim, Yongjoo B.; Packer, Michael S.; Zuris, John A.; Liu, David R. (2016): Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. In: *Nature* 533 (7603), S. 420–424. DOI: 10.1038/nature17946.

Kweon, Jiyeon; Yoon, Jung-Ki; Jang, An-Hee; Shin, Ha Rim; See, Ji-Eun; Jang, Gayoung et al. (2021): Engineered prime editors with PAM flexibility. In: *Molecular Therapy* 29 (6), S. 2001–2007. DOI: 10.1016/j.ymthe.2021.02.022.

Lamb, Trevor D. (2013): Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina. In: *Progress in retinal and eye research* 36, S. 52–119. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2013.06.001.

Lamb, Trevor D.; Collin, Shaun P.; Pugh, Edward N. (2007): Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. In: *Nature reviews. Neuroscience* 8 (12), S. 960–976. DOI: 10.1038/nrn2283.

Lee, Junwon; Chung, Jae-Hee; Kim, Ho Min; Kim, Dong-Wook; Kim, Hyongbum (2016): Designed nucleases for targeted genome editing. In: *Plant biotechnology journal* 14 (2), S. 448–462. DOI: 10.1111/pbi.12465.

Liu, Yao; Li, Xiangyang; He, Siting; Huang, Shuhong; Li, Chao; Chen, Yulin et al. (2020): Efficient generation of mouse models with the prime editing system. In: *Cell Discov* 6 (1). DOI: 10.1038/s41421-020-0165-z.

Loening, Andreas Markus; Fenn, Timothy David; Wu, Anna M.; Gambhir, Sanjiv Sam (2006): Consensus guided mutagenesis of Renilla luciferase yields enhanced stability and light output. In: *Protein engineering, design & selection : PEDS* 19 (9), S. 391–400. DOI: 10.1093/protein/gzl023.

Nambiar, Tarun S.; Billon, Pierre; Diedenhofen, Giacomo; Hayward, Samuel B.; Taglialatela, Angelo; Cai, Kunheng et al. (2019): Stimulation of CRISPR-mediated homology-directed repair by an engineered RAD18 variant. In: *Nat Commun* 10 (1), S. 3395. DOI: 10.1038/s41467-019-11105-z.

Neumann, E.; Schaefer-Ridder, M.; Wang, Y.; Hofschneider, P. H. (1982): Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. In: *The EMBO journal* 1 (7), S. 841–845. Online verfügbar unter https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6329708/.

Pereiro, Xandra; Ruzafa, Noelia; Urcola, J. Haritz; Sharma, Sansar C.; Vecino, Elena (2020): Differential Distribution of RBPMS in Pig, Rat, and Human Retina after Damage. In: *International journal of molecular sciences* 21 (23). DOI: 10.3390/ijms21239330.

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.

Porto, Elizabeth M.; Komor, Alexis C.; Slaymaker, Ian M.; Yeo, Gene W. (2020): Base editing: advances and therapeutic opportunities. In: *Nature reviews. Drug discovery* 19 (12), S. 839–859. DOI: 10.1038/s41573-020-0084-6.

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.

Robb, G. Brett (2019): Genome Editing with CRISPR-Cas: An Overview. In: *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* 19 (1), e36. DOI: 10.1002/cpet.36.

Ruiz-Ederra, Javier; García, Monica; Hicks, David; Vecino, Elena (2004): Comparative study of the three neurofilament subunits within pig and human retinal ganglion cells. In: *Molecular vision* 10, S. 83–92. DOI: Study.

Schene, Imre F.; Joore, Indi P.; Oka, Rurika; Mokry, Michal; van Vugt, Anke H. M.; van Boxtel, Ruben et al. (2020): Prime editing for functional repair in patient-derived disease models. In: *Nature communications* 11 (1), S. 5352. DOI: 10.1038/s41467-020-19136-7.

Stargardt, K. (1909): Über familiäre, progressive Degeneration in der Maculagegend des Auges. In: *Graefes Arhiv für Ophthalmologie* 71 (3), S. 534–550. DOI: 10.1007/BF01961301.

Tanna, Preena; Strauss, Rupert W.; Fujinami, Kaoru; Michaelides, Michel (2017): Stargardt disease: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. In: *The British journal of ophthalmology* 101 (1), S. 25–30. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2016-308823.

Thomas, Clare E.; Ehrhardt, Anja; Kay, Mark A. (2003): Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. In: *Nat Rev Genet* 4 (5), S. 346–358. DOI: 10.1038/nrg1066.

Travis, Gabriel H.; Golczak, Marcin; Moise, Alexander R.; Palczewski, Krzysztof (2007): Diseases caused by defects in the visual cycle: retinoids as potential therapeutic agents. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 47, S. 469–512. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105225.

Veleri, Shobi; Lazar, Csilla H.; Chang, Bo; Sieving, Paul A.; Banin, Eyal; Swaroop, Anand (2015): Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models. In: *Disease Models & Mechanisms* 8 (2), S. 109–129. DOI: 10.1242/dmm.017913.

Wiedenheft, Blake; Sternberg, Samuel H.; Doudna, Jennifer A. (2012): RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. In: *Nature* 482 (7385), S. 331–338. DOI: 10.1038/nature10886.

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; Sawinski, Hannah; Urban, Anne M.; Motlik, Jan; Stieger, Knut (2023): Rapid and Reliable Quantification of Prime Editing Targeting Within the Porcine ABCA4 Gene Using a Bioluminescence Resonance Energy Transfer-Based Sensor. In: *Nucleic acid therapeutics*. DOI: 10.1089/nat.2022.0037.

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.

Yoshimi, Kazuto; Oka, Yuichiro; Miyasaka, Yoshiki; Kotani, Yuko; Yasumura, Misato; Uno, Yoshihiro et al. (2021): Combi-CRISPR: combination of NHEJ and HDR provides efficient and precise plasmid-based knock-ins in mice and rats. In: *Human genetics* 140 (2), S. 277–287. DOI: 10.1007/s00439-020-02198-4.

Zuo, Erwei; Sun, Yidi; Wei, Wu; Yuan, Tanglong; Ying, Wenqin; Sun, Hao et al. (2019): Cytosine base editor generates substantial off-target single-nucleotide variants in mouse embryos. In: *Science (New York, N.Y.)* 364 (6437), S. 289–292. DOI: 10.1126/science.aav9973.

11. Anhang

Tabelle 11.1: ausgewählte pegRNAs 7-27 und ngRNAs 1-4, jeweils in 5 '→ 3' Richtung.

Legende pegRNAs: Spacer – Scaffold – RT-Template – PBS

7	GCGGAGAGTGCTTTGGCCTCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACT
8	GCGGAGAGTGCTTTGGCCTCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTC
9	GCGGAGAGTGCTTTGGCCTCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTCT
10	GCGGAGAGTGCTTTGGCCTCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACT
11	GCGGAGAGTGCTTTGGCCTCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTC
12	GCGGAGAGTGCTTTGGCCTCCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTCT
13	GGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCAC
14	GGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACT
15	GGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTC
16	GGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCAC
17	GGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACT
18	GGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTC
19	GGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCAC

20	GGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACT
21	GGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTC
22	GGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCGCTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCAC
23	GGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCGCTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACT
24	GGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCGCTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTC
25	GGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCAGCTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCAC
26	GGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCAGCTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACT
27	GGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT AAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG GTGCAGCTCCGTTCACTCCCAGGAGGCCAAAGCACTC
1	GGCCAAAGCACTCTCCGGGCaaacGCCCGGAGAGTGCTTTGGCC
2	GCAGGAGGCCAAAGCACTCTCaaacGAGAGTGCTTTGGCCTCCTGC
3	GCAGCTCCGTTCACTCCCAGGaaacCCTGGGAGTGAACGGAGCTGC
4	GTGCCAGCTCCGTTCACTCCCaaacGGGAGTGAACGGAGCTGGCAC

12. Publikationsverzeichnis

Publikationen

Wimmer, T., Sawinski, H., **Urban, A. M.**, Motlik, J., & Stieger, K. (2023).

Rapid and Reliable Quantification of Prime Editing Targeting Within the Porcine ABCA4 Gene Using a Bioluminescence Resonance Energy Transfer-Based Sensor. Nucleic acid therapeutics, 10.1089/nat.2022.0037. https://doi.org/10.1089/nat.2022.0037

Posterpräsentationen

Wimmer, T., Sawinski, H., **Urban, A. M.**, Motlik, J., & Stieger, K. (2022).

Quantification of the porcine Abca4 V1973X Prime Edit gene correction. ARVO, Denver.

13. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, 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.

Gießen, 06.05.2024

Ort, Datum	Unterschrift

14. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und den wissenschaftlichen Austausch einschließlich des Korrekturlesens der Dissertation bedanken.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Dr. Tobias Wimmer für die stets hilfsbereite und intensive Betreuung während der Durchführung der Arbeit, die vielen wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen sowie für das Korrekturlesen der Dissertation.

Ich danke allen Mitarbeiter*innen und Doktorand*innen der Arbeitsgruppe für die Hilfe bei allen Fragen bezüglich des Labors sowie für die sehr schöne Zeit mit gemeinsamen Mittagessen und Gesprächen. Sie wird mir immer in Erinnerung bleiben.

Ich danke meinem Freund Philipp für die beständige und liebevolle Unterstützung während des Studiums und der Promotion. Dein Optimismus und deine positive Energie haben mich immer wieder angesteckt und motiviert.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern für den ununterbrochenen emotionalen und finanziellen Beistand während des gesamten Studiums sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Ohne euch wäre all das nicht möglich gewesen.

Vielen Dank!