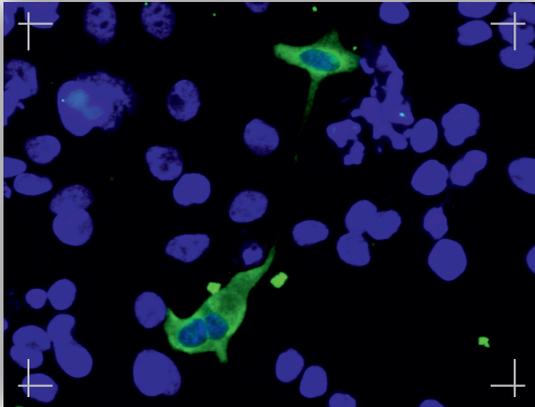


**DANNY ATAT**

---

Die Effizienz der Cas9 Endonuklease für die  
DNA-Doppelstrangbruchinduktion *in vitro*



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

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2020

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Die Effizienz der Cas9 Endonuklease**  
**für die DNA-Doppelstrangbruchinduktion *in vitro***

**Inauguraldissertation**

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

vorgelegt von

**Danny Atat**  
aus Gießen

Gießen 2019

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde,  
unter der Leitung von Prof. Dr. Birgit Lorenz,  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Gutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann

Tag der Disputation: 05.10.2020

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Degenerative Netzhauterkrankungen.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Die Retina .....	1
1.1.2 Einteilung der retinalen Erkrankungen nach Ursprungszellen.....	3
1.1.2.1 Stäbchen-Zapfen-Dystrophien (RCD, <i>Retinitis pigmentosa</i> ).....	4
1.1.2.2 Zapfen-Stäbchen-Dystrophien .....	5
1.1.2.3 Zapfen-Dystrophien .....	6
<b>1.2 Therapieoptionen bei degenerativen Netzhauterkrankungen.....</b>	<b>6</b>
1.2.1 Unspezifische Gentherapie.....	7
1.2.2 Spezifische Gentherapie .....	7
<b>1.3 DNA-Doppelstrangbruchreparatur .....</b>	<b>10</b>
1.3.1 Regulation des Zellzyklus.....	10
1.3.2 Erkennung von Doppelstrangbrüchen (DSB) .....	12
1.3.3 DNA Reparaturmechanismen.....	13
1.3.3.1 <i>Non-homologous end-joining</i> (NHEJ) .....	13
1.3.3.2 <i>Microhomology-mediated end joining</i> (MMEJ) .....	14
1.3.3.3 <i>homology directed repair</i> (HDR).....	15
<b>1.4 Genome editing mit Hilfe von programmierbaren Endonukleasen .....</b>	<b>16</b>
1.4.1 Meganukleasen.....	17
1.4.2 Zinkfinger nukleasen .....	17
1.4.3 TALE-Nukleasen (TALEN) .....	18
1.4.4 CRISPR-Cas.....	18
<b>1.4 Zielsetzung .....</b>	<b>22</b>
<b>2. Material .....</b>	<b>23</b>
2.1 Chemikalien .....	23
2.2 Antibiotika.....	24
2.3 Enzyme und Antikörper.....	24
2.4 Reagenzien und Kits.....	25
2.5 Puffer, Medien und Lösungen .....	26
2.6 Größenmarker .....	27
2.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	28
2.8 Biologische Materialien .....	30
2.8.1 Plasmide.....	30

2.8.2 E.Coli Stämme .....	33
2.8.3 Oligonukleotide.....	33
2.8.4 Zelllinien .....	34
<b>3. Methoden.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>35</b>
3.1.1 Kultivierung von E.coli Bakterien.....	35
3.1.2 DNA Transformation von E.coli Bakterien .....	35
3.1.2.1 Elektrotransformation.....	36
3.1.2.2 Chemische Transformation .....	36
<b>3.2 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>36</b>
3.2.1 Plasmid DNA Isolierung.....	36
3.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	37
3.2.3 Gelelektrophorese.....	37
3.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese.....	37
3.2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
3.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	38
3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	39
<b>3.3 Biochemische Methoden .....</b>	<b>40</b>
3.3.1 Coomassie – Färbung.....	40
3.3.2 Expression und Aufreinigung der Cas 9 Endonuklease.....	40
3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	41
3.3.4 Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode .....	42
<b>3.4 Eukaryotische Zellkultur.....</b>	<b>42</b>
3.4.1 Passagieren von HEK 293 Zellen .....	42
3.4.2 Auszählen von HEK 293 Zellen.....	43
3.4.3 Transfektion von Plasmid-DNA.....	43
3.4.4 Proteinextraktion aus HEK 293 Zellen.....	44
3.4.5 Western-Blot .....	44
3.4.6 Immunodetektion .....	44
3.4.7 Immunfluoreszenz.....	45
3.4.8 Durchflusszytometrie .....	46
3.4.8.1 Probenaufbereitung für FACS Analysen .....	46
<b>3.5 Klonierung der <i>guide</i> RNA Sequenz in den pX330 Vektor .....</b>	<b>46</b>
<b>3.6 Generierung von <i>guide</i> RNA für den Cas 9 Endonuklease Aktivitätstest unabhängig von zelleigenen Mechanismen im <i>tube</i> .....</b>	<b>48</b>
3.6.1 PCR Produktreinigung.....	49

3.6.2 Transkription der PCR Produkte .....	49
3.7 Aktivitätstest der Cas 9 Endonuklease im zellfreien Milieu.....	50
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
4.1 Design und Klonierung der <i>guide</i> RNAs.....	51
4.2 Expression und Aufreinigung der Cas9-Endonuklease .....	54
4.3 Aktivitätstest der Cas9-Endonuklease mit den <i>guides</i> T1 und T2 in zellfreien Enzymreaktionen .....	55
4.4 Nachweis der Expression von Cas9 in eukaryotischen Zellen.....	58
4.5 Nachweis der Translokation von Cas9 in den Zellkern von eukaryotischen Zellen .....	59
4.6 Qualitativer Aktivitätstest der Cas9 Endonuklease in eukaryotischen Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie .....	60
4.7 Quantitativer Aktivitätstest der Cas9 Endonuklease in eukaryotischen Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie.....	62
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>65</b>
5.1 Ergebnisse der Aktivitätstests von Cas9 in zellfreien Enzymreaktionen unter artifiziellen Bedingungen.....	65
5.2 Ergebnisse in der Zellkultur .....	66
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>70</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>72</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>9. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>74</b>
<b>10. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>75</b>
<b>11. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>76</b>
<b>12. Erklärung zur Dissertation .....</b>	<b>91</b>
<b>13. Lebenslauf .....</b>	<b>92</b>



# 1. Einleitung

## 1.1 Degenerative Netzhauterkrankungen

Für die visuelle Sinneswahrnehmung nimmt die Signalverarbeitung in der Netzhaut eine zentrale Rolle ein. Durch komplexe Signalkaskaden wird das einfallende Licht durch die Fotorezeptoren absorbiert und in elektrochemische Signale umgewandelt. Der *Nervus opticus* leitet diese Signale zum Gehirn weiter. Dort werden sie bis zur Wahrnehmung weiterverarbeitet. Degenerative Retinaerkrankungen sind durch den Untergang von Fotorezeptoren oder retinaler Pigmentepithelzellen gekennzeichnet. Heute sind bereits über 200 Genloci identifiziert worden, die ursächlich für eine Reihe von Netzhauterkrankungen mit unterschiedlichster Ausprägung sein können. In den letzten Jahren wurden immer mehr Strategien zur gentherapeutischen Behandlung erforscht und optimiert (den Hollander et al. 2010).

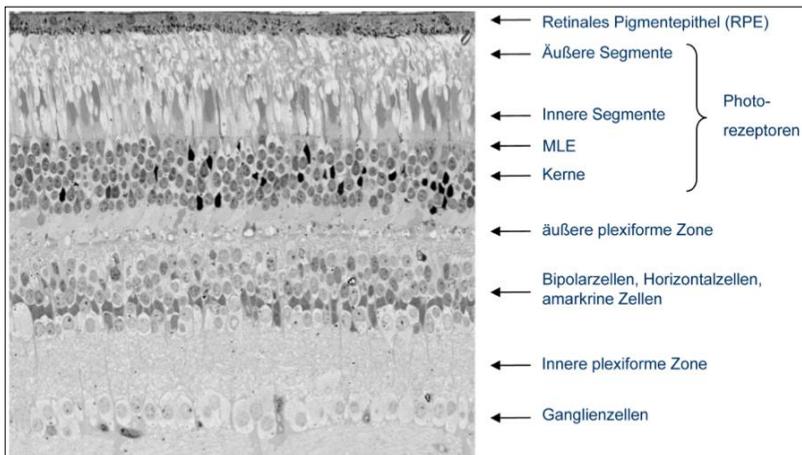
### 1.1.1 Die Retina

Die Retina entsteht embryologisch aus einer Ausstülpung des Diencephalons. Sie kleidet das Innere des Augapfels aus. Nahe der Papille hat die Netzhaut eine Dicke von 0,56 mm. Am dünnsten ist die Netzhaut mit 0,1 mm in der Mitte der *Fovea centralis*. Innerhalb der Retina befinden sich die Fotorezeptoren, welche die eigentlichen Sinneszellen der Retina darstellen. Ca. 120 Millionen Stäbchen sind in der Retina verteilt, um das Hell-Dunkel-Sehen bzw. Dämmerungssehen und die Helligkeitsempfindlichkeit zu ermöglichen. Zusätzlich befinden sich circa 6 Millionen Zapfen in der Netzhaut, die für das Farbsehen bzw. das Tagessehen verantwortlich sind. In der *Fovea centralis* befinden sich ausschließlich Zapfen. In der Umgebung der Fovea sind mehr Zapfen als Stäbchen vorhanden während in der Peripherie die Stäbchen überwiegen (Ulfig 2005, Bommas-Ebert et al. 2006). Wenn das einfallende Licht auf die Fotorezeptoren trifft, werden Photonen durch das Photopigment absorbiert. Das Photopigment aktiviert eine Signalkaskade um das Lichtsignal in ein elektrochemisches Signal umzuwandeln. In diesem Zyklus ist auch das retinale Pigmentepithel beteiligt, indem es die Chromophore regeneriert. Die elektrochemischen

Signale werden über Bipolarzellen zu den Ganglienzellen weitergeleitet, wo sie dann in Aktionspotenziale umgewandelt werden und schließlich zur Sehrinde im Gehirn gelangen (Arshavsky et al. 2002).

Histologisch besteht die Retina aus mehreren Schichten (siehe Abbildung 1). Die Fotorezeptoren bestehen aus lichtempfindlichen Außensegmenten und aus Innensegmenten. In den Außensegmenten findet die Lichtabsorption, sowie die anschließende komplexe Signalkaskade statt. Angrenzend befindet sich das retinale Pigmentepithel (RPE). Das Pigmentepithel ist an dem Stoffwechsel der Netzhaut sowie an der Phagozytose abgestoßener Fotorezeptoren und der Absorption von überschüssigen Lichtstrahlen beteiligt. In den Innensegmenten der Fotorezeptorzelle findet die Proteinbiosynthese statt. Die Innensegmente sind durch das *connecting Cilium* mit den Außensegmenten verbunden. Die *Membrana Limitans Externa* (MLE) stellt eine undurchlässige Membran dar, welche jedoch kreisförmige Öffnungen für die Fotorezeptoren bietet. In der äußeren Körnerschicht (*Outer Nuclear Layer*, ONL) liegen die Zellkörper der Fotorezeptoren. Die ONL grenzt an die Innen- und Außensegmente der Rezeptorzelle an. Die äußere plexiforme Schicht (*Outer Plexiform Layer*, OPL) folgt glaskörperwärts der ONL und beinhaltet die Axone der Rezeptorzellen, die Synapsen und die Axone der Bipolar- und Horizontalzellen. In der inneren Körnerschicht (*Inner Nuclear Layer*, INL) liegen die Bipolarzellen sowie die Horizontalzellen und Amakrinzellen. Die innere plexiforme Schicht (*Inner Plexiform Layer*, IPL) beinhaltet die Axone der Bipolar- und Amakrinzellen und die Dendriten und Synapsen der Ganglienzellen. An die IPL angrenzend folgt die Ganglienzellschicht (*Ganglion Cell Layer*, GCL). Sie beinhaltet die Zellkörper der Ganglienzellen.

In der Nervenfaserschicht (*Nerve Fiber Layer*, NFL) befinden sich Bündel nicht-myelinisierter Ganglienzellaxone (Bommas-Ebert et al. 2006).



**Abb. 1: Histologischer Schnitt durch die Retina.**

*Quelle: Augenklinik*

### 1.1.2 Einteilung der retinalen Erkrankungen nach Ursprungszellen

Eine Einteilung der degenerativen Retinaerkrankungen erfolgt unter Berücksichtigung der Ursprungszellen, in denen durch Mutationen Fehlfunktionen auftreten. Dies betrifft zum Einen das retinale Pigmentepithel (RPE) und zum Anderen die Fotorezeptoren. Mutationen in RPE-spezifischen Genen führen über Funktionsverlusten in verschiedenen Stoffwechselfvorgängen im Endeffekt zu einem fortschreitenden Untergang der Fotorezeptoren (Lorenz et al. 2010). Je nachdem welche Fotorezeptorart zuerst degeneriert, unterscheidet man drei Gruppen der Netzhauterkrankungen. Bei der Zapfen-Degeneration (*cone-dystrophy*) sterben nur die Zapfen-Fotorezeptoren ab. Wenn zunächst die Zapfen untergehen und später die Stäbchen-Fotorezeptoren spricht man von einer Zapfen-Stäbchen-Degeneration (*cone-rod-dystrophy*), wohingegen bei den Stäbchen-Zapfen-Degenerationen (*rod-cone-dystrophy*) der Untergang der Fotorezeptorart in umgekehrter Reihenfolge stattfindet. Liegt eine isolierte Zapfendegeneration oder eine Zapfen-Stäbchen-Degeneration vor, haben Patienten im

Anfangsstadium Probleme mit dem Farbsehen und dem scharfen Sehen. Patienten, die unter Stäbchendegenerationen leiden entwickeln zunächst eine Nachtblindheit und fortschreitende Gesichtsfeldeinschränkungen. Im späteren Verlauf und fortgeschrittener Degeneration der Fotorezeptoren leiden die Patienten unter erheblicher Sehbehinderung bis hin zur Erblindung (Stieger and Lorenz 2009).

### **1.1.2.1 Stäbchen-Zapfen-Dystrophien (RCD, *Retinitis pigmentosa*)**

Unter *Retinitis pigmentosa* (RP) werden alle vererbaren degenerativen Retinopathien zusammengefasst, die mit dem Funktionsausfall der Stäbchen- und im Verlauf auch Zapfenrezeptoren sowie dem RPE einhergehen (Onakpoya et al. 2016). Die weltweite Prävalenz liegt bei 1 : 4000 mit mehr als 1 Million betroffenen Patienten (Hartong et al. 2006), wobei aufgrund des schleichenden Verlaufs der Erkrankung die Dunkelziffer höher ausfallen dürfte (Daiger et al. 2007). RP stellt die größte und heterogenste Gruppe der degenerativen Netzhauterkrankungen dar. Der Beginn der Erkrankung variiert stark und reicht von Erblindung bereits in der 2. oder 3. Lebensdekade bis zum Symptombeginn im mittleren Erwachsenenalter (Hartong et al. 2006). Auch die Symptome variieren, jedoch ist die Nachtblindheit meist das Initialsymptom, gefolgt von Gesichtsfeldverlusten und Verschlechterungen der Sehschärfe über mehrere Lebensdekaden bis schließlich, meist nicht vor dem 60. Lebensjahr, die Patienten erblinden (Hamel 2006, Parmeggiani 2011). In den meisten Fällen handelt es sich um eine monogene Erkrankung, also einer Krankheitsausprägung durch Veränderungen in nur einem Gen. Die RP tritt aber auch in syndromaler Form auf wie z.B. beim Usher Syndrom (Wolfrum and Nagel-Wolfrum 2018). Mutationen in über 60 bekannte Gene werden mit der RP in Verbindung gebracht (Daiger et al. 2007). Alle drei Hauptvererbungsformen treten auf: autosomal-rezessiv (50 % - 60 %), autosomal-dominant (30 % - 40 %) und X-Chromosomal (5 % - 15 %). Es ist bekannt, dass 25 % aller autosomal-dominanten Formen durch Mutationen im Rhodopsin Gen (RHO) entstehen, 20 % aller autosomal-rezessiven Formen durch das USH2A Gen und 70 % aller X-Chromosomalen Formen der RP durch das RPGR Gen ausgelöst werden (Hartong et al. 2006). Besonders schwerwiegende Formen der Retinadegeneration stellen die Leber'sche kongenitale Amaurose (LCA) unmittelbar nach der Geburt oder bis zum 1. Lebensjahr und die frühkindliche juvenile Netzhautdystrophie (EOSRD) in

den ersten Lebensjahren dar. Diese Krankheitsformen gehen mit einer schweren Beeinträchtigung des Sehvermögens einher. Die Patienten können keine Objekte fixieren, häufig tritt ein Nystagmus mit Strabismus auf. Sie leiden unter Gesichtsfeldeinschränkungen und Sehschärfenminderungen. Anfangs kann der Netzhautbefund unauffällig sein. Im fortgeschrittenen Stadium fallen Schäden im RPE durch Depigmentierung auf (Weleber et al. 2011, Kumaran et al. 2017). Die Vererbungsform ist meist autosomal-rezessiv, obwohl auch autosomal-dominante Mutationen bekannt sind. Heute sind 25 verschiedene Gene bekannt, die mit diesen Krankheitsformen in Bezug gebracht werden, unter anderem das RPE65 Gen (den Hollander et al. 2008). Das Gen kodiert für die Isomerohydrolase RPE65, welche im retinalen Pigmentepithel synthetisiert wird und mit dem Recycling des Sehpigments in Verbindung gebracht wird. Eine gestörte Biosynthese des Proteins führt zu einem Mangel an 11-cis Retinal, dem lichtempfindlichen Bestandteil des Sehpigments Rhodopsin. Vor allem die Stäbchen-Rezeptoren sind auf das 11-cis-Retinal angewiesen. Dies erklärt warum ein Mangel in frühen Stadien bereits in einer ausgeprägten Nachtblindheit resultiert (Lorenz et al. 2008, Cai et al. 2009, Lorenz et al. 2012).

### **1.1.2.2 Zapfen-Stäbchen-Dystrophien**

Die Prävalenz dieser Gruppe der Retinopathien liegt bei 1 : 40000. Führend ist hier zunächst der Untergang der Zapfen gefolgt von den Stäbchen. Die Zapfenbeteiligung resultiert zunächst in einer verminderten Sehschärfe sowie Sensibilitätsverlust des zentralen Gesichtsfelds. In fortgeschrittenen Stadien nimmt die Nachtblindheit immer weiter zu. Das periphere Gesichtsfeld nimmt stetig weiter ab. Die Sehschärfenminderung schreitet voran, die Lichtempfindlichkeit nimmt zu und ein Nystagmus tritt häufig auf (Michaelides et al. 2006, Hamel 2007). Auch die Zapfen-Stäbchen-Dystrophien können Symptome von Syndromen wie z.B. der spinozellulären Ataxie Typ 7 (SCA7) sein (Aleman et al. 2002). Diese Gruppe von Retinopathien ist genetisch heterogen. Analog zur RP sind auch in diesem Formenkreis eine Reihe von Genen identifiziert worden. Das ABCA4 Gen, welche durch Mutation die Stargardt-Krankheit auslöst, ist für 30 % - 60 % der autosomal-rezessiven Zapfen-Stäbchen-Dystrophien verantwortlich (Cremers et al. 1998). Mutationen in folgenden Genen sind

verantwortlich für die meisten autosomal-dominanten Formen. Das CRX Gen ist an der Embryogenese der Fotorezeptoren beteiligt (Freund et al. 1997). Darüber hinaus führen Mutationen in dem GUCY2D, dem RDS Gen und dem AIPL1 Gen ebenfalls zu Dystrophien (Kelsell et al. 1998, Sohocki et al. 2000, Michaelides et al. 2006). Des Weiteren ist bekannt, dass in seltenen Fällen eine Mutation im RPGR Gen zu X-chromosomalen Formen der Zapfen-Stäbchen-Dystrophien führen kann (Demirci et al. 2002). Sowohl bei der Retinitis pigmentosa als auch den Zapfen-Stäbchen-Dystrophien lässt sich übereinstimmend feststellen, dass die Gene für Proteine kodieren, die in verschiedene Kaskaden involviert sind. Störungen in der Fototransduktionskaskade, im visuellen Zyklus oder in allgemeinen, struktur- und zellerhaltenden Funktionen können allesamt in einer unspezifischen Degeneration der Netzhaut enden (Stieger and Lorenz 2009).

### **1.1.2.3 Zapfen-Dystrophien**

Reine Zapfen-Dystrophien stellen eine seltene Form der Degenerationen dar. Da die Symptome Folge degenerierter Zapfen-Rezeptoren sind, leiden die Patienten unter Lichtempfindlichkeit, Probleme mit dem Farbsehen und Verschlechterung der Sehschärfe. Bekannte Gene, die mit Zapfen-Dystrophien in Verbindung gebracht werden sind das CNGA3 Gen, CNGB3 Gen und das PDE6C Gen (Wissinger et al. 2001, Thiadens et al. 2009).

## **1.2 Therapieoptionen bei degenerativen Netzhauterkrankungen**

Mittlerweile sind über 200 Gene bekannt, in denen Mutationen zu retinalen Dystrophien führen können (Berger et al. 2010). Die Möglichkeit, relativ einfach im Rahmen der Gentherapie korrigierte DNA Sequenzen über virale Vektoren zu applizieren, um mutierte Gene zu therapieren, trägt dazu bei, dass die Retina als ein geeignetes Modell

genutzt wird, gentherapeutische Strategien zu entwickeln und zu testen (Petit et al. 2016). Zusätzlich kann der therapeutische Effekt mit nicht-invasiven ophthalmologischen Methoden kontrolliert werden (Fishman et al. 2005). Es werden zwei verschiedene Strategien der Gentherapie verfolgt. Die spezifische Gentherapie sowie die unspezifische Gentherapie.

### **1.2.1 Unspezifische Gentherapie**

Degenerative Veränderungen der Retina führen in vielen Fällen, zum Teil über noch unbekannte Mechanismen, zur Apoptose (Marigo 2007). Darüber hinaus sind auch seit mehreren Jahren nicht-apoptotische Wege bekannt, die über Veränderungen des Metabolismus zum Zelluntergang führen (Sancho-Pelluz et al. 2008). Die Idee hinter der unspezifischen Gentherapie ist es, neuroprotektive Faktoren in den Zellen zu exprimieren, um die Rate des programmierten Zelltods zu verringern. Die Expression von neuroprotektiven Peptiden und Antioxidantien vor Ort sowie die Blockade des Fas Rezeptors (APO-1; CD95), der an der Apoptose beteiligt ist, sind vielversprechende Ansätze die Zellen zu schützen und Gegenstand der Forschung (Li et al. 2006, Chinsky et al. 2014). Es konnten bereits signifikante Ergebnisse gezeigt werden, dass der in den Müller-Zellen und im RPE physiologisch vorhandene neuroprotektive Faktor MANF (*mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor*) durch zusätzliche intravitreale Injektion die Stäbchen und Zapfen potent schützen konnte (Lu et al. 2018). GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*) ist ein weiterer Faktor, welcher in der Retina gebildet wird (Lucini et al. 2007). Mehrere Studien zeigten, dass bereits geringe Konzentrationen eine protektive Wirkung auf Ganglionzellen und Fotorezeptoren aufwiesen (Checa-Casalengua et al. 2011, Garcia-Caballero et al. 2018).

### **1.2.2 Spezifische Gentherapie**

Die spezifische Gentherapie kann angewendet werden, wenn das mutierte Gen bekannt ist. Sollte aufgrund der Genmutation ein Funktionsverlust des Proteins resultieren, kann mit der sogenannten Genadditionstherapie (*gene addition therapy*) eine korrekte Kopie des mutierten Gens in die Zellen eingeschleust werden (Sengillo et al. 2017).

Der Gentransfer wird mittels rekombinanter adenoassoziiertes viraler Vektoren (rAAV) bewerkstelligt. AAV sind sehr kleine, 21 nm durchmessende unbehüllte Parvoviren, die sich hervorragend für den Gentransfer eignen und eine lang andauernde Expression gewähren (Weber et al. 2003). Es sind insgesamt 12 verschiedene Serotypen bekannt, wovon Serotyp 2 hauptsächlich genutzt wird. In aktuellen Studien liegt der Fokus auf die Serotypen 5 und 8 sowie für den Transfer in RPE Zellen Serotyp 4, da mit ihnen höhere Transferraten erreicht werden können (Vandenberghes et al. 2011, Georgiadis et al. 2016). Die viralen Vektoren werden transskleral, transvitreal in den subretinalen Spalt zwischen dem RPE und den Photorezeptoren gespritzt. Dies führt zu einer lokalen, temporären Anhebung der Retina, die sich nach 1-2 Tagen zurückbildet (Stieger 2018). Die Möglichkeiten auf die subretinale Injektion zu verzichten und eine effektive intravitreale Injektion anzubieten, werden aktuell intensiv erforscht. Dadurch wäre es möglich die gesamte Retina zu therapieren sowie die Gefahr der Netzhautablösung zu minimieren (Dalkara et al. 2013). Andererseits steigt auch das Risiko einer Immunantwort des Körpers. Daher müssen mögliche Nebenwirkungen gründlich untersucht werden (Seitz et al. 2017).

Seit 2007 wurden bereits über 120 Patienten mit RPE65 Mutationen behandelt (MacLaren et al. 2014, Edwards et al. 2016, Bennett 2017). Es konnte gezeigt werden, dass sich nach erfolgter Additionstherapie die Funktionalität der Stäbchen-Rezeptoren in schwachem Beleuchtungsambiente deutlich verbessert hat. Positive Ergebnisse hinsichtlich eines verbesserten Visus konnten bisher nicht verzeichnet werden (Jacobson et al. 2015). Darüber hinaus konnten Studien, die über 3-5 Jahre gingen, zeigen, dass der Behandlungseffekt nachlassen kann. Die genauen Hintergründe sind nicht vollständig verstanden, jedoch wird vermutet, dass zum Einen die Expression des Enzyms ungenügend ist, um eine physiologische Zellfunktion zu erreichen und zum Anderen die Zellen einen „*point of no return*“ erreicht haben, in dem eine Funktionswiederherstellung nicht mehr erreicht werden kann (Jacobson et al. 2012, Bainbridge et al. 2015). Seit November 2018 ist Novartis' Gentherapeutikum Luxturna<sup>®</sup> (*Voretigene neparvovec*) zur Behandlung von Mutationen im RPE65 Gen auch in der EU zugelassen.

Mutationen im CHM-Gen führen zu einem Fehlen oder Mangel der Rab-Escortproteine (REP1), was zu gestörten intrazellulären Proteintransportvorgängen im RPE und den Fotorezeptoren führt (Preisung and Ayuso 2004). Dies hat zu Folge, dass bei der Chorioideremie, der klinischen Ausprägung dieser Mutation, die Patienten jahrelang

einen guten zentralen Visus aufweisen bei gleichzeitig ausgeprägter Gesichtsfeldeinschränkung, da die Erkrankung von peripher nach zentral fortschreitet. Die Genadditionstherapie integriert eine funktionelle Kopie des Gens für das REP1-Enzym in die Zellen, damit die Transportvorgänge wieder hergestellt werden können und der Zelluntergang aufgehalten wird (MacLaren et al. 2014). Edwards et. al zeigten 2016 erste Ergebnisse nach 3 Jahren, die darauf hindeuten, dass die Therapie ein Fortschreiten der Erkrankung mindestens verzögert (Edwards et al. 2016). In den letzten drei Jahren wurden über 10 neue klinische Studien begonnen, die verschiedene Genmutationen behandeln und in Zukunft weitere Erkenntnisse im Bereich der Gentherapie retinaler Erkrankungen bringen werden.

Bei dominant negativen Erbgängen wird eine andere Strategie verfolgt. Das mutierte Genprodukt wirkt aufgrund fehlerhafter Faltung, Funktion und Stabilität zellschädigend. Es ist bekannt, dass Mutationen im Rhodopsin-Gen am häufigsten betroffen sind (Dryja et al. 1991). Mit der „*gene silencing*“ – Technik wird zunächst versucht die Expression mittels Ribozyme oder siRNA herunter zu regulieren bevor das korrekte Gen transferiert wird und das korrekte Protein in den Zielzellen synthetisiert werden kann (Peters-Silva and Linden 2014). Die Ribozyme sowie die siRNA interferieren mit der mRNA und greifen somit in die Proteinbiosynthese ein (Mao et al. 2012).

Sowohl das *gene addition* als auch das *gene silencing* Verfahren stellen rein symptomatische Therapieoptionen dar, da das mutierte Gen nicht direkt korrigiert wird. Als vielverheißende Alternative hat sich zu diesen Verfahren das *genome editing* etabliert. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Verfahren wird hier mit Hilfe von hochspezifischen, „programmierbaren“ Nukleasen die gewünschte Ziel-DNA an einer exakten Position gespalten. Zelleigene Reparatursysteme verknüpfen die Enden des Doppelstrangbruchs. Unter Zugabe einer DNA Vorlage mit der korrigierten Sequenz in die Zielzellen kann die korrigierte Gensequenz mittels Homologie-vermittelter Reparatur (HDR) eingebaut werden und somit ein mutiertes Gen direkt therapiert werden (Jasin and Haber 2016, Yanik et al. 2017). Nachdem in den letzten Jahren die Effizienz dieser präzisen *tools* mehrfach bewiesen wurde, ist heute der Fokus vermehrt auf Strategien gesetzt, um das Problem der *off-target* Toxizität, also ungewünschte Spaltung nicht adressierter Genabschnitte, dieser Nukleasen zu lösen (Stieger 2018). Zusätzlich sind die Konstrukte meist sehr groß, sodass sie nicht in einen viralen Vektor passen. Die Anwendung zweier Vektoren im Rahmen einer Therapie senkt jedoch die Effizienz. In Zukunft muss der Schwerpunkt auf optimierte Vektoren sowie verbesserte

Nukleasen und Expressionskonstrukte gelegt werden, damit das große Potential dieser Methode auch praktisch umgesetzt werden kann. Gleichzeitig müssen die DNA-Reparaturmechanismen in Zusammenhang mit künstlich erzeugten DSBs in den Zellen besser verstanden werden, da der Großteil der Erkenntnisse auf Ergebnissen aus Zellkultursystemen stammt (Ran et al. 2015, Yanik et al. 2017).

### **1.3 DNA-Doppelstrangbruchreparatur**

Unterschiedliche Noxen können die DNA als Träger der genetischen Information verschieden stark schädigen. Reaktive Sauerstoffradikale können die DNA ebenso wie ionisierende Strahlung (Röntgenstrahlen, UV-Strahlung) oder mutagen wirkende Chemikalien und Chemotherapeutika schädigen. Die dabei entstehenden Schäden reichen von einzelnen Basenschädigungen bis zu DNA-Einzelstrangbrüchen (ESBs) und gravierender zu DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs). Insbesondere durch DSBs ist die genomische Integrität der Zellen gefährdet, da durch etwaige Schädigung eine genomische Instabilität oder der programmierte Zelltod resultieren kann (Pfeiffer et al. 2000, Bowater and Doherty 2006). Dementgegen stehen den Zellen, in Abhängigkeit der Zellzyklusphase, verschiedene Reparaturmechanismen zur Verfügung.

#### **1.3.1 Regulation des Zellzyklus**

Der Zellzyklus besteht aus zwei Phasen, der Interphase und der M-Phase. Die Interphase gliedert sich in die G1-Phase, die S-Phase und der G2-Phase. Die M-Phase gliedert sich in die Mitose und die Cytokinese, die Cytoplasmateilung. Zellen können aus der G1-Phase in die G0-Phase, die Ruhephase übergehen. Dieser Zustand ist oft reversibel. Stammzellen können sich beispielsweise für einen langen Zeitraum in der Ruhephase befinden. Bei Zelltypen, bei denen keine weitere Zellteilung mehr stattfindet (z.B. Nervenzellen), ist der Übertritt in die G0-Phase unumkehrbar. Die G1-Phase beginnt unmittelbar nach der Zellteilung. Zellwachstum und Zellorganellen- und Zellbestandteilbildung sind Hauptmerkmale dieser Phase. Nach der Reifung geht die

Zelle in die S-Phase über. In der Synthesephase findet die DNA-Replikation statt. Chromatinproteine und Histone werden produziert. Die DNA wird mit Hilfe der Chromatinproteine um die Histone gewickelt, sodass Chromatin, also eine besondere Anordnung der DNA, entsteht. In der G<sub>2</sub>-Phase findet eine Zellkontaktlösung und Zellvergrößerung statt. Zellorganellen und Zellbestandteile teilen sich auf. Es werden verschiedene Teilungsfaktoren synthetisiert. Das Ende der G<sub>2</sub>-Phase markiert gleichzeitig auch das Ende der Interphase. Während der Mitose kondensiert die DNA von Chromatin zu den Chromosomen. Es werden Spindelapparate gebildet. Darüber hinaus lösen sich die Zellmembran und das Kernkörperchen auf. Die Chromatiden werden mit Hilfe der Spindelapparate zu den Polen gezogen. Darauf folgend werden die Zellkernmembranen und Kernkörperchen neu gebildet und die Spindelapparate aufgelöst. Mithilfe eines kontraktilen Rings, bestehend aus Aktin und Myosin wird das Cytoplasma geteilt und es entstehen zwei neue Tochterzellen.

Die Zellzyklusregulation ist ein komplexer Vorgang, an dem verschiedene Enzyme beteiligt sind. Durch Cycline und Cyclin-abhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, *CDK*) wird der Phasenübergang reguliert. Dabei wird zu bestimmten Zeitpunkten die Cyclinexpression verstärkt bis ein Maximum erreicht wird. Anschließend werden die Cycline rasch wieder abgebaut. Spezifische Konzentrationen der Cycline sind für den Übergang von Phase in die nächste ausschlaggebend. Weitere Faktoren, die eine Rolle spielen ob eine Zelle von einer Phase in die nächste übergeht sind Zellgröße, Anzahl vorhandener Nachbarzellen, das Vorhandensein verschiedener Wachstumsfaktoren und das Nährstoffangebot. Der Zyklus wird über Kontrollpunkte (*checkpoints*) überwacht. Dies stellt sicher, dass eine neue Phase erst dann beginnt, wenn die vorherige abgeschlossen ist (Alberts 2002). Treten in einer Zelle gehäuft DNA-Schäden auf, kann dies zu einem passageren Stop des Zyklus führen. Komplexe Schadenserkennungskaskaden und Reparaturmechanismen greifen sodann in Abhängigkeit der vorliegenden Zellzyklusphase ein (Yuan et al. 2010). Bei der Früherkennung von Schäden sind ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) involviert. ATR ist an der Signalweitergabe an die Checkpointkinase 1 (Chk1) beteiligt, welche wiederum Zielproteine wie Cdc25A (*M-phase inducer phosphatase 1*) und Cdc25C (*M-phase inducer phosphatase 3*) durch Phosphorylierung inaktiviert. Durch die Inaktivierung dieser Threonin-Phosphatasen können CDK1 (*Cyclin-dependent kinase 1*) und CDK2 (*Cyclin-dependent kinase 2*) nicht durch Dephosphorylierung aktiviert werden, sodass

der Zellzyklus nicht fortschreitet (Peng et al. 1997, Sanchez et al. 1997). ATM phosphoryliert die Checkpointkinase 2 (Chk2), welche ebenfalls Cdc25A und Cdc25C inaktivieren kann. Darüber hinaus aktiviert ATM das Protein p53. Dies führt zur einer verstärkten Transkription des CDK-Inhibitors p21. Dieser bindet an den G1-Cyclin-CDK Komplex und verhindert den Übergang von der G1-Phase in die S-Phase. (Hurley and Bunz 2007, Matsuoka et al. 2007).

### 1.3.2 Erkennung von Doppelstrangbrüchen (DSB)

Zu Beginn erkennen ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) einen Doppelstrangbruch und binden dort. Die Serin/Threonin-Kinasen können unter anderem eine schnelle Phosphorylierung des H2AX Histons durchführen, welches dann  $\gamma$ H2AX genannt wird (Matsuoka et al. 2000). Das H2AX Histon gehört zur H2A Familie und stellt mit circa 10% aller H2A Moleküle eine eher seltene Histonvariante dar, wobei die Häufigkeit von Zelltyp zu Zelltyp variiert (Bonner et al. 2008). Im Rahmen der Früherkennung von Doppelstrangbrüchen spielt es jedoch eine zentrale Rolle, da es als erstes Protein eine Signalkaskade initialisiert, wodurch es zur Akkumulation von einer Vielzahl von Proteinen kommt, die an der Schadenserkennung beteiligt sind (Rogakou et al. 1998, Bartova et al. 2008). MDC1 (*Mediator of Damage Checkpoint protein 1*) bindet direkt an  $\gamma$ H2AX wodurch die E3 ubiquitin protein Ligase RNF8 (*ring finger protein 8*) aktiviert wird. RNF8 und RNF168 (*ring finger protein 168*) ubiquitinylieren  $\gamma$ H2AX (Brandsma and Gent 2012). Resultierend kommt es zur Rekrutierung von 53BP1 (*p53 binding protein 1*) und RAP80 (*receptor-associated protein 80*) (Stewart et al. 2009). RAP80 bildet mit BRCA1 (*Breast cancer 1*) einen Komplex, sodass in der S-Phase oder G2-Phase die Homologie-vermittelte Reparatur (HDR) stattfinden kann. Dementgegen sind 53BP1 und RIF1 (*Telomere-associated protein RIF1*) für die Initiierung von *non-homologous end-joining* (NHEJ) verantwortlich (Ward et al. 2003).

### 1.3.3 DNA Reparaturmechanismen

Es existieren zwei Hauptreparaturmechanismen in den Zellen um DSBs zu reparieren: *homology directed repair* (HDR) und *non-homologous end-joining* (NHEJ) wobei letzterer der häufigste, schnellste aber auch unpräzisere Mechanismus ist. Eine Alternative zum klassischen NHEJ ist das *Microhomology-mediated end joining* (MMEJ).

#### 1.3.3.1 *Non-homologous end-joining* (NHEJ)

NHEJ ist der Hauptreparaturmechanismus der Zellen, da es in jeder Phase des Zellzyklus stattfinden kann. Gleichzeitig gilt es als ein unpräziser Mechanismus, da die DNA Bruchenden ohne Vorlage „einfach“ wieder miteinander verknüpft werden. Dies hat zur Folge, dass Informationsteile durch das Fehlen oder durch das Hinzufügen von einigen wenigen Nukleotiden verloren gehen können. Andererseits können im ungünstigsten Fall ohne NHEJ mehrere Hundert Gene verloren gehen.

Für die Reparatur von DSBs wird im Allgemeinen Nukleaseaktivität benötigt um zerstörte DNA Teile zu entfernen, Polymeraseaktivität um den Reparaturprozess zu unterstützen sowie Ligaseaktivität um den DNA-backbone wiederherzustellen (Lieber 2010). Die Reparatur eines DSB beginnt mit dem Binden des Ku70/Ku80 Heterodimers an die DNA. Das Heterodimer bildet einen asymmetrischen Ring um die DNA und umschließt sie, sodass die DNA Enden im Bereich des Bruches zusätzlich stabilisiert werden (Blier et al. 1993). Durch Konformationsänderung des gebundenen Ku Proteins ist eine starke Bindung zu weiteren benötigten Proteinen möglich (Lieber et al. 2006). Eine weitere Aufgabe des Ku70/Ku80 Komplexes ist die Rekrutierung von DNA-PKcs (*DNA dependent protein kinase catalytic subunit*). Diese ist scheinbar in der Lage die Lücke zwischen den Bruchenden zu überbrücken und hält sie somit eng beieinander (DeFazio et al. 2002). Darüber hinaus werden die Bruchenden verdeckt, sodass ein zusätzlicher Schutz vor falscher Verknüpfung durch Ligasen vorliegt (Weterings et al. 2003). Ku70/Ku80 bindet anschließend DNA-PKcs und formt zusammen einen Komplex, welcher DNA-PK genannt wird. Damit die beschädigte Stelle repariert werden kann, müssen die freien Enden von DNA-PK wieder freigegeben werden.

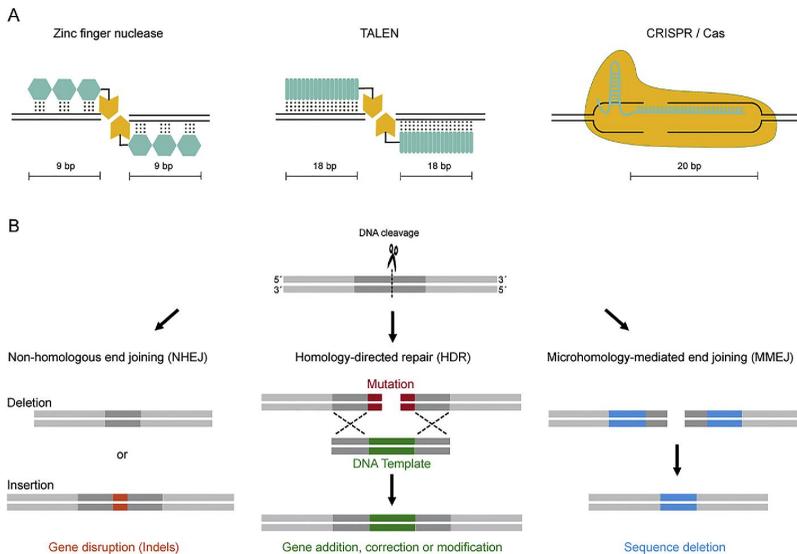
Dies geschieht durch Autophosphorylierung von DNA-PKcs (Meek et al. 2007). Der Komplex erfährt hierdurch wiederum eine Konformationsänderung, sodass die Enden wieder frei vorliegen (Chen et al. 2007). Darüber hinaus werden WRN (*Werner syndrome ATP-dependent helicase*) und die Nuklease Artemis von DNA-PKcs phosphoryliert und damit aktiviert (Karmakar et al. 2002). Nun kann Artemis als 5' oder 3' Endonuklease funktionieren. Fehlende Nukleotide werden von den Polymerasen  $\lambda$  und  $\mu$  hinzugefügt (Schipler and Iliakis 2013). Zum Schluss bilden die ATP-dependent *LIG4 (DNA Ligase IV)*, *XRCC4 (X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4)* und *XLJ (NHEJ1, non-homologous end joining factor 1)* einen Komplex und die DNA wird ligiert (Povirk 2012).

### **1.3.3.2 Microhomology-mediated end joining (MMEJ)**

Eine Alternative zum klassischen c-NHEJ stellt das *microhomology-mediated end joining* (MMEJ) dar. Im Gegensatz zu NHEJ werden die Bruchenden mit microhomologen Domänen (5-25 Nukleotide) erst verlängert und anschließend verknüpft, wodurch regelhaft Deletionen oder auch Insertionen auftreten können (Deng et al. 2014). Diesen Mechanismus können Wissenschaftler nutzen, um gewünschte DNA Vorlagen einzubauen, sofern sie die exakten mikrohomologen Regionen enthalten. MMEJ ist unabhängig von Ku und der *LIG4* und findet fast ausschließlich in der S-Phase statt. Der MRN Komplex, bestehend aus *Mre11 (double strand break repair nuclease)*, *NBS1 (Nibrin)* und *Rad50 (Rad50 double strand break repair protein)* ist für diesen Signalweg, genauso wie für die homologie-vermittelte Reparatur (HDR) essentiell (Truong et al. 2013). Es ist jedoch noch unklar, welche Faktoren dafür eine Rolle spielen, dass MMEJ anstelle von HDR oder NHEJ stattfindet. Nach der Prozessierung werden die DNA Enden durch die *DNA Ligase III* wieder verknüpft (Sinha et al. 2016).

### 1.3.3.3 *homology directed repair (HDR)*

HDR stellt einen sehr präzisen, nahezu fehlerfreien Reparaturweg dar, da für die Beseitigung von DSBs ein Template vorliegt. Hierdurch können die Enden mit der richtigen Nukleotidsequenz durch Abgleich sequenzhomologer Bereiche wieder miteinander verknüpft werden (Heyer et al. 2010). Die Vorlage bildet dabei das Schwesternchromatid, weshalb dieser Mechanismus lediglich in der späten S-Phase oder G2-Phase möglich ist (Sung and Klein 2006). Durch intensive Forschung konnten eine Vielzahl von Proteinen und deren Funktion in Eukaryoten im Rahmen der HDR detektiert werden (West 2003). Nach der Erkennung eines DSB wird der MRN Komplex, bestehend aus Mre11 (*double strand break repair nuclease*), NBS1 (*Nibrin*) und Rad50 (*Rad50 double strand break repair protein*) rekrutiert. Die Bruchenden werden prozessiert, sodass einzelsträngige 3' Überhänge entstehen (Heyer et al. 2010). An diesem Prozess sind zudem EXO 1 (*exonuclease 1*), DNA2 (*DNA replication helicase 2 homolog*) und humanes CtIP (*C-terminal binding protein (ctBP)-interacting protein*) beteiligt (Sartori et al. 2007, Symington and Gautier 2011). Rad50 ist zusätzlich in der Lage die DNA zu entwinden (Paull and Gellert 1999). Es wird vermutet, dass NBS1 durch Kommunikation mit ATM an der Schadenssignalkaskade beteiligt ist und die HDR Kaskade gefördert wird, während der NHEJ Reparaturweg supprimiert wird (Saidi et al. 2010). Darüber hinaus ist bekannt, dass BRCA1 (*breast cancer 1*) an der Prozessierung der DNA bei der Reparatur beteiligt ist (Daley and Sung 2014). Die einzelsträngigen DNA Enden werden von RPA1 (*replication protein A1*) gebunden und somit geschützt. RPA1 wird von BLM (*Bloom syndrome, RecQ helicase-like*) and EXO1 (*Exonuclease 1*) rekrutiert (Mimitou and Symington 2009). RPA1 wird von Rad51 mit Hilfe von BRCA1, BRCA2 und Rad52 ersetzt und bildet ein Nukleoproteinfilament. Das Protein sucht nach homologen Regionen und akkumuliert zusammen mit BRCA2 DNA (Ting and Lee 2004). Die DNA Ligase I (LIG1) ligiert nach abgeschlossener DNA Synthese die DNA enden (Holthausen et al. 2010).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der genutzten Endonukleasen und der Hauptreparaturwege**

(A) Die DNA *binding* Domänen sind in türkis dargestellt und die DNA Restriktionsproteine in gelb. Unter jeder schematischen Darstellung ist jeweils die Länge der charakteristischen DNA Erkennungssequenz dargestellt. (B) Übersicht der drei Hauptreparaturwege, welche in eukaryotischen Zellen vorhanden sind, um Doppelstrangbrüche zu reparieren. Unter den Schemata sind die jeweiligen Auswirkungen der Reparaturmechanismen dargestellt (Yanik et al. 2017).

## 1.4 Genome editing mit Hilfe von programmierbaren Endonukleasen

Hochspezifische Nukleasen können gezielt Doppelstrangbrüche verursachen. Dies wird genutzt, um durch die zelleigenen Reparatursysteme ein *gene knock out* (Lieber 2010) oder durch Hinzufügen einer DNA Vorlage mittels HDR *gene addition* oder *gene correction* herbeizuführen (Jasin and Haber 2016). Es gibt eine Reihe von hochspezifischen Endonukleasen, die im Folgenden beschrieben werden.

### 1.4.1 Meganukleasen

Meganukleasen sind natürlich vorkommende Endodesoxyribonukleasen (14-40 Basenpaare), welche in 5 Familien eingeteilt werden. Die LAGLIDADG Familie ist die größte Familie und am besten charakterisiert (Pauwels et al. 2014). Aus dieser Familie stammt auch das natürlich vorkommende Enzym I-CreI, welches als Vorlage für künstlich entwickelte Meganukleasen gilt (Grizot et al. 2010). Es ist sehr aufwendig die Nukleasen auf neue Gensequenzen zu „programmieren“ und in ihrer Spezifität zu modifizieren, sodass mit der Zeit der Fokus immer mehr auf andere Endonukleasen gelegt wurde (Boissel et al. 2014).

### 1.4.2 Zinkfingernukleasen

Zinkfingernukleasen (ZFN) gehören zu den *tools* „der ersten Stunde“ im *genome editing* (Chandrasegaran and Carroll 2016). Es handelt sich um chimäre Enzyme, die aus einer DNA-Bindungsdomäne bestehen, welche mit einer Nukleasedomäne, meist FokI fusioniert ist (Bibikova et al. 2001). Die DNA-Bindungsdomäne besteht aus 3-6 Zinkfingern, wobei jeder aus 30 Aminosäuren besteht und 3 Nukleotide binden kann (Klug 2010). Um lange DNA Sequenzen zu binden, ist es möglich mehrere Module aneinandertzureihen. Dabei gilt es zu beachten, dass die Module nicht als unabhängig betrachtet werden können. Darüber hinaus interferieren die einzelnen benachbarten Module und können sich sogar von der DNA lösen, sodass die Spezifität bei steigender ZFN-Kettenlänge abnimmt (Ramirez et al. 2008). Durch algorithmische Methoden wie OPEN ( *oligomerized pool engineering* (Maeder et al. 2008) oder CoDa (*context dependent assembly*) (Sander et al. 2011) konnten durch Ermittlung geeigneter Anordnungen der Module die Probleme minimiert werden. Trotz des großen Aufwands geeignete Anordnungen zu finden und der limitierten „Programmierbarkeit“ (Pingoud and Wende 2011) sind ZFN wichtige *tools* in der Gentherapie und sind Gegenstand der Forschung in klinischen Studien zur Behandlung von Hämophilie B, Mucopolysaccharidose I und der Geneditierung des CCR5 Gens im Rahmen von HIV Infektionen (Tebas et al. 2014).

### 1.4.3 TALE-Nukleasen (TALEN)

*Transcription-activator-like-Effector*-Nukleasen sind ebenfalls Fusionsproteine bestehend aus einer Nukleasedomäne mit der katalytischen Untereinheit des Fok I sowie einer DNA -Bindungsdomäne, welche der zentralen Region der TALE-Proteinen aus dem phylogenen Bakterium *Xanthomonas* entstammt (Boch and Bonas 2010). Die zentrale Region ist durch repetitive Sequenzen, den repeats aufgebaut. Ein Repeat besteht aus 34 Aminosäuren. Einzig an den Aminosäurepositionen 12 und 13 unterscheiden sich die repeats, die sich zwischen eineinhalb und 33,5 Mal wiederholen können. Diese zwei Aminosäuren werden auch *repeat variable disresidues* (RVD) genannt (Scholze and Boch 2011). Es ist bekannt, dass lediglich diese zwei Aminosäuren in jedem *repeat* für die Erkennung der DNA verantwortlich sind (Boch et al. 2009). Nahezu jede DNA Sequenz kann durch die TALEN adressiert werden. Eine höhere Spezifität kann zusätzlich durch den Austausch der Nukleasen erreicht werden (Schmid-Burgk et al. 2015).

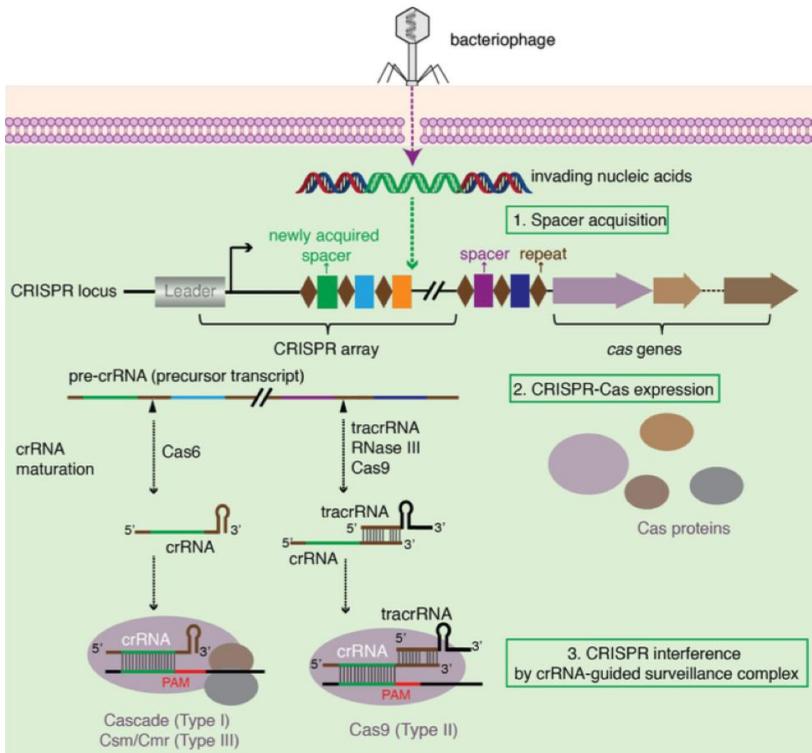
### 1.4.4 CRISPR-Cas

*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) wurden 1987 erstmals in *Escherichia coli* entdeckt (Ishino et al. 1987). Sie sind Teil eines komplexen Schutzmechanismus vieler Prokaryoten vor eindringenden Viren oder Plasmiden (Wiedenheft et al. 2012). Die CRISPR-Cas Systeme werden in drei Hauptgruppen (I, II, III) und 11 Subtypen unterteilt.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen im Allgemeinen in der Art und Weise, wie die „Immunantwort“ prozessiert wird und welche Nukleasen beteiligt sind (Makarova et al. 2011). Es ist bekannt, dass in circa 40 % der sequenzierten Bakterien- und in circa 90 % der Archaeengenome CRISPR vorhanden sind (Horvath and Barrangou 2010, Richter et al. 2012). Eine CRISPR Anordnung besteht aus sich wiederholenden kurzen (21-47 bp) Sequenzen, den *repeats*. Diese *repeats* werden von kurzen Sequenzen den *spacer* oder *protospacer* unterbrochen. Während die *repeats* innerhalb einer Anordnung nahezu identisch in ihrer Abfolge und Länge sind, variiert die Sequenz der *protospacer* erheblich (Karginov and Hannon 2010). Vergleiche der *protospacer* Sequenzen mit der Sequenz bekannter Phagen oder Plasmiden zeigten eine

homologe Übereinstimmung. Diese Ergebnisse stützen die heutigen Erkenntnisse, dass in der Adaptionsphase nach Eindringen eines Pathogens die Fremd-DNA zunächst erkannt wird und in Form eines *protospacers* an das proximale Ende eines CRISPR Arrays integriert wird und von einem duplizierten *repeat* flankiert wird (Bolotin et al. 2005). Man geht davon aus, dass an der Akquisition der *protospacer* die Cas1, Cas2 und auch Cas9 Endonukleasen beteiligt sind, obwohl die genauen Mechanismen bisher nicht vollständig bekannt sind (Makarova et al. 2015, Shmakov et al. 2015). Nach der Integration der Fremd-DNA wird die *protospacer* Region transkribiert und es entsteht zunächst eine unreife *precursor-crRNA* (pre-crRNA) und schließlich über weitere, nicht genau verstandene Prozessierungsschritte mit Hilfe der RNase III und Cas9 Nuklease eine reife CRISPR RNA (crRNA), welche die Sequenz der Fremd-DNA beinhaltet (Deltcheva et al. 2011). crRNA hybridisiert mit einer weiteren RNA, der *transactivating crRNA* (tracrRNA). Die tracrRNA ist ebenfalls an der Prozessierung der crRNA beteiligt. Die nun doppelsträngige RNA bildet einen Komplex mit der Cas9 Endonuklease und „leitet“ diese zur *target* DNA, um dort gezielt einen Doppelstrangbruch zu verursachen (Hille and Charpentier 2016).

Als *gene editing tool* hat sich das CRISPR-Cas II System mit der zugehörigen Endonuklease Cas9 aus *Streptococcus pyogenes* (Typ II-A) bewährt (Cong et al. 2013, Hwang et al. 2013). Cas9 ist eine Endonuklease mit zwei aktiven Domänen, die RuvC-Nuklease und die HNH-Nuklease und nimmt eine zentrale Rolle in diesem Mechanismus ein (Gasiunas et al. 2012). Der Komplex aus crRNA, tracrRNA und Cas9 bindet an der *protospacer adjacent motif* (PAM) Sequenz über die *PAM interacting* Domäne des Cas9. Die Cas9 Nuklease aus *Streptococcus pyogenes* erkennt und bindet an die PAM Sequenz 5'-NGG-3' (Anders et al. 2014). Die PAM Sequenz muss zwingend unmittelbar an das *target* angrenzen, da sonst keine Erkennung und keine Bindung an den komplementären Strang stattfindet (Sternberg et al. 2014). Die HNH Nuklease spaltet den an die crRNA gebundenen Strang und die RuvC Nuklease den gegenüberliegenden Strang drei Basenpaare von der PAM Sequenz entfernt (Ran et al. 2013, Ishino et al. 2018).



**Abb. 3: Schematischer Überblick des CRISPR-Cas Systems**

Ein CRISPR Locus besteht aus einer AT-reichen Leader Sequenz (graue Box) gefolgt von einer Reihe repetitiver DNA-Sequenzen den *repeats* (braune Rauten) und nicht repetitiven Sequenzen den *spacer* (bunte Rechtecke) sowie den Cas-Genen (breite Pfeile). 1) Eindringende Fremd-DNA (grün hervorgehoben) wird prozessiert und in Form eines neuen *spacers* in das CRISPR Array integriert. 2) In der Expressionsphase werden verschiedene Cas Enzyme synthetisiert sowie eine lange *precursor* RNA (pre-crRNA) transkribiert. In Typ I und III Systemen wird die pre-crRNA durch Cas9 in kleine crRNAs geschnitten. In Typ II Systemen werden die reifen crRNAs durch *trans-activating* RNA (tracrRNA), Cas9 und RNase III prozessiert. 3) In der Interferenzphase fungiert die crRNA als *guide* RNA für die Cas Endonukleasen. In Typ I und III Systemen schneidet ein Komplex aus mehreren Unterheiten die Fremd-DNA. In Typ II Systemen wird ein DSB durch die zwei aktiven Zentren von Cas9 verursacht. Cas9 bildet einen Komplex mit tracrRNA und crRNA. Die Bindung an das *target* entsteht durch Erkennung der PAM Sequenz (Jiang and Doudna 2015).

Jinek et al. entwickelten 2012 erstmals eine 20 bp lange chimäre *guide* RNA, welche den natürlich in Prokaryoten vorkommenden tracrRNA:crRNA Komplex ersetzte. Hierfür wurde das 3' Ende der crRNA Sequenz über eine *linker* Sequenz mit dem 5' Ende der tracrRNA verknüpft. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass mit Hilfe der artifiziellen *guide* RNA und der Cas9 Endonuklease DNA Sequenzen angrenzend an einer PAM Sequenz *in vitro* gespalten werden konnten (Jinek et al. 2012). 2013 folgten erfolgreiche Versuche DNA Abschnitte mit Hilfe artifizieller *guide* RNAs und Cas9 zu adressieren und zu spalten (Cong et al. 2013, Mali et al. 2013). Im selben Jahr fanden auch erste *in vivo*-Experimente in Mausmodellen statt. Die Ergebnisse zeigten eine hohe Effizienz der Cas9 Endonuklease und die Möglichkeit mehrere *targets* gleichzeitig zu adressieren (Wang et al. 2013). Die Stärke dieses *genome editing tools* zeigte sich abermals 2015, als erfolgreich 62, aus Schweinen stammende Retroviren (*porcine endogenous retroviruses PERVs*) in einer Zelllinie inaktiviert werden konnten. Auf dem Gebiet der Xenotransplantation stellt dies einen bedeutenden Fortschritt dar (Yang et al. 2015).

Das CRISPR-Cas9 System ermöglicht Forschern eine vergleichsweise einfache und schnellere „Programmierung“ und wird *ex vivo* in verschiedenen Zellen unter anderem Stammzellen und Zygoten angewendet. Durch gezielte DSBs können via zelleigener Reparatursysteme (NHEJ vs. HDR) Gene ausgeschaltet werden oder im Rahmen der homologie-vermittelten Reparatur und unter Zugabe einer korrekten DNA Vorlage fehlerhafte Gensequenzen korrigiert werden (Mei et al. 2016). Ebenso wie bei den restlichen *genome editing tools* spielen auch bei CRISPR-Cas Systemen *off-target* Effekte, also unerwünschte Spaltungen der Ziel-DNA an nicht adressierten Lokalisationen eine Rolle. Unter Umständen kann dies zur Folge haben, dass es zu Genmutationen oder die Zellen in Apoptose gehen (Yee 2016). Daher ist mit den Jahren der Fokus immer mehr in die Quantifizierung der *off-target* Effekte sowie der Entwicklung von Strategien, um diese zu minimieren gesetzt worden (Tsai et al. 2015). Beispielsweise werden mittlerweile verschiedene PAM Sequenzen genutzt oder gar generiert (Kleinstiver et al. 2015, Haeussler and Concordet 2016). Web-basierte Datenbank-*tools* sagen die Effizienz und mögliche *off-targets* vorher (Doench et al. 2016). Die Inaktivierung einer Nukleasedomäne von Cas9 führt dazu, dass lediglich *nicking* stattfindet, also Einzelstrangbrüche entstehen. Cas9 Enzyme mit *nicking*-Aktivität senken die *off-target* Effekte ebenfalls (Ran et al. 2013).

## 1.4 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist es herauszufinden, inwiefern die Informationen aus den Experimenten in zellfreien Reaktionssystemen, Voraussagen über die Aktivität der Cas9 Endonuklease mit verschiedenen *guide* RNAs in der Zellkultur erlauben.

Im ersten Schritt muss hierfür die *guide* RNA in ein Plasmid kloniert werden, damit die Nuklease zur ausgesuchten *target-site* geführt werden kann. Anschließend werden zuerst zellfreie Tests zum Aktivitätsnachweis durchgeführt, bevor das System in eukaryotischen Zellen *in vitro* getestet werden kann. Hier soll die Expression der Cas9 Endonuklease in den Zellen und die Translokation in die Zellkerne bewiesen werden. Abschließend sollen qualitative sowie quantitative Aktivitätstests mit Hilfe von FACS Analysen und der Fluoreszenzmikroskopie zeigen, wie aktiv einzelne *guide* RNAs sind.

## 2. Material

### 2.1 Chemikalien

**Tabelle 1: Verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
40 % Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	Applichem (Darmstadt)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Coomassie Brilliant Blue G 250	Applichem (Darmstadt)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Carl Roth (Karlsruhe)
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	Applichem (Darmstadt)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Applichem (Darmstadt)
Glycin	Applichem (Darmstadt)
Hepes	Carl Roth (Karlsruhe)
Imidazol	Applichem (Darmstadt)
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Applichem (Darmstadt)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
L-Glutamin	Biochrom AG (Berlin)
Lipofectamine LTX and Plus™ Reagent	Invitrogen (Karlsruhe)

Luria Broth Base	Invitrogen (Karlsruhe)
Sucofin Magermilchpulver	TSI GmbH (Zeven)
2-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Methanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Merck (Darmstadt)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (Darmstadt)
Tris(2-chlorethyl)phosphat (TCEP)	Applichem (Darmstadt)
Triton X 100	Carl Roth (Darmstadt)

## 2.2 Antibiotika

Tabelle 2: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	LB Medium ( $\mu\text{g/ml}$ )	Agar Platte ( $\mu\text{g/ml}$ )
Ampicillin	75	100
Chloramphenicol	20	30
Kanamycin	25	25

## 2.3 Enzyme und Antikörper

Alle Enzyme wurden in den mitgelieferten Puffern und nach Herstellerangaben verwendet.

**Tabelle 3: Verwendete Enzyme und Antikörper**

<b>Enzym / Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Accutase	Pan Biotech (Aidenbach)
BpiI	ThermoScientific (Schwerte)
Pfu DNA Polymerase	Promega (Mannheim)
T4-DNA-Ligase	NewEngland Biolabs (Frankfurt am Main)
T7 RNA Polymerase	Roboklon (Berlin)
Taq DNA Polymerase	NewEngland Biolabs (Frankfurt am Main)
Thermostabile Pyrophosphatase	Roboklon (Berlin)
Anti FLAG Tag Antikörper (Anti DYKDDDDK)	Clontech (St. Germain-en-Laye)
Anti mouse Antikörper	SIGMA (Seelzen)
Donkey anti-mouse Antikörper 488nm	Rockland (Madison IL)

## 2.4 Reagenzien und Kits

**Tabelle 4: Verwendete Reagenzien und Kits**

<b>Reagenz/Kit</b>	<b>Hersteller</b>
dNTPs	Fermentas (St. Leon-Rot)
ECL Westernblotting Detection Reagent	GE Healthcare (Solingen)
FKS (Fötiales Kälberserum)	PAA (Cölbe)
M-Per® Mammalian Protein Extraction Reagent	ThermoScientific (Schwerte)
Ni <sup>2+</sup> -NTA-Agarose	Macherey Nagel (Düren)
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN® Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN® Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden)

Ponceau S Solution	SIGMA (Seelzen)
Proteaseinhibitor	Roche (Mannheim)
T7 Transkriptionskit	Roboklon (Berlin)
Wizard® SV-Gel and PCR Clean Up System	Promega (Mannheim)

## 2.5 Puffer, Medien und Lösungen

**Tabelle 5: Verwendete Puffer, Medien und Lösungen**

<b>Puffer/Medium/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, PAA Cölbe)	435 ml DMEM, 50 ml Fötales Kälberserum (FKS), 10 ml L-Glutamin, 5ml Pencillin/Streptomycin
LB-Agar	LB Medium + 1,5% Agar autoklavieren, Zugabe des Selektionsantibiotikums sowie Gießen der Platten (15ml) und Lagerung bei 4°C.
Blocking Puffer	5% Milchpulver in 1x TBS
10x SDS Laufpuffer	30 g/L Tris, 144 g/L Glycin, 100 ml SDS, pH 8,3
10x TBS	12,11 g/L Tris, 87,75 g/L NaCl, pH 7,5
10x TPE	0,9 M Tris, 20 mM EDTA, pH 8,2
Westernblot Transferpuffer	11,6 g/L Tris, 5,8 g/L Glycin, 400 ml Methanol, qsq 2 Liter H <sub>2</sub> O
10x PBS	80 g/L Natriumchlorid, 2 g/L Kaliumchlorid, 14,4 g/L Dinatriumhydrogenphosphat, 2,4g/L Kaliumhydrogenphosphat, qsq 1 Liter H <sub>2</sub> O
Lysepuffer Proteinaufreinigung	20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, 1 mM TCEP qsq dH <sub>2</sub> O

Waschpuffer für Proteinaufreinigung	20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl, qsq dH <sub>2</sub> O
Dialysepuffer für Proteinaufreinigung	20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM TCEP, 50% Glycerin, qsq dH <sub>2</sub> O
SOC Medium	5 g/l Hefeextrakt 0,5 % (w/v), 20 g/l Trypton 2 % (w/v), 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM Glucose
1x STE	10 mM Tris/ HCl, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0
5x DNA Auftragspuffer	25 % (w/v) Saccharose, 1,2 % (w/v) SDS, 250 mM EDTA, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, pH 8,0 (eingestellt mit NaOH)
1x Laemmli-SDS Elektrophorese Puffer	25 mM Tris, 0,19 M Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3
5x Laemmli-gelaufragspuffer (5x LAP)	350 mM Tris/HCl, 0,1 % (w/v) SDS, 6 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 30 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8
Puffer für den Cas 9 Aktivitätstest in vitro	0,15 M KCl, 0,02 M HEPES, 0,5 mM DTT, 0,1 mM EDTA qsq dH <sub>2</sub> O

## 2.6 Größenmarker

Tabelle 6: Verwendete Größenmarker

Größenmarker	Hersteller
Gene Ruler™ 1kB DNA Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
Page Ruler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
pUC 8 Mix	Fermentas (St. Leon-Rot)
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	ThermoScientific (Schwerte)

## 2.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien

<b>Gerät/Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
6-well-Platten	Greiner (Frickenhausen)
8-well-Platten	Greiner (Frickenhausen)
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare
Autoklav DX-65	Systec (Wettenberg)
BioDocAnalyse	Biometra (Göttingen)
BioPhotometer	Eppendorf (Köln)
Blotter	Biometra (Göttingen)
Drucker für Photometer	Seiko (Neu-Isenburg)
Einmal-Küvetten	Carl Roth (Karlsruhe)
Einweg-Pipettenspitzen	Biozym (Oldendorf)
Eismaschine	Scotsman (Berlin)
Elektrophorese-Kamm	Biometra (Göttingen)
Elektrophorese-Kammer	Biometra (Göttingen)
Elektroporator 2510	Eppendorf (Köln)
Falcon tubes (15 ml/ 50 ml)	Greiner (Frickenhausen)
Fastblot Whatman	Biometra (Göttingen)
Fluoreszenzmikroskop BZ 8000	Keyence (Essen)
Fluorescent Mounting Medium	Dako (Hamburg)
Gefrierschränke	Liebherr (Ochsenhausen)
Gefrierschränke	VWR Int. (Darmstadt)
Gelkamm	Biometra (Göttingen)
Glaspipetten (5 ml/10 ml/20 ml)	VWR Int. (Darmstadt)

Handschuhe	NOBA (Wetter)
Inkubator	Binder (Tuttlingen)
Lichtmikroskop	VWR Int. (Darmstadt)
Magnetrührer	IKA (Staufen)
Milli-Q Synthesis Wasseraufbereitungssystem	Millipore (Schwalbach)
Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	PeqLab (Erlangen)
Netzgerät Power Pack P25T	Biometra (Göttingen)
Neubauer Zählkammer improved	LO Laboroptik (Friedrichsdorf)
Nitrocellulose Transfer Membrane Protran	Whatman (Dassel)
Objektträger SuperFrost® plus	Hartenstein (Würzburg)
PCR-Cycler T Professional Basic Gradient	Biometra (Göttingen)
pH-Elektrode	Mettler Toledo (Greifensee)
Pipetten	Eppendorf (Köln)
Pipetten	Brand (Wertheim)
Quarz-Küvette (10 mm Dicke)	Hellma (Essen)
Reaktionsgefäße (0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Sterilbank MSC Advantage	ThermoScientific (Schwerte)
Thermoblock TB2	Biometra (Göttingen)
Thermocycler	Landgraf (Langenhagen)
Tischzentrifuge Heraeus Pico 17 Centrifuge	ThermoScientific (Schwerte)
Schüttler Certomat H	Sartorius AG (Göttingen)
Ultraschallgerät Sonifier 250	Branson (Danbury)
Vortexer	VWR Int. (Darmstadt)
Waage	Ohaus (Zürich)
Wasserbad TW12	Julabo (Seelbach)

Zellkulturschalen (58cm <sup>2</sup> )	Greiner (Frickenhausen)
Zentrifuge 4K15	SIGMA (München)
Zentrifuge 1-15 PK	SIGMA (München)
Zentrifuge J2-HS	Beckmann (Krefeld)
Zentrifuge J6-HC	Beckmann (Krefeld)

## 2.8 Biologische Materialien

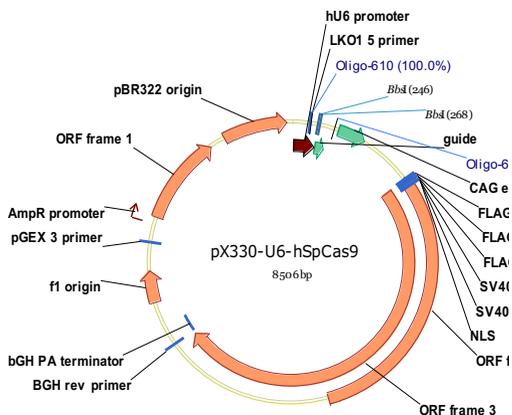
### 2.8.1 Plasmide

#### **pmJ806 (addgene):**

Es handelt sich um einen Expressionsvektor für prokaryotische Zellen. Das Low Copy Plasmid mit einer Kanamycinresistenz kodiert für die Cas9 Endonuklease. N-terminal befindet sich ein His-Tag sowie ein Maltose Binding Protein (MBP). Die Expression wird von einem T7 Promoter reguliert.

#### **pX330 (addgene):**

High Copy Plasmid für eukaryotische Zellen mit einer Ampicillinresistenz. Das pX330 Plasmid kodiert für die Cas 9 Endonuklease und eine guide RNA, die zusätzlich mit einer gewünschten DNA Sequenz erweitert werden kann, um zielgerichtet ein target adressieren zu können. Auf dem Plasmid befinden sich drei FLAG Tags sowie ein NLS. Die Regulation erfolgt über einen hU6 Promoter.



**Abb. 4: px330 All-in-One Vektor**

Über die BbsI Schnittstellen werden die DNA-Kassetten für die gRNA hinter den U6 Promotor kloniert. Der Vektor, mit einer Größe von 8506 bp, enthält für das humane Genom optimierte SpCas9 Gen und eine Ampicillinresistenz.

#### **peGFP-N1 (Clontech):**

Das Plasmid kodiert für GFP und diente als Transfektionseffizienzkontrolle für Transfektionen von HEK 293 Zellen.

#### **pVAX1 (Invitrogen):**

Das Plasmid wird von dem Biochemischen Institut des Fachbereichs Biologie der Justus - Liebig - Universität Gießen freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Gensequenz des Restriktionsenzym I-SceI wurde zuvor in den pVAX1 Vektor kloniert. Es handelt sich bei pVAX1 um einen Expressionsvektor für eukaryotische Zellen. Das Plasmid besitzt eine Kanamycinresistenz zur Selektion in E.coli Zellen. Die Regulation erfolgt über einen CMV Promoter.

#### **pcDNA<sup>TM</sup>5/FRT-TLR (Invitrogen):**

Das Plasmid kodiert für den Traffic Light Reporter und diente als Zielpiasmid in eukaryotischen Zellen im Zuge der Aktivitätstests des CRISPR Cas Systems. Es handelt sich um einen eukaryotischen Expressionsvektor mit einer Regulation über einen CMV

Promoter. Zusätzlich besitzt dieses Plasmid eine Ampicillinresistenz. Der Traffic Light Reporter wurde nachträglich durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe unter der Leitung von Univ. Prof. Dr. Dr. med. vet. Stieger in das pcDNA™5/FRT (Invitrogen) Plasmid integriert und im Verlauf durch Substitution der Fluoreszenzgene modifiziert.

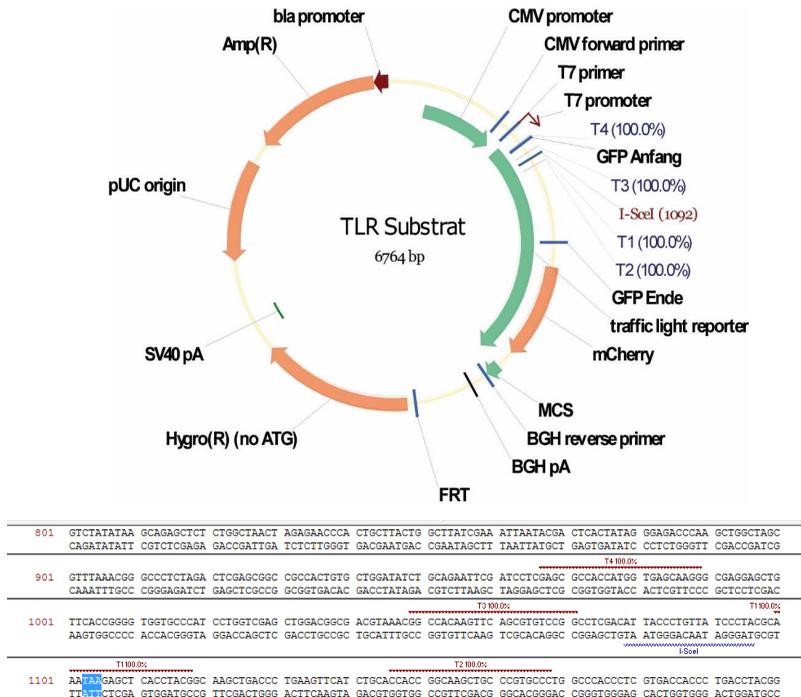


Abb. 5: Cas9 targets im TLR Substratplasmid

In der Abbildung ist das gesamte TLR Plasmid abgebildet, wie es eingesetzt wurde. Innerhalb des GFP-Gens sind die vier gRNAs für das Cas9-Enzym neben der I-SceI site abgebildet. Im unteren Bild wird die genaue Position und Sequenz dargestellt. Das Stoppcodon „TAA“, welches zur Inaktivierung des GFP-Gens führt, ist blau markiert.

## 2.8.2 E.Coli Stämme

### JM109:

Genotyp: *endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB<sup>+</sup> Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB<sup>+</sup> lac<sup>F</sup> lacZΔM15] hsdR17(rk<sup>-</sup>mk<sup>+</sup>)*

Die Anzucht der Zellen während Klonierungsarbeiten erfolgte bei 37°C in Luria-Bertani Medium, welches mit entsprechendem Antibiotikum (Ampicillin) versetzt worden ist.

### Rosetta(DE3)pLysS:

Genotyp: *F<sup>-</sup> ompT hsdS<sub>B</sub>(R<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam<sup>R</sup>)*

Diese Zellen wurden für die Produktion größerer Proteinmengen im Zuge der Proteinaufreinigung genutzt. Rosetta(DE3)pLysS besitzt eine Kanamycin- sowie Chloramphenicolresistenz.

## 2.8.3 Oligonukleotide

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Anmerkung
Oligo-610	GACTATCATATGCTTACCGT	Sequenzierprimer
Oligo-613	CACCGAAATAAGAGCTCACCTACGG	Target 1
Oligo-614	AAACCCGTAGGTGAGCTCTTATTTTC	Target 1
Oligo-615	GTCTGCAGAATTGGCGCACG	Sequenzierprimer
Oligo-618	CACCGGCACGGCAGCTTGCCGGTGG	Target 2
Oligo-619	AAACCCACCGCAAGCTGCCCGTGCCC	Target 2
Oligo-620	AAAAAAGCACCGACTCG	Rückprimer für RNA

Oligo-621	TAATACGACTCACTATAGGGAAATAAGAGCTCA	Primer für RNA T1
Oligo-622	TAATACGACTCACTATAGGGCACGGGCAGCTT	Primer für RNA T2
Oligo-623	TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGAAAGGACGA AACACCGGTGAGCTCTTATTTGCGTA	Target 3
Oligo-624	GACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCT CTAAAACTACGCAAATAAGAGCTCACC	Target 3
Oligo-625	TTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGAAAGGG ACGAAACACCGGGATAACAGGGTAATGTCG	Target 4
Oligo-626	GACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCT CTAAAACCGACATTACCCTGTTATCCC	Target 4

#### 2.8.4 Zelllinien

##### **HEK-293 (ATCC, CRL-1573):**

Bei HEK Zellen (**H**uman **E**mbrionic **K**idney) handelt es sich um adhärent wachsende menschliche Nierenepithelzellen. Sie eignen sich unter anderem gut für Transfektionen von Plasmiden mit hohen *Effizienzen* und bieten damit eine gute Grundlage für weitere Experimente.

##### **Flp- In™ 293-TLR (Invitrogen):**

Hierbei handelt es sich ebenfalls um HEK 293 Zellen mit der Besonderheit, dass diese Zelllinie zusätzlich einen im Genom integrierten *Traffic Light Reporter* trägt (Certo et al. 2011). Der *Traffic Light Reporter* wurde nachträglich durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe PD Dr. Dr. Stieger in das Genom der Flp-In™ 293 (Invitrogen) Zellen integriert.

## **3. Methoden**

### **3.1 Mikrobiologische Methoden**

Um Kontaminationen zu vermeiden, haben alle mikrobiologischen Arbeiten unter sterilen Bedingungen stattgefunden. Daher wurden ausschließlich zuvor autoklavierte Materialien und Medien genutzt und an einer Sterilbank gearbeitet.

#### **3.1.1 Kultivierung von E.coli Bakterien**

Für die Anzucht von E.coli Bakterien wird LB-Medium verwendet. Zur Selektion in Flüssig-Selektivmedien sowie Festmedien werden vor dem Gebrauch entsprechende Antibiotika zugesetzt. Für Festmedien wird zusätzlich 1,5 % (w/v) Agar, vor dem Autoklavieren, dem LB-Medium zugegeben. Nachdem das Medium auf circa 45°C abgekühlt ist, wird das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Anschließend erfolgt das Gießen des Mediums in Petrischalen und die Lagerung bei 4°C.

#### **3.1.2 DNA Transformation von E.coli Bakterien**

Die Transformation beschreibt die Übertragung freier DNA in Bakterienzellen. Damit Zellen in der Lage sind fremde DNA über ihre Zellwand aufzunehmen, muss es sich um kompetente Zellen handeln. Dabei wird zwischen elektrokompetenten und chemisch-kompetenten Zellen unterschieden. Erstere nehmen die DNA durch einen kurzen Hochspannungsimpuls auf. Für eine Transformation chemisch-kompetenter Zellen ist eine längere Inkubation der Zellen mit SOC Medium bei 37°C notwendig.

### **3.1.2.1 Elektrotransformation**

Zunächst werden 50 µl Rosetta(DE3)pLysS Zellen aufgetaut und anschließend mit 100 ng des pMJ806 Plasmids vermischt. Der Ansatz wird in eine Küvette pipettiert und zwei rasch aufeinanderfolgenden Hochspannungsimpulsen ausgesetzt. Anschließend wird dem Ansatz 800 µl LB-Medium zugeführt und durch Auf- und Ab Pipettieren resuspendiert. Es folgt eine Inkubation bei 37°C für eine Stunde. Durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 1100 x g werden die Zellen pelletiert, anschließend erneut in 100 µl LB-Medium aufgenommen und auf einer geeigneten Selektivagarplatte ausplattiert. Die Inkubation erfolgt bei 37°C über Nacht und die Lagerung bei 4°C.

### **3.1.2.2 Chemische Transformation**

Für die Transformation chemisch-kompetenter JM109 Zellen werden 100 ng des px330 Plasmids hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten auf Eis wird der Ansatz mit 400 µl SOC Medium versetzt und bei 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgt die Zentrifugation für eine Minute bei 1100 x g. Der Überstand wird bis auf circa 100 µl verworfen. Der Rest des Überstands wird mit dem Zellpellet erneut vermischt und auf einer geeigneten Agarplatte ausplattiert, bei 37°C über Nacht inkubiert und bei 4°C kühl gelagert.

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Plasmid DNA Isolierung**

Für die Isolierung von Plasmid DNA wird je nach Bedarf und gewünschter DNA Menge (20 µg bis zu 500 µg) entweder das QIAGEN® Plasmid Mini-, Midi- oder Maxi Kit angewendet. Die Durchführung erfolgt nach Herstellerangaben unter Beachtung des beiliegenden Herstellerprotokolls.

### 3.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wird photometrisch mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 (PeqLab, Erlangen) ermittelt. Die Messung erfolgt bei einer optischen Dichte von  $\lambda = 260 \text{ nm}$  ( $\text{OD}_{260}$ ) da bei dieser Wellenlänge das Absorptionsmaximum von DNA vorliegt. Ein  $\text{OD}_{260}$  Wert von 1 entspricht dabei  $50 \text{ ng DNA} / \mu\text{l}$ . Um eine Verunreinigung der Probe einzuschätzen wird das Verhältnis aus  $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$  berechnet. Ein Wert zwischen 1,6 – 1,8 spricht gegen eine Verunreinigung wohingegen kleinere Werte für eine Verunreinigung der DNA mit Proteinen und größere Werte für eine Verunreinigung der Probe mit RNA hinweisen.

### 3.2.3 Gelelektrophorese

#### 3.2.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA Fragmente im Größenbereich von 250 bp bis etwa 20000 bp nach ihrer Größe auftrennen. Für die Herstellung eines 0,8 %-igen Agarosegels werden 0,8 g Agarose in 100 ml 1x TPE aufgekocht und unter Rühren abgekühlt bevor der Ansatz in die Gelkammer gegossen wird. Die DNA-Proben werden mit Agaroseauftragspuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Als Größenmarker dient Gene Ruler™ 1kB DNA Ladder (Fermentas, St. Leon- Rot). Als Laufpuffer wird 1x TPE genutzt. Das Gel läuft bei 5 V/cm für eine Stunde. Anschließend wird das Gel in Ethidiumbromidlösung (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) für 20 Minuten inkubiert. Unter UV-Licht wird das Ergebnis dokumentiert und anschließend ausgewertet.

### 3.2.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird angewendet, wenn kleinere DNA Moleküle (< 1000 bp) aufgetrennt werden sollen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode genutzt um Ergebnisse von vorangegangenen Polymerase-Kettenreaktionen zu visualisieren und zu kontrollieren.

Die DNA Proben werden zunächst mit Agaroseauftragspuffer versetzt und in einem 6% -igen Polyacrylamidgel (1x TPE; Acrylamid : Bisacrylamid = 29 : 1) aufgetrennt. Als Laufpuffer dient 1x TPE. Der Größenmarker ist pUC 8 Mix (Fermentas, St. Leon-Rot). Das Gel wird in Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) für 20 Minuten inkubiert. Die Auswertung erfolgt unter UV Licht.

### 3.2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine durch Hitzeeinwirkung denaturiert. Die Ladungen der einzelnen Proteine werden mit Natriumdodecylsulfat (SDS) maskiert, so dass sie nach ihrer Masse voneinander getrennt werden können. SDS hat einen hydrophoben Schwanz, der an seine hydrophobe Seitenkette Aminosäuren in der Polypeptidkette bindet. Dabei bindet ein SDS-Anion typischerweise an zwei Aminosäurereste. Die SDS-Proteinkomplexe tragen somit eine proportional zu ihrem Molekulargewicht negative Ladung. Wird ein elektrisches Feld angelegt, wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit durch das Gel ist von ihrer Größe abhängig. Größere Proteine müssen einen größeren Widerstand des Gels überwinden und wandern somit langsamer als kleinere Proteine.

Für die Anfertigung eines SDS-Page Gels wird zunächst ein Trenngel angesetzt und rasch in eine Vorrichtung gegossen. Sobald das Gel auspolymerisiert ist, wird ein Sammelgel angesetzt und auf das Trenngel gegossen. Die Proteinproben werden mit Laemmliauftragspuffer + Mercaptoethanol versetzt und anschließend für 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Anschließend werden die Proben in die gespülten Geltaschen geladen. Als Größenmarker dient *Page Ruler™ Unstained Protein Ladder*. Als Laufpuffer wird 1x SDS verwendet. Es wird ein Strom mit einer Stromstärke von 35 mA für 50 Minuten angelegt. Anschließend wird das Gel circa 30 Minuten gefärbt und dokumentiert.

**Tabelle 9: Zusammensetzung des SDS Gels**

<b>8 % Trenngel</b>	<b>6 % Sammelgel</b>
1,6 ml 40 % Acrylamid : Bisacrylamid = 29:1	500 µl 40 % Acrylamid : Bisacrylamid = 29:1
2,24 ml 1,5 M Tris/HCl pH 8,8	520 µl 1,5 M Tris/HCl pH 6,8
80 µl 10 % SDS	40 µl 10 % SDS
4,08 ml dH <sub>2</sub> O	2,94 ml dH <sub>2</sub> O
16 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS)	8 µl Ammoniumperoxodisulfat (APS)
16 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)	8 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)

### 3.2.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR (polymerase chain reaction) ist eine Methode zur enzymatischen Vervielfältigung von doppelsträngiger DNA. Durch Zugabe eines Hin- und Rückprimers kann ein bestimmter Bereich auf einer DNA-Matrize mit Hilfe einer hitzebeständigen Polymerase gezielt amplifiziert werden.

Für die meisten PCR Vorgänge ist die Taq Polymerase (aus *Thermus aquaticus*; Polymerisationsrate = ca. 1000 Nukleotide pro Minute) tauglich. Für eine sequenzexakte Amplifikation eignet sich jedoch die Pfu-DNA-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*; Polymerisationsrate = ca. 500 Nukleotide pro Minute) eher, da die Fehlerquote geringer ist. Die Amplifikation besteht aus drei Schritten. Zunächst steht eine initiale Denaturierung bei 94° C. Die Einzelstränge der DNA-Matrize werden hierdurch getrennt. Die Temperatur wird anschließend auf 52° C abgesenkt. Dies ermöglicht, dass sich die Primer an den komplementären Stellen anlagern (*Annealing*). Darauf hin kann die Polymerase mit der Replikation beginnen. Die DNA Polymerase komplettiert bei einer Temperatur von 72° C, unter Nukleotid-Verbrauch, die Tochterstränge. Die drei Phasen werden 20-30-mal wiederholt.

Folgend sind ein standardisierter PCR-Ansatz sowie ein Standardprogramm aufgeführt:

<b>Standard-PCR-Ansatz (50µl):</b>	<b>Standard-PCR-Programm:</b>
100 ng DNA-Matrize	94° C 2 min
400 nM 5' Primer	92° C 45 sek 52° C 30 sek 72° C 45 sek <span style="font-size: 2em; vertical-align: middle;">}</span> 20-30 mal
400 nM 3' Primer	
200 µM dNTPs	
1x Polymerase Puffer	72° C 5 min
1 U Taq/Pfu-Polymerase	4° C Pause

### 3.3 Biochemische Methoden

#### 3.3.1 Coomassie – Färbung

Um Proteine unspezifisch zu färben, wird Coomassie verwendet. Der Farbstoff lagert sich an den basischen Seitenketten der Aminosäuren an. Nach erfolgter Gelelektrophorese wird das Gel vorsichtig in eine Schale mit Coomassie Lösung gelegt und über Nacht geschwenkt.

#### 3.3.2 Expression und Aufreinigung der Cas 9 Endonuklease

Die Expression und anschließende Aufreinigung des Enzyms wird im Zuge der Vorbereitungen eines Aktivitätstest des CRISPR Cas 9 Systems im zellfreien Milieu durchgeführt.

Aus einer frischen ü.N.-Kultur mit pMJ806 transformierter Rosetta(DE3)pLysS Zellen werden 10 ml der Vorkultur in 500 ml LB-Medium mit entsprechender

Chloramphenicol- sowie Kanamycinzugabe überführt und für circa 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Ab einer  $OD_{600} = 0,5$  wird die Expression der Cas 9 Endonuklease durch Zugabe von 1 ml IPTG (0,1 M) induziert. Die Inkubation der Kultur erfolgt ü.N. bei 20°C. Anschließend wird die Hauptkultur bei 4200 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 40 ml kaltem STE - Puffer gelöst und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

Für die Proteinaufreinigung wird das eingefrorene Zellpellet mit 25 ml Lysepuffer durch Vortexen resuspendiert. Anschließend werden die Zellen durch Ultraschall (12 – mal 15 Sekunden, Sonifier 250) aufgeschlossen und nachfolgend bei 20000 rpm, 4°C für 30 min zentrifugiert. Derzeit werden 20 ml des Lysepuffers mit 1 ml  $Ni^{2+}$ -NTA-Agarose versetzt, 5 min. inkubiert und bei 800 rpm, 4°C für 5 min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der enzymhaltige Überstand aus der vorangegangenen Zentrifugation wird auf das  $Ni^{2+}$ -NTA-Agarose Pellet gegeben und für 1 Stunde auf einem Rollband bei 4 °C inkubiert. Der Ansatz wird dreimal mit je 40 ml Waschpuffer gewaschen und zentrifugiert. Danach werden 4 ml des Ansatzes auf die zuvor äquilibrierte Säule gegeben und nach kurzer Inkubationszeit abgelassen. Im letzten Schritt wird dreimal je 1 ml des imidazolhaltigen Elutionspuffers auf die Säule gegeben und nach 30 min. Inkubationszeit in 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgefangen. Zwei Eluate mit der höchsten Proteinkonzentration werden zusammengeführt und über Nacht dialysiert. Nach erneuter Proteinkonzentrationsbestimmung wird das aufgereinigte Enzym bei -18°C gelagert.

### 3.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des Nanodrop ND-1000 (PeqLab, Erlangen) erfolgt nach der Aufreinigung der Cas 9 Endonuklease. Die Extinktion für Proteine liegt bei  $\lambda = 280$  nm. Falls zuvor eine Dialyse durchgeführt worden ist, wird der *blank*-Wert mit dem Dialysepuffer eingestellt.

### **3.3.4 Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode**

Durch die Bindung mit Coomassie Brilliant Blue 250 werden Proteine ermittelt. In der ursprünglichen kationischen Form des Farbstoffs ist die Extinktion bei einer Wellenlänge von 470 nm. Bindet das Protein an den Farbstoff entsteht eine anionische Form und der Wellenlängenbereich der Extinktion verlagert sich auf 595 nm. Genau bei dieser Wellenlänge kann die Proteinmenge quantifiziert werden.

Zu Beginn werden je 750 µl der Coomassie Reagenz in Einmal-Glasküvetten gegeben. Für die Messung wird 1x PBS im Verhältnis 5 : 1 zu der Proteinlösung gegeben und anschließend mit der Coomassie Reagenz in der Glasküvette vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten erfolgt die Ermittlung der Proteinkonzentration mit Hilfe des Photometers.

## **3.4 Eukaryotische Zellkultur**

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Um Kontaminationen zu vermeiden wurden die Zellen unter einer, zuvor mit Pursept gereinigten, Sterilbank (MSC Advantage, ThermoScientific) passagiert und transfiziert. Der Transport außerhalb der Werkbank erfolgte ausschließlich in geschlossenen Gefäßen (6-well Platte, 10 cm Kulturschale). Alle Puffer, Medien und Lösungen, die in Verbindung mit Zellkulturarbeiten stehen, wurden ebenfalls unter sterilen Bedingungen angesetzt und geöffnet. Verwendete Glaspipetten sowie Flaschenöffnungen wurden zusätzlich vor der Verwendung abgeflammt.

### **3.4.1 Passagieren von HEK 293 Zellen**

Zum Passagieren der Zellen wird zunächst das alte Wachstumsmedium abgezogen und verworfen. Danach werden die Zellen mit 1 ml Accutase für circa 5 Minuten inkubiert. Das Enzymgemisch erlaubt dabei eine schonende Ablösung der Zellen von dem Zellkulturschalenboden. Anschließend werden 9 ml DMEM zu den Zellen gegeben, sodass sich die Zellen homogen in Suspension befinden. Je 1 ml dieser Suspension wird

in eine neue Zellkulturschale überführt und mit 9 ml DMEM verdünnt, homogen verteilt und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank gehalten.

### 3.4.2 Auszählen von HEK 293 Zellen

Durch Bestimmung der Teilchenzahl / Volumeneinheit in Flüssigkeit können mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer Rückschlüsse auf die Zellzahl gezogen werden.

Die Neubauer Zählkammer *improved* besteht aus einer Grundplatte, welche eine Kammertiefe von 0,1 mm hat. Das in den Kammerboden eingravierte Zählnetz besteht aus vier großen Quadranten. Jedes dieser Quadranten ist 1 mm x 1 mm (entspricht 0,1 µl) groß und ist in 16 Quadranten aufgeteilt. Zum Auszählen wird die Zellsuspension (Verdünnung 1:2) zwischen Deckglas und Zählkammer pipettiert und anschließend alle Zellen in den 4 großen Quadranten ausgezählt. Rückschlüsse auf die Zellzahl können durch folgende Formel gezogen werden:

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

G = Großer Quadrat<sup>[1]</sup><sub>SEP</sub>

V = Verdünnungsfaktor (hier: 2)

### 3.4.3 Transfektion von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen einzuschleusen, werden diese transfiziert. Am Tag vor der Transfektion werden 1 - 1,5 x 10<sup>6</sup> Zellen je well einer 6-well Platte überführt und für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Am Transfektionstag wird *Lipofectamine LTX and Plus™ Reagent* (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben verwendet. Das Transfektionsreagenz wird im Verhältnis 1 : 2 : 6 (Plasmid-DNA in µg : Plus™ in µl : Lipofectamine in µl) für jedes well angesetzt und 30 Minuten inkubiert. Während der Inkubationszeit wird das Wachstumsmedium aus den *wells* abgezogen und mit frischem Medium ersetzt. Anschließend wird das Transfektionsreagenz tropfenweise auf die Zellen gegeben. Die 6-well Platte wird für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird erneut

ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Zellen werden zwischen 48 Stunden und 72 Stunden inkubiert, wobei täglich ein Mediumwechsel durchzuführen ist.

#### **3.4.4 Proteinextraktion aus HEK 293 Zellen**

Um Proteine mittels Western-Blot nachweisen zu können, müssen die Zellen zuvor lysiert werden, damit die Proteine frei vorliegen und gewonnen werden können. Dafür wird zunächst das Wachstumsmedium aus den Wells abgezogen und verworfen. Anschließend werden je Well 300 µl M-Per<sup>®</sup> sowie 50 µl Proteaseinhibitor auf die Zellen gegeben. Die Zellsuspension wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten bei 4 °C und 15.000 x g zentrifugiert.

Der proteinhaltige Überstand wird in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 35 µl Glycerol (10 %) versetzt. Um die Proteinmenge zu ermitteln, wird für jeden Ansatz die Gesamtproteinkonzentration nach der Bradford-Methode bestimmt.

#### **3.4.5 Western-Blot**

Beim Western-Blot werden zuvor elektrophoretisch aufgetrennte Proteine von einem SDS-PAGE Gel auf eine Protran-Nitrocellulose Membran übertragen.

Nach dem Aufbau werden die Proteine mit 200 mA/cm<sup>2</sup> für 75 Minuten übertragen.

Um die Transfereffizienz zu überprüfen, wird die Membran mit Ponceau-Rot Lösung bedeckt. Nach einer kurzen Inkubationszeit färben sich vorhandene Proteinbanden rot, sodass Rückschlüsse auf einen Transfererfolg gezogen werden können. Die Färbung kann durch Waschen mit destilliertem Wasser rückgängig gemacht werden.

#### **3.4.6 Immunodetektion**

Mit Hilfe von Antikörpern werden nach dem Western-Blot Proteine auf der Membran detektiert. Unspezifische Bindungsstellen werden durch eine einstündige Inkubation der Membran in Milchpulverlösung geblockt. Die Membran wird mit 1x TBS gewaschen bis sich alle Milchpulverschlieren aufgelöst haben. Folgend wird der Primärantikörper (Anti FLAG Tag Antikörper) in 10 ml 1 x TBS verdünnt (1:1000) und für 1 Stunde mit

der Membran inkubiert. Nicht gebundene Antikörper werden in drei zehnmütigen Waschschrinen mit 1 x TBS entfernt. Anschließend wird der Sekundäantikörper (Donkey anti-mouse Antikörper 488nm) in einer 1:100000 Verdünnung für maximal 1 Stunde auf die Membran gegeben und lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren zehnmütigen Waschschrinen mit 1x TBS erfolgt die Detektion mit ECL (enhanced chemiluminescent solution). Je 2 ml beider Komponenten des ECL Kits werden miteinander vermischt und für circa drei Minuten auf die Membran gegeben. Die Membran wird anschließend in eine Filmkassette gelegt.

Der Sekundäantikörper wandelt das ECL unter Emission von Licht um, sodass auf dem Röntgenfilm nach der Entwicklung eine Schwarzfärbung sichtbar wird. Die Expositionszeit beträgt zwischen drei Minuten und 30 Minuten.

### **3.4.7 Immunfluoreszenz**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die immunzytochemische Färbung von Cas9 durchgeführt, um die Lokalisation des Enzyms in der eukaryotischen Zelle nachzuweisen.

Nach 48 Stunden wird das Wachstumsmedium von den transfizierten Zellen abgezogen. Anschließend werden die Zellen mit PFA (4%) für 10 Minuten auf dem Deckglas fixiert. Nach drei 10-minütigen Waschschrinen mit 1 x PBS wird der Primäantikörper (Anti FLAG Tag Antikörper) in einer 1:100 Verdünnung mit BSA-Blocklösung (3%) verdünnt und für eine Stunde auf die Zellen gegeben. Anschließend wird erneut drei Mal für 10 Minuten mit 1 x PBS gewaschen bevor der Sekundäantikörper (Donkey anti-mouse Antikörper 488nm) in einer 1:400 Verdünnung (in 3% BSA-Blocklösung) auf die Zellen gegeben wird. Während zwei weiteren 10-minütigen Waschschrinen mit 1 x PBS wird DAPI 1:5000 in 1 x PBS verdünnt. DAPI färbt die Zellkerne an, sodass am Fluoreszenzmikroskop BZ-8000 (Keyence, Essen) eine Abgrenzung vom Zellkern zum Zytoplasma erleichtert wird. Für die Zellkernfärbung wird DAPI für 10 Minuten auf die Zellen gegeben und anschließend mit 1 x PBS für 10 Minuten gewaschen.

Die Auswertung der fixierten Zellen erfolgt am Fluoreszenzmikroskop BZ-8000 (Keyence, Essen).

### 3.4.8 Durchflusszytometrie

Die FACS-Analyse (*Fluorescence activated cell sorting*) oder auch Durchflusszytometrie genannt, eignet sich zur Analyse einzelner Zellen. Dabei werden suspendierte Einzelzellen nacheinander an einem Laserstrahl vorbeigeführt.

Während der Messung wird ein Überdruck erzeugt, der die Zellen beim Aufsaugen in die Messkammer stark beschleunigt. Dadurch wird gewährleistet, dass am Messpunkt tatsächlich Einzelzellen gemessen werden. Dieser Vorgang wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet. Durch das optische Detektionssystem und der Elektronik werden die Einzelzellen aufgrund ihres Streulichts und ihrer Fluoreszenzemission quantifiziert.

#### 3.4.8.1 Probenaufbereitung für FACS Analysen

Die transfizierten HEK-Zellen werden nach 72 Stunden geerntet. Dafür wird zunächst das Wachstumsmedium abgezogen und jedes Probenwell einer 6-well Platte mit 300 µl Accutase versetzt und für 5 Minuten inkubiert. Durch das vorsichtige Abklopfen und Resuspendieren der Zellen wird gewährleistet, dass der Großteil der Zellen abgelöst wird. Die Zellsuspension wird anschließend in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1,5 ml 1 x PBS versetzt. Es folgen drei Waschschrte mit 1 x PBS bei denen die Proben je für 5 Minuten und 300 x g und Raumtemperatur zentrifugiert werden und der Überstand verworfen wird. Anschließend wird das Zellpellet in 2 ml 1 x PBS resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert.

### 3.5 Klonierung der *guide* RNA Sequenz in den pX330 Vektor

Damit die Cas 9 Endonuklease gezielt einen Doppelstrangbruch verursachen kann, muss das Enzym zunächst einen Komplex mit der *guide* RNA bilden. Die *guide* RNA „leitet“ das Enzym zur Ziel-DNA, indem ein komplementärer Teil der *guide* RNA an der Ziel DNA bindet. Dadurch kann das Enzym an gewünschter Stelle spezifisch schneiden. Die Expression der vollständigen *guide* RNA im eukaryotischen System wird durch Klonierung einer 23 bp langen Nukleotidsequenz in den px330 Vektor ermöglicht.

Zunächst werden je 20 µl von Oligo 613 und 614 bzw. Oligo 618 und 619 durch Erhitzen auf 95°C und Abkühlen (- 5°C / min) auf 25°C *annealed* und auf eine Endkonzentration von 0,5 µM verdünnt.

Folgender Reaktionsansatz wird angesetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert:

Restriktions- und Ligationsansatz:

---

1 µl pX330 Plasmid

---

2 µl 0,5 µM 613/614 Oligo bzw. 618/619 Oligo

---

1 µl BpII

---

1 µl T4 DNA Ligase

---

2 µl 10x T4 DNA Ligasepuffer

---

13 µl dH<sub>2</sub>O

---

Gesamtvolumen: 20 µl

---

BpII schneidet an der vorhandenen BpII Restriktionssite des pX330 Vektors, sodass das DNA Fragment durch die T4 DNA Ligase ligiert werden kann.

Anschließend wird eine Transformation in *E. coli* JM109 durchgeführt. Die transformierten *E. coli* Zellen werden ausplattiert und bei 4°C kühl gelagert.

Der Erfolg der Klonierung wird durch Sequenzierung überprüft. Die Klone werden unter Verwendung eines Standard Programm einer PCR unterzogen. Hierzu werden zunächst 12 Klone gepickt und in Reaktionsgefäße ausgestrichen. Der direkte Einsatz des Klons kann durchgeführt werden, da durch Erhitzen auf 94°C die enthaltene DNA freigesetzt wird und als Matrize dient.

Für die PCR wird folgender Mastermix angesetzt und je 50 µl des Ansatzes in jedes Reaktionsgefäß hinzugegeben:

**Mastermix Kolonie-PCR:**

---

435 µl dH<sub>2</sub>O

---

75 µl 10x Taq DNA Polymerase Puffer

---

75 µl dNTP's 4µM

---

75 µl Primer (Oligo 610\_fwd)

---

75 µl Primer (Oligo 615\_rev)

---

15 µl Taq DNA Polymerase

---

Gesamtvolumen: 750 µl

Nach der PCR wird zur ersten Kontrolle ein 6%-iges Acrylamidgel angefertigt um die Klone mit der Kontrolle (pX330 ohne insert) zu vergleichen. Zusätzlich werden die Proben einer analytischen Spaltung mit BpiI unterzogen, wodurch geeignete Klone identifiziert werden können. Mit diesen Klonen wird eine Plasmid Mini Präparation durchgeführt und eine Sequenzierung zur definitiven Bestätigung in Auftrag gegeben.

### **3.6 Generierung von *guide* RNA für den Cas 9 Endonuklease Aktivitätstest unabhängig von zelleigenen Mechanismen im *tube***

Für den Aktivitätstest der Cas 9 Endonuklease ist die Generierung von *guide* RNA notwendig. Hierfür wird das T7 Transkriptionskit (Roboklon, Berlin) genutzt. Die T7 RNA Polymerase benötigt einen T7 Promoter um RNA-Transkripte zu synthetisieren. Da sich auf dem pX330 Vektor keine T7 Promotorsequenz befindet, muss ein Primer gewählt werden, welcher die entsprechende Promotorsequenz in einem 5' Überhang aufweist. Anschließend erfolgt eine PCR mit Hilfe der Pfu DNA Polymerase. Das gewünschte PCR Produkt hat nun die T7 Promotorsequenz vor der *guide* RNA Sequenz und kann von der T7 RNA Polymerase transkribiert werden. Im Folgenden ist der PCR Ansatz aufgeführt:

**PCR Reaktionsansatz:**


---

 57  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O
 

---

 10  $\mu$ l 10 x Pfu DNA Polymerase Puffer
 

---

 10  $\mu$ l dNTP 4 $\mu$ M
 

---

 10  $\mu$ l Primer (Oligo 621\_fwd bzw. 622\_fwd)
 

---

 10  $\mu$ l Primer (Oligo 620\_rev)
 

---

 1  $\mu$ l pX330 mit guide RNA Sequenz insert
 

---

 2  $\mu$ l Pfu DNA Polymerase
 

---

 Gesamtvolumen: 100  $\mu$ l
**3.6.1 PCR Produktreinigung**

Die PCR Produktaufreinigung erfolgt mit dem Wizard<sup>®</sup> SV-Gel and PCR Clean Up System (Promega, Mannheim) unter Verwendung des Herstellerprotokolls.

**3.6.2 Transkription der PCR Produkte**

Die Generierung der *guide* RNA erfolgt mit dem T7 Transkriptionskit (Roboklon, Berlin). Nachfolgend ist der Reaktionsansatz für die T7 Transkription aufgeführt:

**Reaktionsansatz der T7 Transkription:**


---

 25  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O
 

---

 5  $\mu$ l T7 RNA Polymerase 5 x Reaktionspuffer
 

---

 1,8  $\mu$ l NTP-Mix je 25 mM
 

---

 1,25  $\mu$ l DTT (100 mM)
 

---

 0,5  $\mu$ l Thermostabile Pyrophosphatase
 

---

 4  $\mu$ l DNA-Template
 

---

 0,5  $\mu$ l T7 RNA Polymerase
 

---

 Gesamtvolumen: 25  $\mu$ l

Die Inkubationszeit beträgt zwei Stunden bei 37°C. Die Lagerung erfolgt bei 4°C im Kühlschrank.

### 3.7 Aktivitätstest der Cas 9 Endonuklease im zellfreien Milieu

Der Aktivitätstest dient dem Nachweis der Aktivität der aufgereinigten Cas 9 Endonuklease mit Hilfe der synthetisierten *guide* RNA im *tube* unabhängig von zelleigenen Mechanismen. Für den Versuch wird zunächst ein passender Puffer hergestellt.

Folgend ist der Reaktionsansatz aufgeführt:

Reaktionsansatz Cas 9 Aktivitätstest:

---

18,59 µl dH<sub>2</sub>O

---

6 µl Puffer (5 x)

---

2,36 µl guide RNA

---

0,75 µl pcDNA<sup>TM</sup>5/FRT-TLR (target Plasmid)

---

2,3 µl Cas 9 (300 nM)

---

Gesamtvolumen: 30 µl

Die Inkubationszeit beträgt eine Stunde bei 37°C. Anschließend wird ein Teil der Probe mit aAP versetzt und auf ein 0,8%-iges Agarosegel geladen. Das Gel läuft für eine Stunde bei 80 Volt.

## 4. Ergebnisse

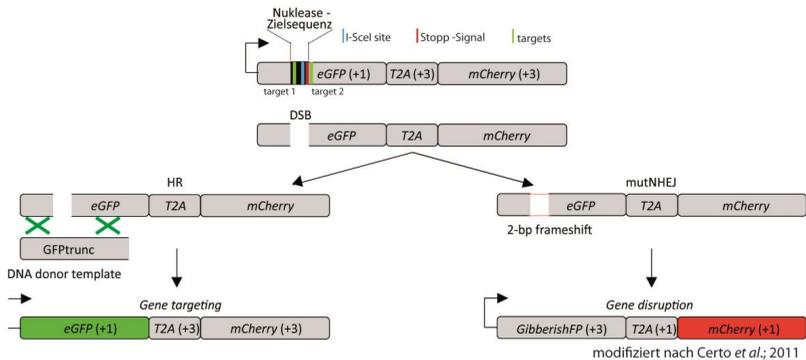
Die Ergebnisse sind in drei Teile unterteilt. Zunächst werden die Klonierungsergebnisse aufgeführt, welche die Grundlage für die späteren Tests darstellen. Im zweiten Teil werden die Ergebnisse der Tests im *tube* unabhängig von zellulären Reparaturmechanismen dargelegt. Zuletzt werden die Ergebnisse der *in vitro* durchgeführten Versuche in den Zellkulturen dargestellt.

### 4.1 Design und Klonierung der *guide* RNAs

Unter den programmierbaren und spezifischen Nukleasen ist die Cas9-Endonuklease aus dem CRISPR/Cas-System eine vergleichsweise einfach zu programmierende Nuklease. Im Gegensatz zum aufwendigen *protein engineering* wird hier die Adressierung der Nuklease auf eine gewünschte DNA-Sequenz durch eine Klonierung einer kurzen DNA-Sequenz in einen Vektor bewerkstelligt. Die sog. *guide* RNA (gRNA) von 20 bp Länge wird in das *all-in-one vector* System px330 über die Restriktionsschnittstelle BbsI integriert. Mit Hilfe des U6-Promotors wird anschließend in der Zelle eine RNA-Sequenz generiert, die für die Aktivierung und Adressierung der Cas9-Endonuklease verantwortlich ist. In Abb. 6 ist der schematische Aufbau des Vektors dargestellt. Als Reportersystem zur Erfassung der Aktivität wird das Traffic-Light-Reporter (TLR)-System verwendet (siehe Abb. 7). Das TLR-System beinhaltet zwei inaktive Fluoreszenzgene, die entweder bei HR oder NHEJ aktiviert werden. Alle weiteren Nukleasen und ihre Zielsequenzen werden in diese Region kloniert und überprüft. Das GFP-Signal kann nur über den Reparaturweg der HR wiederhergestellt werden, indem zusätzlich eine korrekte DNA-Reparatur-Sequenz (*donor template*) der Zelle geboten wird. Ist dies nicht der Fall, dann wird der entstandene DNA-Doppelstrangbruch (DSB) über den Mechanismus des NHEJ repariert, was zu einer Verschiebung des Leserasters führt. Dadurch wird das vollständig vorhandene Gen des mCherry Proteins ins richtige Leseraster gerückt und exprimiert. Die Expression beider Fluoreszenzgene wird durch ein zusätzliches Stopp-Signal innerhalb des GFP-Gens verhindert.

Die Oligos 613 und 614 bilden zusammen eine DNA-doppelsträngige Kasette und generieren die erste gRNA Sequenz, auch genannt *target 1* (gRNA T1). Analog dazu

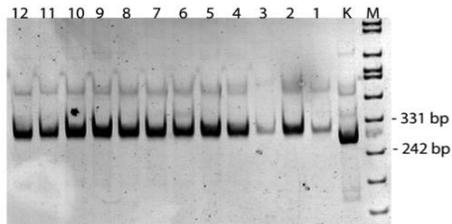




**Abb. 7: Schematische Darstellung des *traffic-light-reporter* Systems (TLR)**

Die grünen Striche zeigen in der oberen Abbildung exemplarisch die beiden *targets* 1 und 2, wobei sich *target 2* hinter dem rot markierten Stoppcodon befindet. Wenn kein *donor template* vorhanden ist, kommt es durch NHEJ zu einem *frameshift* und das mCherry Gen wird exprimiert (rechts unten). Wird zusätzlich ein korrektes *donor template* geboten, so wird über HDR das GFP Gen exprimiert (links unten) (Certo et al. 2011).

Bei einer erfolgreichen Klonierung der gRNAs wird die BbsI Schnittstelle deletiert. Daher wurden die Klone nach einer erfolgreichen Ligation und Transformation in E.coli XL1Blue Zellen auf die BbsI Schnittstelle hin überprüft. Zuerst wurde eine Klon-PCR mit den Primern Oligo 610 und Oligo 615 durchgeführt, anschließend wurde das PCR-Produkt mit einer Größe von 252 bp für den Restriktionsverdau verwendet. Abbildung 8 zeigt das Gelbild des Verdau beispielhaft für gRNA T1.



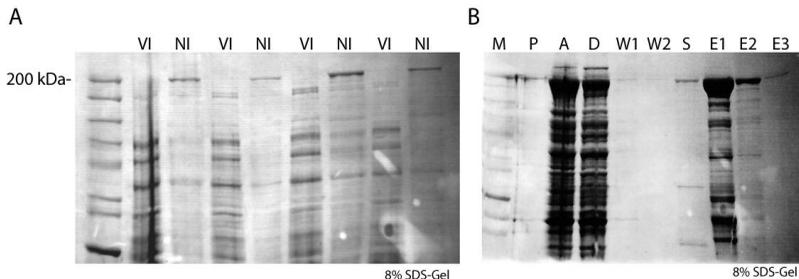
**Abb. 8: Ergebnis der gRNA Klonierung**

Das Acrylamidgel (6%) zeigt den Restriktionsverdau mit BbsI der ausgesuchten Klone 1 bis 12, sowie den Kontrollverdau K mit dem Ausgangsvektor. Bei einer vorhandenen BbsI Schnittstelle werden vom PCR-Produkt 77 bp deletiert. Vom 50 $\mu$ l PCR Ansatz wurden 7 $\mu$ l für den Verdau mit 0,5 $\mu$ l Enzym verwendet.

## 4.2 Expression und Aufreinigung der Cas9-Endonuklease

Für die zellfreien Reaktionen im *tube* muss das Cas9 Protein aufgereinigt vorliegen.

Der Lysin-tag am C-Terminus der Cas9-Nuklease wird für die Aufreinigung der Nuklease genutzt. Für die Expression wurde der E.coli Stamm pmJ806 herangezogen. Es wurden 4 x 500 ml Kulturen mit IPTG induziert und aufgereinigt. Abb.9 zeigt das SDS-Bild der vier Eluate jeweils vor und nach der Induktion. Eine Expression der Cas9-Nuklease ist bei einer Größe von 200kDa zu erwarten.

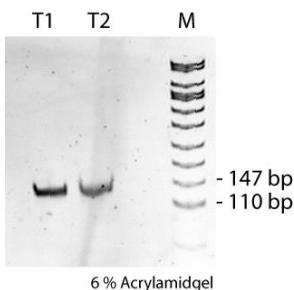


**Abb. 9: Cas9 Expression und Aufreinigung**

**A** Vier 500 ml Ansätze wurden für die Cas9 Aufreinigung angeimpft. Cas9 hat eine Größe von 200 kDa, welche nach der Induktion (NI) auf dem Gel detektierbar ist (VI = vor der Induktion). **B** Aufreinigung der Cas9 Endonuklease mit Hilfe des Lysin-tags. Auftrag nach folgender Reihenfolge: Marker (M), Pellet (P), Auftrag (A), Durchlauf (D), Waschschrte (W1 -2), Säule (S), Elutionen (E1-3).

### 4.3 Aktivitätstest der Cas9-Endonuklease mit den *guides* T1 und T2 in zellfreien Enzymreaktionen

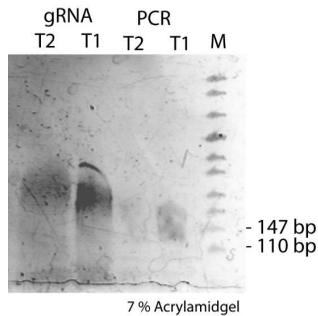
Bevor *in vitro* Zellkultur-Experimente durchgeführt werden, soll der Aktivitätstest der Cas9-Nuklease in zellfreien Reaktionen unabhängig von zellulären Reparaturmechanismen überprüft werden. Da die gRNA essentiell für die Aktivität ist, musste diese hergestellt werden. Dazu wurde ein *forward* Primer mit einem T7-Promotor verwendet. Für gRNA T1 wurde das Oligo 621 und für gRNA T2 das Oligo 622 verwendet. Für beide PCR Ansätze wurde der gleiche Rückprimer 620 herangezogen, um eine Bande bei 123 bp zu erhalten. Abb. 10 zeigt die hergestellte DNA-Sequenz für gRNA für T1 und T2.



**Abb. 10: gRNA PCR**

PCR der *target* gRNAs mit spezifischer T7 Promotor Sequenz mit einer Größe von 123 bp.

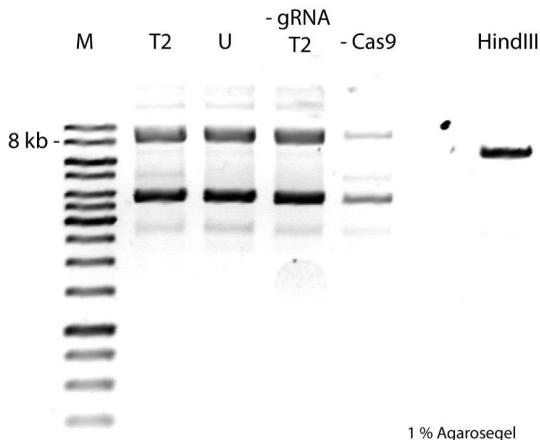
Mit einem T7 Transkriptionskit wurde aus der PCR-DNA-Sequenz die benötigte RNA generiert. Die RNA für die *targets* 1 und 2 sind in Abb. 11 dargestellt.



**Abb. 11: gRNA Generierung mit dem T7 Transkriptionskit**

Ein 7%iges Acrylamidgel wurde verwendet. Von rechts nach links ist zuerst der pUC8- Marker abgebildet, dann das PCR Produkt von T1 und T2 und anschließend die gRNA von T1 und T2.

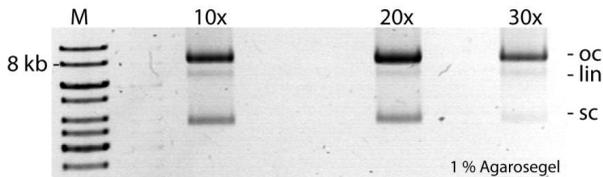
Das aufgereinigte Cas9 Enzym und die gRNA werden für einen zellfreien Aktivitätstest verwendet. Als Substrat dient das *traffic light reporter* (TLR) Plasmid, welches 2 inaktive Fluoreszenzgene besitzt und als Reportersystem für *in vitro* Zellkulturexperimente verwendet wird, um einen Nachweis für Nukleasen und Reparaturmechanismen zu erhalten (Certo et al. 2011). Die beiden gRNAs T1 und T2 adressieren Sequenzen im GFP-Gen und sollten in einem zellfreien Aktivitätsnachweis zur Linearisierung des Plasmids führen. Im ersten Versuch wurde ein 1:1 Ansatz mit 4,5  $\mu\text{M}$  Substratplasmid zu Cas9 gewählt. Die gRNA wurde im doppelten Überschuss eingesetzt. Ein Restriktionsverdau mit dem Enzym HindIII dient als Kontrolle und veranschaulicht das linearisierte Plasmid (Abb. 12).



**Abb. 12: Cas9 Aktivitätsnachweis im zellfreien Milieu**

Rechts neben dem 1kb Marker ist der Ansatz mit allen Komponenten für eine Spaltung des TLR Substratplasmids an T2, gefolgt vom ungeschnittenen Plasmid U, Ansatz ohne gRNA, Ansatz ohne Cas9 und HindIII- Kontrolle.

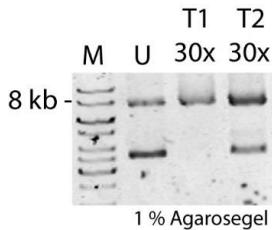
Der 1 : 1 Ansatz in Abbildung 12 zeigt keine Aktivität. Eine linearisierte Bande konnte nicht festgestellt werden. Der Aktivitätsnachweis wurde mit einem Überschuss an Cas9 wiederholt mit jeweils doppelter gRNA Menge. In Abb. 13 wurde Cas9 mit 10 x, 20 x und 30 x Überschuss eingesetzt.



**Abb. 13: Cas9 gRNA T1 Aktivitätsnachweis im Überschuss**

Cas9 wurde mit 10 x, 20 x, 30 x Überschuss gegenüber dem TLR Substratplasmid (4,5  $\mu$ M) eingesetzt. Die gRNA Menge T1 wurde jeweils der Cas9 Konzentration in doppelter Menge angeglichen (oc = open circle; lin = linearisiert; sc= supercoiled).

Der Aktivitätstest weist eine positive Aktivität ab einem Überschuss von 30 x auf. Der Ansatz wurde mit 30 x Überschuss an Cas9 mit beiden gRNAs (T1 und T2) wiederholt.



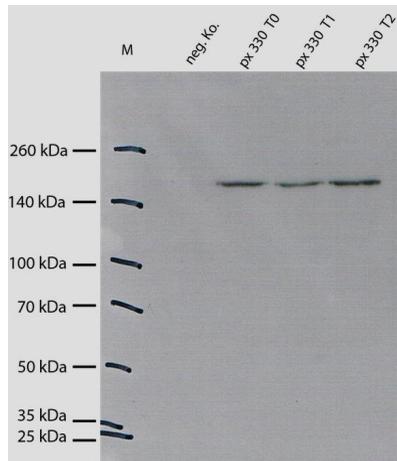
**Abb. 14: Cas9 Aktivitätsnachweis mit 30x Überschuss mit gRNA T1 und T2**

Im Vergleich zum ungeschnittenen Plasmid U wird die Aktivität von Cas9 im 30x Überschuss mit der gRNA T1 und gRNA T2 verglichen.

In Abbildung 14 ist deutlich zu sehen, dass die Spaltungsaktivität von Cas9 mit gRNA T1 gegenüber gRNA T2 erhöht ist. Mit T1 ist kein Substratplasmid in der *supercoiled* Form detektierbar, allerdings wird die DNA hauptsächlich genickt, so dass sie in der *open circle* Form vorliegt. Die *open circle* Form nimmt mit T2 ebenfalls zu.

#### 4.4 Nachweis der Expression von Cas9 in eukaryotischen Zellen

Der px330 Cas9 Vektor mit den klonierten *target sites* 1 und 2 wird in HEK293-Zellen transfiziert, um mit einem anschließenden Westernblot die Expression von Cas9 in eukaryotischen Zellen nachzuweisen. Der Antikörper, der beim Blot verwendet wird, richtet sich gegen den FLAG-Tag, welches sich N-Terminal an Cas9 befindet. 4 µg DNA wurden in 1,5 Mio HEK-Zellen transfiziert und nach 48 h lysiert. Die Abb. 15 zeigt die Ergebnisse des Westernblots nach einer Exposition von 15 Minuten.



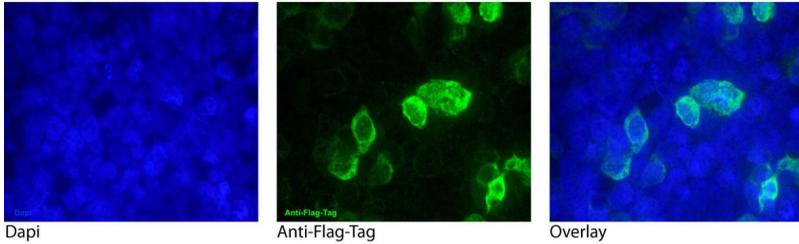
**Abb. 15: Westernblot**

Nachweis des ca. 200 kDa großen Cas9-Proteins in HEK293 Zellen in 8 % Acrylamidgel nach einer Exposition von 15 Minuten.

#### **4.5 Nachweis der Translokation von Cas9 in den Zellkern von eukaryotischen Zellen**

Die prokaryotische Cas9 Endonuklease des CRISPR/ Cas Systems muss in eukaryotischen Zellen in den Zellkern eindringen können, um dort an der gewünschten Stelle in der DNA eine Spaltung durchzuführen. Um dies zu gewährleisten wurde dem Plasmid ein sogenanntes NLS-Signal (*nuclear localisation signal*) N-Terminal an Cas9 integriert. HEK 293 Zellen als auch HeLA Zellen wurden für diesen Nachweis verwendet. Die Cas9 Nuklease im px330 Plasmid mit T0, T1 und T2 konnte immer in beiden Zelltypen im Zellkern mittels Antikörper detektiert werden. Die Abb. 16 zeigt eine Übersicht der Detektion der Nuklease in den zwei verschiedenen Zelltypen.

HEK 293 px330 T2

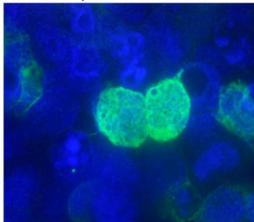


Dapi

Anti-Flag-Tag

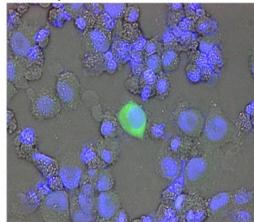
Overlay

HEK 293 px330 T1



Overlay

HeLa px330 T0



Overlay

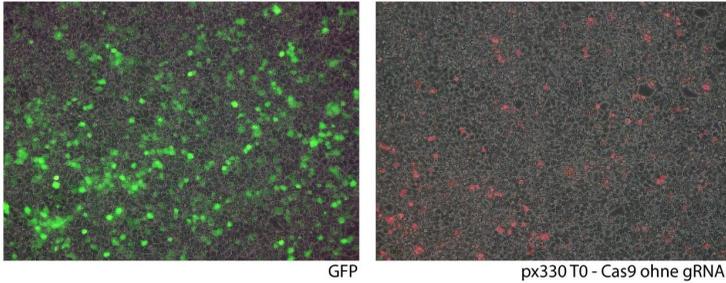
**Abb. 16: Immunofluoreszenz in HEK 293 und HeLa Zellen**

Nach 48 h wurden die Zellen für die Färbung fixiert. Der Anti-Flag-Tag Antikörper wurde 1:400 eingesetzt.

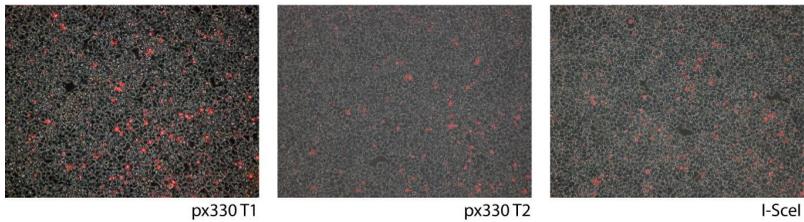
#### **4.6 Qualitativer Aktivitätstest der Cas9 Endonuklease in eukaryotischen Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie**

Nachdem die Expression der Cas9 Nuklease in Säugerzellen und die Integration in den Zellkern bewiesen wurde, wird nun ihre Spaltungsaktivität in Zellkulturexperimenten überprüft. 1,5 Mio. HEK 293 Zellen auf 6-well Platten wurden mit 2  $\mu\text{g}$  TLR-Substratplasmid und 4  $\mu\text{g}$  Nukleaseplasmid transfiziert. Nach erfolgreicher Spaltung des TLR-Plasmids und ihrer Reparatur durch NHEJ wird das rote *mCherry* Signal des Fluoreszenzgens mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops erfasst. Die Aufnahmen in Abb. 17 zeigen die Zellen nach 72 h post Transfektion.

## Kontrollen



## Nukleasen



**Abb. 17: Qualitativer Aktivitätstest**

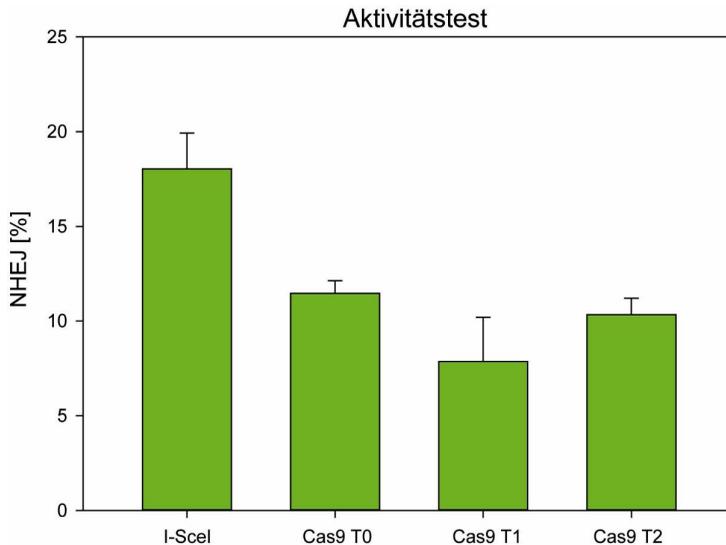
Die Kontrollen sind in der oberen Reihe abgebildet. Die GFP positiv Transfektion dient als erfolgreicher Nachweis für die Transfektion in HEK 293 Zellen. Px330 T0 entspricht der Negativkontrolle, da hier nur Cas9 ohne gRNA exprimiert wird. In der unteren Reihe sind alle aktiven Nukleasen abgebildet, die zusammen mit dem TLR-Substratplasmid transfiziert wurden. I-SceI dient als Positivkontrolle.

1/45 sek. Belichtungszeit nach 72 h post Transfektion. Alle Bilder sind als *overlays* dargestellt.

Die Erfassung eines qualitativen Nachweises des roten *mCherry* Signals ist gelungen. Um genauere Aussagen zu der Aktivität der einzelnen Nukleasen treffen zu können, sind weitere Methoden für eine quantitative Messung nötig. Das nächste Kapitel fasst daher die Ergebnisse der FACS-Analysen zusammen.

## 4.7 Quantitativer Aktivitätstest der Cas9 Endonuklease in eukaryotischen Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

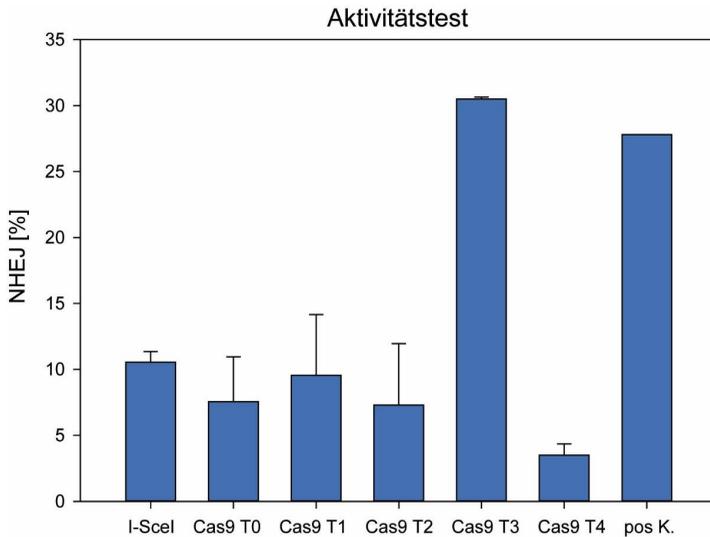
Bei der Durchflusszytometrie, dem sogenannten *fluorescence activated cell sorting* – FACS, werden die Zellen nach der Form und Größe erfasst und je nach Fluoreszenzsignal sortiert. Mit diesem Verfahren ist eine schnelle und genaue quantitative Erfassung möglich. Das FACS-Gerät, welches zur Verfügung stand, konnte nicht das mCherry Fluoreszenzprotein anregen. Daher wurde das TLR-Substratplasmid modifiziert, indem das mCherry-Gen durch das grün fluoreszierende GFP-Gen ersetzt wurde. Das neue TLR2 Plasmid besitzt somit 2 GFP-Fluoreszenz-Gene, die je über die Reparaturwege HR oder NHEJ aktiviert werden. Die Aktivität der Nukleasen wird nur über den NHEJ Weg erfasst, da kein *donor template* angeboten wird. Die Abb. 18 zeigt die Aktivität der Nukleasen bei dreifacher Wiederholung.



**Abb. 18: Quantitativer Aktivitätstest**

Die Messung erfolgte nach 48 h post Transfektion mit dem TLR2 Plasmid, d.h. das GFP-Signal korrepondiert mit dem NHEJ Aktivitätssignal. I-SceI entspricht der Positivkontrolle und Cas9 T0 der Negativkontrolle. 1.5 Mio Zellen wurden im 6-Well-Plate mit 0.8 µg TLR und 6.4 µg Nukleasenplasmid transfiziert (n=3).

Die Positivkontrolle I-SceI erreicht ein Aktivitätssignal von 18 %. Cas9 T1 erreicht ein geringeres Signal als die Negativkontrollen Cas9 ohne *target* (T0) und Cas9 T2, die mit 11 % überragen. Diese erste Messung hat gezeigt, dass die Methode geeignet ist, um die Nukleasen genauer zu analysieren. Um das TLR-System in Zukunft optimal für beide Reparaturwege nutzen zu können, wurde das NHEJ mCherry-Gen ein weiteres Mal substituiert. Das blau fluoreszierende Protein BFP erwies sich als geeignetes Protein, um es zusammen mit GFP in einem Plasmid nutzen und es im FACS anregen zu können. Die Aktivitätsmessung mit dem sog. TLR3 Plasmid wird in der Abb. 19 in blau dargestellt. Zusätzlich zu den bisherigen Cas9 gRNAs T1 und T2 wurden die *target sites* T3 und T4 im GFP Gen ermittelt. Diese wurden erfolgreich nachträglich kloniert, jedoch aus Zeitgründen nicht im *tube* unter artifiziellen Bedingungen getestet. Die Abb. 19 stellt die FACS-Daten mit dem TLR3 Substratplasmid und den neuen gRNAs T3 und T4 dar.



**Abb. 19: FACS Analyse mit Cas9 T3 & T4**

I-SceI entspricht der Positivkontrolle. Die weitere Positivkontrolle in der Abbildung (pos K.) entspricht der Transfektionskontrolle. Hier wurde das TLR Plasmid so modifiziert, dass das BFP Protein immer hergestellt wird (1.2 µg). In diesem Experiment wurden 150000 HEK293 Zellen im 24-Well-Format mit je 600 ng TLR3 und Nukleasen Plasmid eingesetzt. Die Messung erfolgte nach 48 h (n=2).

In diesem Experiment wurde ein anderes Format für die Transfektion gewählt. Als Positivkontrollen dient wieder zum Einen I-SceI und zum Anderen ein modifiziertes TLR Plasmid, bei dem BFP ohne *frameshift* hergestellt werden kann. Auch wenn das Signal für I-SceI etwas geringer als im vorherigen Versuch ausfällt, wird erneut bestätigt, dass das TLR-System in Kombination mit Nukleasen zur Erfassung der Aktivität funktioniert. Auffallend ist, dass die neue *target site* T3 signifikant alle anderen *sites* mit 30 % Aktivität überragt. T0 und T2 dienen als Negativkontrollen. Sie weisen beide mit 7 % das gleiche Aktivitätssignal auf. In diesem Versuchsaufbau ist das Signal von T1 etwas höher als im vorherigen Versuch. Die ebenfalls neue *target site* T4 weist das geringste Signal auf.

## 5. Diskussion

### 5.1 Ergebnisse der Aktivitätstests von Cas9 in zellfreien Enzymreaktionen unter artifiziellen Bedingungen

Das *genome editing* besitzt ein enormes Potential monogenetische Erkrankungen zu therapieren. Durch immer geringer werdende Sequenzierkosten und effizientere Sequenziermethoden, insbesondere das *Next Generation Sequencing* (NGS) (Schmitt et al. 2012), können große Genome wie des Menschen in kürzester Zeit auf Polymorphismen hin entschlüsselt und mit Hilfe der Bioinformatik analysiert werden (Lelieveld et al. 2016). Programmierbare Nukleasen spielen bei der Therapie eine große Rolle. Sie erlauben DNA-Abschnitte präzise zu spalten und mit Hilfe der zelleigenen Reparaturmechanismen zu ersetzen (Cox et al. 2015). Die Entwicklung der programmierbaren Nukleasen nahm ihren Anfang mit den sog. Zinkfinger-nukleasen Ende der 90er Jahre (Chandrasegaran and Carroll 2016). Ihre Programmierung und Bindung an die gewünschte DNA-Sequenz ist mit Limitierungen verbunden, so dass rein theoretisch eine optimale Sequenz alle 500 bp vorliegt (Maeder et al. 2008, Sander et al. 2011). 2010 lösten die TALENs relativ schnell die Zinkfinger-nukleasen ab, sind aber genauso mit aufwendigen *protein engineering* Methoden verbunden (Boch and Bonas 2010). Mit der Publikation von Doudna und Charpentier im Jahr 2012 eröffneten sich neue Möglichkeiten auf dem Gebiet der Geneditierung (Jinek et al. 2012). Durch die modifizierte gRNA ist die Programmierung der Cas9-Endonuklease nicht nur einfach, sie ermöglicht auch simultan an mehreren Stellen im Genom die DNA zu adressieren.

Die Vorbereitungen für die Experimente außerhalb von eukaryotischen Zellen verliefen reibungslos und effizient. Die Klonierung der gRNA in das px330 Plasmid war erfolgreich, so dass die Arbeit zügig für die Expression und Aufreinigung der Cas9-Endonuklease aufgenommen werden konnte.

Der anschließende Aktivitätstest im *tube* unter artifiziellen Bedingungen zeigte nur eine *nicking* Aktivität, und dies nur bei einem sehr hohen Überschuss an Enzym. Hierfür kommen zwei Gründe in Frage: 1. Cas9 ist nur mit einer intakten gRNA aktiv. Diese wurde auch im *tube* hergestellt. RNA ist nicht so stabil wie DNA und auch auf dem

Gelbild (Abb. 11) ist ein „Schmier“ zu sehen mit einer dominanten Bande in der gewünschten Höhe. Eventuell war die Qualität der gRNA nicht ausreichend, hierfür spricht ebenfalls, dass eine höhere Aktivität für T1 detektiert werden konnte. 2. Die gRNA wurde immer im selben Verhältnis wie das Cas9 Enzym eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen, dass erst ab einem 30-fachen Überschuss des Enzyms gegenüber des Substrats eine Aktivität festgestellt werden konnte. Da keine Erfahrungswerte mit der Aktivität von Cas9 unabhängig von zelleigenen Mechanismen vorliegen ist davon auszugehen, dass die Aufreinigung, die Dialyse und die Stabilisierung im Puffer mit Aktivitätseinbußen einhergehen. Auch die Pufferbedingungen für den Aktivitätstest waren einem Standardpuffer angepasst, ohne optimale Bedingungen ausprobiert zu haben. Da jedoch eine Aktivität in den Tests beobachtet werden konnte, war es möglich mit den relevanten Experimenten in der Zellkultur zu beginnen.

## 5.2 Ergebnisse in der Zellkultur

Die Ergebnisse der Expression und der Translokation von Cas9 in den Zellkern sind vielversprechend. Das Westernblot Ergebnis zeigt eine klare Bande bei 200 kDa ohne Nebenbanden und auch die Translokation der Cas9-Nuklease bestätigt die Lokalisation im Zellkern, was essentiell für die Adressierung der DNA im Genom ist. Es konnte klar gezeigt werden, dass die Expression in den humanen Zellen stattfindet und ein erfolgreiches Einschleusen der Cas9-Endonuklease mit Hilfe des zusätzlichen NLS-Signals in den Nukleus ermöglicht wird. Um erste Daten bezüglich der Aktivität sammeln zu können, wurde das TLR Reportersystem eingesetzt. Eine hohe Plasmidzahl wurde zusammen mit dem Cas9 Plasmid in die Zellen transfiziert. Mit dieser Methode liegen die Plasmide in hoher Anzahl episomal vor und die Cas9-Nuklease muss für den Aktivitätsnachweis nicht in den Zellkern eindringen. Im Gegensatz zum Aktivitätstest im *tube*, bei dem für T1 und T2 eine Linearisierung des Plasmids erwartet wurde, sollte in den Zellkulturexperimenten nur ein rotes Aktivitätssignal für T1 nachgewiesen werden, da T2 als Negativkontrolle diente und hinter dem Stoppcodon lokalisiert ist. Es sollte ein qualitativer Aktivitätstest mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops erbracht werden. Dieses Experiment wurde mit verschiedenen Zellen (HEK293 und HeLa), verschiedenen Transfektionsprotokollen und DNA-Konzentrationen sowie neuen Plasmidpräparationen durchgeführt. Überraschenderweise führte die nicht

programmierte Cas9 Nuklease (T0) zu einem roten Aktivitätssignal des TLR Systems. Das Signal zeigte darüber hinaus kaum einen Signalunterschied zur Positivkontrolle mit I-SceI. Erwartungsgemäß hätte nur ein sehr geringes Hintergrundsignal mit kaum fluoreszierenden Zellen beobachtet werden müssen, da Cas9 T0 (ohne gRNA) die Negativkontrolle darstellt. Es konnte kein Fehler in der Durchführung trotz intensiver Nachforschung und multiplen Versuchswiederholungen festgestellt werden.

In den quantitativen Aktivitätstests mittels FACS Analysen wird es nochmal deutlicher. Cas9 T0 als Negativkontrolle erreicht mit 11% mehr Aktivitätssignal als die ausgesuchten *targets* 1 und 2. Umgekehrt ausgedrückt erreicht Cas9 T1, bei dem eine hohe Aktivität erwartet wurde, mit 8% das niedrigste Aktivitätssignal.

Die Ergebnisse aus diesen Versuchsreihen sind nicht ausreichend, um eine Aussage bezüglich der Nukleaseaktivität zu treffen. Darüber hinaus bleibt auch zunächst unklar, ob das TLR System für den Versuchsaufbau geeignet ist.

Um dennoch das Ergebnis und Aktivitätsunterschiede von T0, T1, T2 und I-SceI zu erklären, bieten sich zwei Thesen an: Das TLR-Plasmid liegt episomal in vielfacher Kopie in der Zelle vor. Unabhängig von den Nukleasen kommt es in den Plasmiden natürlicherweise zu DSBs. Diese können durch NHEJ Reparatur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit das NHEJ-Signal aktivieren.

Des Weiteren scheint es, als würde die Cas9 Nuklease, wie es auch in der Literatur beschrieben ist (Gabriel et al. 2015), eine nicht adressierte Aktivität vorweisen. Allerdings ist unklar, woher die gRNA stammt, damit die Nuklease zur DNA geführt werden kann. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die tracrRNA, die im Plasmid integriert ist, evtl. mit zelleigenen RNA Sequenzen interagiert und zu unspezifischen Spaltungen führt. Um eine genauere Aussage treffen zu können, wurde daher das quantitative Messverfahren mittels FACS für weitere Analysen ausgewählt. Weitere Cas9 *targets* (T3 und T4) im GFP-Gen und vor dem Stopp-Signal wurden ausgesucht und nach der Klonierung im Aktivitäts-Assay *in vitro* untersucht. Positiv zu werten ist die Tatsache, dass T0 und T2 mit ca. 7 % auf gleicher Höhe sind, da beide als Negativkontrollen gelten. Für I-SceI und T1 wurde eine höhere Aktivität als circa 10 % erwartet. Diese Daten zeigen jedoch, dass grundsätzlich der Versuchsaufbau und die Aktivitätsmessungen funktionieren. Die Erwartungen wurden mit dem neuen *target* T3 übertroffen, was auch zu neuen Erkenntnissen führte. Das Signal für T3 hat signifikant mit 30 % Aktivität die Ergebnisse aller anderen *targets* übertroffen und ist sogar auf

demselben Niveau, wie die Positivkontrolle, bei der das Stopp-Signal im TLR-Plasmid deletiert wurde, um vergleichbare Signale in der Transfektionskontrolle zu erhalten.

Die gRNA ist essentiell für die Aktivität der Cas9 Endonuklease. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Auswahl der geeigneten *targets* eine zentrale Rolle in der Versuchsplanung einnimmt und das *outcome* entscheidend beeinflusst. Die gRNA-Sequenz hat ebenfalls Einfluss auf die *off-target* Aktivität. Mittlerweile sind mehrere Publikationen veröffentlicht worden, die sich mit Strategien für optimale gRNAs beschäftigt haben. Es konnte gezeigt werden, dass die Generierung kürzerer gRNAs die *off-target*-Toxizität senken konnten (Fu et al. 2014). Auch modifizierte PAM-Varianten werden intensiv erforscht, um in Zukunft die Toxizität zu senken (Kleinstiver et al. 2015). Die Auswahl wird zusätzlich mit verschiedenen Algorithmen unterstützt, um geeignete Zielsequenzen zu finden. Hierdurch sollen Aussagen bezüglich der Aktivität und insbesondere der Toxizität getroffen werden (Doench et al. 2016).

In dieser Arbeit konnte die Methode, um jede neue gRNA bzw. neue Nuklease und ihre *targets* auf ihre Funktion und Aktivität hin zu überprüfen, weiter etabliert werden. Bioinformatische Empfehlungen helfen eine Auswahl zu treffen, aber die generierten Daten aus dem Labor sind entscheidend für den Erfolg und für weitere Erkenntnisse. Die Etablierung des Reportersystems bringt hier große Vorteile für die Versuchsauswertungen. Außerdem ist zu beachten, dass es für eine Therapie zwingend erforderlich ist, dass die Nukleasen in den Zellkern eindringen müssen, um die gewünschte DNA-Sequenz spalten zu können. Aufgrund der Chromatinstruktur können selbst gut ermittelte Sequenzen nicht oder schlecht adressierbar sein.

Die Frage, ob das CRISPR/Cas System für das *genome editing* geeignet ist, kann mit dieser Arbeit nicht beantwortet werden, da die Toxizität keine Fragestellung darstellte. Dennoch ist es wichtig zu erwähnen, dass Wissenschaftler sich der Problematik der *off-target* Spaltung bewusst sind und kontinuierlich daran arbeiten diese Hürde zu meistern, um das Potential des *genome editing* zu entfalten. Zwei unabhängige Gruppen konnten modifizierte Varianten der Cas9 Endonuklease generieren und veröffentlichten in 2016 diese sehr spezifischen Varianten in *Nature* und *Science*. Mit strengen Analysen konnte hier keine *off-target*-Aktivität festgestellt werden (Kleinstiver et al. 2016, Slaymaker et al. 2016). Dennoch ist eine genomweite Analyse essentiell, wenn es um den Einsatz von programmierbaren Nukleasen in der klinischen Anwendungen geht (Corrigan-Curay et al. 2015, Yee 2016).

In dieser Arbeit wurde überprüft, ob man *guide* RNA Tests aus zellfreien Reaktionen mit *in vitro* Ergebnissen korrelieren kann, um so Aussagen zur Effektivität in solchen Modellen treffen zu können. Die Ergebnisse der zellfreien Versuche unter artifiziiellen Bedingungen erlauben keine Rückschlüsse darauf, ob die gewählte *guide* RNA zusammen mit dem Cas9 Protein in den Zellkultur-Versuchen effizient sind. Mit der Auswahl der geeigneten *targets*, konnte jedoch unter anderem mit Hilfe von FACS Analysen deutlich gezeigt werden, dass unter optimalen Bedingungen die Effizienz der Cas9 Endonuklease auch in eukaryotischen Zellen hoch ist.

## 6. Zusammenfassung

Hochspezifische Nukleasen sind potente genome editing *tools* mit deren Hilfe gezielt Doppelstrangbrüche verursacht werden können. Unter den verschiedenen Nukleasen erlaubt das CRISPR-Cas System eine vergleichsweise einfache und schnelle „Programmierung“. Damit die Endonuklease gezielt einen Doppelstrangbruch verursachen kann, muss das Enzym einen Komplex mit der *guide* RNA, einer 20 bp langen Nukleotidsequenz, bilden. Durch die Auswahl der *guide* RNA kann nahezu jeder Abschnitt der DNA adressiert werden. Ziel der Arbeit ist es herauszufinden, inwiefern die Informationen aus den Experimenten in zellfreien Reaktionssystemen Voraussagen über die Aktivität der Cas9 Endonuklease mit verschiedenen *guide* RNAs in der Zellkultur erlauben.

Für die zellfreien Experimente musste *guide* RNA generiert und das Cas9 Protein exprimiert und aufgereinigt werden. Für die Versuche in der Zellkultur wurden zwei verschiedene *guide* RNA in den px330 Vektor kloniert, welcher zusätzlich auch das Gen für Cas9 enthielt. Dieser Vektor wurde zusammen mit einem *Traffic light Reporter System* (TLR) in eine HEK293 Zelllinie kotransfiziert. Das TLR System diene zur Erfassung der Aktivität und beinhaltet inaktive Fluoreszenzgene. Nach einem Doppelstrangbruch kam es durch *Non homologous end joining* (NHEJ) zu einem *frameshift*, wodurch das Fluoreszenzgen exprimiert wurde. Nach der Transfektion wurde mittels Westernblot die Expression von Cas9 in den Zellen nachgewiesen und mit Immunfluoreszenz-Aufnahmen die Translokation des Proteins in den Zellkern dargestellt. Die Aktivität wurde qualitativ mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie und quantitativ mittels FACS Analysen überprüft.

In den zellfreien Experimenten konnte erst bei einem 30-fachen Überschuss des Enzyms eine Nicking-Aktivität festgestellt werden, obwohl Doppelstrangbrüche des Vektorsubstrats erwartet wurden. Die Expression und Translokation des Cas9 Enzyms in den Zellkern konnte bewiesen werden. Insgesamt wurden Aktivitätstests für vier verschiedene *targets* (Cas9 T1- T4) durchgeführt. Einzig Cas9 T3 überragte mit 30 % Aktivität signifikant die anderen *targets*, welche keine Aktivität aufwiesen.

Die Auswahl der geeigneten *targets* nimmt eine zentrale Rolle in der Versuchsplanung ein und beeinflusst das *outcome* entscheidend. Die Ergebnisse der zellfreien Versuche erlauben keine Rückschlüsse darauf, ob die gewählte *guide* RNA zusammen mit dem Cas9 Protein in den Zellkultur-Versuchen effizient sind.

## 7. Summary

Highly specific endonucleases are potent genome editing tools which can provide specific double strand breaks. Among various endonucleases the CRISPR Cas system allows an easy and fast way of programming. In order to cause a double strand break the enzyme needs to form a complex with a guide RNA, which consists of a 20 bp long nucleotide sequence. It is possible to address nearly every locus of the DNA with selection of guide RNA. Purpose of this thesis is to ascertain, whether one can draw inferences from cell-free experiments about the activity of Cas9 endonucleases with different guide RNA in vitro.

Generation of guide RNA and expression of Cas9 enzymes were necessary in order to perform cell-free experiments. Two different guide RNA were cloned into px330 vector, which also contained the gene for Cas9 endonuclease. A HEK293 cell line was cotransfected with this vector and a traffic light reporter system (TLR). The TLR system conducted to track the activity and contained two inactive fluorescence genes. If a break undergoes non homologous end joining (NHEJ) there will be a frameshift and the fluorescence gene will be rendered in frame and expressed. Western Blots were made to prove the expression of Cas9 in cells. Translocation of the proteins to nucleus were shown with immunofluorescence. The activity was verified qualitatively via fluorescence microscopy and quantitatively via FACS analyses.

Although double strand breaks were expected, a 30x excess of the enzyme was necessary to demonstrate nicking activity in cell free experiments. The expression and translocation of Cas9 enzymes to nucleus were demonstrated. Activity tests were performed with 4 different targets (Cas9 T1-T4). Only T3 topped significantly all other targets with 30 % activity. Other tested targets showed no significant activity. The selection of eligible targets plays an important role in experimental designs and affects the outcome crucially. No conclusions can be drawn from the results of cell free experiments; it remains unclear whether the selected guide RNA and the Cas9 protein will be efficient in cell culture experiments.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
bp	base pairs
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
DNA	deoxyribonucleic acid
dnTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSB	Doppelstrangbruch
ESB	Einzelstrangbruch
FACS	Fluorescence activated cell sorting
g	Gramm
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	lysogeny broth
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
RNA	ribonucleic acid
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm	revolutions per minute
T <sup>opt.</sup>	optimale Temperatur
TLR	Traffic Light Reporter
w/v	weight per volume

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Histologischer Schnitt durch die Retina .....	3
Abb. 2: Schematische Darstellung der genutzten Endonukleasen und der Hauptreparaturwege .....	16
Abb. 3: Schematischer Überblick des CRISPR-Cas Systems .....	20
Abb. 4: px330 All-in-One Vektor .....	31
Abb. 5: Cas9 <i>targets</i> im TLR Substratplasmid .....	32
Abb. 6: Schematische Darstellung des px330 All-in-One Vektor .....	52
Abb. 7: Schematische Darstellung des <i>traffic-light-reporter</i> Systems (TLR) .....	53
Abb. 8: Ergebnis der gRNA Klonierung .....	54
Abb. 9: Cas9 Expression und Aufreinigung .....	54
Abb. 10: gRNA PCR .....	55
Abb. 11: gRNA Generierung mit dem T7 Transkriptionskit .....	56
Abb. 12: Cas9 Aktivitätsnachweis im zellfreien Milieu .....	57
Abb. 13: Cas9 gRNA T1 Aktivitätsnachweis im Überschuss .....	57
Abb. 14: Cas9 Aktivitätsnachweis mit 30x Überschuss mit gRNA T1 und T2 .....	58
Abb. 15: Westernblot .....	59
Abb. 16: Immunofluoreszenz in HEK 293 und HeLa Zellen .....	60
Abb. 17: Qualitativer Aktivitätstest .....	61
Abb. 18: Quantitativer Aktivitätstest .....	62
Abb. 19: FACS Analyse mit Cas9 T3 & T4 .....	64

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien .....	23
Tabelle 2: Verwendete Antibiotika .....	24
Tabelle 3: Verwendete Enzyme und Antikörper.....	25
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien und Kits .....	25
Tabelle 5: Verwendete Puffer, Medien und Lösungen.....	26
Tabelle 6: Verwendete Größenmarker .....	27
Tabelle 7: Verwendete Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	28
Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide .....	33
Tabelle 9: Zusammensetzung des SDS Gels.....	39

## 11. Literaturverzeichnis

Alberts, B. (2002). Molecular biology of the cell, Taylor & Francis, New York.

Aleman, T. S., A. V. Cideciyan, N. J. Volpe, G. Stevanin, A. Brice and S. G. Jacobson (2002). "Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) shows a cone-rod dystrophy phenotype." Exp Eye Res **74**(6): 737-745.

Anders, C., O. Niewoehner, A. Duerst and M. Jinek (2014). "Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease." Nature **513**(7519): 569-573.

Arshavsky, V. Y., T. D. Lamb and E. N. Pugh, Jr. (2002). "G proteins and phototransduction." Annu Rev Physiol **64**: 153-187.

Bainbridge, J. W., M. S. Mehat, V. Sundaram, S. J. Robbie, S. E. Barker, C. Ripamonti, A. Georgiadis, F. M. Mowat, S. G. Beattie, P. J. Gardner, K. L. Feathers, V. A. Luong, S. Yzer, K. Balaggan, A. Viswanathan, T. J. de Ravel, I. Casteels, G. E. Holder, N. Tyler, F. W. Fitzke, R. G. Weleber, M. Nardini, A. T. Moore, D. A. Thompson, S. M. Petersen-Jones, M. Michaelides, L. I. van den Born, A. Stockman, A. J. Smith, G. Rubin and R. R. Ali (2015). "Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis." N Engl J Med **372**(20): 1887-1897.

Bartova, E., J. Krejci, A. Harnicarova, G. Galiova and S. Kozubek (2008). "Histone modifications and nuclear architecture: a review." J Histochem Cytochem **56**(8): 711-721.

Bennett, J. (2017). "Taking Stock of Retinal Gene Therapy: Looking Back and Moving Forward." Mol Ther **25**(5): 1076-1094.

Berger, W., B. Kloeckener-Gruissem and J. Neidhardt (2010). "The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases." Prog Retin Eye Res **29**(5): 335-375.

Bibikova, M., D. Carroll, D. J. Segal, J. K. Trautman, J. Smith, Y. G. Kim and S. Chandrasegaran (2001). "Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases." Mol Cell Biol **21**(1): 289-297.

Blier, P. R., A. J. Griffith, J. Craft and J. A. Hardin (1993). "Binding of Ku protein to DNA. Measurement of affinity for ends and demonstration of binding to nicks." J Biol Chem **268**(10): 7594-7601.

Boch, J. and U. Bonas (2010). "Xanthomonas AvrBs3 family-type III effectors: discovery and function." Annu Rev Phytopathol **48**: 419-436.

Boch, J., H. Scholze, S. Schornack, A. Landgraf, S. Hahn, S. Kay, T. Lahaye, A. Nickstadt and U. Bonas (2009). "Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors." Science **326**(5959): 1509-1512.

Boissel, S., J. Jarjour, A. Astrakhan, A. Adey, A. Gouble, P. Duchateau, J. Shendure, B. L. Stoddard, M. T. Certo, D. Baker and A. M. Scharenberg (2014). "megaTALs: a rare-cleaving nuclease architecture for therapeutic genome engineering." Nucleic Acids Res **42**(4): 2591-2601.

Bolotin, A., B. Quinquis, A. Sorokin and S. D. Ehrlich (2005). "Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin." Microbiology **151**(Pt 8): 2551-2561.

Bommas-Ebert, U., P. Teubner and R. Voß (2006). Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie.

Bonner, W. M., C. E. Redon, J. S. Dickey, A. J. Nakamura, O. A. Sedelnikova, S. Solier and Y. Pommier (2008). "GammaH2AX and cancer." Nat Rev Cancer **8**(12): 957-967.

Bowater, R. and A. J. Doherty (2006). "Making ends meet: repairing breaks in bacterial DNA by non-homologous end-joining." PLoS Genet **2**(2): e8.

Brandsma, I. and D. C. Gent (2012). "Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act." Genome Integr **3**(1): 9.

Cai, X., S. M. Conley and M. I. Naash (2009). "RPE65: role in the visual cycle, human retinal disease, and gene therapy." Ophthalmic Genet **30**(2): 57-62.

Certo, M. T., B. Y. Ryu, J. E. Annis, M. Garibov, J. Jarjour, D. J. Rawlings and A. M. Scharenberg (2011). "Tracking genome engineering outcome at individual DNA breakpoints." Nat Methods **8**(8): 671-676.

Chandrasegaran, S. and D. Carroll (2016). "Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering." J Mol Biol **428**(5 Pt B): 963-989.

Checa-Casalengua, P., C. Jiang, I. Bravo-Osuna, B. A. Tucker, I. T. Molina-Martinez, M. J. Young and R. Herrero-Vanrell (2011). "Retinal ganglion cells survival in a glaucoma model by GDNF/Vit E PLGA microspheres prepared according to a novel microencapsulation procedure." J Control Release **156**(1): 92-100.

Chen, B. P., N. Uematsu, J. Kobayashi, Y. Lerenthal, A. Krempler, H. Yajima, M. Lobrich, Y. Shiloh and D. J. Chen (2007). "Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break." J Biol Chem **282**(9): 6582-6587.

Chinskey, N. D., C. G. Besirli and D. N. Zacks (2014). "Retinal cell death and current strategies in retinal neuroprotection." Curr Opin Ophthalmol **25**(3): 228-233.

Cong, L., F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini and F. Zhang (2013). "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems." Science **339**(6121): 819-823.

Corrigan-Curay, J., M. O'Reilly, D. B. Kohn, P. M. Cannon, G. Bao, F. D. Bushman, D. Carroll, T. Cathomen, J. K. Joung, D. Roth, M. Sadelain, A. M. Scharenberg, C. von Kalle, F. Zhang, R. Jambou, E. Rosenthal, M. Hassani, A. Singh and M. H. Porteus (2015). "Genome editing technologies: defining a path to clinic." Mol Ther **23**(5): 796-806.

Cox, D. B., R. J. Platt and F. Zhang (2015). "Therapeutic genome editing: prospects and challenges." Nat Med **21**(2): 121-131.

Cremers, F. P., D. J. van de Pol, M. van Driel, A. I. den Hollander, F. J. van Haren, N. V. Knoers, N. Tijmes, A. A. Bergen, K. Rohrschneider, A. Blankenagel, A. J. Pinckers, A. F. Deutman and C. B. Hoyng (1998). "Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR." Hum Mol Genet **7**(3): 355-362.

Daiger, S. P., S. J. Bowne and L. S. Sullivan (2007). "Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa." Arch Ophthalmol **125**(2): 151-158.

Daley, J. M. and P. Sung (2014). "53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks." Mol Cell Biol **34**(8): 1380-1388.

Dalkara, D., L. C. Byrne, R. R. Klimczak, M. Visel, L. Yin, W. H. Merigan, J. G. Flannery and D. V. Schaffer (2013). "In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous." Sci Transl Med **5**(189): 189ra176.

DeFazio, L. G., R. M. Stansel, J. D. Griffith and G. Chu (2002). "Synopsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase." EMBO J **21**(12): 3192-3200.

Deltcheva, E., K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pirzada, M. R. Eckert, J. Vogel and E. Charpentier (2011). "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Nature **471**(7340): 602-607.

Demirci, F. Y., B. W. Rigatti, G. Wen, A. L. Radak, T. S. Mah, C. L. Baic, E. I. Traboulsi, T. Alitalo, J. Ramser and M. B. Gorin (2002). "X-linked cone-rod dystrophy (locus COD1): identification of mutations in RPGR exon ORF15." Am J Hum Genet **70**(4): 1049-1053.

den Hollander, A. I., A. Black, J. Bennett and F. P. Cremers (2010). "Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies." J Clin Invest **120**(9): 3042-3053.

den Hollander, A. I., R. Roepman, R. K. Koenekoop and F. P. Cremers (2008). "Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms." Prog Retin Eye Res **27**(4): 391-419.

Deng, S. K., B. Gibb, M. J. de Almeida, E. C. Greene and L. S. Symington (2014). "RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks." Nat Struct Mol Biol **21**(4): 405-412.

Doench, J. G., N. Fusi, M. Sullender, M. Hegde, E. W. Vaimberg, K. F. Donovan, I. Smith, Z. Tothova, C. Wilen, R. Orchard, H. W. Virgin, J. Listgarten and D. E. Root (2016). "Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9." Nat Biotechnol **34**(2): 184-191.

Dryja, T. P., L. B. Hahn, G. S. Cowley, T. L. McGee and E. L. Berson (1991). "Mutation spectrum of the rhodopsin gene among patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(20): 9370-9374.

Edwards, T. L., J. K. Jolly, M. Groppe, A. R. Barnard, C. L. Cottrill, T. Tolmachova, G. C. Black, A. R. Webster, A. J. Lotery, G. E. Holder, K. Xue, S. M. Downes, M. P. Simunovic, M. C. Seabra and R. E. MacLaren (2016). "Visual Acuity after Retinal Gene Therapy for Choroideremia." N Engl J Med **374**(20): 1996-1998.

Fishman, G. A., S. G. Jacobson, K. R. Alexander, A. V. Cideciyan, D. G. Birch, R. G. Weleber and D. C. Hood (2005). "Outcome measures and their application in clinical trials for retinal degenerative diseases: outline, review, and perspective." Retina **25**(6): 772-777.

Freund, C. L., C. Y. Gregory-Evans, T. Furukawa, M. Papaioannou, J. Looser, L. Ploder, J. Bellingham, D. Ng, J. A. Herbrick, A. Duncan, S. W. Scherer, L. C. Tsui, A. Loutradis-Anagnostou, S. G. Jacobson, C. L. Cepko, S. S. Bhattacharya and R. R. McInnes (1997). "Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor." Cell **91**(4): 543-553.

Fu, Y., J. D. Sander, D. Reyon, V. M. Cascio and J. K. Joung (2014). "Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs." Nat Biotechnol **32**(3): 279-284.

Gabriel, R., C. von Kalle and M. Schmidt (2015). "Mapping the precision of genome editing." Nat Biotechnol **33**(2): 150-152.

Garcia-Caballero, C., B. Lieppman, A. Arranz-Romera, I. T. Molina-Martinez, I. Bravo-Osuna, M. Young, P. Baranov and R. Herrero-Vanrell (2018). "Photoreceptor preservation induced by intravitreal controlled delivery of GDNF and GDNF/melatonin in rhodopsin knockout mice." Mol Vis **24**: 733-745.

Gasiunas, G., R. Barrangou, P. Horvath and V. Siksnys (2012). "Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(39): E2579-2586.

Georgiadis, A., Y. Duran, J. Ribeiro, L. Abelleira-Hervas, S. J. Robbie, B. Sunkel-Laing, S. Fourali, A. Gonzalez-Cordero, E. Cristante, M. Michaelides, J. W. Bainbridge, A. J. Smith and R. R. Ali (2016). "Development of an optimized AAV2/5 gene therapy vector for Leber congenital amaurosis owing to defects in RPE65." Gene Ther **23**(12): 857-862.

Grizot, S., J. C. Epinat, S. Thomas, A. Duclert, S. Rolland, F. Paques and P. Duchateau (2010). "Generation of redesigned homing endonucleases comprising DNA-binding domains derived from two different scaffolds." Nucleic Acids Res **38**(6): 2006-2018.

Haeussler, M. and J. P. Concordet (2016). "Genome Editing with CRISPR-Cas9: Can It Get Any Better?" J Genet Genomics **43**(5): 239-250.

Hamel, C. (2006). "Retinitis pigmentosa." Orphanet J Rare Dis **1**: 40.

Hamel, C. P. (2007). "Cone rod dystrophies." Orphanet J Rare Dis **2**: 7.

Hartong, D. T., E. L. Berson and T. P. Dryja (2006). "Retinitis pigmentosa." Lancet **368**(9549): 1795-1809.

Heyer, W. D., K. T. Ehmsen and J. Liu (2010). "Regulation of homologous recombination in eukaryotes." Ann Rev Genet **44**: 113-139.

Hille, F. and E. Charpentier (2016). "CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **371**(1707).

Holthausen, J. T., C. Wyman and R. Kanaar (2010). "Regulation of DNA strand exchange in homologous recombination." DNA Repair (Amst) **9**(12): 1264-1272.

Horvath, P. and R. Barrangou (2010). "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea." Science **327**(5962): 167-170.

Hurley, P. J. and F. Bunz (2007). "ATM and ATR: components of an integrated circuit." Cell Cycle **6**(4): 414-417.

Hwang, W. Y., Y. Fu, D. Reyon, M. L. Maeder, S. Q. Tsai, J. D. Sander, R. T. Peterson, J. R. Yeh and J. K. Joung (2013). "Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system." Nat Biotechnol **31**(3): 227-229.

Ishino, Y., M. Krupovic and P. Forterre (2018). "History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology." J Bacteriol **200**(7).

Ishino, Y., H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura and A. Nakata (1987). "Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product." J Bacteriol **169**(12): 5429-5433.

Jacobson, S. G., A. V. Cideciyan, R. Ratnakaram, E. Heon, S. B. Schwartz, A. J. Roman, M. C. Peden, T. S. Aleman, S. L. Boye, A. Sumaroka, T. J. Conlon, R. Calcedo, J. J. Pang, K. E. Erger, M. B. Olivares, C. L. Mullins, M. Swider, S. Kaushal, W. J. Feuer, A. Iannaccone, G. A. Fishman, E. M. Stone, B. J. Byrne and W. W. Hauswirth (2012). "Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years." Arch Ophthalmol **130**(1): 9-24.

Jacobson, S. G., A. V. Cideciyan, A. J. Roman, A. Sumaroka, S. B. Schwartz, E. Heon and W. W. Hauswirth (2015). "Improvement and decline in vision with gene therapy in childhood blindness." N Engl J Med **372**(20): 1920-1926.

Jasin, M. and J. E. Haber (2016). "The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair." DNA Repair (Amst) **44**: 6-16.

Jiang, F. and J. A. Doudna (2015). "The structural biology of CRISPR-Cas systems." Curr Opin Struct Biol **30**: 100-111.

Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna and E. Charpentier (2012). "A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity." Science.

Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna and E. Charpentier (2012). "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Science **337**(6096): 816-821.

Karginov, F. V. and G. J. Hannon (2010). "The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea." Mol Cell **37**(1): 7-19.

Karmakar, P., J. Piotrowski, R. M. Brosh, Jr., J. A. Sommers, S. P. Miller, W. H. Cheng, C. M. Snowden, D. A. Ramsden and V. A. Bohr (2002). "Werner protein is a target of DNA-dependent protein kinase in vivo and in vitro, and its catalytic activities are regulated by phosphorylation." J Biol Chem **277**(21): 18291-18302.

Kellsell, R. E., K. Gregory-Evans, A. M. Payne, I. Perrault, J. Kaplan, R. B. Yang, D. L. Garbers, A. C. Bird, A. T. Moore and D. M. Hunt (1998). "Mutations in the retinal guanylate cyclase (RETGC-1) gene in dominant cone-rod dystrophy." Hum Mol Genet **7**(7): 1179-1184.

Kleinstiver, B. P., V. Pattanayak, M. S. Prew, S. Q. Tsai, N. T. Nguyen, Z. Zheng and J. K. Joung (2016). "High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects." Nature **529**(7587): 490-495.

Kleinstiver, B. P., M. S. Prew, S. Q. Tsai, N. T. Nguyen, V. V. Topkar, Z. Zheng and J. K. Joung (2015). "Broadening the targeting range of Staphylococcus aureus CRISPR-Cas9 by modifying PAM recognition." Nat Biotechnol **33**(12): 1293-1298.

Kleinstiver, B. P., M. S. Prew, S. Q. Tsai, V. V. Topkar, N. T. Nguyen, Z. Zheng, A. P. Gonzales, Z. Li, R. T. Peterson, J. R. Yeh, M. J. Aryee and J. K. Joung (2015). "Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities." Nature **523**(7561): 481-485.

Klug, A. (2010). "The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation." Annu Rev Biochem **79**: 213-231.

Kumaran, N., A. T. Moore, R. G. Weleber and M. Michaelides (2017). "Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: clinical features, molecular genetics and therapeutic interventions." Br J Ophthalmol **101**(9): 1147-1154.

Lelieveld, S. H., J. A. Veltman and C. Gilissen (2016). "Novel bioinformatic developments for exome sequencing." Hum Genet **135**(6): 603-614.

Li, H., V. V. Tran, Y. Hu, W. Mark Saltzman, C. J. Barnstable and J. Tombran-Tink (2006). "A PEDF N-terminal peptide protects the retina from ischemic injury when delivered in PLGA nanospheres." Exp Eye Res **83**(4): 824-833.

Lieber, M. R. (2010). "The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway." Annu Rev Biochem **79**: 181-211.

Lieber, M. R., K. Yu and S. C. Raghavan (2006). "Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations." DNA Repair (Amst) **5**(9-10): 1234-1245.

Lorenz, B., E. Poliakov, M. Schambeck, C. Friedburg, M. N. Preising and T. M. Redmond (2008). "A comprehensive clinical and biochemical functional study of a novel RPE65 hypomorphic mutation." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(12): 5235-5242.

Lorenz, B., M. Preising and K. Stieger (2010). "Retinal blinding disorders and gene therapy--molecular and clinical aspects." Curr Gene Ther **10**(5): 350-370.

Lorenz, B., E. Strohmayer, S. Zahn, C. Friedburg, M. Kramer, M. Preising and K. Stieger (2012). "Chromatic pupillometry dissects function of the three different light-sensitive retinal cell populations in RPE65 deficiency." Invest Ophthalmol Vis Sci **53**(9): 5641-5652.

Lu, J., L. Luo, D. Huang, X. Liu, X. Xia, Z. Wang, B. L. Lam, J. Yi, R. Wen and Y. Li (2018). "Photoreceptor Protection by Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor (MANF)." eNeuro **5**(2).

Lucini, C., L. Maruccio, M. Patruno, T. Martinello, F. Mascarello and L. Castaldo (2007). "Glial cell line-derived neurotrophic factor expression in the retina of adult zebrafish (*Danio rerio*)." Neurosci Lett **429**(2-3): 156-160.

MacLaren, R. E., M. Groppe, A. R. Barnard, C. L. Cottrill, T. Tolmachova, L. Seymour, K. R. Clark, M. J. During, F. P. Cremers, G. C. Black, A. J. Lotery, S. M. Downes, A. R. Webster and M. C. Seabra (2014). "Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial." Lancet **383**(9923): 1129-1137.

Maeder, M. L., S. Thibodeau-Beganny, A. Osiak, D. A. Wright, R. M. Anthony, M. Eichinger, T. Jiang, J. E. Foley, R. J. Winfrey, J. A. Townsend, E. Unger-Wallace, J. D. Sander, F. Muller-Lerch, F. Fu, J. Pearlberg, C. Gobel, J. P. Dassisti, S. M. Pruet-

Miller, M. H. Porteus, D. C. Sgroi, A. J. Iafrate, D. Dobbs, P. B. McCray, Jr., T. Cathomen, D. F. Voytas and J. K. Joung (2008). "Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification." Mol Cell **31**(2): 294-301.

Makarova, K. S., D. H. Haft, R. Barrangou, S. J. Brouns, E. Charpentier, P. Horvath, S. Moineau, F. J. Mojica, Y. I. Wolf, A. F. Yakunin, J. van der Oost and E. V. Koonin (2011). "Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems." Nat Rev Microbiol **9**(6): 467-477.

Makarova, K. S., Y. I. Wolf, O. S. Alkhnbashi, F. Costa, S. A. Shah, S. J. Saunders, R. Barrangou, S. J. Brouns, E. Charpentier, D. H. Haft, P. Horvath, S. Moineau, F. J. Mojica, R. M. Terns, M. P. Terns, M. F. White, A. F. Yakunin, R. A. Garrett, J. van der Oost, R. Backofen and E. V. Koonin (2015). "An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems." Nat Rev Microbiol **13**(11): 722-736.

Mali, P., L. Yang, K. M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J. E. DiCarlo, J. E. Norville and G. M. Church (2013). "RNA-guided human genome engineering via Cas9." Science **339**(6121): 823-826.

Mao, H., M. S. Gorbatyuk, B. Rossmiller, W. W. Hauswirth and A. S. Lewin (2012). "Long-term rescue of retinal structure and function by rhodopsin RNA replacement with a single adeno-associated viral vector in P23H RHO transgenic mice." Hum Gene Ther **23**(4): 356-366.

Marigo, V. (2007). "Programmed cell death in retinal degeneration: targeting apoptosis in photoreceptors as potential therapy for retinal degeneration." Cell Cycle **6**(6): 652-655.

Matsuoka, S., B. A. Ballif, A. Smogorzewska, E. R. McDonald, 3rd, K. E. Hurov, J. Luo, C. E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S. P. Gygi and S. J. Elledge (2007). "ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage." Science **316**(5828): 1160-1166.

Matsuoka, S., G. Rotman, A. Ogawa, Y. Shiloh, K. Tamai and S. J. Elledge (2000). "Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(19): 10389-10394.

Meek, K., P. Douglas, X. Cui, Q. Ding and S. P. Lees-Miller (2007). "trans Autophosphorylation at DNA-dependent protein kinase's two major autophosphorylation site clusters facilitates end processing but not end joining." Mol Cell Biol **27**(10): 3881-3890.

Mei, Y., Y. Wang, H. Chen, Z. S. Sun and X. D. Ju (2016). "Recent Progress in CRISPR/Cas9 Technology." J Genet Genomics **43**(2): 63-75.

Michaelides, M., A. J. Hardcastle, D. M. Hunt and A. T. Moore (2006). "Progressive cone and cone-rod dystrophies: phenotypes and underlying molecular genetic basis." Surv Ophthalmol **51**(3): 232-258.

Mimitou, E. P. and L. S. Symington (2009). "Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination." Trends Biochem Sci **34**(5): 264-272.

Onakpoya, O. H., C. O. Adeoti, T. S. Oluleye, I. A. Ajayi, T. Majengbasan and O. K. Olorundare (2016). "Clinical presentation and visual status of retinitis pigmentosa patients: a multicenter study in southwestern Nigeria." Clin Ophthalmol **10**: 1579-1583.

Parmeggiani, F. (2011). "Clinics, epidemiology and genetics of retinitis pigmentosa." Curr Genomics **12**(4): 236-237.

Paull, T. T. and M. Gellert (1999). "Nbs1 potentiates ATP-driven DNA unwinding and endonuclease cleavage by the Mre11/Rad50 complex." Genes Dev **13**(10): 1276-1288.

Pauwels, K., N. Podevin, D. Breyer, D. Carroll and P. Herman (2014). "Engineering nucleases for gene targeting: safety and regulatory considerations." N Biotechnol **31**(1): 18-27.

Peng, C. Y., P. R. Graves, R. S. Thoma, Z. Wu, A. S. Shaw and H. Piwnica-Worms (1997). "Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216." Science **277**(5331): 1501-1505.

Petit, L., H. Khanna and C. Punzo (2016). "Advances in Gene Therapy for Diseases of the Eye." Hum Gene Ther **27**(8): 563-579.

Petrs-Silva, H. and R. Linden (2014). "Advances in gene therapy technologies to treat retinitis pigmentosa." Clin Ophthalmol **8**: 127-136.

Pfeiffer, P., W. Goedecke and G. Obe (2000). "Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations." Mutagenesis **15**(4): 289-302.

Pingoud, A. and W. Wende (2011). "Generation of novel nucleases with extended specificity by rational and combinatorial strategies." ChemBiochem **12**(10): 1495-1500.

Povirk, L. F. (2012). "Processing of damaged DNA ends for double-strand break repair in mammalian cells." ISRN Mol Biol **2012**.

Preising, M. and C. Ayuso (2004). "Rab escort protein 1 (REP1) in intracellular traffic: a functional and pathophysiological overview." Ophthalmic Genet **25**(2): 101-110.

Ramirez, C. L., J. E. Foley, D. A. Wright, F. Muller-Lerch, S. H. Rahman, T. I. Cornu, R. J. Winfrey, J. D. Sander, F. Fu, J. A. Townsend, T. Cathomen, D. F. Voytas and J. K. Joung (2008). "Unexpected failure rates for modular assembly of engineered zinc fingers." Nat Methods **5**(5): 374-375.

Ran, F. A., L. Cong, W. X. Yan, D. A. Scott, J. S. Gootenberg, A. J. Kriz, B. Zetsche, O. Shalem, X. Wu, K. S. Makarova, E. V. Koonin, P. A. Sharp and F. Zhang (2015). "In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9." Nature **520**(7546): 186-191.

Ran, F. A., P. D. Hsu, C. Y. Lin, J. S. Gootenberg, S. Konermann, A. E. Trevino, D. A. Scott, A. Inoue, S. Matoba, Y. Zhang and F. Zhang (2013). "Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity." Cell **154**(6): 1380-1389.

Ran, F. A., P. D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D. A. Scott and F. Zhang (2013). "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system." Nat Protoc **8**(11): 2281-2308.

Richter, C., J. T. Chang and P. C. Fineran (2012). "Function and regulation of clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR associated (Cas) systems." Viruses **4**(10): 2291-2311.

Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova and W. M. Bonner (1998). "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139." J Biol Chem **273**(10): 5858-5868.

Saidi, A., T. Li, F. Weih, P. Concannon and Z. Q. Wang (2010). "Dual functions of Nbs1 in the repair of DNA breaks and proliferation ensure proper V(D)J recombination and T-cell development." Mol Cell Biol **30**(23): 5572-5581.

Sanchez, Y., C. Wong, R. S. Thoma, R. Richman, Z. Wu, H. Piwnica-Worms and S. J. Elledge (1997). "Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25." Science **277**(5331): 1497-1501.

Sancho-Pelluz, J., B. Arango-Gonzalez, S. Kustermann, F. J. Romero, T. van Veen, E. Zrenner, P. Ekstrom and F. Paquet-Durand (2008). "Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration." Mol Neurobiol **38**(3): 253-269.

Sander, J. D., E. J. Dahlborg, M. J. Goodwin, L. Cade, F. Zhang, D. Cifuentes, S. J. Curtin, J. S. Blackburn, S. Thibodeau-Beganny, Y. Qi, C. J. Pierick, E. Hoffman, M. L. Maeder, C. Khayter, D. Reyon, D. Dobbs, D. M. Langenau, R. M. Stupar, A. J. Giraldez, D. F. Voytas, R. T. Peterson, J. R. Yeh and J. K. Joung (2011). "Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA)." Nat Methods **8**(1): 67-69.

Sartori, A. A., C. Lukas, J. Coates, M. Mistrik, S. Fu, J. Bartek, R. Baer, J. Lukas and S. P. Jackson (2007). "Human CtIP promotes DNA end resection." Nature **450**(7169): 509-514.

Schipler, A. and G. Iliakis (2013). "DNA double-strand-break complexity levels and their possible contributions to the probability for error-prone processing and repair pathway choice." Nucleic Acids Res **41**(16): 7589-7605.

Schmid-Burgk, J. L., T. Schmidt and V. Hornung (2015). "Ligation-independent cloning (LIC) assembly of TALEN genes." Methods Mol Biol **1239**: 161-169.

Schmitt, M. W., S. R. Kennedy, J. J. Salk, E. J. Fox, J. B. Hiatt and L. A. Loeb (2012). "Detection of ultra-rare mutations by next-generation sequencing." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(36): 14508-14513.

Scholze, H. and J. Boch (2011). "TAL effectors are remote controls for gene activation." Curr Opin Microbiol **14**(1): 47-53.

Seitz, I. P., S. Michalakis, B. Wilhelm, F. F. Reichel, G. A. Ochakovski, E. Zrenner, M. Ueffing, M. Biel, B. Wissinger, K. U. Bartz-Schmidt, T. Peters, M. D. Fischer and R.-C. Consortium (2017). "Superior Retinal Gene Transfer and Biodistribution Profile of Subretinal Versus Intravitreal Delivery of AAV8 in Nonhuman Primates." Invest Ophthalmol Vis Sci **58**(13): 5792-5801.

Sengillo, J. D., S. Justus, T. Cabral and S. H. Tsang (2017). "Correction of Monogenic and Common Retinal Disorders with Gene Therapy." Genes (Basel) **8**(2).

Shmakov, S., O. O. Abudayyeh, K. S. Makarova, Y. I. Wolf, J. S. Gootenberg, E. Semenova, L. Minakhin, J. Joung, S. Konermann, K. Severinov, F. Zhang and E. V. Koonin (2015). "Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems." Mol Cell **60**(3): 385-397.

Sinha, S., D. Villarreal, E. Y. Shim and S. E. Lee (2016). "Risky business: Microhomology-mediated end joining." Mutat Res **788**: 17-24.

Slaymaker, I. M., L. Gao, B. Zetsche, D. A. Scott, W. X. Yan and F. Zhang (2016). "Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity." Science **351**(6268): 84-88.

Sohocki, M. M., I. Perrault, B. P. Leroy, A. M. Payne, S. Dharmaraj, S. S. Bhattacharya, J. Kaplan, I. H. Maumenee, R. Koenekoop, F. M. Meire, D. G. Birch, J. R. Heckenlively and S. P. Daiger (2000). "Prevalence of AIPL1 mutations in inherited retinal degenerative disease." Mol Genet Metab **70**(2): 142-150.

Sternberg, S. H., S. Redding, M. Jinek, E. C. Greene and J. A. Doudna (2014). "DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9." Nature **507**(7490): 62-67.

Stewart, G. S., S. Panier, K. Townsend, A. K. Al-Hakim, N. K. Kolas, E. S. Miller, S. Nakada, J. Ylanko, S. Olivarius, M. Mendez, C. Oldreive, J. Wildenhain, A. Tagliaferro, L. Pelletier, N. Taubenheim, A. Durandy, P. J. Byrd, T. Stankovic, A. M. Taylor and D. Durocher (2009). "The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage." Cell **136**(3): 420-434.

Stieger, K. (2018). "Gentherapie bei degenerativen Erkrankungen der Netzhaut - ein Update." Z. prakt. Augenheilkd(39).

Stieger, K. and B. Lorenz (2009). "Gentherapie bei degenerativen Erkrankungen der Netzhaut." Z. prakt. Augenheilkd(30): 561-573.

Sung, P. and H. Klein (2006). "Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(10): 739-750.

Symington, L. S. and J. Gautier (2011). "Double-strand break end resection and repair pathway choice." Annu Rev Genet **45**: 247-271.

Tebas, P., D. Stein, W. W. Tang, I. Frank, S. Q. Wang, G. Lee, S. K. Spratt, R. T. Surosky, M. A. Giedlin, G. Nichol, M. C. Holmes, P. D. Gregory, D. G. Ando, M. Kalos, R. G. Collman, G. Binder-Scholl, G. Plesa, W. T. Hwang, B. L. Levine and C. H. June (2014). "Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV." N Engl J Med **370**(10): 901-910.

Thiadens, A. A., A. I. den Hollander, S. Roosing, S. B. Nabuurs, R. C. Zekveld-Vroon, R. W. Collin, E. De Baere, R. K. Koenekoop, M. J. van Schooneveld, T. M. Strom, J. J. van Lith-Verhoeven, A. J. Lotery, N. van Moll-Ramirez, B. P. Leroy, L. I. van den Born, C. B. Hoyng, F. P. Cremers and C. C. Klaver (2009). "Homozygosity mapping reveals PDE6C mutations in patients with early-onset cone photoreceptor disorders." Am J Hum Genet **85**(2): 240-247.

Ting, N. S. and W. H. Lee (2004). "The DNA double-strand break response pathway: becoming more BRCAish than ever." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 935-944.

Truong, L. N., Y. Li, L. Z. Shi, P. Y. Hwang, J. He, H. Wang, N. Razavian, M. W. Berns and X. Wu (2013). "Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(19): 7720-7725.

Tsai, S. Q., Z. Zheng, N. T. Nguyen, M. Liebers, V. V. Topkar, V. Thapar, N. Wyvekens, C. Khayter, A. J. Iafrate, L. P. Le, M. J. Aryee and J. K. Joung (2015). "GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases." Nat Biotechnol **33**(2): 187-197.

Ulfing, N. (2005). Kurzlehrbuch Histologie.

Vandenberghe, L. H., P. Bell, A. M. Maguire, C. N. Cearley, R. Xiao, R. Calcedo, L. Wang, M. J. Castle, A. C. Maguire, R. Grant, J. H. Wolfe, J. M. Wilson and J. Bennett (2011). "Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey." Sci Transl Med **3**(88): 88ra54.

Wang, H., H. Yang, C. S. Shivalila, M. M. Dawlaty, A. W. Cheng, F. Zhang and R. Jaenisch (2013). "One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering." Cell **153**(4): 910-918.

Ward, I. M., K. Minn, J. van Deursen and J. Chen (2003). "p53 Binding protein 53BP1 is required for DNA damage responses and tumor suppression in mice." Mol Cell Biol **23**(7): 2556-2563.

Weber, M., J. Rabinowitz, N. Provost, H. Conrath, S. Folliot, D. Briot, Y. Cherel, P. Chenuaud, J. Samulski, P. Moullier and F. Rolling (2003). "Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery." Mol Ther **7**(6): 774-781.

Weleber, R. G., M. Michaelides, K. M. Trzuppek, N. B. Stover and E. M. Stone (2011). "The phenotype of Severe Early Childhood Onset Retinal Dystrophy (SECORD) from mutation of RPE65 and differentiation from Leber congenital amaurosis." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(1): 292-302.

West, S. C. (2003). "Molecular views of recombination proteins and their control." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(6): 435-445.

Weterings, E., N. S. Verkaik, H. T. Bruggenwirth, J. H. Hoeijmakers and D. C. van Gent (2003). "The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends." Nucleic Acids Res **31**(24): 7238-7246.

Wiedenheft, B., S. H. Sternberg and J. A. Doudna (2012). "RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea." Nature **482**(7385): 331-338.

Wissinger, B., D. Gamer, H. Jagle, R. Giorda, T. Marx, S. Mayer, S. Tippmann, M. Broghammer, B. Jurklies, T. Rosenberg, S. G. Jacobson, E. C. Sener, S. Tatlipinar, C. B. Hoyng, C. Castellan, P. Bitoun, S. Andreasson, G. Rudolph, U. Kellner, B. Lorenz, G. Wolff, C. Verellen-Dumoulin, M. Schwartz, F. P. Cremers, E. Apfelstedt-Sylla, E. Zrenner, R. Salati, L. T. Sharpe and S. Kohl (2001). "CNGA3 mutations in hereditary cone photoreceptor disorders." Am J Hum Genet **69**(4): 722-737.

Wolfrum, U. and K. Nagel-Wolfrum (2018). "[The Usher Syndrome, a Human Ciliopathy]." Klin Monbl Augenheilkd **235**(3): 273-280.

Yang, L., M. Guell, D. Niu, H. George, E. Lesha, D. Grishin, J. Aach, E. Shrock, W. Xu, J. Poci, R. Cortazio, R. A. Wilkinson, J. A. Fishman and G. Church (2015). "Genome-wide inactivation of porcine endogenous retroviruses (PERVs)." Science **350**(6264): 1101-1104.

Yanik, M., B. Muller, F. Song, J. Gall, F. Wagner, W. Wende, B. Lorenz and K. Stieger (2017). "In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies." Prog Retin Eye Res **56**: 1-18.

Yee, J. K. (2016). "Off-target effects of engineered nucleases." FEBS J **283**(17): 3239-3248.

Yuan, J., R. Adamski and J. Chen (2010). "Focus on histone variant H2AX: to be or not to be." FEBS Lett **584**(17): 3717-3724.

## 12. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, 11.10.2020



---

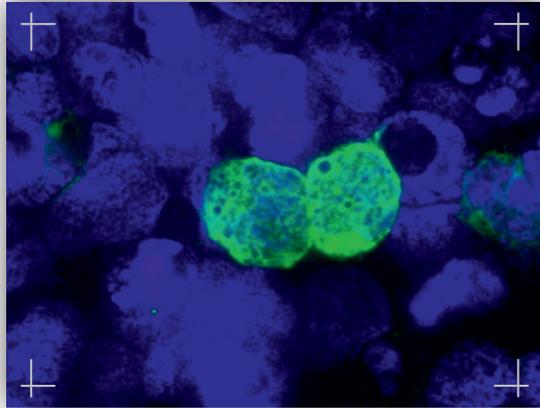
Ort, Datum

---

Unterschrift

## **13. Lebenslauf**

Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen entfernt.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6904-9



9 783835 196904 9