

**Etablierung und Validierung eines Reportersystems  
zur Identifikation von  
mikro-homologer DNA-Rekombination**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von  
Gambert, Isabel Sophia  
aus Grimma

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Gutachter: Prof. Dr. Michael Niepmann

Tag der Disputation: 15.03.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hinführung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Anatomie des Auges.....</b>	<b>2</b>
1.2.1 Aufbau und Struktur der Netzhaut und Photorezeptoren.....	3
1.2.2 Funktionsweise des Sehprozesses .....	5
<b>1.3 Retinitis pigmentosa.....</b>	<b>5</b>
1.3.1 X-linked Retinitis pigmentosa .....	7
1.3.1.1 RPGR-Gen.....	7
1.3.1.1.1 Struktur und Funktion .....	8
1.3.1.1.2 Mutationen in der ORF15-Region .....	10
<b>1.4 Therapiemöglichkeiten der RP .....</b>	<b>11</b>
1.4.1 Genaddition .....	12
1.4.2 Gen-Silencing .....	12
<b>1.5 Genome editing .....</b>	<b>13</b>
1.5.1 DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen.....	14
1.5.1.1 Non-homologous end joining .....	16
1.5.1.2 Homologous recombination.....	18
1.5.1.3 Microhomology-mediated end joining .....	20
1.5.1.4 Aktivität im Zellzyklus - Zellkultur versus post-mitotische Photorezeptoren .....	22
1.5.2 CRISPR/Cas-System .....	24
1.5.2.1 Aufbau, Struktur und Funktionsweise .....	24
1.5.2.2 Guide-RNA.....	26
<b>1.6 Reportersystem und Beschreibung der Funktionalität .....</b>	<b>28</b>
<b>1.7 Zielsetzung.....</b>	<b>30</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>31</b>
<b>2.1 Materialien .....</b>	<b>31</b>
2.1.1 Chemikalien.....	31
2.1.2 Enzyme.....	31
2.1.3 Primer und Oligonukleotide .....	32
2.1.4 Puffer und Lösungen .....	33
2.1.5 Medien für die Bakterienkultur .....	33
2.1.6 Medien für die eukaryotische Zellkultur .....	33

2.1.7	Antibiotika.....	34
2.1.8	Kits .....	34
2.1.9	Geräte .....	34
2.1.10	Biologische Materialien.....	35
2.1.10.1	Vektoren und Plasmide.....	35
2.1.10.2	Zelllinie.....	36
2.1.10.3	E.coli-Stämme .....	36
<b>2.2</b>	<b>Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>36</b>
2.2.1	Herstellung elektrokompenter E.coli-Zellen.....	36
2.2.2	Transformation elektrokompenter E.coli-Zellen .....	37
2.2.3	Plasmid-DNA Aufreinigung durch Mini-Präparation .....	37
2.2.4	Plasmid-DNA Aufreinigung mittels Kit (Mini, Midi, Maxi) .....	38
2.2.5	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration .....	38
2.2.6	Herstellung von Glycerin-Stocks.....	38
<b>2.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>39</b>
2.3.1	Klonierungen.....	39
2.3.1.1	Restriktionsverdau .....	39
2.3.1.2	Dephosphorylierung von DNA.....	39
2.3.1.3	Hybridisierung der Oligonukleotide .....	40
2.3.1.4	Ligation.....	40
2.3.2	Sequenzierung der DNA.....	41
2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	41
2.3.4	DNA-Extraktion aus Agarose-Gel.....	41
<b>2.4</b>	<b>Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>41</b>
2.4.1	Zellkultur .....	41
2.4.2	Kryokonservierung von Zellen .....	42
2.4.3	Auftauen von Zellen .....	42
2.4.4	Auszählen von Zellen .....	42
2.4.5	Transfektion.....	43
2.4.6	Proteinextraktion .....	44
2.4.7	Luziferase-Aktivitätsmessung .....	44
<b>2.5</b>	<b>Statistische Analyse.....</b>	<b>45</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Setup des Reportersystems für die Fragestellung der Dissertation.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2</b>	<b>Klonierungen der Donor-Plasmide.....</b>	<b>49</b>
<b>3.3</b>	<b>Analyse des Reportersystems im mikrohomologen Bereich .....</b>	<b>52</b>
3.3.1	Variation der Längen der mikrohomologen Sequenzen .....	52
3.3.2	Suppression ausgewählter Proteine der Reparaturmechanismen.....	54
3.3.2.1	15 bp mikrohomologe Sequenzen.....	55

3.3.2.2	20 bp mikrohomologe Sequenzen.....	56
3.3.2.3	30 bp mikrohomologe Sequenzen.....	57
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Variation der Länge der mikrohomologen Bereiche .....</b>	<b>59</b>
<b>4.2</b>	<b>Analyse der Aktivität der DSB-Reparaturmechanismen durch gezielte Suppression ausgewählter Proteine .....</b>	<b>61</b>
<b>4.3</b>	<b>Hypothese der Funktionalität des Reportersystems .....</b>	<b>63</b>
<b>4.4</b>	<b>Reportersystem als Therapieaussicht für XLRP? .....</b>	<b>64</b>
<b>4.5</b>	<b>Vergleich Genome Editing mit Genaddition .....</b>	<b>67</b>
<b>4.6</b>	<b>Schlussfolgerung/Fazit.....</b>	<b>68</b>
<b>4.7</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>71</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>72</b>
<b>6.</b>	<b>Abstract.....</b>	<b>73</b>
	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>74</b>
	<b>PUBLIKATIONSVERZEICHNIS .....</b>	<b>82</b>
	<b>ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION .....</b>	<b>83</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>84</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>AV</b>	Ausgangsvektor
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>Cas</b>	CRISPR-assoziierte Gene, <i>CRISPR-associated genes</i>
<b>Cas9</b>	CRISPR assoziiertes Protein mit zwei Endonuklease Domänen
<b>CC</b>	<i>Connecting Cilium</i>
<b>CRISPR</b>	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
<b>crRNA</b>	CRISPR RNA
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	zweifach destilliertes Wasser, <i>double-distilled water</i>
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DSB</b>	Doppelstrangbruch
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>FKS</b>	fetales Kälberserum
<b>gRNA</b>	<i>guide</i> RNA
<b>HEK</b>	humane embryonale Nierenzellen, <i>human embryonic kidney cells</i>
<b>HEK293<sub>mORF15</sub></b>	stabile HEK293-Zelllinie mit einer murinen ORF15 Region
<b>HNH-Domäne</b>	Endonuklease Domäne von Cas9, benannt nach ihren Histidin- und Asparagin-Resten
<b>HDR</b>	<i>homology directed repair</i>
<b>HR</b>	<i>homologous recombination</i>
<b>K</b>	Klon
<b>M</b>	Gelmarker
<b>MH</b>	Mikrohomologien
<b>mhS</b>	mikrohomologe Sequenzen
<b>MMEJ</b>	<i>microhomology-mediated end joining</i>
<b>NHEJ</b>	<i>non-homologous end joining</i>
<b>nt</b>	Nukleotid
<b>PAM</b>	<i>Protospacer-Adjacent Motif</i>
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung, <i>phosphate buffered saline</i>
<b>RLU</b>	relative Lichteinheit als Maß zur Lumineszenz-Messung, <i>relative light unit</i>

<b>RP</b>	<i>Retinitis pigmentosa</i>
<b>rpm</b>	<i>revolutions per minute</i>
<b>RuvC-Domäne</b>	Endonuklease-Domäne von Cas9, benannt nach einem <i>E.coli</i> Protein
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TALEN</b>	Restriktionsenzyme, die an definierter Stelle im Genom DNA-Stränge schneiden können, <i>Transcription activator-like effector nuclease</i>
<b>target sites</b>	ausgewählte Zielstellen der zu hervorrufenden DSB
<b>tracrRNA</b>	Teil des CRISPR/Cas9 System, <i>trans-activating crRNA</i>
<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
<b>XLRP</b>	X-chromosomale Form der Retinitis pigmentosa, <i>X-linked Retinitis pigmentosa</i>

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anatomie des Augapfels .....	2
Abb. 2: Schematische Darstellung der ersten drei Neurone der Sehbahn und ihrer Verschaltung .....	3
Abb. 3: Aufbau und Struktur von Stäbchen und Zapfen .....	4
Abb. 4: Aufbau der primären Isoformen der kodierenden Sequenzen in mRNAs des humanen <i>RPGR</i> -Gens .....	8
Abb. 5: Aufbau und Funktionsweise des <i>Connecting Cilium</i> .....	10
Abb. 6: DSB-Reparaturmechanismen .....	14
Abb. 7: Signalkaskade der Proteine der DNA-DSB-Reparaturmechanismen .....	15
Abb. 8: DSB-Reparaturmechanismus NHEJ .....	17
Abb. 9: DSB-Reparaturmechanismus HR .....	19
Abb. 10: DSB-Reparaturmechanismus MMEJ .....	21
Abb. 11: Aktivität der DSB-Reparaturmechanismen im Zellzyklus .....	22
Abb. 12: CRISPR/Cas9-System .....	25
Abb. 13: Reportersystem in stabiler HEK293 <sub>mORF15</sub> -Zelllinie .....	28
Abb. 14: Versuchsaufbau der Dissertation .....	47
Abb. 15: Angriffsorte der gezielten Suppression ausgewählter Proteine der körpereigenen DSB-Reparaturmechanismen .....	48
Abb. 16: Donor-Plasmid mit Angabe der die Luziferase flankierenden mhS .....	49
Abb. 17: Screening pSQT1313 Luc 10 bp links .....	50
Abb. 18: Chromatogramm pSQT1313 Luc 10 bp links .....	51
Abb. 19: Screening pSQT1313 Luc 10 bp li + re .....	51
Abb. 20: Chromatogramm pSQT1313 Luc 10 bp li + re .....	52
Abb. 21: Variation der Länge der mikrohomologen Sequenzen .....	53
Abb. 22: Suppression ausgewählter Proteine der DSB-Reparaturmechanismen bei 15 bp mhS .....	55
Abb. 23: Suppression ausgewählter Proteine der DSB-Reparaturmechanismen bei 20 bp mhS .....	57
Abb. 24: Suppression ausgewählter Proteine der DSB-Reparaturmechanismen bei 30 bp mhS .....	58



## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Chemikalien.....	31
Tab. 2: Restriktionsenzyme.....	32
Tab. 3: Weitere Enzyme und Marker .....	32
Tab. 4: Primer .....	32
Tab. 5: Primer zur Sequenzierung.....	33
Tab. 6: Puffer und Lösungen.....	33
Tab. 7: Medien für die eukaryotische Zellkultur.....	33
Tab. 8: Antibiotika .....	34
Tab. 9: Kits.....	34
Tab. 10: Geräte.....	35
Tab. 11: Ansatz des Einzelverdau und Doppelverdau.....	39
Tab. 12: Hybridisierung der Oligonukleotide .....	40
Tab. 13: Ansatz der Ligation.....	40
Tab. 14: Ansatz zur Sequenzierung .....	41
Tab. 15: Ansatz der Variation der Länge der Mikrohomologien .....	43
Tab. 16: Ansatz der Suppression einzelner Proteine der DSB-Reparaturmechanismen .....	44

# 1. Einleitung

## 1.1 Hinführung

Die *Retinitis pigmentosa* (RP) stellt eine sehr heterogene Gruppe von hereditären retinalen Dystrophien dar, die durch Mutationen im Genom zu einem progredienten Untergang der Photorezeptoren führen und eine der häufigsten Ursachen des Sehverlustes im mittleren Erwachsenenalter darstellen. Die X-chromosomale Form der *Retinitis pigmentosa* (XLRP) nimmt aufgrund des frühen Zeitpunktes der Erblindung innerhalb der 2. Lebensdekade und ihrer raschen Progredienz eine besondere Rolle ein. Es wurden bereits multiple Therapiestrategien zur Behandlung der *Retinitis pigmentosa* entwickelt, durch die eine Verlangsamung der Progredienz der Erkrankung erzielt werden kann. Eine Therapiestrategie zur Behandlung der Krankheitsursache der RP existiert bisher nicht.

In den letzten Jahren gewann die Gentherapie, speziell auch das Genome editing, immens an Bedeutung. Die Entdeckung des CRISPR/Cas-Systems und die Möglichkeit der Nutzung körpereigener DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen zur gezielten Gentherapie haben die Entwicklung kurativer genterapeutischer Ansätze gefördert.

Im Labor der „Experimentellen Ophthalmologie“ der Justus-Liebig-Universität Gießen wurde zur Analyse morphologischer Veränderungen nach retinalem Gentransfer ein neues Mausmodell entwickelt, das aufgrund einer dem Menschen äquivalenten Mutation die XLRP entwickelt.

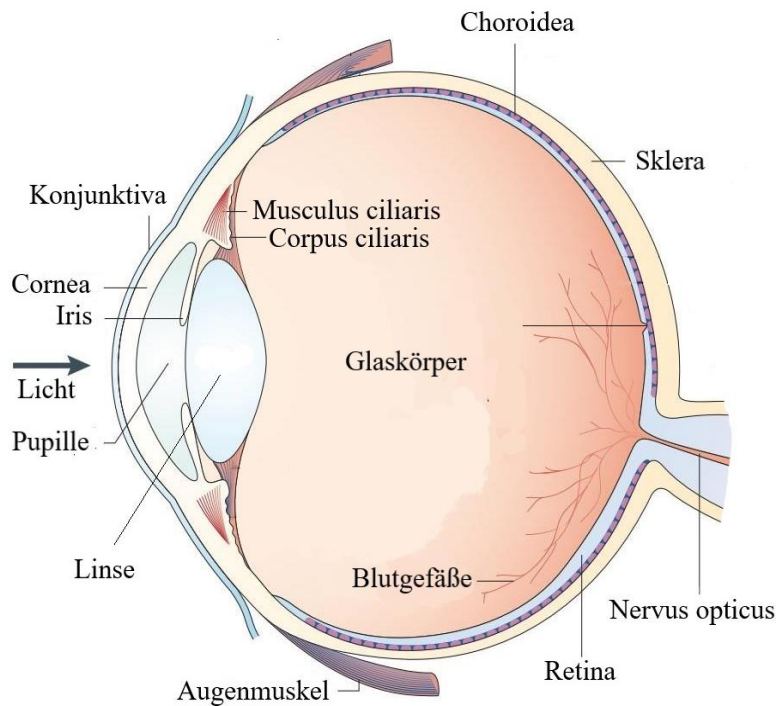
In dieser Arbeit soll ein Reportersystem zur Quantifizierung des korrekten Einbaus der gewünschten Gensequenz in das Genom durch die Induktion des körpereigenen DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismus MMEJ (*microhomology mediated end-joining*) etabliert und validiert werden.

Dieses Reportersystem stellt einen ersten Schritt auf dem Weg zur Entwicklung eines genterapeutischen Ansatzes zur Behandlung der XLRP dar.

Auf die theoretischen Grundlagen und Hintergründe soll in den folgenden Kapiteln der Einleitung eingegangen werden.

## 1.2 Anatomie des Auges

Das Auge ist ein hoch spezialisiertes, lichtempfindliches Organ, das Lichtreize in elektro-physiologische Signale umwandelt und somit den Prozess des Sehens als Sinneswahrnehmung ermöglicht. Das Auge, dargestellt in Abb. 1, besteht aus einem vorderen physikalisch-optischen Bereich, dem dioptrischen Apparat, sowie einem hinteren rezeptiven Bereich. Der dioptrische Apparat besteht aus der Hornhaut (*Cornea*), der Linse (*Lens*) sowie dem Glaskörper (*Corpus vitreum*) und dient der Lichtbrechung, währenddessen die Netzhaut (*Retina*) im hinteren rezeptiven Bereich für die Wahrnehmung der Lichtreize zuständig ist. Die Lederhaut (*Sklera*) dient als äußere Hülle dem Schutz des Augapfels, wohingegen die Aderhaut (*Choroidea*) für die Versorgung der äußeren Netzhautanteile mit Nährstoffen zuständig ist.



**Abb. 1: Anatomie des Augapfels**

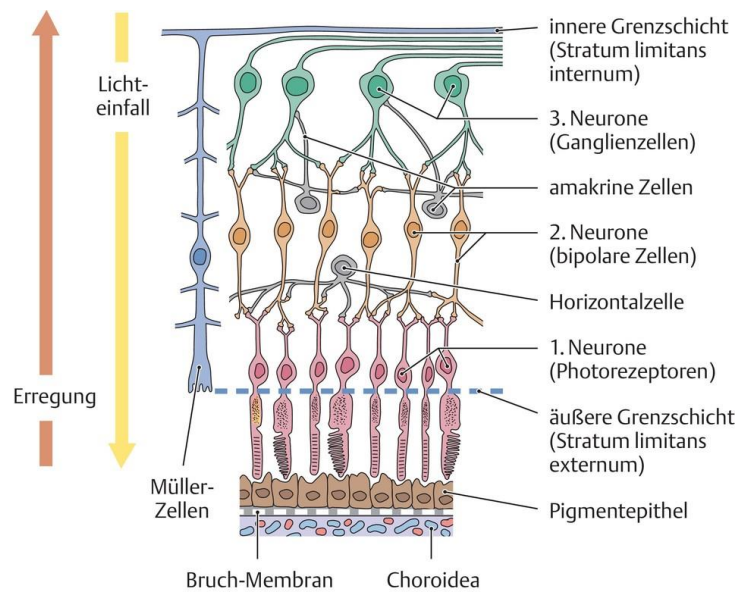
Sagittalschnitt des humanen Auges: Vorderer physikalisch-optischer Bereich bestehend aus der Hornhaut (*Cornea*), der Linse (*Iris*) und dem Glaskörper (*Corpus vitreum*). Hinterer rezeptiver Bereich bestehend aus der Netzhaut (*Retina*) mit dem Ort des schärfsten Sehens, der *Fovea centralis*.

Modifiziert nach Wright et al. 2010.

Die Netzhaut (*Retina*) stellt eine hoch komplexe lichtempfindliche Struktur dar, die die Innenseite des Augapfels auskleidet. Sie dient der Umwandlung physikalischer Lichtreize in photochemischen Prozessen zu elektro-physiologischen Signalen. Dabei werden diese bereits in der Netzhaut auf niedriger Ebene integrierend verarbeitet und schließlich über den *Nervus opticus* den höheren visuellen Zentren im Gehirn zugeleitet.

### 1.2.1 Aufbau und Struktur der Netzhaut und Photorezeptoren

Die Netzhaut ist embryologisch aus der Ausstülpung des Zwischenhirnes entstanden und somit ein Gewebe neuronalen Ursprungs. Sie enthält die ersten drei Neurone der Sehbahn, die schematisch in Abb. 2 dargestellt sind. Dabei sind von außen nach innen in Bezug zum Augapfel die Photorezeptoren (1. Neuron), die Bipolarzellen (2. Neuron) und die Ganglienzellen (3. Neuron) zu unterscheiden.



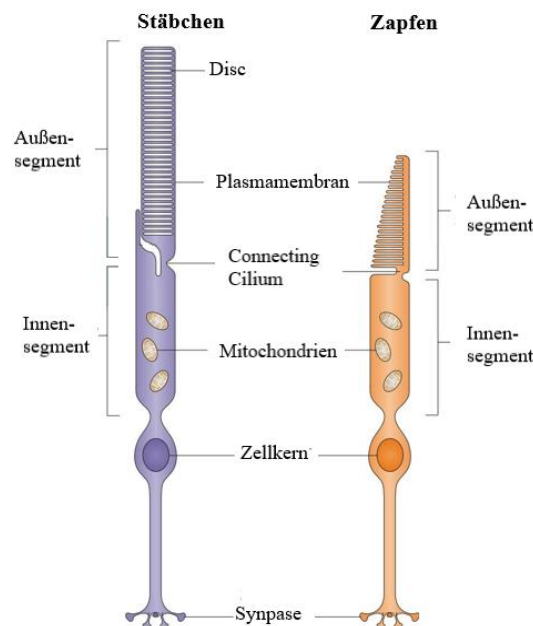
**Abb. 2: Schematische Darstellung der ersten drei Neurone der Sehbahn und ihrer Verschaltung (Schünke, Schulte, Schumacher, Voll, Wesker 2012)**

Als innerste Schicht der Netzhaut zeigt sich direkt an die Aderhaut (*Choroidea*) anliegend das Pigmentepithel mit den Photorezeptoren. Darauf folgen die Bipolarzellen und die Ganglienzellen, die mit ihren Axonen den *Nervus opticus* bilden. Amakrine Zellen und Horizontalzellen dienen der horizontalen Verschaltung der Neurone zur ersten Integration der Signale. Der Prozess der Erregung der Sinneszellen und der Einfall des Lichtes laufen in inverser Richtung ab.

Bei den Photorezeptoren handelt es sich um spezialisierte neurosensorische Zellen, die dem initialen Schritt des Sehens dienen. Diese lichtempfindlichen Sinneszellen bilden die innerste Schicht der Netzhaut und liegen dem retinalen Pigmentepithel (RPE) direkt an, dem eine besondere Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Vitalität der Photorezeptoren zukommt. Die Photorezeptoren können nach ihrem Aufbau und ihrer Funktion in zwei Arten unterteilt werden: die Stäbchen und die Zapfen. Die Stäbchen enthalten den Sehfärbstoff Rhodopsin und sind für das Dämmerungs- und Nachtsehen verantwortlich. Die Zapfen dienen dem photobischen Sehen bei Tageslicht und der Wahrnehmung von Farben. Sie enthalten den Sehfärbstoff Opsin, der der Grundstruktur des Rhodopsin der Stäbchen ähnelt. Der Mensch besitzt als Trichromat drei Typen von Zapfen, die durch strukturelle Veränderungen des Opsins jeweils ein Absorptionsmaximum für die Farben Rot, Gelb und Blau aufweisen. Die humane

Netzhaut verfügt über 120 Millionen Stäbchen und 6 Millionen Zapfen, die aufgrund ihrer Funktion eine unterschiedliche Verteilung innerhalb der Netzhaut aufzeigen. Die höchste Dichte an Zapfen ist in der *Fovea centralis* (Ort des schärfsten Sehens) lokalisiert, während die höchste Dichte an Stäbchen in den peripheren Bereichen der Netzhaut vorzufinden ist.

Die Photorezeptoren bestehen aus einem Außensegment, einem Innensegment, einem Zellkörper und einem Axon mit einer Synapse, wie in Abb. 3 dargestellt. Das Außensegment und das Innensegment der Photorezeptoren sind durch das *Connecting Cilium* miteinander verbunden. Das Außensegment der Stäbchen und Zapfen weist strukturelle Unterschiede auf (siehe Abb. 3). Während das Außensegment der Stäbchen von etwa 1000 Membranscheibchen gebildet wird, die den Sehfärbstoff Rhodopsin enthalten, besteht das Außensegment der Zapfen aus Membraneinschnürungen, die den Sehfärbstoff Opsin enthalten. Im Außensegment der Photorezeptoren findet der Prozess der Phototransduktion statt, wohingegen das Innensegment mit dem Zellkern die dafür notwendigen Stoffwechselprodukte zur Verfügung stellt. Die Informationsweitergabe erfolgt über den synaptischen Spalt an die weiteren Neurone der Sehbahn.



**Abb. 3: Aufbau und Struktur von Stäbchen und Zapfen**

Darstellung des allgemeinen Aufbaus der Photorezeptoren bestehend aus Außensegment, Innensegment, Zellkörper und Axon mit Synapse. Verbindung des Außensegmentes mit dem Innensegment über das *Connecting cilium*. Das Innensegment enthält wichtige Zellorganellen für die Proteinbiosynthese.

Links: Stäbchen mit Membranscheibchen im Außensegment, die den Sehfärbstoff Rhodopsin enthalten.

Rechts: Zapfen mit Membraneinfaltungen im Außensegment, die unterschiedliche Opsine enthalten.

Modifiziert nach Wright et al. 2010.

### 1.2.2 Funktionsweise des Sehprozesses

Das einfallende Licht wird durch den dioptrischen Apparat gebrochen und fällt dann auf die Innenseite des rezeptiven Teils des Auges. Der Sehprozess verläuft, wie in Abb. 2 dargestellt, in inverser Richtung zum Lichteinfall. Zuerst trifft das Licht auf das Retinale Pigmentepithel (RPE), das die Netzhaut von der Aderhaut abgrenzt und aufgrund des enthaltenen Pigmentes Melanin zum Schutz der tieferen Schichten des Auges das einfallende Licht absorbiert. An das RPE grenzen die Photorezeptoren, in denen die Umwandlung von optischen Reizen in elektrophysiologische Signale stattfindet. Das einfallende Photon trifft auf das in den Membranscheibchen bzw. Membraneinschnürungen enthaltene Sehpigment und führt durch Photoisomerisation zu einer Konformationsänderung des jeweiligen Sehfärbstoffes. Diese Konformationsänderung löst eine Signaltransduktionskaskade aus, die zu einer Verminderung der Permeabilität der äußeren Membranen für Natrium- und Calciumionen und damit zu einer Veränderung des Membranpotenzials führt. Im Gegensatz zu anderen Rezeptoren kommt es in den Photorezeptoren durch den adäquaten Reiz (Lichteinfall) zu einer Hyperpolarisation, welche zu einer verminderten Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat an den Synapsen der Photorezeptoren führt. Die hemmende Wirkung des Glutamats im synaptischen Spalt auf die Bipolarzellen wird aufgehoben, die Bipolarzellen werden erregt und leiten die Erregung an die Ganglienzellen weiter. Horizontalzellen und Amakrine Zellen sind durch interneuronale Verschaltung innerhalb der Netzhaut für die Kontrastverstärkung der visuellen Wahrnehmung zuständig, wodurch eine Modulation und Weiterverarbeitung der Signale schon innerhalb der Netzhaut möglich wird. Letztendlich erfolgt die Weiterleitung der elektrophysiologischen Signale von den Ganglienzellen, die als 3. Neuron der Sehbahn fungieren, an die visuellen Zentren im Gehirn (Pape, Kartz, Silbernagl 2019).

### 1.3 Retinitis pigmentosa

Die *Retinitis pigmentosa* (RP) stellt eine sehr heterogene Gruppe von hereditären Erkrankungen der Netzhaut dar, die durch den progressiven Verlust von Photorezeptoren charakterisiert ist (Hartong et al. 2006). Die RP ist eine der führenden Ursache für die hereditäre Form der Erblindung. Die Prävalenz für diese Gruppe von Erkrankungen beträgt 1:3000 bis 1:7000 (Lyraki et al. 2016). Weltweit sind ca. 3 Millionen Menschen von dieser Erkrankung betroffen, während in Deutschland 30.000 bis 40.000 Menschen an einer Form der Retinitis pigmentosa leiden (Retinitis pigmentosa (RP) | PRO RETINA

Deutschland e. V.). Diese Gruppe von hereditären nicht-entzündlichen Erkrankungen ist gekennzeichnet durch die Einlagerung von Pigment-Depots in die Photorezeptoren der Netzhaut. Diese Pigment-Einlagerung sind namensgebend für die Erkrankungsgruppe und führen zu einem progressiven Untergang der Stäbchen, gefolgt von der sekundären Degeneration der Zapfen. Die Stäbchen sind stärker betroffen, wodurch die Nachtblindheit als primäres Hauptsymptom der RP erklärt werden kann (Hamel 2006).

Die *Retinitis pigmentosa* ist eine progrediente Erkrankung, die sich über mehrere Jahrzehnte entwickelt. Die Funktion der Photorezeptoren ist schon viele Jahre vor dem Auftreten der ersten klinischen Symptome eingeschränkt und zeigt sich in einer verminderten Signalaktivität in der Elektroretinographie (Hartong et al. 2006). Das frühe Stadium der Erkrankung präsentiert sich vor allem durch Nachtblindheit aufgrund der primären Degeneration der Stäbchen. Die milde Nachtblindheit wird von Patienten oft nicht erkannt. In diesem frühen Stadium ist die Sehschärfe normal oder nur leicht eingeschränkt. Im weiteren Verlauf kommt es durch den fortschreitenden Untergang der Stäbchen zur progredienten Einengung des peripheren Gesichtsfeldes mit dem sogenannten Tunnelsehen und zum Verlust des Farb- und Kontrastsehens. Im Endstadium der Erkrankung führt der sekundäre Untergang der Zapfen zu einer progredienten Abnahme der Sehschärfe bis hin zur Erblindung (Hartong et al. 2006; Hamel 2006). Die RP kann sich im Hinblick auf das Manifestationsalter, das Voranschreiten der Degeneration und die an der Degeneration beteiligten Strukturen (Stäbchen, Zapfen und retinales Pigmentepithel) klinisch sehr heterogen manifestieren (Daiger et al. 2013). Während einige Patienten in der Kindheit einen schweren Sehverlust erleiden, bleiben andere Patienten bis zum Erreichen des mittleren Erwachsenenalters asymptomatisch (Hartong et al. 2006). Neben der vorher beschriebenen primären RP kann die RP auch sekundär als Syndrom auftreten, d.h. dass neben der RP auch andere Organe mit spezifischen Krankheitssymptomen beteiligt sein können. Die beiden häufigsten RP-Syndrome sind zum einen das Usher-Syndrom, bei der die Patienten neben der RP an Schwerhörigkeit bis hin zur Taubheit erkrankt sind und zum anderen das Bardet-Biedl-Syndrom, bei dem die RP mit Adipositas, Polydaktylie, geistiger Retardierung und Unterentwicklung der Geschlechtsorgane vergesellschaftet ist (Guadagni et al. 2015). Die primäre Form der RP ist jedoch mit einem Anteil über 90 % der Patienten die vorherrschende Form der RP (Retinitis pigmentosa (RP) | PRO RETINA Deutschland e. V.).

Die primäre RP kann genetisch autosomal-dominant (30-40 %), autosomal-rezessiv (50-60 %) oder X-chromosomal-rezessiv (5-15 %) vererbt werden. Bislang wurden über 50 mutierte Gene identifiziert, die für die primäre RP verantwortlich sind (RetNet - Retinal Information Network 2019; Hartong et al. 2006; Daiger et al. 2013). Jedes Gen kodiert ein Protein, das als eine entscheidende Komponente im Prozess der Erhaltung der Vitalität der an dem Sehprozess beteiligten Strukturen fungiert. Die Mutation eines solchen Gens kann innerhalb der Sehprozesse zu Beeinträchtigungen führen, beziehungsweise den Signalweg des Sehprozesses unterbrechen (Verbakel et al. 2018). In den letzten Jahren konnten immense Fortschritte in der Erforschung weiterer die RP verursachender Gendefekte und Fortschritte im Screening pathologischer Mutationen bei Patienten erzielt werden (Daiger et al. 2013).

### **1.3.1 X-linked Retinitis pigmentosa**

Die X-chromosomale Form der *Retinitis pigmentosa* (XLRP) stellt eine der schwerwiegenderen Formen der RP dar. Klinisch manifestiert sich diese Form der RP mit einer in der ersten Lebensdekade beginnenden Nachtblindheit, progredienten Einschränkungen des Gesichtsfeldes in der Adoleszenz bis hin zur Reduktion der Sehschärfe und Erblindung innerhalb der zweiten bis vierten Lebensdekade. Die XLRP ist zudem mit dem Auftreten von Kurzsichtigkeit vergesellschaftet. Obwohl die XLRP in den meisten Fällen X-chromosomal-rezessiv vererbt wird, zeigen sich in einigen Fällen auch dominante Vererbungsformen von denen auch Frauen betroffen sind (Hamel 2006). Aber auch Frauen, die Träger der Mutationen der XLRP sind, können nicht-spezifische Symptome wie Nachtblindheit sowie pathologische Veränderungen des retinalen Pigmentepithels und Pigmenteinlagerungen in der Netzhaut aufweisen (Vervoort und Wright 2002; Shu et al. 2007). Die häufigste Form der XLRP wird durch Mutationen im *RPGR*-Gen verursacht. Mutationen, die zu selteneren Formen der XLRP führen, wurden im *RP2*-Gen und im *OFD-1* Gen beschrieben (Lyraki et al. 2016).

#### **1.3.1.1 RPGR-Gen**

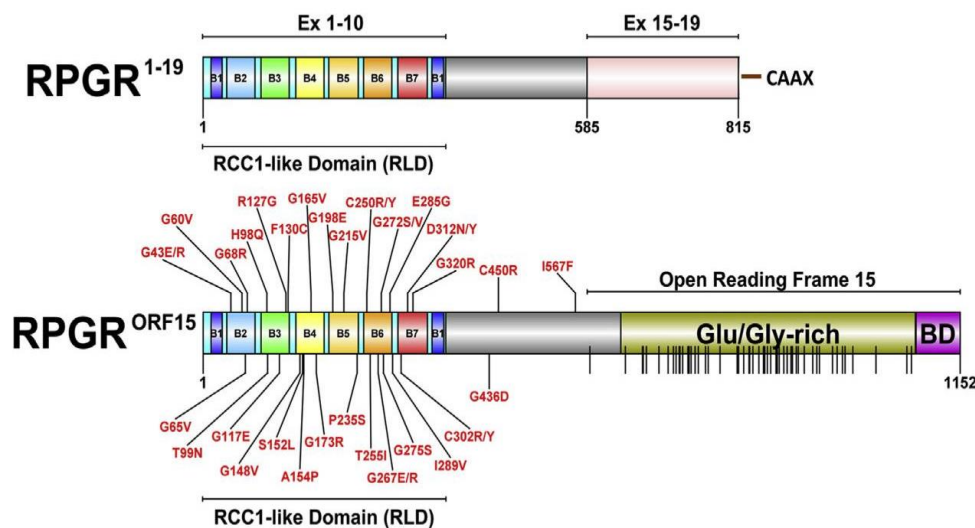
Das *Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator Gen* (*RPGR*) ist auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp11.4) lokalisiert (RetNet: Disease Table 2021.000Z). Mutationen im *RPGR*-Gen sind die Ursache für 10-20 % aller primären RP-Fälle und für mehr als 70 % der an XLRP erkrankten Patienten verantwortlich (Vervoort et al. 2000). Die hohe Prävalenz und die Schwere der Erkrankung, die durch Mutationen im *RPGR*-Gen verursacht werden, haben einen erheblichen Einfluss auf den Stellenwert für die



Entwicklung eines gentherapeutischen Ansatzes für die RP (La Martinez-Fernandez de Camara et al. 2020).

### 1.3.1.1.1 Struktur und Funktion

Das *RPGR*-Gen wird in verschiedenen humanen Geweben wie z. B. in der Lunge, im Gehirn, in den Nieren und im Hoden exprimiert. Je nachdem, in welchem Gewebe und Zelltyp das *RPGR*-Gen exprimiert werden soll, findet ein organspezifisches Spleißen statt. Es sind über zehn durch alternatives Spleißen entstandene Transkripte bekannt, von denen fünf Transkripte für Proteine kodieren (Megaw et al. 2015). Die zwei häufigsten Isoformen  $RPGR^{Ex1-19}$  und  $RPGR^{ORF15}$  des *RPGR*-Gens sind in Abb. 4 dargestellt. Während die Isoform  $RPGR^{Ex1-19}$  als konstitutives Transkript in vielen Zilien tragenden Geweben unter anderem auch der Retina vorkommt, entsteht die Isoform  $RPGR^{ORF15}$  durch organspezifisches Spleißen und wird deshalb vor allem in der Retina exprimiert (Tee et al. 2016).



**Abb. 4: Aufbau der primären Isoformen der kodierenden Sequenzen in mRNAs des humanen *RPGR*-Gens (Megaw et al. 2015, S. 33)**

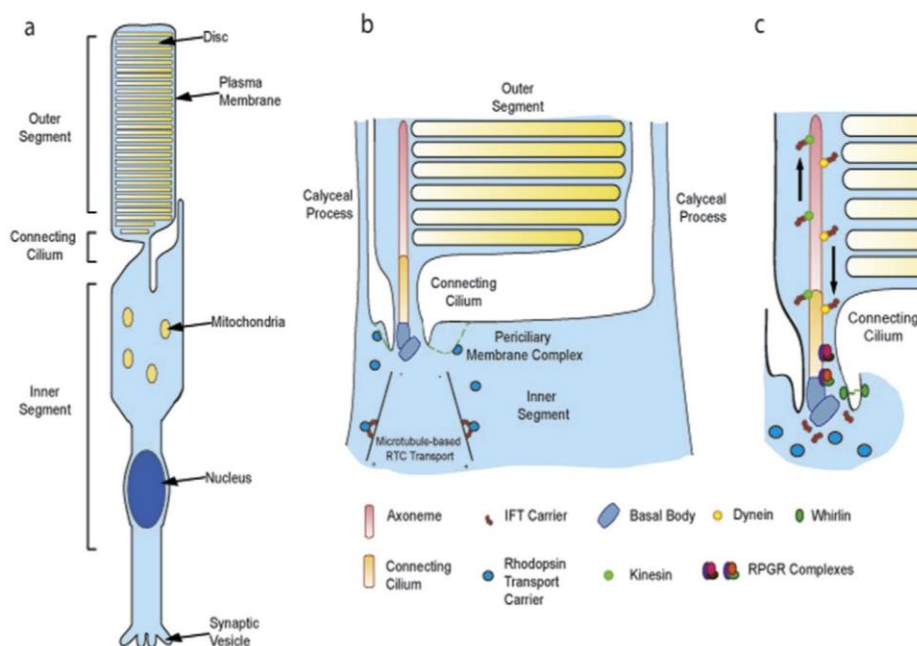
Schematische Darstellung des Aufbaus der zwei primären Isoformen der kodierenden Sequenzen in mRNAs des *RPGR*-Gens:  $RPGR^{Ex1-19}$  und  $RPGR^{ORF15}$ . Als konstitutives Transkript enthält  $RPGR^{Ex1-19}$  die Exons 1-19 und das Isoprenylierungsmotiv -CAAX. Die durch alternatives Spleißen entstandene Retina-spezifische Isoform  $RPGR^{ORF15}$  enthält nach den Exons 1-14 die ORF15 Region. Diese weist eine Glutamin- und Glycinsäure-reiche Domäne auf, die zu einer hohen Mutationsrate dieser Region führen. Die Exons 16-19 werden in  $RPGR^{ORF15}$  nicht kodiert.

$RPGR^{Ex1-19}$  ist das konstitutive Transkript des *RPGR*-Gens und besteht aus 19 Exons, die ein Protein mit 815 Aminosäuren kodieren. Diese Isoform weist am C-Terminus die Isoprenylierungs-Sequenz -CAAX auf (Patnaik et al. 2015). Das zweithäufigste Transkript des *RPGR*-Gens  $RPGR^{ORF15}$  wird als Retina-spezifische Isoform bezeichnet, da sie die höchste Expression in den Photorezeptoren aufweist (Shu et al. 2007).  $RPGR^{ORF15}$  kodiert

ein Protein bestehend aus 1152 Aminosäuren. Beide Transkripte enthalten die Exons 1-14. Der Bereich der Exons 1-11 weist eine Ähnlichkeit zu *RCC1 (regulator of chromosome condensation 1)* auf, ein nukleäres Protein, das als *guanine exchange factor* (GEF) für die GTPase Ran fungiert. Aufgrund dessen, wird die sich am N-Terminus befindliche Sequenz als *RCC1-like domain* (RLD) bezeichnet (Hong et al. 2003). Das retinale Transkript  $\text{RPGR}^{\text{ORF15}}$  weist nach den Exons 1-14 ein langes durch alternatives Spleißen entstandenes Exon auf, das als *open reading frame 15* (ORF15) bezeichnet wird. Die ORF15 Region enthält eine repetitive Glutamin- und Glycinsäure-reiche Komponente und ist durch ein Stopp-Codon terminiert, sodass im Transkript  $\text{RPGR}^{\text{ORF15}}$  die Exons 16-19 nicht kodiert werden (Vervoort et al. 2000; Megaw et al. 2015). Während in der ausgereiften Retina  $\text{RPGR}^{\text{ORF15}}$  die am meisten exprimierte Isoform darstellt, konnte für die Entwicklung der Photorezeptoren eine hohe Aktivität der konstitutiven Isoform  $\text{RPGR}^{\text{Ex1-19}}$  nachgewiesen werden. Eine Überexpression des konstitutiven Transkriptes  $\text{RPGR}^{\text{Ex1-19}}$  würde in der reifen Retina zu einer erhöhten Rate von Dystrophien führen (Wright et al. 2011).

RPGR und seine interagierenden Proteine sind für die Entstehung und den Funktionserhalt der Zilien und der Regulation ziliärer Prozesse von immenser Bedeutung. Die in der Retina am häufigsten exprimierte Isoform  $\text{RPGR}^{\text{ORF15}}$  ist essentiell für die Funktion der Zilien-tragenden Komponenten der Retina und ist im *Connecting Cilium* (CC) der Stäbchen und Zapfen vorzufinden (Megaw et al. 2015). Abb. 5 zeigt den Aufbau des CC und die Bedeutung von  $\text{RPGR}^{\text{ORF15}}$  für die Funktion des CC.  $\text{RPGR}^{\text{ORF15}}$  steht mit dem Axonem und dem Basalkörper des CC in Verbindung und interagiert mit weiteren Proteinen wie RPGRIP1. RPGRIP1 ist mit der *RCC1-like domain* des RPGR verbunden und verankert somit RPGR im CC (Wright et al. 2011).

Die Lokalisation von RPGR im CC der Photorezeptoren und die Interaktion mit Proteinkomplexen, die am Proteintransport beteiligt sind, zeigen, dass RPGR eine bedeutende Rolle in der Regulation des Transportes wichtiger Proteine und Stoffe zwischen dem Außen- und Innensegment der Photorezeptoren zukommt und somit entscheidend für den Erhalt der Vitalität und der Funktion der Photorezeptoren ist (Beltran et al. 2014). Das Verstehen und Erfassen der vorherrschenden molekularen Mechanismen von RPGR bleibt jedoch weiterhin eine Herausforderung (Patnaik et al. 2015).



**Abb. 5: Aufbau und Funktionsweise des *Connecting Cilium* (Megaw et al. 2015, S. 35)**

Struktur der retinalen Photorezeptoren.  $RPGR^{ORF15}$  als Bestandteil des *Connecting Cilium*, welches für den Stofftransport zwischen Außen- und Innensegment sorgt und damit die Vitalität und Funktion der Photorezeptoren als verbindende Komponente erhält.  $RPGR^{ORF15}$  steht in Verbindung mit dem Axonem und Basalkörper und interagiert mit anderen Proteinen wie  $RPGRIP1$ .  $RPGR^{ORF15}$  spielt eine wesentliche Rolle in der Regulierung des Stofftransportes zwischen dem Außen- und Innensegment.

### 1.3.1.1.2 Mutationen in der ORF15-Region

80 % der die XLRP auslösenden Mutationen im Bereich des *RPGR*-Gens sind in der ORF15 Region lokalisiert, weshalb diese Region auch als *mutational hotspot* bezeichnet wird. Die anderen die XLRP auslösenden Mutationen sind in den Exons 1-14 des *RPGR*-Gens vorzufinden. Mutationen im Bereich der Exons 16-19 konnten bisher nicht beschrieben werden, da diese kritisch für das Überleben des Organismus sind (Schmid et al. 2010; Vervoort et al. 2000).

Die hohe Mutationsrate der ORF15-Region kann auf die repetitive Glutamin- und Glycinsäure-reiche Domäne zurückgeführt werden (Patnaik et al. 2015). Durch die repetitive Sequenz können weitere Spleißstellen aktiviert werden, die zur Produktion verkürzter und damit fehlerhafter Proteine führen können. Des Weiteren kann es durch die repetitive Sequenz zur Änderung der DNA-Doppelhelix Konfiguration kommen, die zu einer Beeinträchtigung der Replikation und Transkription und damit zu einer Genom-Instabilität führen kann (Zhao et al. 2010).

An der XLRP erkrankte Patienten, die Mutationen in der ORF15 Region des *RPGR*-Gens aufweisen, haben oft einen milderen Krankheitsverlauf als Patienten mit Mutationen im Bereich der Exons 1-14 (Sharon et al. 2003). Unabhängig davon welcher Mutationstyp

vorliegt, besteht eine Korrelation zwischen der Mutationslokalisierung in der ORF15-Region und der Schwere der Erkrankung. Je länger die kodierte Wildtyp-Aminosäuresequenz ist, desto milder ist der Krankheitsverlauf (Megaw et al. 2015).

#### **1.4 Therapiemöglichkeiten der RP**

Die RP ist momentan nicht heilbar und irreversibel, sobald die retinale Degeneration eingetreten ist. Die in den letzten Jahren empfohlene Einnahme von Nahrungsergänzungsmitteln wie Vitamin A oder Fischölen konnte keine klare Evidenz bezüglich positiver Effekte auf die RP aufweisen (Rayapudi et al. 2013). Aktuell finden sich weitere therapeutische Ansätze der RP in der Erforschung: Zellersatztherapie mittels retinaler Vorläuferzellen im fortgeschrittenen Stadium der RP (Verbakel et al. 2018), Netzhautimplantate zum Einsatz bei Patienten im Endstadium der RP (Mills et al. 2017; Stingl et al. 2017), neuroprotektive Faktoren zur Verlangsamung der Degeneration der Photorezeptoren (Birch et al. 2016) und transkorneale Elektrostimulation als neue Behandlungsperspektive der RP (Jolly et al. 2020).

Trotz des Vorhandenseins multipler Therapieansätze gibt es aktuell keinen Therapieansatz zur direkten Bekämpfung der Krankheitsursache und damit zur Heilung der RP (Cuenca et al. 2014). In den letzten Jahren nimmt die Bedeutung der spezifischen Gentherapie, in der die Kenntnis der krankheitsauslösenden Mutationen vorausgesetzt wird, als Werkzeug zur Therapie eines weiten Spektrums an Erkrankungen an Bedeutung zu (Stieger und Lorenz 2014). Über 2.335 klinische Studien wurden in den letzten 30 Jahren abgeschlossen, sind aktuell in der Umsetzung oder wurden bereits zur Durchführung genehmigt (Hanna et al. 2017). Die Gentherapie bietet durch das Einbringen von kodierenden Gensequenzen in die Zellen, in denen die Fehlfunktion der Gene lokalisiert ist, einen kurativen Therapieansatz für die RP (Lipinski et al. 2013).

Die Netzhaut bietet aufgrund ihrer guten Abgrenzbarkeit, leichten Zugänglichkeit und ihres Immunprivilegs für die Gentherapie ein geeignetes Organ zur therapeutischen Intervention. Durch die vorhandene optische Transparenz des Auges ist es möglich mittels nicht invasiver Verfahren wie der Elektoretinographie, der Funduskopie und der Optischen Kohärenztomografie (OCT) die therapeutischen Effekte am Auge zu evaluieren. Des Weiteren limitiert die Blut-Retina-Schranke durch die Reduktion der systemischen Verbreitung immunologische Reaktionen auf die angewandte Therapie. Diese Vorteile führten in den letzten Jahren durch die Erforschung molekularer Krankheitsmechanismen, die Charakterisierung von Tiermodellen und die

Weiterentwicklung von Werkzeugen für den Gentransfer zur Entwicklung multipler Getherapie-Strategien für schwere Formen von Retinopathien (Petit et al. 2016; La Martinez-Fernandez de Camara et al. 2020).

Es werden drei Formen der Getherapie unterschieden: Genaddition, Gen-Silencing und Genome Editing Diese Formen der Getherapie sollen im Folgenden erläutert werden, dabei soll auf die Form des Genome Editing genauer eingegangen werden.

#### **1.4.1 Genaddition**

Als Genaddition wird eine Form der Getherapie bezeichnet, die vor allem bei den rezessiven Vererbungsformen von Erkrankungen angewendet wird, bei denen die Proteine des mutierten Gens fehlen bzw. keinen toxischen Effekt bewirken. Durch den Transfer eines externen Vektors werden cDNA-Kopien, die die für das ausfallende Protein kodierende Gensequenzen enthalten, in die Zellen eingebracht. Das neu transferierte Protein übernimmt die Funktion vom endogenen Protein (Stieger et al. 2010). Im November 2018 erfolgte die erste Zulassung der Genadditionstherapie bei Patienten mit Leber'scher kongenitaler Amaurose (LCA), bei der ein Mangel an RPE65 durch den Einsatz von AAV-Vektoren, die humane cDNA Kopien des RPE65-Gens unter der Kontrolle eines viralen Promoters exprimieren, ausgeglichen wird (Prado et al. 2020).

#### **1.4.2 Gen-Silencing**

Das Gen-Silencing findet seinen Einsatz in der Getherapie von Erkrankungen mit dominanter Vererbungsform. Hier kommt es durch das mutierte Gen zur Expression von Proteinen, die einen negativen oder toxischen Effekt aufweisen (Yanik et al. 2017). Das Ziel ist es durch Gen-Silencing die Expression des toxischen Genproduktes zu verhindern. Die RNA-Interferenz ist als zelleigener Prozess zur Regulation der endogenen Genexpression ein wirksames Werkzeug. Durch die Wechselwirkung von kurzen RNA-Abschnitten kommt es zu einer verminderten Expression der Proteine. Es gibt verschiedene Typen von RNA-Interferenzen von denen vor allem die siRNA (*small-interfering* RNA) und die miRNA (*micro* RNA) in der Gen-Silencing Therapie eingesetzt werden (Davidson und McCray 2011). Die RNA-Interferenzen weisen jedoch keine sehr hohe Spezifität auf und führen nicht immer zu einer vollständigen Suppression der Genexpression, die bei einigen Erkrankungen zur Therapie notwendig wäre (Cox et al. 2015).

## 1.5 Genome editing

Die vorher beschriebenen Formen der Gentherapie führen zwar zur Neutralisation der Symptomatik, aber nicht zur Behebung des krankheitsverursachenden Problems. Bei Verwendung viraler Vektoren im Bereich der Genaddition werden die zu exprimierenden Proteine über den Promoter des viralen Vektors reguliert und unterliegen somit nicht intrazellulären Regulationsmechanismen. Es werden entweder zu viel oder zu wenig Proteine produziert und das erforderliche physiologische Level der Proteinproduktion kann nicht erreicht werden. Weiterhin können fehlerhafte Proteine in der Zelle den Effekt der transgen exprimierten Proteine beeinflussen (Yanik et al. 2017).

Eine neue Therapiemöglichkeit der RP stellt das Genome Editing dar. Als Genome Editing wird die gezielte Modifikation des Genoms durch Insertionen, Deletionen oder den Austausch von DNA-Sequenzen in kultivierten Zellen und lebenden Organismen definiert. Diese Form der Gentherapie ermöglicht es der Zelle durch den Ersatz der mutierten Gensequenz durch eine Wildtyp-Gensequenz im Genom, funktionsfähige Proteine herzustellen und durch die erfolgende intrazelluläre Regulation ein physiologisches Level der Proteinexpression wiederzuerlangen (Yanik et al. 2017). Die Entwicklung gentherapeutischer Strategien zur Reparatur krankheitsverursachender Mutationen führt in zwei Richtungen: *ex vivo* Genome Editing und *in vivo* Genome Editing.

Das *ex vivo* Genome Editing basiert auf der Durchführung einer Korrektur der mutierten Gensequenz außerhalb des Körpers. *Ex vivo* Genome Editing weist den einfacheren Einsatz der Gentherapie, Screening- und Selektionsmöglichkeiten vor Reimplantation der Zellen in das Zielgewebe als Vorteile auf. Beim *in vivo* Genome Editing erfolgt die Korrektur der mutierten Gensequenz dagegen direkt in den zu behandelnden Zellen. Für den nötigen Gentransfer können virale Vektoren wie zum Beispiel Adeno-assoziierte Viren (AAV) oder Lentiviren, aber auch nicht-virale Vektoren wie z.B. Nanopartikel eingesetzt werden. Diese Vektoren können durch subretinale oder intravitreale Injektionen zu den Zielzellen gebracht werden. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die Möglichkeit der Selektion und des Screenings der Zellen aufgrund der *in vivo* Therapie verwehrt bleibt. Deshalb ist es von größter Bedeutung, eine Strategie zur gezielten Modifikation zu entwickeln, um Nebeneffekte zu vermeiden.

Zum Genome Editing, d. h. zur Korrektur der krankheitsverursachenden Mutation im Genom durch Einbringen der Wildtyp-Sequenz des mutierten Gens wird die Möglichkeit

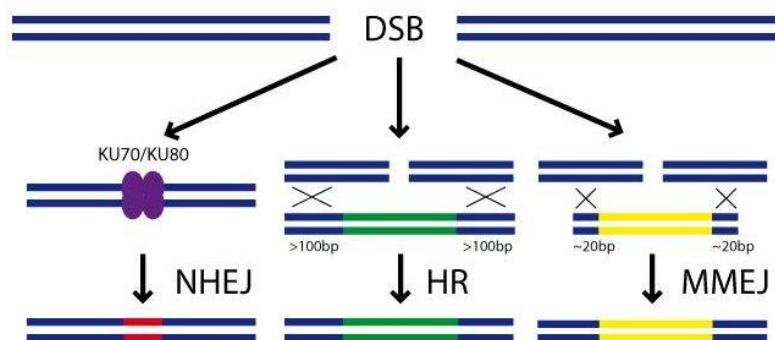
der Zelle genutzt, DNA-Doppelstrangbrüche durch körpereigene Reparaturmechanismen zu reparieren. Zur gezielten Induktion der Doppelstrangbrüche im Bereich der mutierten Gensequenz werden hochspezifische Endonukleasen eingesetzt. Diese sind programmierbar und können an der gewünschten Stelle einen Doppelstrangbruch induzieren, die Frequenz der Doppelstrangbrüche erhöhen und körpereigene DNA-Doppelstrangreparaturmechanismen zum Einbau der korrekten Gensequenz induzieren.

In den folgenden Kapiteln soll auf die körpereigenen DNA-DSB-Reparaturmechanismen näher eingegangen werden und das CRISPR/Cas9-System als hochspezifische Endonuklease zum Einsatz als Werkzeuge für das Genome Editing näher erläutert werden.

### 1.5.1 DNA-Doppelstrangbruch-Reparaturmechanismen

Die Zellen des menschlichen Körpers sind ständig endogenen und exogenen Einflüssen ausgesetzt. Der Einfluss ionisierender Strahlung, reaktiver Sauerstoffspezies, entstehender Fehler während der eigenen DNA-Replikation oder das Schneiden der DNA durch nukleäre Enzyme können zu Schädigungen der DNA führen. Durchschnittlich kommt es pro Tag geschätzt zu zehn DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) pro Zelle (Chang et al. 2017) und stellen eine schwere toxische Schädigung der DNA für die Zelle dar. Zur Bewahrung der Integrität des Genoms haben die Zellen eigene Mechanismen zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen entwickelt (Jasin und Haber 2016).

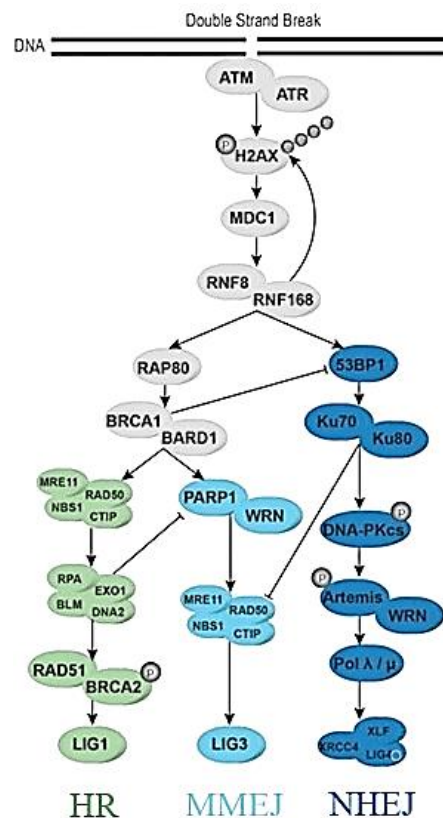
Es werden zwei große DNA-DSB-Reparaturmechanismen, dargestellt in Abb. 6, unterschieden: *non-homologous end joining* (NHEJ) und *homologous recombination* (HR).



**Abb. 6: DSB-Reparaturmechanismen (Yanik et al. 2018)**

Schematische Darstellung der Voraussetzungen/Erfordernisse für die drei Hauptformen der DSB-Reparaturmechanismen. NHEJ erfolgt durch den Ku70/80-Komplex unabhängig von homologen Sequenzen. HR benötigt den DSB flankierende Homologien mit einer Länge von über 100 bp. Für MMEJ sind mikrohomologe Sequenzen von 5-25 bp erforderlich.

Vor einigen Jahren wurde ein alternativ zum NHEJ in Eukaryonten stattfindender DSB-Reparaturmechanismus identifiziert, der als *microhomology-mediated end joining* (MMEJ) oder als alternatives NHEJ (a-NHEJ) bezeichnet wird. MMEJ bietet als neu identifizierter körpereigener DSB-Reparaturmechanismus eine weitere Option zum Einsatz im Bereich des Genome Editing (Kostyrko und Mermod 2016; Seol et al. 2018). Erfolgt in der DNA eine Schädigung in Form eines DSB, so wird eine Signalkaskade an Proteinen induziert, die zur Initiierung der DSB-Reparaturmechanismen führen. Diese Signalkaskade wird in Abb. 7 aufgezeigt.



**Abb. 7: Signalkaskade der Proteine der DNA-DSB-Reparaturmechanismen**

Abbildung der an den DSB-Reparaturmechanismen beteiligten Schlüsselproteine. Bei Vorliegen eines DNA-Doppelstrangbruches erfolgt die Rekrutierung von Proteinen (in grau unterlegt), die eine DNA-Schädigung anzeigen, weitere Proteine rekrutieren und zur Prozessierung der DNA-Enden führen. Die Signalkaskade resultiert in der Rekrutierung von 53BP1 und RAP80. 53BP1 leitet als Schlüsselprotein für NHEJ die Proteinkaskade für die Reparatur des DSB durch NHEJ (dargestellt in dunkelblau) ein. Die Bindung von RAP80 an BRCA1 führt zur Aktivierung der Proteinkaskade, die zur Reparatur des DSB durch HR (in grün unterlegt) oder MMEJ (in hellblau unterlegt) führt.

Modifiziert nach Yanik et al. 2017.

Initial wird der DSB durch die Bindung von ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3related protein*) erkannt. Diese Serin/Threonin-Kinasen führen zu einer schnellen Phosphorylierung von H2AX. H2A ist eines der fünf Haupt-Histon-Proteine und ist an der Organisation der eukaryotischen DNA im



Chromatin beteiligt. H2AX markiert den DSB und hat eine zentrale Rolle in der Rekrutierung der Schlüsselproteine und anderer Faktoren zum DSB wie dem MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein 1*) (Yuan et al. 2010). Durch die Bindung von MDC1 wird RNF8 (*Ring finger protein 8*) und RNF168 (*Ring finger protein 168*) aktiviert, das wiederum zur Ubiquitinylierung von H2AX führt (Brandsma und Gent 2012). Diese Proteinkaskade resultiert in der Rekrutierung von 53BP1 (*p53 binding protein*) und RAP80 (*receptor-associated protein 80*) (Stewart et al. 2009). Die Bindung von RAP80 an BRCA1 (*breast cancer 1*) führt entweder zum DSB-Reparaturmechanismus HR oder MMEJ, während 53BP1 das Regulatorprotein für den DSB-Reparaturmechanismus NHEJ darstellt (Ward und Chen 2004).

Die exakten Regulationsmechanismen, die zur Wahl des DSB-Reparaturmechanismus führen sind aktuell nicht ausreichend geklärt. Die aktuelle Phase des Zellzyklus, die Struktur der DNA-Enden und die für die Endresektion erforderlichen Prozesse haben jedoch einen entscheidenden Einfluss auf die Wahl des vorliegenden DSB-Reparaturmechanismus (Srivastava und Raghavan 2015).

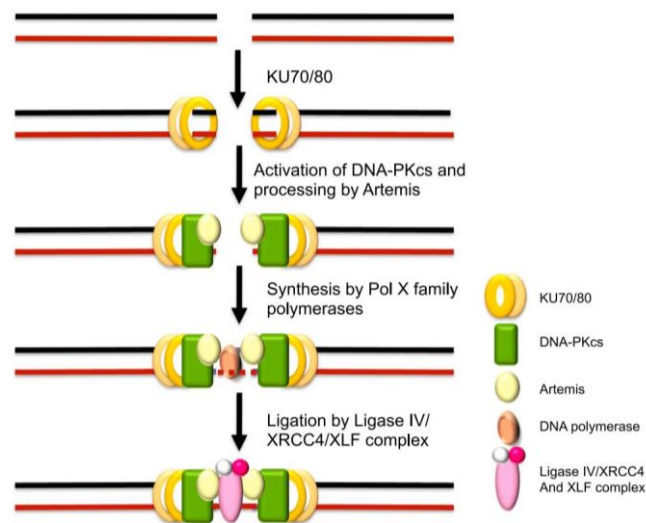
#### **1.5.1.1 Non-homologous end joining**

*Non-homologous end joining* (NHEJ) ist der dominierende DNA-DSB-Reparaturmechanismus in den Zellen höherer Eukaryonten, auch wenn dieser zum Verlust genetischer Informationen führen kann. NHEJ benötigt für die Durchführung der Reparatur des DSB keine homologen Sequenzen und kann somit einfach, schnell und zu jederzeit im Zellzyklus stattfinden (Chang et al. 2017). Zum Einsatz von NHEJ wird zum einen eine Nuklease zur Resektion der DNA-Schädigung, eine Polymerase zum Einfügen neuer DNA-Sequenzen und eine Ligase zur Wiederherstellung der DNA-Integrität benötigt (Lieber 2010).

Im Folgenden soll unter Einbeziehung von Abb. 8 der Reparaturmechanismus NHEJ genauer erläutert werden:

Bei Auftreten eines DSB kommt es zur Bindung des Schlüsselproteins Ku des NHEJ-Signalweges an die DNA-Enden des DSB. Das Protein Ku, welches ein Heterodimer bestehend aus den Untereinheiten Ku70 und Ku80 ist, schützt durch dessen Bindung die DNA-Enden vor weiteren Abbauprozessen und dient als Rekrutierungsort für die Proteine des Reparaturmechanismus NHEJ. Das Protein Ku ist ein ringförmiges Protein, dessen Untereinheiten einen asymmetrischen Ring um die DNA formen. Der entstehende Kanal

bindet die DNA-PKcs (*DNA-dependent protein kinase*), die aufgrund der DNA-abhängigen Bindung autophosphoryliert wird. Die aktivierte DNA-PKcs formt mit Artemis einen Komplex und kann als Endonuklease den DSB prozessieren. (Srivastava und Raghavan 2015). Polymerasen wie Pol  $\mu$  und Pol  $\delta$  führen durch die Synthese weiterer DNA zur Erzeugung kompatibler DNA-Enden. Abschließend erfolgt die Ligation der DNA-Enden durch den Ligase-Komplex bestehend aus der DNA-Ligase 4, XRCC4 (*X-ray cross complementation group 4*) und XLF (*Xrcc4-like factor*) (Brandsma und Gent 2012).



**Abb. 8: DSB-Reparaturmechanismus NHEJ (Srivastava und Raghavan 2015)**

Während NHEJ erfolgt bei Vorliegen eines DSB die Bindung des Heterodimers Ku70/80 an die DNA-Enden. Ku70/80 schützt vor weiteren Abbauprozessen und dient als Rekrutierungsort weiterer Reparaturproteine. Durch Autophosphorylierung wird DNA-PKcs aktiviert. Der DNA-PKcs/Artemis-Komplex prozessiert als Endonuklease den DSB. Anschließend erfolgt die Synthese der kompatiblen DNA-Enden durch die Polymerasen Pol  $\mu$  und Pol  $\delta$  und die Ligation der kompatiblen DNA-Enden durch den Ligase IV/XRCC4/XLF-Komplex.

Die am NHEJ-Reparaturprozess beteiligten Nukleasen, Polymerasen und Ligasen weisen eine höhere mechanische Flexibilität auf als die Proteine, die an den anderen DSB-Reparaturmechanismen beteiligt sind. Diese Flexibilität erlaubt den strukturspezifischen Proteinen den DSB unabhängig von der Konfiguration der bei einem DSB entstandenen DNA-Enden zu reparieren. Zum Beispiel ist es der Ligase 4 aufgrund der mechanischen Flexibilität möglich inkompatible DNA-Enden zu ligieren. Durch diese Flexibilität können jedoch variable Endresultate entstehen (Srivastava und Raghavan 2015; Chang et al. 2017; Lieber 2010).

Der Prozess der Modifikation der DNA-Enden ist während NHEJ unabhängig vom Vorliegen eines homologen DNA-Stranges und kann zu Insertionen, Deletionen sowie Substitutionen in der DNA führen und ist somit sehr fehlerbelastet (Chang et al. 2017).

Der DSB-Mechanismus NHEJ ist für das fehlerfreie Einbringen von präzisen DNA-Sequenzen in der Gentherapie nicht geeignet. Jedoch können durch NHEJ verursachte Insertionen und Deletionen zu einer Verschiebung des Leserasters führen und damit zum gezielten Ausschalten eines spezifischen Genes genutzt werden (Le Cong et al. 2013).

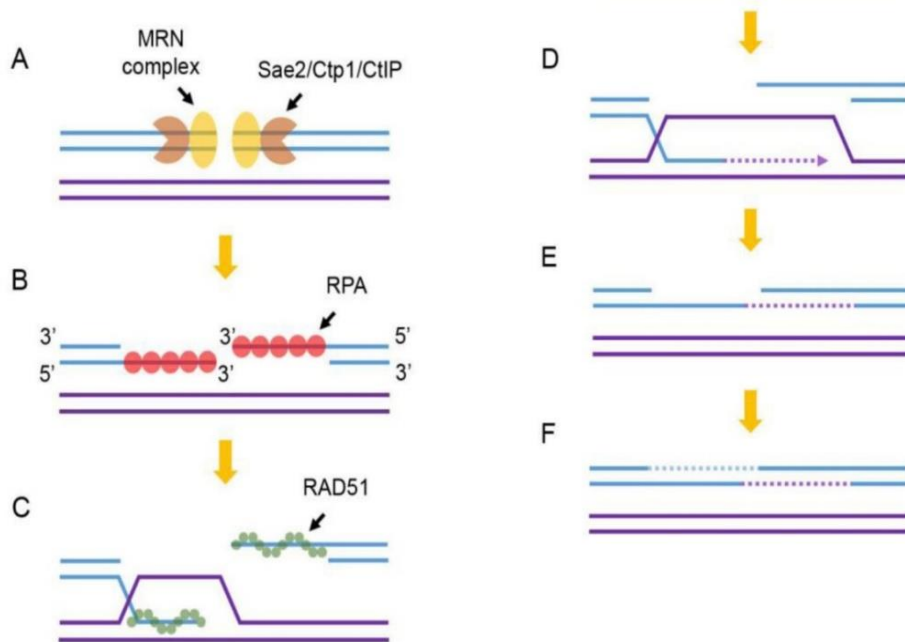
### **1.5.1.2 Homologous recombination**

*Homologous recombination* (HR) ist der akkuratere DNA-DSB-Reparaturmechanismus von den zwei großen DSB-Reparaturmechanismen, da dieser zur Reparatur eines DSB ein Template mit DNA-Sequenzen verwendet, die ähnlich bzw. identisch zur DNA-Sequenz am DSB sind. In höheren Eukaryonten ist HR an die Phasen des Zellzyklus gebunden, in denen homologe DNA-Sequenzen in Form des Schwesterchromatids vorliegen. Diese Bindung an bestimmte Aktivitätsphasen des Zellzyklus verhindert die Rekombination von nicht-identischen/repetitiven DNA-Sequenzen und ermöglicht damit eine nahezu fehlerfreie und effiziente Reparatur des DSB (Jasin und Haber 2016).

Der Mechanismus des DSB-Reparaturmechanismus ist in Abb. 9 dargestellt und soll im Folgenden näher erläutert werden:

Bei Vorliegen eines DSB im Rahmen einer DNA-Schädigung kommt es bei HR zur Rekrutierung des MRN-Komplexes (Mre11/Rad50/Xrs2) und der Endonuklease Sae2/Ctp1/CtIP zum DSB. Diese resezieren die geschädigte DNA an den 5'-Enden und generieren einen einzelsträngigen 3'-DNA-Überhang. An die entstandenen freien DNA-Einzelstränge lagern sich RPA-Proteine (*replication protein A*) an, die zu einer Stabilisierung der freien DNA-Einzelstränge führen und dadurch die Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindern. Im weiteren Verlauf werden die RPA-Proteine durch die Rekombinase RAD51 ersetzt, welche in Kombination mit der DNA ein Nukleotidfilament ausbildet und die Suche nach komplementärer DNA auf dem homologen DNA-Template initialisiert und katalysiert. Sobald dieses Nukleotidfilament eine homologe DNA-Sequenz auf einem Schwesterchromatid in unmittelbarer Nähe gefunden hat, kommt es zur Bindung des 3'-DNA-Einzelstranges an die komplementäre DNA-Sequenz des Schwesterchromatids und zum Verdrängen des im Schwesterchromatid gegenüberliegenden DNA-Stranges und somit zur Ausbildung einer D-Loop-Konfiguration. Es erfolgt zur Wiederherstellung der durch den DSB verloren gegangenen genetischen Informationen die DNA-Synthese unter Zuhilfenahme der homologen Sequenz als Matrize. Der neu synthetisierte DNA-Strang kann sich nun an die Einzelstrang DNA des 3'-Überhangs auf der anderen Seite des DSB anlagern. Es

erfolgt die Schließung der Lücken durch eine Polymerase und anschließend die Ligation der DNA-Stränge durch die Ligase I (Cannan und Pederson 2016; Misteli und Soutoglou 2009).



**Abb. 9: DSB-Reparaturmechanismus HR (Cannan und Pederson 2016)**

Darstellung der Hauptschritte des DSB-Reparaturmechanismus HR und der beteiligten Schlüsselproteine:

**A)** Bindung und Resektion der geschädigten DNA-Enden durch den MRN-Komplex und die Endonuklease Sae2/Ctp1/CtIP.

**B)** Bindung von RPA an die entstandenen einzelsträngigen 3'-DNA-Überhänge.

**C)** RPA wird durch RAD51 ersetzt, welches die Suche nach komplementärer DNA-Homologien katalysiert.

**D)** Ausbildung einer D-Loop-Konfiguration und DNA-Synthese.

**E)** Verlassen der D-Loop-Konfiguration. Anlagerung des neu synthetisierten DNA-Stranges an den zweiten 3'-DNA-Überhang.

**F)** DNA-Synthese und Ligation zur Komplettierung der DNA-Reparatur.

Es konnte gezeigt werden, dass HR unter der Verwendung von hochspezifischen Nukleasen Einsatz in der Gentherapie findet. HR eignet sich besonders zur Reparatur sequenzspezifischer DSB, da aufgrund der präzisen Arbeitsweise von HR durch das externe Hinzuführen von homologen Sequenzen Modifikationen fehlerfrei in das Genom eingebracht werden können. Dafür werden, wie in Abb. 6 zu sehen ist, homologe Sequenzen mit einer Länge von über 100 bp benötigt. Allerdings weist HR in mitotischen Zellen nur eine geringe Reparatureffizienz von 15 % auf, während 85% der DSB durch den DSB-Reparaturmechanismus NHEJ repariert werden. Durch das gezielte Einbringen eines DSB konnte die Effizienzrate von HR jedoch auch in mitotischen Zellen um das 1000fache gesteigert werden (Jasin und Haber 2016; Frohns et al. 2014).

### 1.5.1.3 Microhomology-mediated end joining

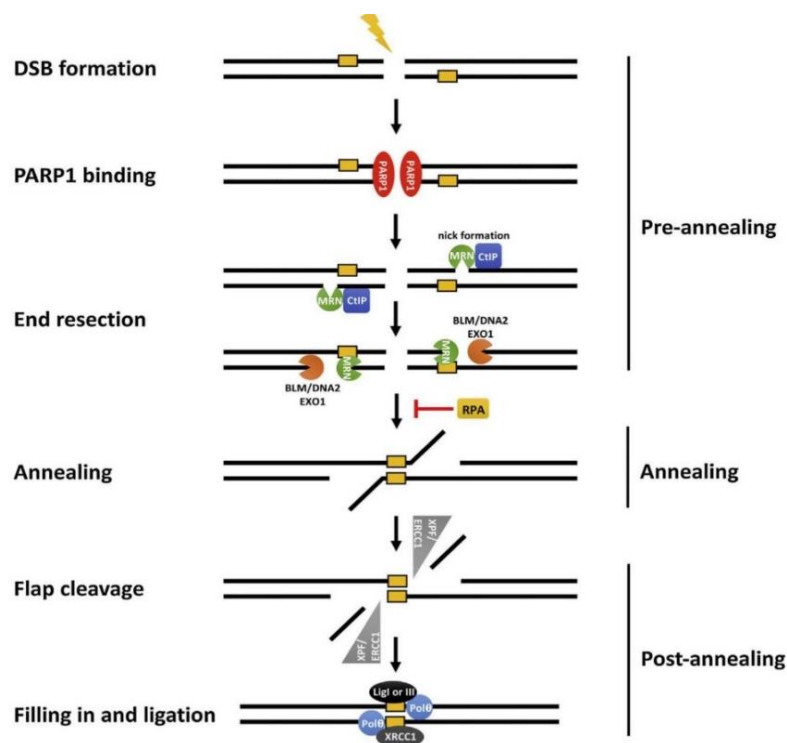
Vor einigen Jahren wurde ein weiterer zur Gruppe des alternativen NHEJ (a-NHEJ) gehörender DSB-Reparaturmechanismus entdeckt, der als *microhomology-mediated end joining* (MMEJ) bezeichnet wird. Die Grundlage des DNA-DSB-Reparaturmechanismus MMEJ bilden kurze Mikrohomologien mit einer Länge von 2-20 bp, die den DSB beidseitig flankieren. Durch die Rekombination der Mikrohomologien, kommt es zur Reparatur des DNA-Doppelstrangbruches (Sinha et al. 2016; Deng et al. 2014). MMEJ weist durch das Verknüpfen der resezierten DNA-Enden Ähnlichkeiten zum DSB-Reparaturmechanismus NHEJ auf, findet jedoch Ku70/80 und Ligase IV unabhängig statt. MMEJ weist initial die gleichen Resektionsschritt wie der der DSB-Reparaturmechanismus HR auf. In Abhängigkeit der notwendigen Resektionslänge der DNA-Enden erfolgt die Aktivitätsregulation zwischen den DSB-Reparaturmechanismen MMEJ und HR (Truong et al. 2013). Da MMEJ auch bei Funktionsfähigkeit von NHEJ und HR stattfindet, kann MMEJ als eigenständiger DSB-Reparaturmechanismus angesehen werden (Wang und Xu 2017).

Der Reparaturmechanismus MMEJ erfolgt in drei Hauptschritten und soll unter Einbeziehung von Abb. 10 im Folgenden erläutert werden (Seol et al. 2018):

1) **Pre-annealing:** Bei Vorhandensein eines DSB erfolgt die Bindung von PARP1, der Poly-[ADP-ribose]-Polymerase 1, die den DSB detektiert und zur Rekrutierung des MRN-Komplexes mit CtIP führt. In der Nähe des DSB kommt es zur Ausbildung einer Kerbe. Durch die Exonuklease-Aktivität erfolgt eine 3'-5'- Resektion und es entstehen einzelsträngige 3'-DNA-Überhänge. Die Beteiligung des MRN-Komplexes ist sowohl in MMEJ als auch in HR nachzuweisen. Das Replikationsprotein A (RPA), welches im Reparaturmechanismus von HR beteiligt ist, soll eine entscheidende Rolle in der Regulation des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ zukommen. Durch die Bindung an die DNA kann RPA die komplementäre Bindung der Mikrohomologien verhindern und somit zu einer Suppression von MMEJ führen (Deng et al. 2015). In Abb. 10 ist ein weiterer Exonuklease-Komplex BLM/EXO1 erwähnt, der durch 5'-3'-Resektion zu einer extensiveren Resektion führt. Die Aktivität dieses Exonuklease-Komplexes wird bei Mikrohomologien, die nicht weiter als 2 bp vom DSB entfernt liegen, supprimiert und es ist anzunehmen, dass diese extensivere Resektion eher in HR als in MMEJ vorzufinden ist (Truong et al. 2013; Deng et al. 2014).

2) **Annealing:** Es erfolgt die komplementäre Bindung der durch die Resektion freigelegten Mikrohomologien. Der genaue Prozess des Annealing ist zurzeit nicht geklärt (Sinha et al. 2016).

3) **Post-annealing:** Die entstandenen nicht-komplementären Überhänge (*flaps*) werden durch den Nuklease-Komplex XPF/ERCC1 durch Trimmen entfernt und am 3'-Ende hydroxyliert. Der XRCC1/Ligase III Komplex und PARP1 sind an der Endmodifizierung der DNA-Enden beteiligt und rekrutieren die Polymerase  $\theta$  zum DSB. Anschließend erfolgt die DNA-Synthese mittels der Polymerase  $\theta$  und die Ligation durch die Ligase I oder Ligase III. Aktuelle Studien zeigen, dass die Ligase I unter Verwendung von 10 bp langen Mikrohomologien im Reparaturmechanismus  $\alpha$ -NHEJ involviert ist und mit der Ligase III in Konkurrenz steht (Liang et al. 2008). Jedoch könnte die Ligase III entscheidend für das Mikrohomologien-abhängige alternative NHEJ sein, während die Ligase I das von Mikrohomologien-unabhängige alternative NHEJ ermöglicht (Srivastava und Raghavan 2015).



**Abb. 10: DSB-Reparaturmechanismus MMEJ (Seol et al. 2018)**

Der DNA-DSB-Reparaturmechanismus MMEJ kann in drei Hauptschritte unterteilt werden:

1) **Pre-Annealing:** Es kommt zur Bindung von PARP1 an die freiliegenden DNA-Enden und damit zur Detektion des DSB und Rekrutierung der Resektionsfaktoren MRN und CtIP. Es erfolgt eine Endresektion zur Freilegung der Mikrohomologien.

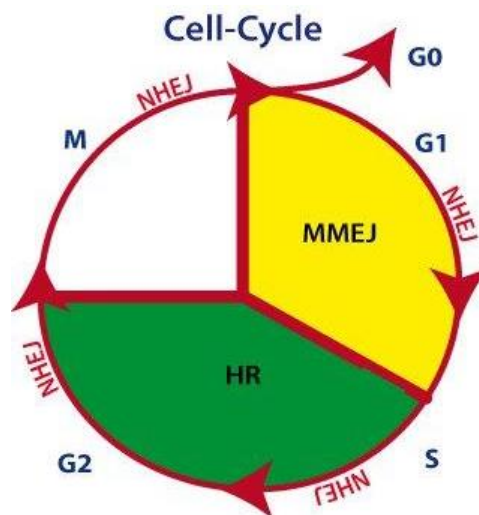
2) **Annealing:** Bindung der komplementären Mikrohomologien und Entstehung von 3'-DNA-Überhängen

3) **Post-Annealing:** Entfernung der überhängenden nicht-komplementären *flaps* durch Nuklease-Komplex XPF/ERCC1. DNA-Synthese durch Polymerase  $\theta$  mit anschließender Ligation durch den LigaseIII/XRCC1 Komplex.

MMEJ ist als körpereigener DSB-Reparaturmechanismus fehlerbehaftet, da aufgrund der Rekombination der den DSB flankierenden kurzen Mikrohomologien Deletionen von 10 bis 1000 bp entstehen können (McVey 2014). MMEJ kann jedoch durch das Einbringen eines externen Vektors, der die Zielsequenz flankiert von Mikrohomologien enthält, für präzises Genome Editing genutzt werden (Nakade et al. 2014; Sakuma et al. 2016). Die Effizienz von MMEJ ist abhängig von der Länge der mikrohomologen Sequenzen: je länger die mikrohomologen Sequenzen, desto höher sei die Effizienz (McVey und Lee 2008). Mikrohomologien von 15 bp und länger sollen eine effiziente Integration einer externen DNA-Sequenz in das Genom aufweisen (Villarreal et al. 2012).

#### 1.5.1.4 Aktivität im Zellzyklus - Zellkultur versus post-mitotische Photorezeptoren

Die DNA-DSB-Reparaturmechanismen stehen untereinander in Konkurrenz. Durch die Induktion eines DSB entsteht eine kompetitive Situation zwischen MRN, dem Erkennungskomplex für HR und MMEJ, und dem Schlüsselprotein Ku des DSB-Reparaturmechanismus NHEJ (Truong et al. 2013). Das primäre Vorliegen des DSB-Reparaturmechanismus ist abhängig vom Zustand und damit in welcher aktuellen Phase des Zellzyklus sich die Zelle befindet, in der ein DSB vorliegt. In Abb. 11 sind die Aktivitäten der drei DSB-Reparaturmechanismen NHEJ, HR und MMEJ während des Zellzyklus aufgezeigt und sollen im Folgenden kurz erläutert werden:



**Abb. 11: Aktivität der DSB-Reparaturmechanismen im Zellzyklus (Yanik et al. 2018)**

Schematische Darstellung der Aktivität der drei Haupt-DSB-Reparaturmechanismen während des Zellzyklus bei Vorliegen eines DSB. Der fehlerbehaftete DSB-Reparaturmechanismus NHEJ zeigt Aktivitäten während allen Phasen des Zellzyklus, während HR (grün unterlegt) nur bei Vorliegen von Homologien in Form des Schwesterchromatids in der S- und G2-Phase aktiv ist. Die Aktivität des DSB-Mechanismus MMEJ (gelb unterlegt) konnte in der G1-Phase und der frühen S-Phase des Zellzyklus nachgewiesen werden.

Der DSB-Reparaturmechanismus NHEJ zeigt eine Aktivität während des gesamten Zellzyklus und vor allem in der G1-Phase auf. Laut Lieber (2010) weisen Zellen mit ca. 400.000 Molekülen eine hohe Anzahl des Proteins Ku auf, die zur Bindung durch den DSB entstandenen freien DNA-Enden führen und damit die umfangreiche Resektion dieser durch andere Enzyme inhibieren. Dies ist einer der Gründe, weshalb NHEJ während des gesamten Zellzyklus aktiv ist und in der G1-Phase aufgrund der hohen Anzahl an Protein Ku und der vorliegenden Suppression der anderen Faktoren 50fach begünstigt wird (Chang et al. 2017).

Die Faktoren, die eine extensive Resektion der DNA-Enden fördern, sind vor allem während der S- und G2-Phase des Zellzyklus aktiv und favorisieren bei Anwesenheit eines Schwesterchromatids den DSB-Reparaturmechanismus HR. Durch die Nutzung von Homologien der Schwesternchromatide besteht in diesem Zeitfenster die Möglichkeit zur fehlerfreien Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen. Wie oben bereits genannt, konkurriert auch NHEJ während dieser Phase des Zellzyklus mit HR. Das Verhältnis der Aktivität von NHEJ zu HR in somatischen Wild-Typ Säugetierzellen während der S- und G2-Phase beträgt 4:1 (Chang et al. 2017). Damit bleibt NHEJ als im Genome Editing nicht favorisierter DSB-Reparaturmechanismus der DSB-Reparaturmechanismus mit der höheren Aktivität.

Aktivitäten des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ ließen sich in der G1- und der frühen S-Phase des Zellzyklus nachweisen. Dadurch bietet MMEJ die Möglichkeit das Zeitfenster einer fehlerfreien Reparatur auf diese Phasen des Zellzyklus zu erweitern.

Bei den Photorezeptoren handelt es sich um postmitotische neuronale Zellen, die sich in der G0-Phase befinden. Aktuell herrscht in postmitotischen neuronalen Zellen keine Klarheit bezüglich der Aktivitäten der oben genannten DSB-Reparaturmechanismen und der Expression und Lokalisation der an den Reparaturmechanismen beteiligten Proteine (Yanik et al. 2017). Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass NHEJ als DSB-Reparaturmechanismus in postmitotischen Zellen stattfindet (Chan et al. 2011; Frohns et al. 2014). Basierend auf dieser Erkenntnis kann angenommen werden, dass auch eine Aktivität der anderen DSB-Reparaturmechanismen wie HR und MMEJ in diesen Zelltyp vorliegen könnte.



## 1.5.2 CRISPR/Cas-System

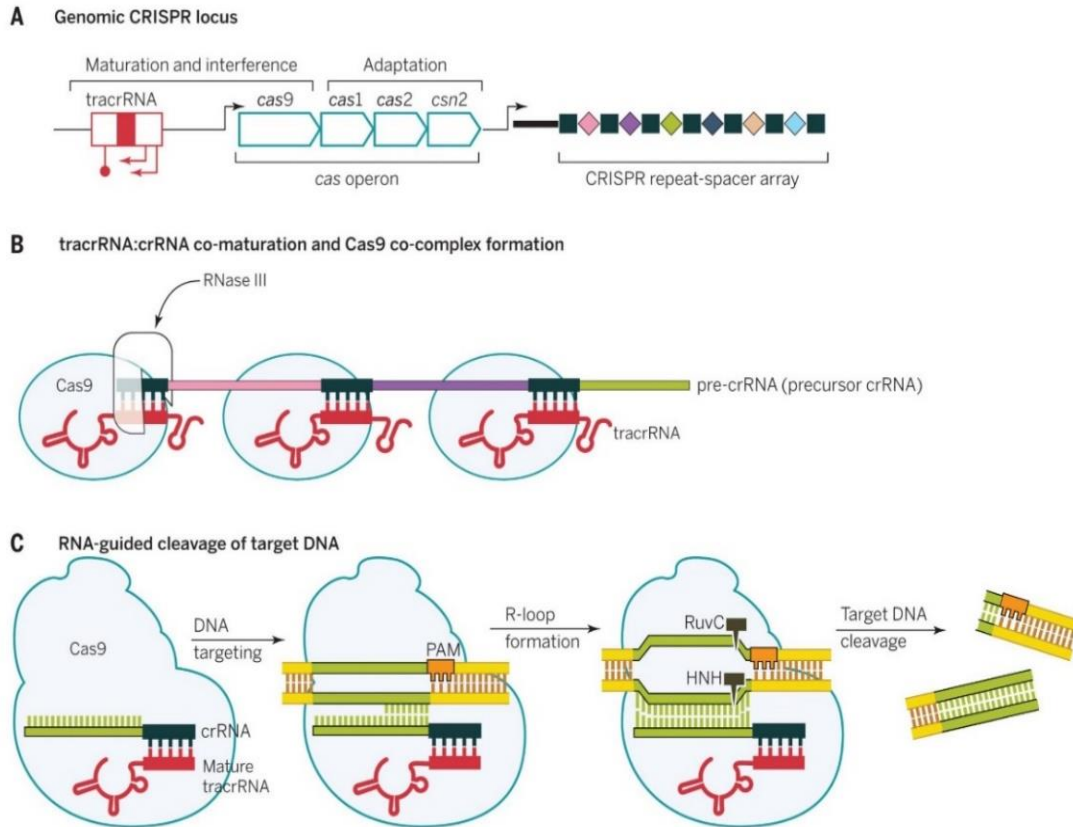
CRISPR/Cas stellt ein System zur adaptiven Immunabwehr in Prokaryonten dar und dient diesen zum Schutz vor eindringenden Viren und fremder Plasmid-DNA. CRISPR steht als Akronym für *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* und bezeichnet einen Genlokus mit kurzen sich wiederholenden DNA-Sequenzen, der in ca. 90 % der Archaeen und ca. 50 % der Bakterien vorzufinden ist (Makarova et al. 2015).

Seit der erstmaligen Entdeckung von CRISPR/Cas 1987 im Bakterium *Escherichia coli* hat dieses System in den letzten Jahren als Werkzeug zum Einsatz im *genome engineering* an immenser Bedeutung gewonnen (Ishino et al. 2018). E. Charpentier und J. Doudna wurden 2020 für die Entdeckung der Verwendung des CRISPR/Cas-Systems als Genschere und der damit verbundenen Revolutionierung des *genome engineering* mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet (NobelPrize.org 2021.000Z).

### 1.5.2.1 Aufbau, Struktur und Funktionsweise

Der CRISPR-Genlokus besteht aus zwei Komponenten (siehe Abb. 12 Abschnitt A): dem CRISPR-Array und dem *cas*-Operon. In dem CRISPR-Array wechseln sich Abschnitte mit DNA-Einzelsequenzen eines sich wiederholenden Grundmotivs (*repeats*) mit Bereichen variabler DNA-Sequenzen (*spacers*) ab. Die *Spacers* stammen aus Bakteriophagen und fremden Plasmiden (Horvath und Barrangou 2010). Angeheftet an dem CRISPR-Array befindet sich das *cas*-Operon, welches die *cas*-Gene (CRISPR-associated Gene) enthält. Die *Cas*-Gene kodieren eine Vielzahl von heterogenen Proteinen, die als Nukleasen, Helikasen, Polymerasen und Polynukleotid-bindende Proteine fungieren und für die adaptive Immunabwehr notwendig sind (Haft et al. 2005).

Das CRISPR/Cas-System lässt sich aufgrund der genetischen, strukturellen und funktionellen Unterschiede in zwei Hauptklassen, sechs Typen und neunzehn Subtypen einteilen (Lemay et al. 2017). Dabei kommt dem CRISPR-System Typ II, welches der zweiten CRISPR-Klasse zuzuordnen ist, mit der dazugehörigen Endonuklease Cas9 im Genome Editing aufgrund seiner Programmierbarkeit eine große Bedeutung zu (Makarova und Koonin 2015; Makarova et al. 2015). Deshalb soll im folgenden Kapitel der Aufbau und die Struktur des CRISPR/Cas9 Typ II-A System des Bakterium *Streptococcus pyogenes* beschrieben werden.



**Abb. 12: CRISPR/Cas9-System (Doudna und Charpentier 2014)**

**A)** Abbildung des CRISPR-Genlokus: Der CRISPR-Genlokus besteht aus einem *Cas*-Operon, das die für die adaptive Immunabwehr notwendigen Proteine kodiert und dem CRISPR-Array. Das CRISPR-Array besteht aus repetitiven DNA-Sequenzen *repeats* (dargestellt in schwarz) und aus variablen DNA-Sequenzen *spacers* (dargestellt in unterschiedlichen Farben), die aus Bakteriophagen oder fremder Plasmid-DNA stammen. An das *Cas*-Operon vorgeschaltet befindet sich die *tracrRNA*, die für den Prozess der Reifung und Interferenz ebenfalls exprimiert wird.

**B)** Ausbildung des CRISPR-Surveillance Komplex bestehend aus dem *tracrRNA*:*crRNA* Duplex und der aktivierten Endonuklease Cas9. Vorherige Prozessierung durch die RNase III und weitere Reifung der prä-crRNA zur crRNA.

**C)** Zielgerichtetes Schneiden der Fremd-DNA: Der CRISPR Surveillance Komplex bindet über die crRNA an die Fremd-DNA. Bei Vorhandensein des PAM-Motiv kommt es zum Schneiden des komplementären und gegenüberliegenden DNA-Stranges durch die Nuklease-Domänen (HNH und RuvC) der Endonuklease Cas9. Es entsteht ein zielgerichteter DSB mit entstehenden glatten Enden vor dem PAM-Motiv und damit die zielgerichtete Ausschaltung der Fremd-DNA.

Die Funktionsweise des CRISPR/Cas9-Systems in Prokaryonten zur adaptiven Immunabwehr kann in drei Hauptschritte eingeteilt werden:

1) **Adaption:** Das CRISPR/Cas9-System schneidet kurze DNA-Fragmente von einer Länge von ~20 bp aus der eindringenden fremden DNA heraus und integriert diese als *spacer* zwischen die *repeats* der CRISPR Array.

2) **Transkription und Prozessierung der crRNA:** Der sich in der CRISPR *leader*-Sequenz, einer 5'-upstream der CRISPR-Array gelegenen Adenosin- und Thyminreichen nicht-kodierenden Sequenz, befindliche Promoter transkribiert den CRISPR

*repeat-spacer* Array. Es entsteht die prä-crRNA. Neben der Transkription der prä-crRNA erfolgt ebenso die Transkription der tracrRNA (*trans-activation cr-RNA*), die sich über Basenpaarung an die *repeats* der prä-crRNA bindet (siehe Abschnitt B in Abb. 12). Es erfolgt die Bildung eines tracrRNA:prä-crRNA-Duplex, der durch das zusätzlich über die tracrRNA gebundene Cas9-Protein stabilisiert wird. Es kommt zur Rekrutierung der RNase III, die den Duplex prozessiert, wodurch kurze RNA-Abschnitte entstehen, die einen *spacer* enthalten, der von zwei partiellen *repeats* umgeben ist (Deltcheva et al. 2011). Durch anschließendes *trimming* erfolgt die weitere Reifung der prä-crRNA zur crRNA, sodass ein reifer RNA-Duplex entsteht, der bereits mit der Endonuklease Cas9 komplexiert ist und diese aktiviert (Jinek et al. 2012).

3) **Interferenz:** Die im CRISPR-Surveillance Komplex enthaltene aktivierte Endonuklease Cas9 wird durch die Hybridisierung der crRNA mit dem komplementären Einzelstrang der Ziel-DNA zur gewünschten Schnittstelle geführt. Die aktivierte Endonuklease Cas9 kann speziell DNA-Sequenzen, die komplementär zur crRNA sind schneiden. Die Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein einer 3-5 bp langen DNA-Sequenz am 3'-Ende der Zielstelle, die als PAM-Sequenz (*protospacer adjacent motif*) bezeichnet wird. Die PAM-Sequenz ist zum Schutz vor dem Schneiden der eigenen bakteriellen DNA und damit zur Prävention einer Autoimmunität nicht in den *repeats* der CRISPR-Array vorzufinden. Durch die Bindung des CRISPR-Surveillance Komplexes an die Ziel-DNA erfolgt die Ausbildung einer R-Loop-Formation 8-12 nt *upstream* der PAM-Sequenz. Anschließend wird die Ziel-DNA durch die Nuklease-Domänen der Endonuklease Cas9 gespalten: Die HNH-Domäne induziert einen Einzelstrangbruch an dem mit der crRNA hybridisierten Ziel-DNA-Strang, während die RuvC-Domäne zur Spaltung des gegenüberliegenden/nicht-hybridisierten DNA-Einzelstranges der Ziel-DNA führt. Durch die RNA-abhängige Bindung des CRISPR-Surveillance Komplex an die Ziel-DNA wird somit zielgerichtet ein Doppelstrangbruch mit entstehenden glatten DNA-Enden etwa 3 nt *upstream* des PAM-Motivs in der Ziel-DNA eingebracht (Horvath und Barrangou 2010; Barrangou und Marraffini 2014; Sternberg et al. 2016).

### 1.5.2.2 Guide-RNA

2012 demonstrierten die Wissenschaftlerinnen Doudna und Charpentier, dass die crRNA und die tracrRNA auf einer sogenannten guide RNA (gRNA) kombinierbar sind. Dafür muss die gRNA folgende Merkmale aufweisen: zum einen benötigt diese am 5'-Ende eine 20 bp lange DNA-Sequenz, die über Watson-Crick-Basenpaarung die Schnittstelle

auf der Ziel-DNA festlegt. Des Weiteren wird am 3'-Ende der gRNA eine DNA-Doppelstrangstruktur zur Bindung der Endonuklease Cas9 benötigt (Jinek et al. 2012).

Durch die Änderung der gRNA-Sequenz kann CRISPR-Cas9 programmiert werden und an jeder beliebigen DNA-Zielsequenz schneiden, die an eine PAM-Sequenz angrenzt. Das CRISPR-System Typ II war das erste CRISPR/Cas-System, welches mittels Genome Editing in eukaryontischen Zellen zum Einsatz kam, da dieses zur zielgerichteten RNA-abhängigen Induktion eines Doppelstrangbruches nur die Endonuklease Cas9 als alleiniges Protein benötigt (Le Cong et al. 2013; Mali et al. 2013). Jede Cas9-Endonuklease hat seine artspezifische eigene PAM-Sequenz, an die sie bindet und schneidet. Die spCas9 (*Streptococcus pyogenes*) des CRISPR/Cas-System Typ II benötigt 5'-NGG als spezifische PAM-Sequenz. Dies limitiert keinesfalls die Einsatzmöglichkeit im humanen Genom, da diese Sequenz im Durchschnitt alle 8-12 bp gefunden werden können (Ran et al. 2013).

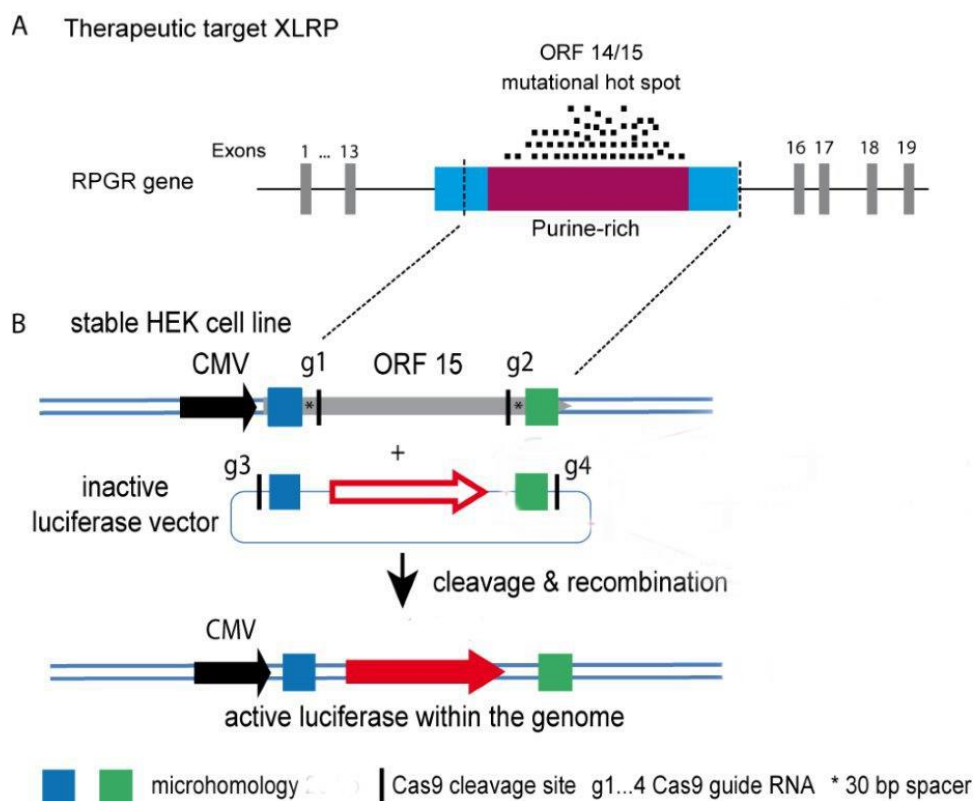
Im Gegensatz zu anderen hochspezifischen Endonukleasen wie Zinkfinger-Nukleasen oder TALEN ist für den Einsatz des CRISPR/Cas9-Systems kein Design spezifischer Proteine nötig (Jinek et al. 2013). Die einfache Konstruktion dieses Systems bestehend aus zwei Komponenten und der durch die Anpassung der gRNA an die Zielsequenz entstehende Flexibilität hat das Genome Editing in den letzten Jahren im Einsatz an einer Vielzahl an Zelltypen und Organismen revolutioniert (Ma et al. 2014; Mei et al. 2016). Weiterhin bietet CRISPR/Cas9 die Besonderheit durch die Kombination multipler gRNA mit der Endonuklease Cas9 gleichzeitig mehrere DSB an den gewünschten Schnittstellen der Ziel-DNA einzubringen (Cong 2013).

Die Selektion der richtigen Zielsequenz und der korrespondierenden gRNA sind entscheidend für das zielgerichtete und effiziente Schneiden und führen zur Reduktion von *off-target* Ereignissen, nicht-gewünschter DSB innerhalb der DNA, die aufgrund ähnlicher Zielsequenzen auftreten können (Yanik et al. 2017). Laut Fu et al. (2014) sollen kürzere gRNA von 17 oder 18 nt zu einer höheren Effizienz des gezielten Einbringens eines DSB und eine geringere Rate an *off-target* Ereignissen aufweisen. Durch die Programmierbarkeit der gRNA von CRISPR/Cas9 lassen sich durch eine vorherige sensitive *off-target* Analyse des gesamten Genoms *off-targets* und damit unerwünschte DNA-Ereignisse reduzieren.

## 1.6 Reportersystem und Beschreibung der Funktionalität

In Vorexperimenten der Arbeitsgruppe „Experimentelle Ophthalmologie“ der Universität Gießen erfolgte die Entwicklung eines Reportersystems zur Identifikation von DNA-Rekombination in einer stabilen HEK293-Zelllinie, die die ORF15-Region des *RPGR*-Gens als therapeutischen Angriffspunkt der XLRP enthält.

Im Folgenden soll unter Einbeziehung von Abb. 13 das Reportersystem erläutert und seine Funktionalität beschrieben werden.



**Abb. 13: Reportersystem in stabiler HEK293<sub>mORF15</sub>-Zelllinie**

A) Aufbau des *RPGR*-Gens mit farbiger Hervorhebung der ORF15-Region mit ihren Purin-reichen repetitiven Sequenzen. Da 80 % der die XLRP auslösenden Mutationen des *RPGR*-Gens in der ORF15-Region vorzufinden sind, bietet diese als *mutational hotspot* einen therapeutischen Angriffspunkt zur Behandlung der XLRP mittels der Gentherapie.

B) Schematische Darstellung des Reportersystems. Es erfolgte die Generierung der stabilen HEK293<sub>mORF15</sub>-Zelllinie durch die Integration der murinen ORF15-Region in HEK293 Zellen mit Vorschaltung eines CMV-Promoters. Die integrierte ORF15-Region ist von mikrohomologen Bereichen dargestellt in blau und grün umgeben, die komplementär zu den mikrohomologen Sequenzen des Donor-Plasmids sind. Die vertikalen schwarzen Linien markieren die Schnittstellen der Endonuklease Cas9 mit Kennzeichnung der dafür notwendigen gRNAs. Zwischen der Cas9-Schnittstelle und den mhS ist ein Abstandhalter von 30 bp eingebracht, der mittels Sternchen markiert ist. Das Donor-Plasmid enthält die promotorlose Luziferase, die von mikrohomologen Sequenzen und Schnittstellen für die gRNA g3 und g4 flankiert wird. Nach der zielgerichteten Induktion der DSB durch CRISPR/Cas9 und der nachfolgenden DNA-Rekombination wird die Gensequenz der Luziferase in die stabile Zelllinie integriert und durch den CMV-Promoter exprimiert. Abbildung modifiziert nach Yanik et al. 2018.

Die Entwicklung eines auf Fluoreszenz-basierenden Reportersystems zur Identifikation mikrohomologer DNA-Rekombination und die Analyse der Funktionalität des Systems erfolgte in einer humanen stabilen Zelllinie. Aufgrund der guten Kultivierbarkeit wurden HEK293-Zellen zum Design des Reportersystems ausgewählt. Da die ORF15-Region des *RPGR*-Gens den *mutational hotspot* für die XLRP darstellt, wurde diese mittels *random integration* in die HEK293-Zellen eingebracht. Um dieses *in vitro* Reportersystem in den nächsten Schritten auf ein Mausmodell zu transferieren, wurde eine Wildtypsequenz der ORF15-Region des murinen *RPGR*-Gens verwendet. Vor die in die stabile Zelllinie eingebrachte ORF15-Region wurde ein CMV-Promoter geschaltet, der für die Expression der in das Genom der Zelllinie einzubringenden Luziferase-Gensequenz wichtig ist. In vorhergehenden *in vitro* Experimenten der Arbeitsgruppe erfolgte die Suche nach Schnittstellen vor und nach der ORF15-Region, an denen am effizientesten Doppelstrangbrüche durch das CRISPR/Cas9-System induziert werden können. Diese Schnittstellen sind in der Abb. 13 als *cleavage site* die ORF15-Region flankierend gekennzeichnet. An diese Schnittstellen kann die Endonuklease Cas9 mithilfe der gRNA g1 und gRNA g2 gebracht werden und bei Vorhandensein der PAM-Sequenz gezielt an diesen Stellen die notwendigen Doppelstrangbrüche induzieren. Zwischen der Cas9-Schnittstelle und den mhS ist ein Abstandshalter von 30 bp eingebracht, der mittels Sternchen markiert ist.

Zum Einbringen der korrekten Gensequenz in das Genom der Zelllinie wird ein Vektor benötigt. Dieser enthält in diesem Reportersystem anstatt der gewünschten Gensequenz die Luziferase, die erst durch das Vorschalten eines Promoters exprimiert und deren auf Fluoreszenz-basierende Aktivität gemessen werden kann. Auf dem Donor-Plasmid befinden sich vor und nach der Luziferase-Gensequenz mikrohomologe Sequenzbereiche, die in Abb. 13 B links der Luziferase in blau und rechts der Luziferase liegend in grün gekennzeichnet sind. Diese mikrohomologen Sequenzbereiche sind komplementär zu den die ORF15-Region in der Zelllinie flankierenden Sequenzbereichen.

Mittels Transfektion werden die benötigten Plasmide in die stabile Zelllinie eingebracht. Durch das eingebrachte CRISPR/Cas9-System werden Doppelstrangbrüche an den *cleavage sites* induziert und die mutierte ORF15-Region aus dem Genom der stabilen Zelllinie herausgeschnitten. Des Weiteren kommt es durch das Schneiden des CRISPR/Cas9-System an den *cleavage sites* g3 und g4 zur Separierung der Luziferase

mit den umliegenden mikrohomologen Sequenzen vom restlichen Vektor. Es erfolgt die Anlagerung der komplementären mikrohomologen Bereiche und die Integration der Luziferase durch den DSB-Reparaturmechanismus MMEJ in das Genom der Zelllinie. Bei korrekter Integration ist der Luziferase-Gensequenz ein CMV-Promoter vorgeschaltet, sodass die Luziferase aktiv exprimiert werden kann. Die Luziferase-Aktivität lässt sich durch die Durchführung eines Luziferase-Assays erfassen. Die Stärke der Luziferase-Aktivität ist abhängig von der Effizienz des Einbaus des Donor-Template in das Genom der Zelllinie. Durch die Messung der Luziferase-Aktivität ist die Bestimmung der Effizienz des Einbaus der einzubringenden Gensequenz durch die Induktion des DSB-Reparaturmechanismus möglich.

## **1.7 Zielsetzung**

Das Ziel dieser Doktorarbeit ist es ein Reportersystem zur Testung und Effizienzsteigerung des dritten DNA-DSB-Reparaturmechanismus MMEJ in der Zellkultur zu etablieren. Durch den Einsatz von CRISPR/Cas9 sollen gezielt Doppelstrangbrüche induziert werden, die die körpereigenen DNA-DSB-Reparaturmechanismen stimulieren. Durch die Verwendung von mikrohomologen Sequenzen im Bereich von 10 bis 30 bp soll der körpereigene DSB-Reparaturmechanismus MMEJ induziert werden und dessen Aktivität unter Variation der mhS untersucht werden.

Da die körpereigenen DSB-Reparaturmechanismen untereinander konkurrieren soll des Weiteren untersucht werden, ob durch die gezielte Suppression der einzelnen DSB-Reparaturmechanismen die Aktivität des Reparaturmechanismus MMEJ beeinflusst bzw. erhöht werden kann.

Dieses Reportersystem wurde in dieser Arbeit speziell für die ORF15-Region des *RPGR*-Gens etabliert und bietet durch den zielgerichteten Einsatz von CRISPR/Cas9 und der Induktion des körpereigenen DNA-DSB-Reparaturmechanismus MMEJ einen möglichen therapeutischen Ansatz für die XLRP.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Die für die Anfertigung dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind alphabetisch mit Angabe des Herstellers in Tab. 1 aufgeführt.

Chemikalie	Hersteller
Accutase	<i>eBioscience</i> (Frankfurt am Main)
Agarose LE	<i>Genaxxon Bioscience</i> (Ulm)
Borsäure	<i>Merk</i> (Darmstadt)
DMSO	<i>Merk</i> (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat	<i>Roth</i> (Karlsruhe)
DMEM	<i>PAN-Biotech</i> (Aidenbach)
EDTA	<i>Roth</i> (Karlsruhe)
Ethanol	<i>Roth</i> (Karlsruhe)
FKS	<i>PAN-Biotech</i> (Aidenbach)
h-Coelenterazine (#301)	<i>NanoLight Technology</i> (USA)
Isopropanol	<i>Roth</i> (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	<i>Roth</i> (Karlsruhe)
L-Glutamin	<i>Biochrom</i> (Berlin)
Luria Broth Base	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe)
Natriumchlorid	<i>Merk</i> (Darmstadt)
Polyethylenimin (PEI)	<i>Polyscience AG</i> (Cham (CH))
Select Agar	<i>Invitrogen</i> (Karlsruhe)
Stickstoff (flüssig)	<i>Linde</i> (München)
TRIS	<i>Roth</i> (Karlsruhe)

**Tab. 1: Chemikalien**

#### 2.1.2 Enzyme

Die in Tab. 2 und Tab. 3 angegebenen Enzyme wurden unter Herstellerangaben und unter Beachtung der Kompatibilität der einzelnen Enzyme sowie ihrer dazugehörigen Puffer verwendet. Die verwendeten Restriktionsenzyme ebenso wie die mitgelieferten Puffer wurden von der Firma *New England Biolabs (NEB)* hergestellt.



Enzym	Erkennungssequenz
AvrII	5'... C↓CTAG G ... 3' 3'... G GATC↑C... 5'
BamHI	5'... G↓GATC C ... 3' 3'... C CTAG↑G... 5'
NheI	5'... G↓CTAG C ... 3' 3'... C GATC↑G... 5'
PciI	5'... A↓CATG T ... 3' 3'... T GTAC↑A ... 5'
XhoI	5'... C↓TCGA G ... 3' 3'... G AGCT↑C ... 5'

Tab. 2: Restriktionsenzyme

Enzym/Marker	Hersteller
Gene Ruler 1 kb DNA Ladder	<i>Fermentas</i> (St.Leon-Rot)
Shrimp Alkalische Phosphatase	<i>New England Biolabs</i> (Frankfurt am Main)
T4 DNA-Ligase	<i>New England Biolabs</i> (Frankfurt am Main)

Tab. 3: Weitere Enzyme und Marker

### 2.1.3 Primer und Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide und Primer zur Sequenzierung sind in den nachfolgenden Tabellen mit ihren Sequenzen in 5' → 3' Richtung aufgeführt. Die Primer, von der Firma *Metabion* bezogen, wurden 1:10 auf eine Gebrauchskonzentration von 10 µM verdünnt.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
MY-287	CTAGCCCTTGCTCACCATGGTGGCGCTCCAAAGTTCGATCTTAT	15 bp L
MY-288	GATCATAAGATCGAACTTTGGAGCGCCACCATGGTGAGCAAGGG	15 bp L
MY-289	TCGAGACTTTATCTGGAATTGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGG	15 bp R
MY-290	CATGCCCGGACACGCTGAACTTGTGGCCAATTCAGATAAAGTC	15 bp R
MY-291	CTAGCCCTTGCTCACCATGGTGGCGCTCCAACCAGATTTTTCCCAA AGTTCGATCTTAT	30 bp L
MY-292	GATCATAAAGATCGAACTTTGGGAAAAATCTGGTTGGAGCGCCAC CATGGTGAGCAAGGG	30 bp L
MY-293	TCGAGACTTTATCTGGAATTGAAGTAACAGGGAAGGGCCACAAG TTCAGCGTGTCCGGG	30 bp R
MY-294	CATGCCCGGACACGCTGAACTTGTGGCCCTTCCCTGTTACTTCAAT TCCAGATAAAGTC	30 bp R
MY-320	CTAGCCCTTGCTCACCATGGTGGCGCTCTTCGATCTTAT	10 bp L
MY-321	GATCATAAGATCGAAGAGCGCCACCATGGTGAGCAAGGG	10 bp L
MY-322	TCGAGACTTTATCTGGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGG	10 bp R
MY-323	CATGCCCGGACACGCTGAACTTGTGGCCAGATAAAGTC	10 bp R

Tab. 4: Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')
MY-67	GAAGCATTTATCAGGGTTATTGTC
MY-301	CCAGCACGTTTCATTTGCTTGCAGCG
MY-302	CAGAATTTGCCTGGCGGCAGTAGC
Wolle 610	GACTATCATATGCTTACCGT

Tab. 5: Primer zur Sequenzierung

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen sind der folgenden Tab. 6 zu entnehmen.

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
Ladepuffer 5 x Loading Dye	<i>Fermentas</i> (St.Leon-Rot)
PBS	pH = 7,4 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat 1,8 mM Kaliumhydrogenphosphat
PEI-Mix	pH = 7 0,1 g/l PEI, 150 mM NaCl
TBE	pH = 8,0 89 mM TRIS, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA

Tab. 6: Puffer und Lösungen

### 2.1.5 Medien für die Bakterienkultur

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium): 25 g/l Luria Broth Base (w/v)

LB-Agar: LB-Medium, 15 g/l Select Agar (w/v)

### 2.1.6 Medien für die eukaryotische Zellkultur

Die verwendeten Medien für die eukaryotische Zellkultur und deren Zusammensetzung werden in Tab. 7 aufgeführt.

Medium	Zusammensetzung
DMEM +++	DMEM 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) 10 % FKS (v/v) 4 mM L-Glutamin
DMEM +++ mit Geneticin	DMEM 1 % Penicillin/Streptomycin (v/v) 10 % FKS (v/v) 4 mM L-Glutamin 5 % Geneticin (v/v)
Einfriermedium	90 % FKS (v/v) 10 % DMSO (v/v)

Tab. 7: Medien für die eukaryotische Zellkultur

### 2.1.7 Antibiotika

Zur Selektion prokaryotischer und eukaryotischer Kulturmedien wurden die in Tab. 8 aufgeführten Antibiotika mit der angegebenen Konzentration verwendet.

Antibiotikum	Konzentration	Hersteller
Ampicillin	100 µg/ml	<i>Sigma</i> (München)
Geneticin	500 µg/ml	<i>Life Technologies</i> (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin	100 µg/ml	<i>PAN-Biotech</i> (Aidenbach)
Tetrazyklin	10 µg/ml	<i>Roth</i> (Karlsruhe)

Tab. 8: Antibiotika

### 2.1.8 Kits

Die in Tab. 9 angegebenen Kits mit den mitgelieferten Puffern wurden gemäß Herstellerangaben verwendet.

Kit	Verwendung	Hersteller
NucleoSpin Gel and PCR-Clean-up	Gel/PCR-Aufreinigung	<i>Macherey-Nagel</i> (Düren)
NucleoSpin QuickPure Mini Kit	Mini-Präparation	<i>Macherey-Nagel</i> (Düren)
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Midi-Präparation	<i>Qiagen</i> (Hilden)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Maxi-Präparation	<i>Qiagen</i> (Hilden)
Renilla Luciferase Assay System	Luziferase-Aktivitätsmessung	<i>Promega</i> (Mannheim)

Tab. 9: Kits

### 2.1.9 Geräte

In Tab. 10 sind alle Geräte aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Gerät	Hersteller	Gerät	Hersteller
Autoklav	<i>Systec</i> (Wettenberg)	Multiporator	<i>Eppendorf</i> (Wesseling-Berzdorf)
BioDocAnalyse	<i>Biometra</i> (Göttingen)	Pipettierhilfe	<i>Hirschmann Laborgeräte</i> (Eberstadt)
BioPhotometer	<i>Eppendorf</i> (Wesseling-Berzdorf)	Schüttler	<i>Sartorius AG</i> (Göttingen)
Eismaschine	<i>Scotsman</i> (Berlin)	Thermoblock	<i>Biometra</i> (Göttingen)
Elektrophorese-Kammer	<i>Biometra</i> (Göttingen)	Thermocycler	<i>Biometra</i> (Göttingen)
Elektrophorese Power Supply	<i>Biometra</i> (Göttingen)	Vortexer	<i>VWR International</i> (Darmstadt)
Gasbrenner Fireboy	<i>Integra Biosciences</i> (Zizers)	Waage	<i>Ohaus</i> (Zürich)
Inkubator	<i>Binder</i> (Tuttlingen)	Wasseraufbereitungssystem	<i>Sartorius AG</i> (Göttingen)
Laminar Flow	<i>Thermo Scientific</i> (Schwerte)	Wasserbad	<i>Julabo</i> (Seelbach)
Lichtmikroskop	<i>VWR International</i> (Darmstadt)	Zentrifuge 1-15PK, AK 15	<i>Sigma</i> (München)

Multimode-Mikroplattenreader	Tecan (Männedorf)	Zentrifuge Micro 200	Hettich Lab Technology (Tuttlingen)
Minizentrifuge	VWR International (Darmstadt)		

Tab. 10: Geräte

## 2.1.10 Biologische Materialien

### 2.1.10.1 Vektoren und Plasmide

Nachfolgend werden die Vektoren und Plasmide aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden:

**pSQT1313 Luc 14:** Ausgangsvektor zur Klonierung der Donor-Plasmide mit unterschiedlich langen mikrohomologen Bereichen (10 bp, 15 bp und 30 bp), die die enthaltene Luziferase beidseitig flankieren. Dieser Vektor verfügt über eine Ampicillin-Resistenz und einen U6-Promotor.

**pSQT1313-Luc-20bp-Tg1/Tg2:** Donor-Vektor mit Luziferase-Gen, welches links und rechts mit 20 bp langen mikrohomologen Bereichen flankiert ist, welche komplementär zu der DNA-Sequenz der *target sites* T-g1 und T-g2 sind. Die PAM-Sequenz befindet sich direkt angrenzend an der gRNA Zielsequenz. Die Expression der Luziferase erfolgt durch den enthaltenen U6-Promotor.

**pSQT1313 gRNA-g1/g2:** Vektor zur Expression der gRNA g1 und g2, die in Kombination mit Cas9 an den *target sites* T-g1 und T-g2 der Ziel-DNA schneiden.

**px459-gRNA-g3-Cas9:** Expressionsvektor für Cas9 und gRNA g3, die im Bereich der mhS links des Luziferase-Gens an der *target site* T-g3 schneidet. Der px459 Vektor enthält zur Selektion in *E.coli*-Zellen eine Ampicillin-Resistenz. Zur Expression von gRNA g3 und Cas9 enthält dieser Vektor einen CMV-Promotor.

**pSQT1313-gRNA-X-target-knockout:** Dieser Vektor dient der Expression von zwei gRNA mit der PAM-Sequenz, die elementar für Cas9 sind, um einen DSB hervorzurufen, der in dem genomischen Bereich eines Proteins zu dessen Knockout führt. Das X steht für das jeweilige Protein, welches supprimiert werden soll: Ligase 1, RAD51, Ligase 3, 53BP1, Ligase 4 und XRCC6.

**pcDNA Luc:** Expressionsvektor, der durch den enthaltenden CMV-Promoter zu einem hohen Level der Expression der Luziferase in der Zelle führt.

### **2.1.10.2 Zelllinie**

Zur Durchführung der Transfektionen wurde in dieser Arbeit eine stabile HEK293-Zelllinie verwendet. Diese enthält eine durch *random integration* eingebrachte Wildtyp-Sequenz der ORF15-Region des murinen *RPGR*-Gens und einen CMV-Promoter zur Expression der integrierten Wunschsequenz. HEK293-Zellen sind gut kultivierbar und wachsen adhärent in einer Zellschicht. Durch die Verwendung der Enzym-Mixtur Accutase können die Zellen schonend vom Untergrund abgelöst werden. Des Weiteren ist diese Zelllinie gut zugänglich für Transfektions-Experimente. Zur Selektion enthält diese HEK293<sub>mORF15</sub>-Zelllinie eine Geneticin-Resistenz.

### **2.1.10.3 E.coli-Stämme**

Zur Transformation wurden folgende elektrokompetente *E.coli*-Zellen verwendet:

XL-1 Blue: Hersteller: *Stratagene*, La Jolla (USA)

One-Shot TOP-10: Hersteller: *Invitrogen*, Karlsruhe

## **2.2 Mikrobiologische Methoden**

### **2.2.1 Herstellung elektrokompetenter E.coli-Zellen**

Zur Transformation von DNA-Plasmiden erfolgte die Herstellung von XL-1-Blue elektrokompetenten *E.coli*-Zellen. Dafür wurden am Vortag 2 x 5 ml LB-Medium, welches 0,5 µl Tetrazyklin (1 M) enthält, aus dem XL-1-Blue Glycerin-Stock angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Außerdem wurden HEPES-Puffer und 10%iges Glycerin vorbereitet und bei 4 °C über Nacht im Kühlschrank vorgekühlt.

Am Tag der Herstellung wurden die Übernachtskulturen in jeweils 200 ml LB-Medium (mit 20 µl Tetrazyklin) überführt und für ca. 4 Stunden bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Unter Verwendung des OD 600-Programm des Photometers konnte durch die Messung der optischen Dichte die Zelldichte der Suspensionskultur bestimmt werden. Die optische Dichte der Suspensionskultur gemessen bei 600 nm sollte zwischen 0,6 und 0,8 liegen. Bei Erreichen dieses Wertes, wurden die Suspensionskulturen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen abgefüllt und zusammen mit dem vorgekühlten HEPES-Puffer und 10%igem Glycerin auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Suspensionskulturen bei 5100 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt. Es wurden 50 ml gekühlter HEPES-Puffer (1mM) hinzugegeben und das Pellet wurde vollständig resuspendiert. Die Resuspensionen wurden wieder unter denselben Konditionen zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mehrmals wiederholt, jedoch wurden jeweils die im

Folgenden aufgezählten Lösungen zu dem Pellet hinzugegeben: 25 ml gekühlter HEPES-Puffer (1 mM), 10 ml gekühltes 10%iges Glycerin, 5 ml gekühltes 10%iges Glycerin, 5 ml gekühltes 10%iges Glycerin und 0,5 ml gekühltes 10%iges Glycerin. Alle Ansätze wurden vereinigt und jeweils 50 µl in 1,5 ml Eppendorf Gefäße aliquotiert. Die Zellen wurden dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### **2.2.2 Transformation elektrokompenter *E.coli*-Zellen**

Die Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*-Zellen erfolgte mithilfe der Elektroporation. Dafür wurden 50 µl der elektrokompenten *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, 2 µl der möglichst salzfreien Plasmid-DNA hinzugegeben und resuspendiert. Der Ansatz wurde in eine zuvor auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette luftblasenfrei eingeführt und die Küvette wurde nach dem Abwischen der Elektrodenoberflächen in den Elektroporator gestellt. Der Ansatz wurde einem Hochspannungssignal von 2000 V für maximal 5 ms ausgesetzt und sofort in 1 ml LB-Medium resuspendiert. Der Ansatz wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube pipettiert und für 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Bei der Verwendung von XL-1 elektrokompenten *E.coli*-Zellen, wurden die Bakterienzellen nach der Inkubation für 1 min bei 5000 rpm pelletiert. Anschließend wurde der Überstand bis auf 200 µl verworfen und das Pellet wurde in dem restlichen LB-Medium vollständig resuspendiert. Davon wurden dann 75 µl auf eine Selektivagarplatte ausgestrichen. Bei der Verwendung von One Shot TOP-10 elektrokompenten *E.coli*-Zellen wurde ohne Zentrifugation direkt 50 µl des Transformations-Ansatzes auf eine Selektivagarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden anschließend über Nacht für 16-18 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### **2.2.3 Plasmid-DNA Aufreinigung durch Mini-Präparation**

Für die Plasmid-DNA Aufreinigung ohne Kit wurde am Vortag eine einzelne Kolonie mithilfe einer Pipettenspitze von der Selektivagar-Platte ausgewählt, in 3 ml LB-Medium mit 0,1 % Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Am Folgetag konnte die Plasmid-DNA aus der Flüssigkultur gewonnen werden. Dafür wurden 2 ml der Übernachtskultur in ein 2 ml Eppendorf-Tube überführt und für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes, wurde das Zellpellet in 100 µl Resuspensions-Puffer S1 vollständig gelöst. Zur Suspension wurde anschließend 100 µl Lysis-Puffer S2 hinzugefügt und das Eppendorf-Tube wurde sechsmal invertiert. Danach wurden 100 µl des Neutralisationspuffers S3 hinzugegeben und das Eppendorf-Tube wurde weitere sechsmal invertiert. Anschließend wurden die entstandenen

Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 min von der Suspension getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und es wurden 700 µl -20 °C kalter Ethanol (absolut) zur Fällung der DNA hinzugegeben und nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 4 °C mit maximaler Geschwindigkeit für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 200 µl 70%iger Ethanol hinzugegeben und für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet wurde an der Luft getrocknet bis das Ethanol vollständig verdunstet war. Anschließend wurde das DNA-Pellet in 30 µl ddH<sub>2</sub>O vollständig gelöst.

#### **2.2.4 Plasmid-DNA Aufreinigung mittels Kit (Mini, Midi, Maxi)**

Für die schnellere und saubere Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen wurden die in Tab. 9 angegeben Kits gemäß Herstellerangaben und mit den vorgesehenen Puffern verwendet. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte beim Mini-Kit zweimal mit jeweils 30 µl ddH<sub>2</sub>O und beim Midi-Kit zweimal mit jeweils 200 µl. Das bei der Aufreinigung der Plasmid-DNA mithilfe des Maxi-Kits entstandene DNA-Pellet wurde in 300 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

#### **2.2.5 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration**

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch durch die Messung der Extinktion der DNA-Probe bei 260 nm. Dafür wurde 1 µl der zu bestimmenden Plasmid-DNA im Verhältnis 1:10 in ddH<sub>2</sub>O verdünnt und in eine dafür vorgesehene Küvette pipettiert.

Durch die Bildung des Verhältnisses der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm kann die Reinheit der DNA bestimmt werden. Das ideale  $E_{260/280}$  Ratio der DNA sollte zwischen 1,6 und 1,8 liegen. Sind die Werte größer als 1,8 ist dies hinweisend für eine Verunreinigung durch RNA, bei kleineren Werten kann es sich um eine Verunreinigung der DNA durch Proteine handeln.

#### **2.2.6 Herstellung von Glycerin-Stocks**

Für die langfristige Aufbewahrung von DNA-Plasmiden ist es nützlich Glycerin-Stocks herzustellen. Durch diese Art der Speicherung des DNA-Plasmids wird keine erneute Transformation benötigt, da das gewünschte DNA-Plasmid schon in den Bakterien eingebracht ist. Durch die Zugabe von Glycerin zu der Bakterienkultur kommt es zu einer Stabilisierung der eingefrorenen Bakterien, indem die Zellmembran vor Schädigungen geschützt und die Zellen am Leben erhalten werden.

Für die Herstellung von Glycerin-Stocks werden 500 µl von der über-Nacht-Kultur des am Vortag angeimpften DNA-Plasmids in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt. Das Kryoröhrchen wird mit 100%igem Glycerin aufgefüllt und geschüttelt bis keine Phasentrennung mehr sichtbar ist. Der Glycerin-Stock wird dann bei -80 °C eingefroren und bei dieser Temperatur gelagert.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Klonierungen

Zur Herstellung der benötigten DNA-Plasmide wurden in dieser Arbeit das Klonierungs-Verfahren der Restriktion und Ligation angewandt.

#### 2.3.1.1 Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau wurden die in Tab. 2 angegebenen Restriktionsenzyme nach Herstellerangaben verwendet. Die eingesetzten Restriktionsenzyme erzeugen die für die Einbringung von hybridisierten Oligonukleotide notwendigen überlappenden Enden in der DNA. Der Ansatz des Restriktionsverdau wurde nach dem in Tab. 11 angegebenen Schema pipettiert. Dabei wurde auf die Kompatibilität der jeweiligen Restriktionsenzyme und des verwendeten Puffers geachtet. Die Inkubation des 20 µl Restriktionsverdau-Ansatzes erfolgte im Wasserbad bei 37 °C für 1 h. Danach wurde der Restriktionsverdau durch Einfrieren gestoppt.

	<b>Einzelverdau</b>	<b>Doppelverdau</b>
Plasmid-DNA	1000 ng	1000 ng
Enzym 1	1,5 µl	1,5 µl
Enzym 2	-	1,5 µl
10 x Puffer	2 µl	2 µl
dd H <sub>2</sub> O	ad 20 µl	ad 20 µl
<b>Gesamt</b>	<b>20 µl</b>	<b>20 µl</b>

**Tab. 11: Ansatz des Einzelverdau und Doppelverdau**

#### 2.3.1.2 Dephosphorylierung von DNA

Zur Reduktion der Wahrscheinlichkeit der Re-Ligation der geschnittenen Plasmide wurden die 5'-Phosphat Gruppe mithilfe einer Phosphatase abgespalten. Dafür wurde 1 µl der Shrimp Alkalischen Phosphatase zu dem Restriktionsverdau hinzugegeben und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeaktivierung bei 65 °C für 5 min.



### 2.3.1.3 Hybridisierung der Oligonukleotide

Die Herstellung des Inserts für den Backbone erfolgte durch Hybridisierung der in Tab. 4 angegebenen Oligonukleotide. Dafür wurden wie in Tab. 12 angegeben 8 µl MY-*n* und 8 µl MY-*n+1* in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube gegeben. Dieser Ansatz wurde mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 µl Volumen aufgefüllt, bei 90 °C für 10 min inkubiert und danach für 30 min bei RT inkubiert.

MY- <i>n</i>	8 µl
MY- <i>n+1</i>	8 µl
ddH <sub>2</sub> O	4 µl
Gesamt	20 µl

Tab. 12: Hybridisierung der Oligonukleotide

### 2.3.1.4 Ligation

Die Ligation der zueinander kompatiblen, überhängenden Enden der Plasmid-DNA und des DNA-Inserts erfolgt enzymatisch durch die T4-Ligase. Diese Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe kompatibler Enden doppelsträngiger DNA. Der Ansatz der Ligation wurde nach dem in Tab. 13 angegebenen Schema pipettiert und anschließend bei 37 °C für 10 min im Wasserbad inkubiert. Ein zweiter Ansatz der Ligation wurde über Nacht bei 16 °C im Cycler inkubiert. Nach der angegebenen Inkubationszeit erfolgte die Zugabe von 0,5 µl des Restriktionsenzym 2 und eine erneute Inkubation des Ansatzes für 30 min bei 37 °C im Wasserbad. Anschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch das Einfrieren des Ansatzes. Bei korrektem Einbau des DNA-Inserts in den Backbone-Vektor entfällt die Schnittstelle für das Restriktionsenzym 2. Durch die Zugabe des Restriktionsenzym 2 werden so Plasmide, in denen das DNA-Insert nicht korrekt eingebaut wurde, linearisiert und haben dadurch eine geringere Wahrscheinlichkeit nach der anschließenden Transformation in elektrokompetente *E.coli*-Zellen repliziert zu werden.

Verdau	100 ng
Insert	5 µl
T4-Ligase	1 µl
T4-Ligase-Puffer	2 µl
ddH <sub>2</sub> O	ad 20µl
Gesamt	20 µl

Tab. 13: Ansatz der Ligation

### 2.3.2 Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung der DNA erfolgte extern durch die Firma *Microsynth Seqlab* in Göttingen. Dazu wurden die zu sequenzierenden Proben unter Verwendung der in Tab. 14 angegebenen Sequenzierungsprimer nach dem folgenden Ansatz vorbereitet:

Plasmid-DNA	1000 ng
ddH <sub>2</sub> O	ad 10 µl
Primer	2 µl [10 µM]
Gesamt	12 µl

Tab. 14: Ansatz zur Sequenzierung

### 2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Verwendung von GeneRuler 1 kb als Größenmarker kann doppelsträngige DNA im Bereich von 250 bis 10.000 bp elektrophoretisch untersucht werden. Durch die Elektrophorese werden DNA-Fragmente nach ihrer Größe geordnet aufgetrennt.

Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit dem Gel-Ladepuffer versetzt und jeweils 7 µl in die Taschen eines 1%igen Agarose-Gel pipettiert. Zur Herstellung des Agarose-Gels wurde Agarose in 1xTBE-Puffer mit dem Gelfarbstoff GelRed nach Herstellerangaben versetzt. Die Auftrennung der DNA nach ihrer Größe erfolgte durch Elektrophorese unter der Verwendung von 1xTBE als Ladepuffer und unter Anlage einer Feldstärke von 10 V/cm für 1 h. Der Gelfarbstoff GelRed bindet durch Interkalation zwischen den hydrophoben Basen der DNA die doppelsträngige DNA und führt zu strukturellen Veränderungen, die die doppelsträngigen DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar machen. Die Dokumentation erfolgte mittels der *BioDocAnalyze* Software.

### 2.3.4 DNA-Extraktion aus Agarose-Gel

Zur Extraktion der gewünschten DNA-Bande aus dem Agarose-Gel wurde das *Nucleo Spin Clean-Up* Kit gemäß Herstellerangaben verwendet. Vorher wurde die Bande mit der gewünschten Größe des DNA-Fragmentes unter einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elution der DNA erfolgte mit ddH<sub>2</sub>O.

## 2.4 Zellbiologische Methoden

### 2.4.1 Zellkultur

Die HEK293<sub>mORF15</sub> Zellen wurden in einem Brutschrank unter speziellen Konditionen (37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 10 % CO<sub>2</sub>-Gehalt) auf Zellkulturschalen (Ø 10 cm)

gehalten. Die Zellen wurden durch die Nutzung einer Laminar Flow Werkbank unter sterilen Bedingungen passagiert. Dazu wurde den adhären wachsenden Zellen das Medium abgenommen und nach Zugabe von 2 ml Accutase für 10 min im Brutschrank inkubiert. Durch die Verwendung der Accutase erfolgt eine schonende Lösung der Zellen vom Boden der Zellplatte. Nach der Inkubationszeit wurde der Zellplatte 8 ml DMEM hinzugegeben und die Zellen wurden resuspendiert. Es wurden dann 1-2 ml der Zellsuspension auf eine neue Zellkulturschale (Ø 10 cm) gegeben und diesen wurden mit DMEM auf 10 ml Volumen aufgefüllt.

Für die Kultivierung von HEK293<sub>mORF15</sub> Zellen wurde aufgrund der in den Zellen enthaltenen Geneticin-Resistenz DMEM +++ mit Geneticin als Kultivierungsmedium verwendet.

#### **2.4.2 Kryokonservierung von Zellen**

Zur längerfristigen Aufbewahrung von HEK293<sub>mORF15</sub> Zellen, wurden diese Zellen in flüssigen Stickstoff eingefroren. Dazu wurde auf die Zellen einer gut bewachsenen 10 cm Zellkulturschale 2 ml Accutase gegeben und bei 37 °C für 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 8 ml DMEM vom Plattenboden gelöst und im Medium resuspendiert. Nach Überführung der Zellsuspension in ein 15 ml Falcon, wurde die Zellsuspension bei 125 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 10 ml Einfriermedium resuspendiert und dann in 1 ml Kryoröhrchen gefüllt. Nach Lagerung der Kryoröhrchen für 24 h bei -80 °C in Isopropanol, wurden diese in -196 °C flüssigem Stickstoff gelagert.

#### **2.4.3 Auftauen von Zellen**

Die Kryoröhrchen mit den eingefrorenen Zellen wurden in ein Wasserbad gegeben und bei 37 °C aufgetaut. Die Zellen wurden in eine Glaspipette, die 5 ml DMEM+++ Geneticin enthält, hineingezogen, resuspendiert und auf eine Zellkulturschale gegeben. Diese wurde dann mit dem Medium DMEM+++ Geneticin auf 10 ml aufgefüllt. Da in dem Einfriermedium für die Zellen DMSO enthalten ist, konnten die Zellen erst nach zwei- bis dreimaligen Passagieren für Transfektionen verwendet werden.

#### **2.4.4 Auszählen von Zellen**

Zur Quantifizierung von Zellen in der Suspension wurde die Neubauer-Zählkammer verwendet. Dafür wurden die zu zählenden Zellen 1:1 im Medium verdünnt und 10 µl der Zellsuspension unter das Deckglas auf die Neubauer-Zählkammer pipettiert. Es erfolgte

die Auszählung der Zellen in den vier Großquadraten. Anschließend wurde unter Hinzunahme des Verdünnungsfaktors die Zellzahl nach der unten angegebenen Formel berechnet.

$$\frac{(GQ\ 1 + GQ\ 2 + GQ\ 3 + GQ\ 4)}{4} \times 10^4 \times VF = \text{Zellzahl pro ml}$$

*GQ ... Großquadrate, VF ... Verdünnungsfaktor*

### 2.4.5 Transfektion

Mittels Transfektion wurde die Plasmid-DNA in die HEK293<sub>mORF15</sub> Zellen eingebracht. Als Transfektion-Reagenz wurde PEI-Mix genutzt (0,1 g/l PEI, 150 mM NaCl, pH 7 mit HCl).

24 h vor der Transfektion wurden die Zellen von der Zellkulturschale (Ø 10 cm) mit 2 ml Accutase und 8 ml DMEM +++ ohne Geneticin abgelöst und mithilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Es wurden dann 100.000 Zellen pro Well in Six-Well-Platten ausplattiert. Jedes Well wurde mit 3 ml DMEM +++ ohne Geneticin aufgefüllt. Es erfolgte eine 24-stündige Inkubation der ausplattierten Zellen.

Am Tag der Transfektion wurde von den Six-Well-Platten das alte Medium abgenommen und 3 ml frisches DMEM zu den Zellen dazugegeben. Dann wurde der DNA-PEI-Transfektionsansatz vorbereitet. Dazu wurden zu 100 µl NaCl (150 mM) die Plasmid-DNA von maximal 5 µg hinzugegeben. Unter Beachtung der maximalen Inkubationszeit von 10 min für den PEI-Mix, wurde 200 µl PEI-Mix zu den DNA-Ansätzen hinzugefügt. Der DNA-PEI-Transfektion-Ansatz wurde resuspendiert und direkt auf die Zellen geträufelt. Die Platte wurde leicht geschwenkt und dann in den Inkubator gestellt.

Nach 4-6 h Inkubationszeit wurde das Medium mit einer sterilen Glaspipette abgenommen und 3 ml frisches DMEM +++ ohne Geneticin vorsichtig hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 48 h nach Zugabe der DNA wurden die Zellen für die Proteinextraktion geerntet.

Donor-Plasmid Luciferase mit mhS	2 µg
gRNA g1 + g2	1 µg
gRNA g3 + Cas9	500 ng
Gesamt	3,5 µg

**Tab. 15: Ansatz der Variation der Länge der Mikrohomologien**

Donor-Plasmid Luciferase mit mhS	2 µg
gRNA g1 + g2	1 µg
gRNA g3 + Cas9	500 ng
Protein Knockout	1 µg
Gesamt	4,5 µg

**Tab. 16: Ansatz der Suppression einzelner Proteine der DSB-Reparaturmechanismen**

### 2.4.6 Proteinextraktion

Die Proteinextraktion der Zellen erfolgte nach einer Inkubationszeit von 48 h unter Verwendung des Promega Cell Culture Kit gemäß Herstellerangaben. Zur Vorbereitung der Proteinextraktion wurde die *Luciferase Cell Culture Lysis* Reagenz 5:1 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt, resuspendiert und auf Eis gelagert.

Für die Proteinextraktion wurde den inkubierten Zellen das Medium abgenommen. Nach dem einmaligen Waschen der Zellen mit 1 ml 1xPBS (pH=7,4) wurden jeweils 250 µl der vorbereiteten Lysis-Reagenz auf jedes Well gegeben. Nach kurzer Wartezeit kam es zum Zellaufschluss und die Zellen wurden mithilfe von Zellschabern vom Plattenboden entfernt und die homogene Lösung wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Ein zusätzlicher Zellaufschluss erfolgte durch zweifache Stickstoff-Behandlung nach dem *freeze and thaw* Prinzip. Dafür wurden die Zellen zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut. Das Zell-Lysat wurde bei maximaler Geschwindigkeit bei 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und für die Luziferase-Aktivitätsmessung auf Eis gelagert.

### 2.4.7 Luziferase-Aktivitätsmessung

Die Luziferase-Aktivitätsmessung erfolgte unter Verwendung des *Renilla Luciferase Assay System* von Promega nach deren Herstellangaben. Als Injektor wurde das Tecan infinite M1000 Pro genutzt. Das für den Luziferase-Assay benötigte Substrat #301 h-Coelenterazine wurde zuvor in 500 µl Nano-Fuel-Solvent gelöst. Die Lagerung des Substrats erfolgte lichtgeschützt. Für die Luziferase-Aktivitätsmessung wurde das gelöste Substrat 1:100 in steriles 1xPBS (pH=7,4) verdünnt. Von den zu messenden Proben wurden jeweils 20 µl luftblasenfrei auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Es erfolgte eine Dreifach-Bestimmung jeder einzelnen Probe. Diese Platte wurde dann in das Tecan-Gerät eingeführt und das Programm *i-Controll* wurde gestartet. Zur Nutzung des Injektors musste dieser zuvor mit 1,5 ml des in PBS verdünnten Substrats gespült werden. Die Injektion und Messung der Luziferase-Aktivität erfolgte automatisch durch die Nutzung

des Programms *i-Controll*. Es erfolgte die Injektion von 100 µl Substrat pro Well und die Messung der Lumineszenz nach 1000 ms.

## 2.5 Statistische Analyse

Die Messung der Luziferase-Aktivität wurde im Luziferase-Assay als Dreifachbestimmung mit Berechnung des Mittelwertes des jeweiligen Ansatzes durchgeführt. Die Berechnung der relativen Luziferase-Aktivität erfolgte durch Normierung der Werte auf die Positivkontrolle. Die Positivkontrolle bildete in den Versuchen die Transfektion eines Plasmides, welches bei erfolgreicher Transfektion die auf dem Plasmid enthaltene Luziferase exprimiert. Auf eine Korrektur der Luziferase-Aktivitätswerte mittels Subtraktion der Negativkontrolle wurde verzichtet, da die Negativkontrolle im Vergleich zu den Messwerten als vernachlässigbar gering bewertet wurde. Insgesamt wurden die Transfektionsansätze viermal durchgeführt (n=4). Die berechneten relativen Luziferase-Aktivitäten wurden zur Signifikanztestung mithilfe von Sigmaplot unter Verwendung der Holm-Sidak-Methode paarweise multipel verglichen. Der p-Wert wurde wie in den Graphen gekennzeichnet für jeden Datensatz separat festgelegt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Setup des Reportersystems für die Fragestellung der Dissertation

Für die Fragestellung der Dissertation war zunächst die Anpassung des bereits in Kapitel 1.6 beschriebenen Reportersystems notwendig, da der Einbau der Zielsequenz in Genom über die Induktion des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ erfolgen soll. Da MMEJ vor allem im Bereich von 5-30 bp langen mikrohomologen Sequenzen stattfindet, wurden zur Integration des die Luziferase enthaltenden Vektors die Luziferase flankierende mikrohomologe Sequenzen von 10, 15, 20 und 30 bp Länge ausgewählt.

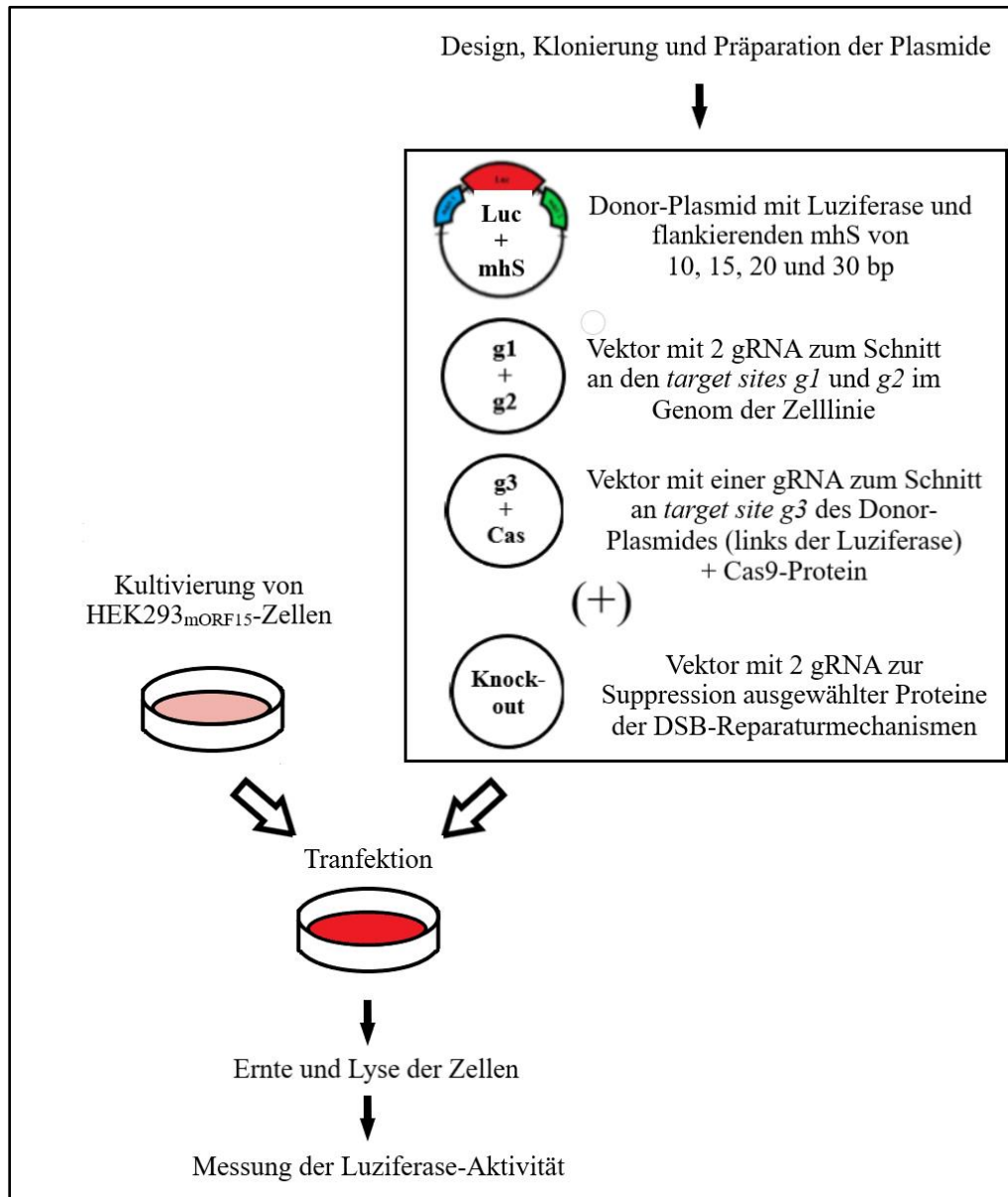
Zur Durchführung der Experimente waren folgende Arbeitsschritte notwendig, die in Abb. 14 dargestellt sind:

Es erfolgte die Kultivierung der stabilen Zelllinie HEK293<sub>mORF15</sub>. Parallel erfolgte das Design und die Klonierung der Donor-Plasmide, welche die Luziferase-Gensequenz flankiert von mhS der Länge 10, 15, 20 und 30 bp enthalten. Nach Präparation der für die Transfektion notwendigen Plasmide erfolgte die Transfektion.

Für die Funktionalität dieses Reportersystems war die Transfektion folgender Plasmide notwendig:

Zum einen wird das die promotorlose Luziferase enthaltende Donor-Plasmid mit Variation der mhS von 10, 15, 20, und 30 bp benötigt. Zum anderen ist ein Plasmid erforderlich, welches die gRNA g1 und gRNA g2 für das Schneiden der Endonuklease Cas9 im Genom der Zelllinie enthält. Für diese beiden Plasmide wurde der Vektor pSQT1313 als Ausgangsvektor für die Klonierungen gewählt. Des Weiteren ist die Transfektion des die gRNA g3 und die Endonuklease Cas9 enthaltenden Plasmids erforderlich. Diese sind auf einem px459-Vektor enthalten. In Bezug auf Abb. 13 wäre das Einbringen eines die gRNA g4 enthaltenden Plasmids notwendig. In vorherigen Arbeiten konnte jedoch gezeigt werden, dass die Transfektion ohne das Einbringen des vierten Vektors, der die gRNA g4 enthält, eine höhere Luziferase-Aktivität aufzeigt als die Quadrupel-Transfektion, die zum Schneiden an den *target sites* g1-g4 führt (Müller 2016). Aufgrund dieser Ergebnisse und der Erhöhung der Wahrscheinlichkeit des simultanen Einbringens der Plasmide in die Zelle durch die Reduktion der zu transfizierenden Plasmide wurde eine Tripel-Transfektion durchgeführt und auf die Transfektion des die gRNA g4 enthaltenden Vektors verzichtet.

Nach Transfektion der Plasmide in die stabile Zelllinie erfolgte nach 48 h die Ernte und Lyse der Zellen und die Messung der Luziferase-Aktivität.



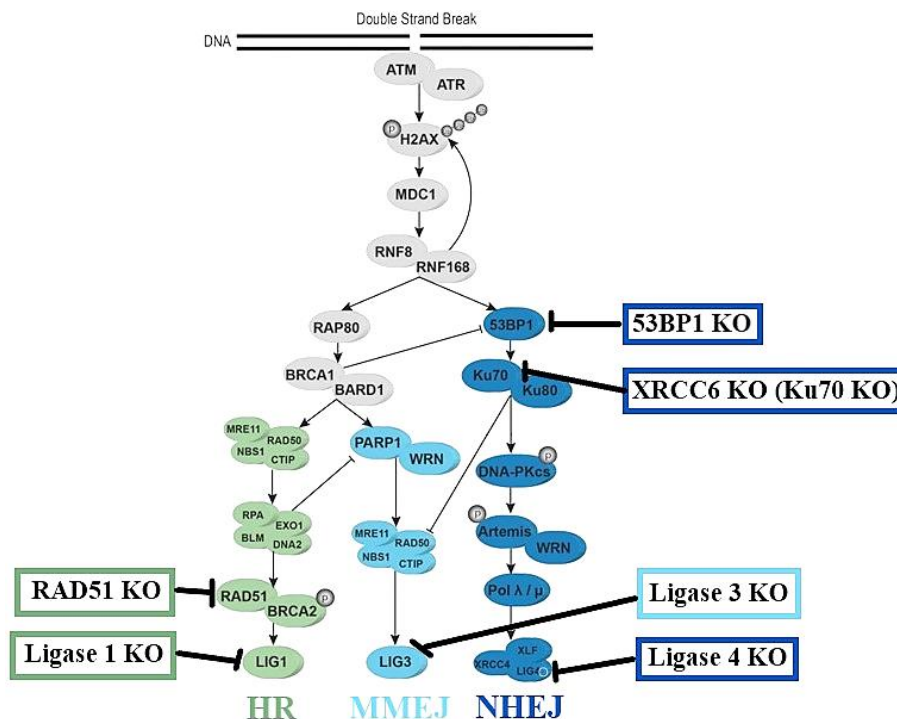
#### Abb. 14: Versuchsaufbau der Dissertation

Schematische Darstellung der durchzuführenden Arbeitsschritte. Zum einen erfolgte die Kultivierung der HEK293<sub>mORF15</sub>-Zellen. Parallel erfolgte die Herstellung der die Luziferase enthaltenden Donor-Plasmide mit Variation der die Luziferase flankierenden mikrohomologen Sequenzen von 10 bis 30 bp. Nach Präparation und Aufreinigung der Plasmide erfolgte zur Messung der Variation der mikrohomologen Bereiche die Transfektion des Donor-Plasmides (Luziferase und mhS enthaltend), des die gRNA *g1* und *g2* enthaltenden Vektors zum Schnitt an den gleichnamigen *target sites* im Genom der stabilen Zelllinie sowie die Transfektion eines Vektors, der das für die gRNA notwendige Cas9-Protein sowie die gRNA *g3* zum Schnitt an der *target site g3* am Donor-Plasmid enthält. Zur Unterdrückung der Aktivitäten der konkurrierenden DSB-Reparaturmechanismus erfolgte die zusätzliche Transfektion eines Vektors, der zwei gRNA zur gezielten Suppression ausgewählter Schlüsselproteine der DSB-Reparaturmechanismen enthält (53BP1, RAD51, Ligase 1, Ligase 3, XRCC6 und Ligase 4). Nach Transfektion der Plasmide erfolgte die Ernte und Lyse der Zellen zur Messung der Luziferase-Aktivität.



Durch das Design dieses Reportersystems kann in dieser Dissertation durch die Bestimmung der Luziferase-Aktivität die Effizienz des DNA-DSB-Reparaturmechanismus MMEJ bestimmt werden und durch die Variation der Länge der mikrohomologen Bereiche optimiert werden.

Zur weiteren Evaluation der Aktivitäten der konkurrierenden DSB-Reparaturmechanismen während des Einbaus des Donor-Plasmids über mikrohomologe DNA-Rekombination wurden in Vorarbeiten Plasmide hergestellt, die zur Suppression einzelner Schlüsselproteine der DNA-DSB-Reparaturmechanismen NHEJ, HR und MMEJ führen. In Abb. 15 sind die Proteinkaskaden der DSB-Reparaturmechanismen dargestellt und die zur Suppression ausgewählten Proteine markiert.



**Abb. 15: Angriffsorte der gezielten Suppression ausgewählter Proteine der körpereigenen DSB-Reparaturmechanismen**

Schematische Darstellung der Proteinkaskaden der drei körpereigenen DSB-Reparaturmechanismen mit Markierung der jeweiligen Angriffsorte zur Suppression der jeweiligen Proteine. Zur Suppression von HR wurden die Proteine RAD51 und Ligase 1 ausgewählt. Die Suppression des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ erfolgt über die Suppression des endständigen Schlüsselproteins Ligase 3. Zur Suppression des im Genome Editing nicht erwünschten DSB-Reparaturmechanismus NHEJ wurden mehrere Angriffsorte zur Reduktion der Aktivität der Schlüsselproteine gewählt: 53BP1, XRCC6 und Ligase 4. Die Suppression von XRCC6 führt zur Suppression von Ku70.

Modifiziert nach Yanik et al. 2017.

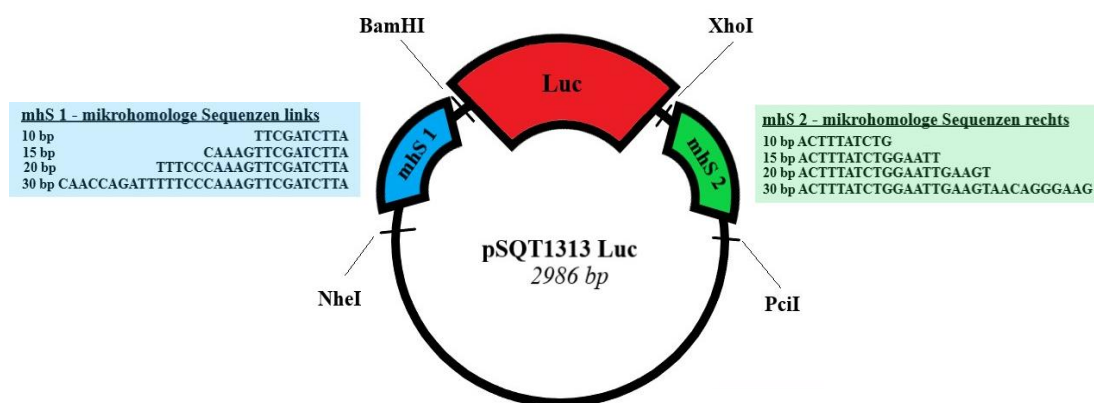
Zur Suppression des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ und damit zur Untersuchung der Aktivität von MMEJ unter Variation der Länge der mhS wurde das finale Schlüsselprotein der Signalkaskade, die Ligase 3, inhibiert. Zur Untersuchung der Aktivität des DSB-Reparaturmechanismus HR wird das finale Schlüsselprotein, die

Ligase 1, supprimiert. Da der DSB-Reparaturmechanismus NHEJ eine hohe Aktivität aufweist, aber als Reparaturmechanismus zum Einbau einer korrekten Gensequenz fehlerbehaftet ist, wurden zur Suppression von NHEJ drei Schlüsselproteine ausgewählt: Ku70, welches durch den Knockout des XRCC6-Gens supprimiert wird; 53BP1 und die Ligase 4. Durch die Suppression der Schlüsselproteine zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Signalkaskade soll genauer untersucht werden, an welchem Ansatzpunkt der Signalkaskade der Schlüsselproteine die maximale Reduktion der Aktivität von NHEJ erreicht werden kann. Die Plasmide zum Knockout der einzelnen Schlüsselproteine der DSB-Reparaturmechanismen NHEJ, HR und MMEJ erfolgen als Ko-Transfektion zu der vorher im Reportersystem beschriebenen Tripel-Transfektion.

Im Folgenden werden zuerst die Klonierungen der Donor-Plasmide beschrieben. Anschließend erfolgt die Darstellung der Ergebnisse der Variation der Länge der mikrohomologen Bereiche, gefolgt von der Darstellung der Ergebnisse der Suppression ausgewählter Proteine der Reparaturmechanismen.

### 3.2 Klonierungen der Donor-Plasmide

Zur Durchführung der Transfektionen war in dieser Arbeit die Klonierung der Donor-Plasmide mit den die Luziferase flankierenden mikrohomologen Bereichen einer Länge von 10, 15, 20 und 30 bp notwendig. Im Folgenden wird exemplarisch die Klonierung des Donor-Plasmids mit 10 bp langen mhS beschrieben, da sich die Klonierung der Donor-Plasmide nur in der Verwendung der unterschiedlichen Kassetten, angegeben in Abb. 16, unterscheiden.

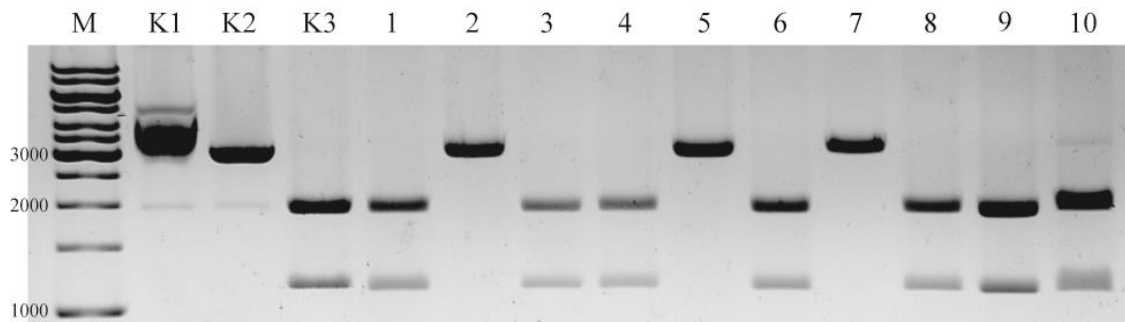


**Abb. 16: Donor-Plasmid mit Angabe der die Luziferase flankierenden mhS**

Schematische Darstellung des die Luziferase (Luc, rot) enthaltenden pSQT1313-Vektors mit den die Luziferase flankierenden mikrohomologen Sequenzen links (blau) und rechts (grün). In den farbigen Kästen sind jeweils die Sequenzen der Mikrohomologien der Längen 10, 15, 20 und 30 bp aufgelistet. Des Weiteren sind die für die Klonierung notwendigen Schnittstellen der Restriktionsenzyme schematisch dargestellt.

Für die Klonierung der Donor-Plasmide wurde als Ausgangsvektor das Plasmid pSQT1313 Luc verwendet, welches die promotorlose Luziferase enthält. Erst durch das Vorschalten eines Promoters erfolgt die Expression der Luziferase. Zur Induktion des körpereigenen DSB-Reparaturmechanismus MMEJ sind mikrohomologe Bereiche links und rechts der Luziferase notwendig, die komplementär zu den an die ORF15-Region grenzenden Bereiche im Genom sind.

Der Einbau der mikrohomologen Bereiche in den pSQT1313 Luc erfolgt schrittweise. Zuerst erfolgte der Einbau der links der Luziferase gelegenen mhS. Dafür wurde der Ausgangsvektor durch die Restriktionsenzyme NheI und BamHI, wie in Abb. 16 schematisch dargestellt, an den entsprechenden Schnittstellen geschnitten und linearisiert. Die einzubauenden Oligonukleotide MY-320 und MY-321 wurden zu einem Oligoduplex hybridisiert und anschließend mit dem Backbone ligiert. Abb. 17 zeigt das Screening der Klone der Klonierung des Donor-Plasmids pSQT1313 Luc 10 bp links. Für das Screening wurden die Klone mit den Restriktionsenzymen XhoI und BamHI versetzt. Durch den erfolgreichen Einbau des Oligoduplex in den Backbone, kommt es zum Verlust der Schnittstelle für das Restriktionsenzym BamHI, sodass der Vektor nur durch XhoI geschnitten und linearisiert wird. Die positiven Klone sollten eine Bande auf der Höhe wie die Bande der Kontrolle 2 (K2) aufweisen, daher könnten die Klone 2, 5 und 7 positiv sein.

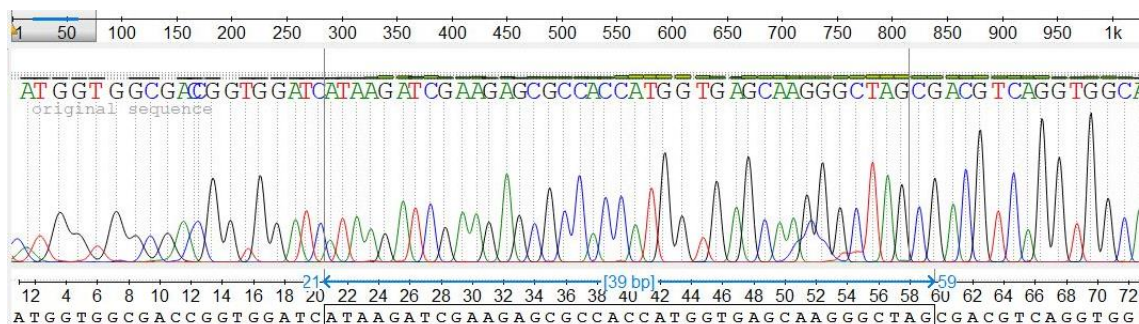


**Abb. 17: Screening pSQT1313 Luc 10 bp links**

Ergebnis des Restriktionsverdau mit XhoI und BamHI nach Einbau der Kassetten MY-320/MY-321 in den Vektor pSQT1313 Luc zur Klonierung des Donor-Plasmids mit 10 bp mhS links von der Luziferase. Durch den Wegfall der BamHI-Schnittstelle erfolgt eine Linearisierung des Plasmids. Positive Klone zeigen eine Bande auf der gleichen Höhe wie K2 auf.

M: *GeneRuler* 1 kb, K1: Ausgangsvektor (AV) unverdaut, K2: AV mit XhoI geschnitten, K3: AV mit XhoI und BamHI geschnitten; 1-10: Klone 1 bis 10.

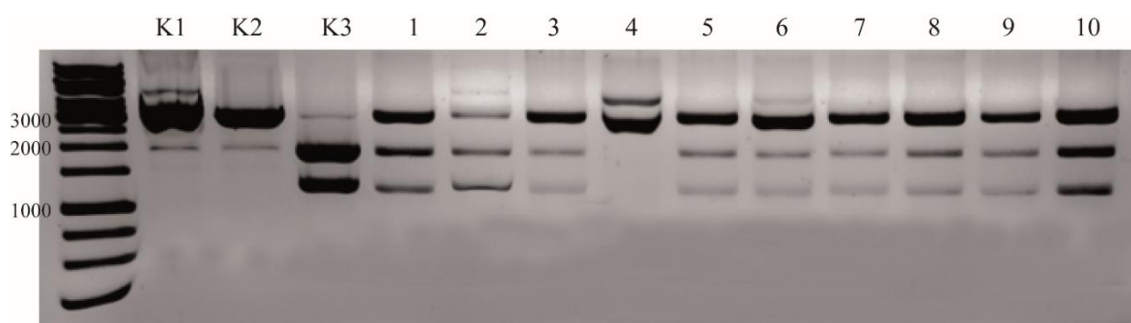
Nach dem Screening wurden die Klone 2 und 7 durch eine Sequenzierung mit dem Primer MY-301 überprüft (Seqlab, Göttingen). Das Ergebnis der Sequenzierung des positiven Klons 2 ist in dem Chromatogramm in Abb. 18 zu sehen. In diesem ist nur der Sequenzbereich abgebildet, indem der Einbau der linken mhS erwartet wurde.



**Abb. 18: Chromatogramm pSQT1313 Luc 10 bp links**

Gezeigt ist das Chromatogramm der Sequenzierung des Klon 2 des Vektors pSQT1313 Luc 10 bp links. Die schwarz eingerahmte Sequenz markiert den Einbau der Kassette der mhS links. Aufgrund der Verwendung des Primers MY-301 erfolgte die Sequenzierung revers. Das Chromatogramm wurde durch die Nutzung des Programms UGENE erstellt.

Nach der Aufreinigung des Plasmids pSQT1313 Luc 10 bp links wurde dieser für den Einbau der Kassetten für die 10 bp mhS rechts von der Luziferase vorbereitet, indem er durch die Restriktionsenzyme XhoI und PciI linearisiert wurde. Die einzubauenden Oligonukleotide MY-322 und MY-323 für die rechten mhS wurden hybridisiert und mit dem Backbone ligiert. Abb. 19 zeigt das Screening auf positive Klone des Donor-Plasmids mit 10 bp langen mhS beidseits. Das Screening erfolgte hier mittels der Restriktionsenzyme NheI und PciI. Aufgrund des Verlusts der PciI-Schnittstelle durch die Änderung der Schnittstellensequenz beim Einbau der rechten Kassette ist beim Screening eine Linearisierung des Plasmids zu erwarten und die Bande sollte sich auf Höhe der Bande von K2 darstellen. Das Screening ergab, dass es sich bei Klon 4 um einen positiven Klon handeln könnte.

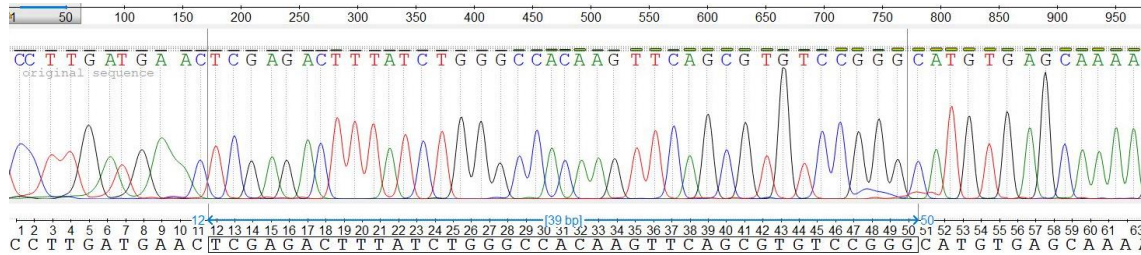


**Abb. 19: Screening pSQT1313 Luc 10 bp li + re**

Ergebnis des Restriktionsverdau mit NheI und PciI nach Einbau der Kassetten MY-322/MY-323 in den Vektor pSQT1313 Luc 10 bp links zur Klonierung des Donor-Plasmids mit 10 bp mhS links und rechts. Durch den Wegfall der PciI-Schnittstelle stellt sich die Bande der positiven Klone auf Höhe der Bande von K2 dar.

M: *GeneRuler* 1 kb, K1: Ausgangsvektor (AV) unverdaut, K2: AV mit NheI geschnitten, K3: AV mit NheI und PciI geschnitten; 1-10: Klone 1 bis 10.

Dies wurde durch die Sequenzierung von Klon 4 mit dem Primer MY-302 bestätigt. Das Ergebnis der Sequenzierung ist im Chromatogramm in Abb. 20 zu sehen. Die Sequenz der eingebauten Kasette der rechten mhS ist schwarz eingerahmt.



**Abb. 20: Chromatogramm pSQT1313 Luc 10 bp li + re**

Gezeigt ist das Chromatogramm der Sequenzierung des Klons 4 des Vektors pSQT1313 Luc 10 bp li + re. Die schwarz eingerahmte Sequenz markiert den Einbau der Kasette der 10 bp mhS rechts. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung des Primers MY-302. Das Chromatogramm wurde durch die Nutzung des Programms UGENE erstellt.

### 3.3 Analyse des Reportersystems im mikrohomologen Bereich

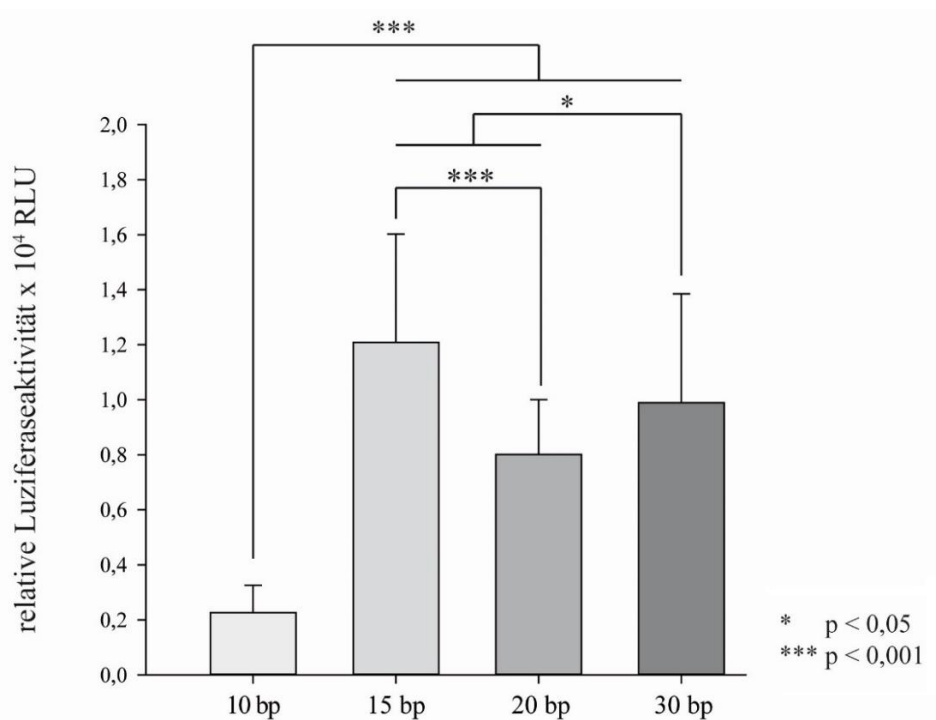
Die Analyse des Reportersystems erfolgt in dieser Arbeit zur Untersuchung des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ im mikrohomologen Bereich unter Variation der Länge der mikrohomologen Sequenzen von 10 bp bis 30 bp. Durch das CRISPR/Cas9-System sollen gezielt Doppelstrangbrüche hervorgerufen werden, die zur Induktion der körpereigenen DSB-Reparaturmechanismen und damit zum Einbau der Zielsequenz ins Genom führen. Es erfolgt zum einen die Variation der Längen der mikrohomologen Bereiche und zum anderen die Messung der Aktivitäten der drei konkurrierenden DSB-Mechanismen (NHEJ, HR und MMEJ) unter Suppression ausgewählter Schlüsselproteine des jeweiligen DSB-Reparaturmechanismus.

#### 3.3.1 Variation der Längen der mikrohomologen Sequenzen

Die Analyse der Aktivitäten im Reportersystem bei Variation der Längen der mikrohomologen Sequenzen erfolgt als Triple-Transfektion, wie in Tab. 15 angegeben. Es werden die mikrohomologen Bereiche mit einer Länge von 10, 15, 20 und 30 bp untersucht. Durch den korrekten Einbau der Zielsequenz in das Genom der Zelllinie durch die Induktion des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ mittels Verwendung mikrohomologer Sequenzen wird die Luziferase in den Zellen durch den vorgeschalteten CMV-Promoter exprimiert. Die Expression der Luziferase kann durch Messung der Lumineszenz durch die Verwendung des Luziferase-Assays bestimmt und quantifiziert werden.

In Abb. 21: Variation der Länge der mikrohomologen Sequenzen sind die gemessenen Luziferase-Aktivitäten der oben genannten Triple-Transfektionen dargestellt. Dabei erfolgte die Normierung der gemessenen Luziferase-Aktivität auf die Positivkontrolle. Als Positivkontrolle erfolgte die Transfektion eines DNA-Plasmid (pcDNA Luc), das in der Zelle zu einer messbaren Luziferase-Aktivität führt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Holm-Sidak-Methode (n=4). Der p-Wert ist in der Legende des Diagramms angegeben.

Die in Abb. 21 gezeigten Ergebnisse weisen signifikante Unterschiede in der Variation der Länge der mikrohomologen Sequenzen auf. Die Variation der Länge der mikrohomologen Bereiche wird in diesem Diagramm durch die Verwendung verschiedener Graustufen verdeutlicht.



**Abb. 21: Variation der Länge der mikrohomologen Sequenzen**

Diagramm der relativen Luziferase-Aktivitäten gemessen in RLU (*Relative Light Unit*) nach MMEJ-induzierter Integration der Luziferase in die Zelllinie. Normierung der Luziferase-Aktivität auf die Positivkontrolle (Transfektion eines die Luziferase enthaltenden DNA-Plasmids). Die Messung erfolgte unter Variation der Länge der mikrohomologen Sequenzen von 10 bp bis 30 bp, gekennzeichnet durch Verwendung verschiedener Graustufen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Holm-Sidak-Methode (n=4). Angabe des p-Wertes in der Legende des Diagramms.

Die Transfektion des Donor-Plasmides mit 10 bp Mikrohomologien zeigt eine relative Luziferase-Aktivität von  $0,22 \pm 0,07 \times 10^4$  RLU und weist damit die geringste Luziferase-Aktivität der untersuchten Mikrohomologien auf. Dagegen wurde bei Verwendung des Donor-Plasmides mit 20 bp langen mikrohomologen Sequenzen eine vierfach höhere relative Luziferase-Aktivität mit  $0,8 \pm 0,18 \times 10^4$  RLU gemessen. Die Transfektion des

Donor-Plasmides mit 30 bp führte zu einer gemessenen Luziferase-Aktivität von  $0,99 \pm 0,37 \times 10^4$  RLU und damit zu einer geringeren Luziferase-Aktivität. Die höchste Luziferase-Aktivität wurde mit  $1,21 \pm 0,36 \times 10^4$  RLU bei Verwendung 15 bp langer mikrohomologer Sequenzen gemessen.

### **3.3.2 Suppression ausgewählter Proteine der Reparaturmechanismen**

Im Folgenden sollen die Aktivitäten der einzelnen miteinander konkurrierender DSB-Reparaturmechanismen untersucht werden, indem jeweils ein Schlüsselprotein der Signalkaskaden von NHEJ, MMEJ und HR supprimiert wird. Zur Suppression des DSB-Reparaturmechanismus NHEJ erfolgt jeweils der Knockout der Schlüsselproteine 53BP1, Ku70 (durch Knockout des XRCC6-Gens) und der Ligase 4. Zur Reduktion der Aktivität des DSB-Reparaturmechanismus HR werden die Schlüsselproteine RAD51 und Ligase 1 als Angriffspunkte der Knockouts gewählt. Zur Untersuchung der Aktivität von MMEJ wird dieser DSB-Reparaturmechanismus durch den Knockout des finalen Schlüsselproteins, der Ligase 3, supprimiert. Durch den gezielten Knockout der einzelnen DSB-Reparaturmechanismen ist es nicht nur möglich deren Aktivitäten aufzuzeigen, sondern auch die Aktivität nicht gewünschter DSB-Reparaturmechanismen wie zum Beispiel die Aktivität des fehlerbehafteten Reparaturmechanismus NHEJ zu reduzieren, um damit die Wahrscheinlichkeit für den korrekten Einbau der gewünschten Gensequenz durch den DSB-Reparaturmechanismus MMEJ zu erhöhen.

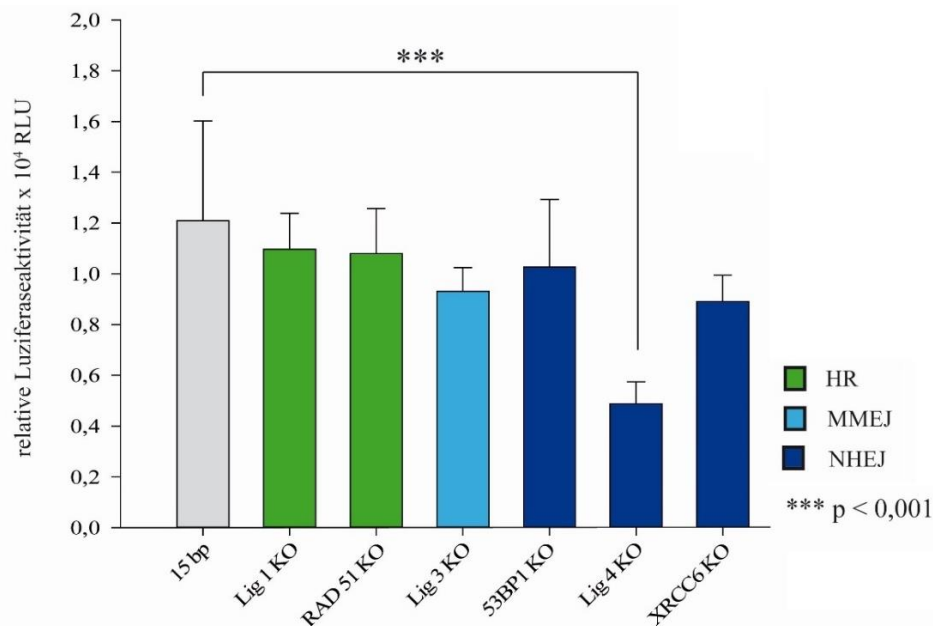
Für die folgenden Versuche wurde eine Quadrupel-Transfektion mit nachstehend aufgezählten Plasmiden durchgeführt: Transfektion des Donor-Plasmides mit Variation der mhS, Transfektion des die gRNA g1 und g2 enthaltenden Plasmides, Transfektion des die gRNA g3 und die Endonuklease Cas9 enthaltenden Plasmides und die Transfektion des zur Suppression einzelner Schlüsselproteine führenden Plasmides. Für den Knockout der einzelnen Schlüsselproteine wird ein Plasmid verwendet, welches zwei für das zu supprimierende Protein spezifische gRNAs und die Endonuklease Cas9 enthält. Die durch CRISPR/Cas9 zielgerichtet induzierten Doppelstrangbrüche führen zum Funktionsverlust und damit zum Knockout des einzelnen Proteins der DSB-Reparaturmechanismen.

Parallel zur Suppression der Schlüsselproteine der Reparaturwege erfolgte zur Analyse der Aktivitäten der drei konkurrierenden DSB-Reparaturmechanismen die Variation der Länge der mikrohomologen Bereiche. Untersucht wurden in dieser Doktorarbeit die Suppression der DSB-Reparaturmechanismus-Aktivitäten bei Einbau des Donor-

Plasmides mit mhS von 15 bp, 20 bp und 30 bp. Der Einbau des Donor-Plasmides mit mhS von 10 bp Länge wurde aufgrund der geringen Integration in den Vorexperimenten nicht eingesetzt.

### 3.3.2.1 15 bp mikrohomologe Sequenzen

In Abb. 22 sind die Luziferase-Aktivitäten der einzelnen Protein-Suppressionen bei Verwendung des Donor-Plasmids mit 15 bp mhS aufgezeigt.



**Abb. 22: Suppression ausgewählter Proteine der DSB-Reparaturmechanismen bei 15 bp mhS**

Das Diagramm zeigt die gemessenen Luziferase-Aktivitäten bei Suppression einzelner Schlüsselproteine der DSB-Reparaturmechanismen NHEJ, HR und MMEJ unter Verwendung des Donor-Plasmids mit 15 bp mhS. Als Vergleichswert ist die relative Luziferase-Aktivität des Donor-Plasmids mit 15 bp langen Mikrohomologien ohne Knockout angegeben (grau). Die Legende zeigt die Signalkaskade der an den einzelnen DSB-Reparaturmechanismen beteiligten Proteine mit roter Markierung der zu supprimierenden Proteine. Die Messung der Aktivität des DSB-Reparaturmechanismus HR erfolgt jeweils unter der Suppression von RAD51 und von Ligase 1, farblich in grün gekennzeichnet. Das zu supprimierende Protein des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ, die Ligase 3, ist in hellblau gekennzeichnet. Für den fehlerbehafteten und im Genome Editing unerwünschten DSB-Reparaturmechanismus NHEJ wurden Schlüsselproteine verschiedener Zeitpunkte der Signalkaskade ausgewählt: Die in dunkelblau gekennzeichneten Proteine 53BP1, XRCC6 (führt zum Knockout von Ku70) und die Ligase 4 werden dafür einzeln supprimiert. Der Knockout der Ligase 4 bei Induktion der mikrohomologen DNA-Rekombination durch Verwendung von 15 bp Mikrohomologien führt zu einer messbaren Reduktion der Aktivität der Luziferase. Die Suppression der anderen Proteine der DSB-Reparaturmechanismen führen zu keiner signifikanten Reduktion der Luziferase-Aktivität. Die statistische Analyse erfolgte mittels der Holm-Sidak-Methode, der p-Wert ist in der Legende angegeben.

Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die einzelnen Schlüsselproteine der DSB-Reparaturmechanismen farblich dem zugrunde liegenden DSB-Reparaturmechanismus zugeordnet, wie in der Legende angegeben. Die Luziferase-Aktivitäten sind auf die Positivkontrolle normiert. Für den jeweiligen Knockout dient als Referenz die relative



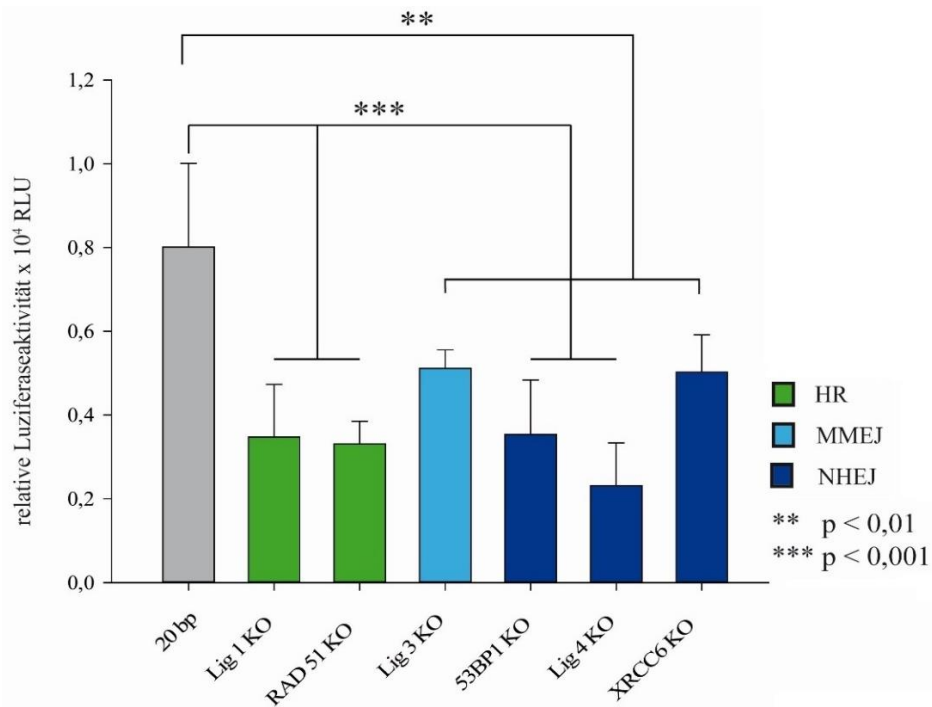
Luziferase-Aktivität mit  $1,21 \pm 0,36 \times 10^4$  der Transfektion des Donor-Plasmids mit 15 bp langen Mikrohomologien.

Die Suppression der für den DSB-Reparaturmechanismus HR ausgewählten Schlüsselproteine Ligase 1 und RAD51 zeigen mit einer relativen Luziferase-Aktivität von  $1,1 \pm 0,11 \times 10^4$  RLU und  $1,08 \pm 0,14 \times 10^4$  RLU keine signifikante Reduktion der Luziferase-Aktivitäten auf. Dagegen führt die Reduktion der Aktivität von MMEJ durch die Inhibition des Schlüsselproteins Ligase 3 zu einer geringen Reduktion der Luziferase-Aktivität auf  $0,93 \pm 0,07 \times 10^4$  RLU. Die Suppression des dritten DSB-Reparaturmechanismus NHEJ führt durch die Suppression von 53BP1 mit einer gemessenen Luziferase-Aktivität von  $1,03 \pm 0,21 \times 10^4$  RLU und durch die Suppression von XRCC6 mit einer gemessenen Luziferase-Aktivität von  $0,89 \pm 0,08 \times 10^4$  RLU zu einer Reduktion der Luziferase-Aktivität. Durch Inhibition der Ligase 4 als Endglied des NHEJ Signalweges war eine Luziferase-Aktivität von  $0,49 \pm 0,07 \times 10^4$  RLU messbar. Die Inhibition der Ligase 4 führt zu einer Reduktion der Luziferase-Aktivität um das 2,5fache des Referenzwertes.

### 3.3.2.2 20 bp mikrohomologe Sequenzen

Die Ergebnisse der Bestimmung der Luziferase-Aktivität bei Suppression einzelner Schlüsselproteine der DSB-Reparaturmechanismen NHEJ, HR und MMEJ bei Verwendung des Donor-Plasmids mit 20 bp Mikrohomologien sind im Diagramm in Abb. 23 dargestellt. Die in grau gekennzeichnete Luziferase-Aktivität des Donor-Plasmides mit 20 bp langen Mikrohomologien ohne Knockout zeigt eine Aktivität von  $0,8 \pm 0,19 \times 10^4$  RLU auf und dient als Referenz zu den einzelnen Protein-Suppressionen.

Wie im Diagramm Abb. 23 zu sehen, führt die Suppression der DSB-Reparaturmechanismus-Proteine bei 20 bp mhS zur signifikanten Reduktion der gemessenen Luziferase-Aktivitäten. Durch die Inhibition des DSB-Reparaturmechanismus HR ist bei beiden Schlüsselproteinen eine Reduktion der Luziferase-Aktivität um das 2,3-2,4fache in Bezug zum Referenzwert zu verzeichnen. Bei der Suppression der Ligase 1 wird eine Luziferase-Aktivität von  $0,35 \pm 0,1 \times 10^4$  RLU gemessen. Die Luziferase-Aktivität bei der Suppression von RAD51 beträgt  $0,33 \pm 0,04 \times 10^4$  RLU.



**Abb. 23: Suppression ausgewählter Proteine der DSB-Reparaturmechanismen bei 20 bp mhS**

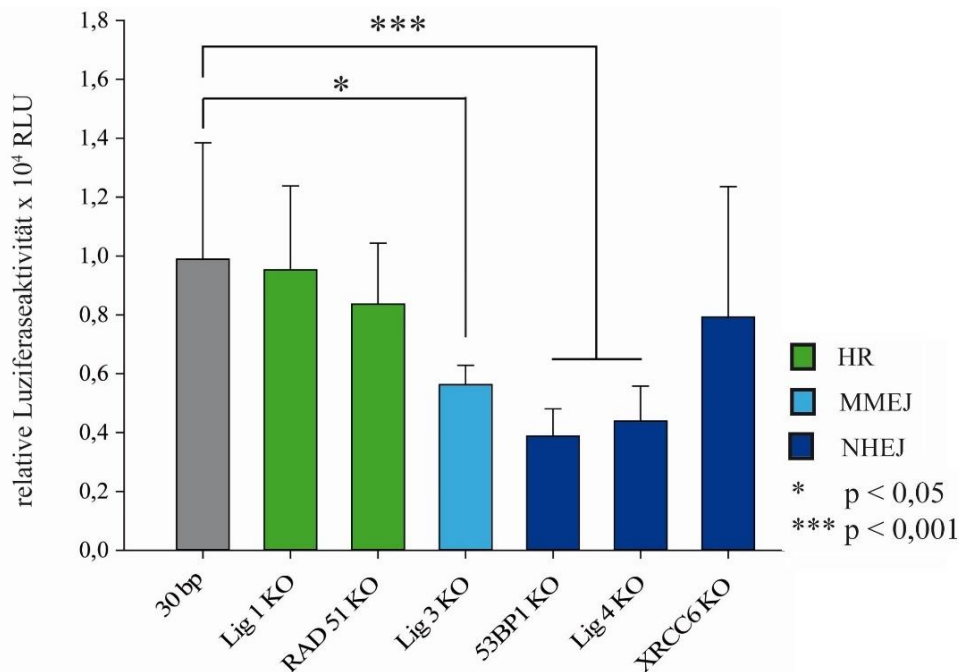
Das Diagramm zeigt die gemessenen Luziferase-Aktivitäten bei Suppression einzelner Schlüsselproteine der DSB-Reparaturmechanismen NHEJ, HR und MMEJ unter Verwendung des Donor-Plasmids mit 20 bp mhS. Als Vergleichswert ist die relative Luziferase-Aktivität des Donor-Plasmids mit 20 bp langen Mikrohomologien ohne Knockout angegeben (grau). Die Suppression ausgewählter Proteine der drei DSB-Reparaturmechanismen weisen bei 20 bp Mikrohomologien eine signifikante Reduktion der relativen Luziferase-Aktivität auf. Der Signifikanztest erfolgt mittels der Holm-Sidak-Methode, Angabe der p-Werte in der Legende.

Des Weiteren ist eine signifikante Reduktion der Luziferase-Aktivität bei Suppression des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ zu verzeichnen, da durch Inhibition der Ligase 3 die Aktivität der Luziferase um das 1,6fache auf eine messbare Aktivität von  $0,51 \pm 0,03 \times 10^4$  RLU reduziert wird. Die Inhibition der Schlüsselproteine des DSB-Reparaturmechanismus NHEJ zeigen eine signifikante Reduktion der Luziferase-Aktivität an. Die Luziferase-Aktivität wird durch die Suppression der Proteine des DSB-Reparaturmechanismus NHEJ auf folgende Werte reduziert: Die Inhibition von 53BP1 erbringt eine relative Luziferase-Aktivität von  $0,35 \pm 0,1 \times 10^4$  RLU, die Suppression der Ligase 4 eine Aktivität von  $0,23 \pm 0,08 \times 10^4$  RLU und von XRCC6 führt zu einer Reduktion der Luziferase-Aktivität auf  $0,5 \pm 0,07 \times 10^4$  RLU.

### 3.3.2.3 30 bp mikrohomologe Sequenzen

Die Ergebnisse der Analyse der Luziferase-Aktivitäten der einzelnen DSB-Reparaturmechanismen durch Suppression der jeweiligen Schlüsselproteine bei Verwendung des Donor-Plasmids mit 30 bp mhS sind in Abb. 24 dargestellt. Die Tripel-Transfektion des Donor-Plasmids mit 30 bp langen Mikrohomologien ohne

Knockout zeigte eine relative Luziferase-Aktivität von  $0,99 \pm 0,37 \times 10^4$  RLU und dient als Referenzwert für die jeweilige Suppression der Proteine der DSB-Reparaturmechanismen.



**Abb. 24: Suppression ausgewählter Proteine der DSB-Reparaturmechanismen bei 30 bp mhS**

Das Diagramm zeigt die gemessene Luziferase-Aktivität bei Suppression einzelner Schlüsselproteine der DSB-Reparaturmechanismen NHEJ, HR und MMEJ unter Verwendung des Donor-Plasmids mit 30 bp mhS. Als Vergleichswert ist die relative Luziferase-Aktivität des Donor-Plasmids mit 30 bp langen Mikrohomologien ohne Knockout angegeben (dunkelgrau). Die Suppression ausgewählter Proteine der DSB-Reparaturmechanismen bei Verwendung der 30 bp Mikrohomologien führt zu einer signifikanten Reduktion der Luziferase-Aktivität von MMEJ und von NHEJ. Der Knockout des DSB-Reparaturmechanismus HR weist keine signifikante Änderung der Luziferase-Aktivität auf. Der Signifikanztest erfolgte mittels der Holm-Sidak-Methode, Angabe der p-Werte in der Legende.

Die Suppression der Schlüsselproteine von HR führen zu keiner signifikanten Reduktion der Luziferase-Aktivität. Die Inhibition der Ligase 1 hat eine Luziferase-Aktivität von  $0,95 \pm 0,22 \times 10^4$  RLU, während bei Suppression von RAD51 eine Luziferase-Aktivität von  $0,84 \pm 0,16 \times 10^4$  RLU messbar war. Dagegen kam es bei Inhibition des MMEJ-Reparaturmechanismus durch die Suppression der Ligase 3 zu einer signifikanten Reduktion der messbaren Aktivität auf  $0,56 \pm 0,05 \times 10^4$  RLU und zeigte damit eine 1,8fache Reduktion der Aktivität in Bezug zum Referenzwert auf. Auch die Inhibition der Schlüsselproteine von NHEJ wiesen eine signifikante Reduktion der Aktivität auf. Die Suppression des Schlüsselproteins 53BP1 führte zu einer Senkung der Aktivität auf  $0,39 \pm 0,07 \times 10^4$  RLU, währenddessen die Suppression der Ligase 4 eine Reduktion der Aktivität auf  $0,44 \pm 0,09 \times 10^4$  RLU aufzeigte. Die Suppression von XRCC6 wies mit einer gemessenen Luziferase-Aktivität von  $0,79 \pm 0,3 \times 10^4$  RLU keine signifikante Veränderung auf.

## 4. Diskussion

Die XLRP weist mit 20 % einen hohen Anteil der an RP erkrankter Patienten auf und stellt aufgrund der raschen Progredienz und des frühen Eintritts der Erblindung innerhalb der 2. Lebensdekade eine der schwerwiegenderen Formen der RP dar. Aktuell besteht zur Behandlung der XLRP kein kurativer Ansatz. In den letzten Jahren hat das Genome Editing vor allem mit der Entdeckung des CRISPR/Cas9-Systems zum Einsatz in der Gentherapie an immenser Bedeutung gewonnen.

Als monogenetische Erkrankung ist die XLRP mit Mutationen assoziiert, die größtenteils im *RPGR*-Gen vorzufinden sind. Aufgrund der Größe des *RPGR*-Gens und der Häufung der Mutationen in der ORF15-Region des *RPGR*-Gens, bietet die XLRP einen idealen Ansatzpunkt für die Gentherapie. Des Weiteren ist das Auge aufgrund seiner lokalen Abgrenzbarkeit, der Möglichkeit der Objektivierung der Therapiefortschritte ohne invasive Maßnahmen und seines Immunprivilegs, der Blut-Retina-Schranke, als Therapieziel für den Einsatz in der Gentherapie gut geeignet.

Das Genome Editing, angewendet in der ORF15-Region des *RPGR*-Gens, ermöglicht die Korrektur der ca. 2000 bp langen krankheitsverursachenden DNA-Sequenz und repräsentiert damit eine kurative Therapieoption für 80 % der XLRP-Patienten in einem Ansatz.

### 4.1 Variation der Länge der mikrohomologen Bereiche

Die Messung der transfizierten Donor-Plasmide mit Variation der Längen der mhS zeigte eine Aktivität der Luziferase auf, die in Bezug zur Positivkontrolle, der Transfektion einer die Luziferase enthaltenden pcDNA, reduziert war. Die Negativkontrolle wurde im Vergleich zu den Messwerten als vernachlässigbar gering gewertet. Das Reportersystem weist bei Variation der Länge der mikrohomologen Sequenzen wie in Abb. 21 dargestellt, signifikante Unterschiede in der Messung der einzelnen Luziferase-Aktivitäten auf. Dabei zeigt sich die höchste Luziferase-Aktivität bei der Verwendung von 15 bp mhS gefolgt von geringeren Signalaktivitäten bei 20 bp und 30 bp mhS. Die 10 bp mhS zeigen eine deutlich geringere Signalaktivität auf.

Aufgrund der Unterschiede der Luziferase-Aktivitäten bei Variation der Länge der Mikrohomologien ist davon auszugehen, dass der Einbau der Luziferase im Reportersystem zu einem wesentlichen Anteil auch über die mikrohomologen Sequenzen und damit in Abhängigkeit vom DSB-Reparaturmechanismus MMEJ stattfindet. Sakuma

et al. 2016 haben gezeigt, dass ein präziser Einbau einer Gensequenz über den DSB-Reparaturmechanismus MMEJ durch die Verwendung kurzer Mikrohomologien möglich ist. Bei alleinigem Vorliegen des DSB-Reparaturmechanismus NHEJ dürfte es durch die fehlende Endresektion der DNA-Enden und durch die Ligation der DNA-Enden des DSB unabhängig von deren Konfiguration zu keinem Unterschied der Signalaktivität bei Veränderung der Länge der mhS kommen. Daher kann vermutet werden, dass durch die Transfektion des die mikrohomologen Sequenzen enthaltenden Donor-Plasmids der DSB-Reparaturmechanismus MMEJ induziert wird. Diese Hypothese kann jedoch erst durch die ebenfalls in dieser Arbeit durchgeführte Suppression der Schlüsselproteine der einzelnen DSB-Reparaturmechanismen bestätigt werden.

Villarreal und Kollegen zeigten in knospenden Hefezellen, dass die Effizienz des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ bei Verwendung von mhS mit einer Länge kürzer als 14 bp abnimmt. Die Messung der 10 bp langen Mikrohomologien bestätigen die Ergebnisse von Villarreal et al. 2012). Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Luziferase-Aktivität auf ein Sechstel in Bezug zur Luziferase-Aktivität bei 15 bp mhS. Im Unterschied zu den Ergebnissen in dieser Arbeit, in der die Zunahme der Länge der mhS zu einer verminderten messbaren Luziferase-Aktivität und damit zu einer Abnahme der Reparatureffizienz des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ führen, detektierten Tadi und Kollegen eine Erhöhung der Effizienz von MMEJ bei zunehmender Länge der Mikrohomologien (Tadi et al. 2016).

Aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Luziferase-Aktivitäten lässt sich tendenziell eine Reduktion der Effizienz von MMEJ bei Reduktion der Länge der mhS vermuten. Die Kollegin Ginsberg aus der Arbeitsgruppe zeigte jedoch eine nochmalige Erhöhung der Luziferase-Aktivität bei Verwendung von 5 bp mhS um das 1,5-fache im Vergleich zur Luziferase-Aktivität bei 15 bp mhS auf (Yanik et al. 2018). Diese gemessene Erhöhung im kürzesten mikrohomologen Bereich könnte durch eine höhere Aktivität des DSB-Reparaturmechanismus NHEJ bei Vorliegen von MMEJ im Grenzbereich bedingt sein, da NHEJ zu jederzeit im Zellzyklus und unabhängig vom Vorliegen von Mikrohomologien stattfindet.

Zur genauen Untersuchung, ob sich die einzelnen DSB-Reparaturmechanismen in ihrer Aktivität bei Variation der Längen der mhS überschneiden und zum Nachweis der Aktivität von MMEJ bei Verwendung von 10 bis 30 bp langen mhS, erfolgte die Suppression einzelner Schlüsselproteine der DSB-Reparaturmechanismen.

## **4.2 Analyse der Aktivität der DSB-Reparaturmechanismen durch gezielte Suppression ausgewählter Proteine**

Die Analyse der Aktivitäten der DSB-Reparaturmechanismen erfolgte durch die gezielte Suppression der Schlüsselproteine der DSB-Reparaturmechanismen unter Variation der Länge der mikrohomologen Sequenzen des Donor-Plasmids. Die Ergebnisse sind in den Abb. 22, Abb. 23 und Abb. 24 graphisch dargestellt. Die Suppression einzelner Proteine der DSB-Reparaturmechanismen führt nicht bei allen Proteinen und Längen der verwendeten Mikrohomologien zu einer signifikanten Reduktion der Luziferase-Aktivität. Die Suppression der Schlüsselproteine erfolgt als Genknockout durch das gezielte Einbringen von Doppelstrangbrüchen durch speziell für das jeweilige Schlüsselprotein designte gRNAs und der Endonuklease Cas9. Mittels der Messung der relativen Luziferase-Aktivität und dem Vergleich der gemessenen Aktivität zum Referenzwert ohne Suppression eines Schlüsselproteins kann eine quantitative Aussage über die vorliegende Suppression der einzelnen Proteine erzielt werden. Die Messung gibt jedoch keine Auskunft darüber, ob qualitativ ein Knockout des Proteins und damit eine vollständige Suppression des Proteins vorliegt.

Im Rahmen der Auswertung der Diagramme kann zusammenfassend gesagt werden, dass im Bereich von 15 bp mhS eine signifikante Reduktion der Luziferase-Aktivität bei Suppression der Ligase 4 (NHEJ) erzielt werden kann. Die 20 bp mhS zeigen eine signifikante Suppression der DSB-Reparaturmechanismen NHEJ, HR und MMEJ auf, während es bei der Verwendung von 30 bp mhS zu einer Suppression der DSB-Reparaturmechanismen MMEJ und NHEJ kommt.

Aus den Diagrammen können folgende Aussagen abgeleitet werden: In diesem Reportersystem findet durch die Verwendung eines Donor-Plasmides mit mikrohomologen Sequenzen eine Induktion des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ und demzufolge ein MMEJ-abhängiger Einbau des Luziferase-Gens in das Genom statt, da die 20 bp und 30 bp mhS bei Suppression des Schlüsselproteins von MMEJ, der Ligase 3, eine signifikante Reduktion der Luziferase-Aktivität aufweisen. Die signifikante Reduktion der Luziferase-Aktivität der Schlüsselproteine von MMEJ und HR zeigen bei der Verwendung von 20 bp langen Mikrohomologien auf, dass die Homologie-getriebenen DSB-Reparaturmechanismen bei 20 bp mhS am stärksten aktiv sind. Überraschenderweise ist bei 15 bp langen Mikrohomologien bei Suppression der Ligase 3 keine signifikante Reduktion der Luziferase-Aktivität zu verzeichnen, obwohl

die 15 bp mhS laut den Ergebnissen der Variation der Länge der mikrohomologen Bereiche die höchste Luziferase-Aktivität aufweisen. Entweder ist die MMEJ-Aktivität zu niedrig, was sich aber mit den vorherigen Ergebnissen und der gemessenen Aktivität des Referenzwertes ohne Knockout widerspricht oder es erfolgt keine vollständige Suppression der Ligase 3 als Schlüsselprotein des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ.

Das weiterhin messbar hohe Level der Luziferase-Aktivität bei Suppression der Ligase 3 weist daraufhin, dass neben MMEJ weitere DSB-Reparaturmechanismen aktiv sind. Diese Vermutung kann durch die Suppression der Schlüsselproteine des DSB-Reparaturmechanismus NHEJ bestätigt werden: Der Knockout des am Anfang der Signalkaskade stehenden Proteins 53BP1 führt bei 20 bp und 30 bp mhS zu einer signifikanten Reduktion der Luziferase-Aktivität, währenddessen die Suppression von XRCC6 und damit die Suppression des Protein Ku70 nur eine geringe Reduktion der Luziferase-Aktivität bei 20 bp mhS aufweist. Die geringere Reduktion der Aktivität von NHEJ bei Knockout von XRCC6 könnte durch eine reduzierte Effizienz des qualitativen Knockouts von XRCC6 bedingt sein. Ein weiterer Grund für die fehlende Reduktion könnte jedoch auch darauf zurückgeführt werden, dass das Ku70 Protein Teil eines Heterodimers ist, die alleinige Suppression von Protein Ku70 nicht ausreichend ist und demzufolge die additive Suppression von Protein Ku80 notwendig wäre. Dies müsste durch eine quantitative Untersuchung der Knockouts mit der zusätzlichen Suppression von Ku80 weiter analysiert werden. Die höchste Reduktion der Luziferase-Aktivität ist bei der Suppression des endständigen Schlüsselproteins des DSB-Reparaturmechanismus NHEJ, der Ligase 4, zu verzeichnen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Knockouts der Proteine des DSB-Reparaturmechanismus NHEJ, dass NHEJ eine hohe Aktivität aufweist. NHEJ bietet zwar als körpereigener DSB-Reparaturmechanismus die Möglichkeit zur Integration von DNA-Sequenzen, ist aber aufgrund der zu Mutationen führenden auftretenden Insertionen und Deletionen sehr fehlerbehaftet. NHEJ kann zum Knockout von Genen eingesetzt werden, jedoch ist dieser Reparaturmechanismus zum korrekten Austausch einer Ziel-Gensequenz im Rahmen des Genome Editing nicht geeignet. Da NHEJ, wie in den vorliegenden Ergebnissen durch den Knockout bestätigt, ein sehr aktiver Mechanismus ist, der je nach bestehender Zellzyklusphase mit MMEJ in der G1-/frühen S-Phase und mit HR in der S-/G2-Phase konkurriert und lt. Taleei und Nikjoo 2013 bei einfacheren Resektions-Enden den schnelleren DSB-Mechanismus und damit

den bevorzugten Mechanismus der Zelle darstellt, ist es wichtig, diesen DSB-Mechanismus gezielt zu supprimieren, um die Aktivität des gewünschten DSB-Reparaturmechanismus MMEJ zu erhöhen und dadurch die Effizienz des korrekten Einbaus der gewünschten Gensequenz zu steigern. Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Suppression von NHEJ eine deutliche Reduktion der Luziferase-Aktivität erreicht werden kann und dass das endständige Schlüsselprotein der NHEJ-Signalkaskade, die Ligase 4, einen möglichen Ansatzpunkt zur effektiven Suppression von NHEJ darstellt.

Aufgrund seiner hohen Genauigkeit wurde bis zur Entdeckung des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ das HR im Bereich des Genome editing zur Korrektur einer Gensequenz eingesetzt. Mehrere Studien zeigen jedoch unterschiedliche Erfolgsraten von HR. Diese sind dabei abhängig von dem zu behandelnden Genloкус, den eingesetzten Nukleasen und dem zugrundeliegenden Zelltyp/Organismus, indem der DSB-Reparaturmechanismus HR eingesetzt wird (Cristea et al. 2013; Li et al. 2015; Miyaoka et al. 2016). Da HR als DSB-Reparaturmechanismus bei dem Vorhandensein von homologen Sequenzen über 100 bp während der S- und G2-Phase des Zellzyklus stattfindet (Cannan und Pederson 2016), ist nicht zu erwarten, dass HR in diesem Reportersystem bei Verwendung von mhS von 10 bis 30 bp aktiv wird. Jedoch zeigen die Ergebnisse bei 20 bp mhS mit Suppression beider Schlüsselproteine von HR eine reduzierte Luziferase-Aktivität auf. Die Wahl des Ansatzpunktes in der Signalkaskade durch Suppression des Anfangs- oder Endproteins führen zu keinem Unterschied in der Signalaktivität.

### **4.3 Hypothese der Funktionalität des Reportersystems**

Das für die Fragestellung dieser Doktorarbeit angepasste Reportersystem zeigt im mikrohomologen Bereich von 10 bp bis 30 bp Signalaktivitäten auf, die in Abhängigkeit von der Länge der eingesetzten mhS variieren. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine Mikrohomologien-abhängige DNA-Rekombination stattfindet und dass dieses Reportersystem die Effizienz des Einbaus der gewünschten DNA-Sequenz durch die Messung der Luziferase-Aktivität aufzeigt. Die Streuung der Messwerte ist durch den Einfluss multipler Faktoren auf die Effizienz des Reportersystems erklärbar. Diese sollen in diesem Kapitel kurz thematisiert werden.

Während der Transfektion können sich die im folgenden Abschnitt genannten Faktoren auf die Messdaten auswirken: Die Auszählung der zu transfizierenden Zellen erfolgte durch die Neubauer-Zählkammer, hier kann es durch die nicht vollständige Separierung



und durch die Konfluenz der Zellen zu Abweichungen der für die Transfektion zur Verfügung stehenden Zellanzahl kommen. Auch eine mögliche Kontamination der Zellen durch unsteriles Arbeiten in der Zellkultur kann zu einer Reduktion der Zellzahl führen. Des Weiteren hat die Passage-Zahl der Zellen einen entscheidenden Einfluss auf die Fähigkeit der Zellen, die gewünschten Plasmide in die Zelle aufzunehmen. In dieser Arbeit wurde eine maximale Passagierzahl der HEK293-Zellen von 20 festgesetzt. Für die Durchführung der Mikrohomologien-abhängigen DNA-Rekombination waren Tripel- und Quadrupel-Transfektionen zur Einbringung der gewünschten DNA-Plasmide in die Zelle notwendig. Die Anzahl der zu transfizierenden Plasmide beeinflusst die Effizienz der Transfektionen. Je weniger Plasmide transfiziert werden, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für das vollständige Einbringen der notwendigen DNA-Plasmide in die Zelle.

Die nachfolgende Integration der Ziel-DNA-Sequenz in das Genom der Zelllinie zur Expression der Luziferase ist zum einen davon abhängig, in welcher Aktivitätsphase des Zellzyklus sich die Zellen befinden und dementsprechend welche DSB-Reparaturmechanismen in dieser Phase des Zellzyklus Aktivitäten aufweisen. Zum anderen ist die Effektivität der Integration der Ziel-DNA-Sequenz in das Genom der Zelllinie von der Lokalisation der induzierten DNA-Doppelstrangbrüche abhängig. So konnten durch Vorexperimente der Arbeitsgruppe für Experimentelle Ophthalmologie in Gießen spezifische Schnittstellen im Genom der Zelllinie identifiziert werden, durch deren Einsatz die Effizienz des Einbaus der DNA-Zielsequenz in das Genom an der gewünschten Lokalisation gesteigert werden kann (Yanik et al. 2018).

Zur Durchführung des Luziferase-Assays im Reportersystem erfolgte die Extraktion der Luziferase-Proteine durch eine mechanische Zellernte. Im Rahmen der Zellernte kann das unvollständige mechanische Lösen der Zellen vom Untergrund der Zellkulturschale zu Ungenauigkeiten führen. Des Weiteren ist das verwendete Substrat zur Durchführung der Luziferase-Messung (h-Coelenterazine) licht- und wärmeempfindlich und kann somit durch eine unzureichend lichtgeschützte Lagerung frühzeitig umgesetzt werden.

#### **4.4 Reportersystem als Therapieaussicht für XLRP?**

Die XLRP führt durch den Funktionsverlust des *RPGR*-Gens zu einer fortschreitenden Degeneration der Photorezeptoren. Das Genome Editing bietet durch die Korrektur des zugrundeliegenden genetischen Defekts im Genom eine durch die Zellmaschinerie gesteuerte Expression eines physiologischen Levels der funktionsrelevanten Proteine. In

dieser Doktorarbeit konnte ein Reportersystem, basierend auf die Expression der Luziferase auf genomischen Ebene *in vitro* etabliert werden, welches eine sensitive Methode zur Messung der Effizienz des DNA-Reparaturmechanismus MMEJ in zielgerichteten Genome editing Ansätzen darstellt.

Der klinische Einsatz einer Gentherapie ist durch eine Vielzahl an Faktoren limitiert (Crane et al. 2021): die Verteilung und Aufnahme des Vektors in die Zielzellen, das eingeschränkte therapeutische Zeitfenster bei degenerativen Erkrankungen, die Effizienz des Genome Editing und die *off-target* Ereignisse im Rahmen des Genome Editing.

Das Auge ist als Ort der Applikation für die Gentherapie leicht zugänglich. Durch die lokale Applikation der Vektoren kann die Therapeutika-Dosis und die *off-target* Rate deutlich reduziert werden. Die subretinale Applikation ermöglicht die Applikation an die Zielzellen der XLRP (Photorezeptoren), jedoch zeigt sie aufgrund der möglichen Netzhautabhebung an der Infiltrationsstelle eine hohe Komplikationsrate auf. Bei intravitrealer Applikation und OCT-gestützter suprachoroidealer Applikation mittels Verwendung von Mikronadelsystemen ist eine Penetration mehrerer Schichten bis zu den Zielzellen erforderlich (Crane et al. 2021). Yiu et al. zeigten mit der transskleralen subretinalen Applikation über Mikronadeln eine neue Möglichkeit der lokalen Applikation mit einhergehender reduzierter Immunreaktion auf. Für das Einbringen des Vektors in die gewünschten Zielzellen kommen virale Vektoren zum Einsatz, die Unterschiede in der Größe ihrer genetischen Verpackungskapazitäten aufweisen: Adeno-assoziierte Viren mit einer maximalen genetischen Verpackungskapazität von 5 kbp (Wu et al. 2010) mit möglicher Steigerung der Verpackungskapazität auf bis zu 10 kbp durch die Verwendung dualer AAV-Vektoren (Trapani 2019) sowie Lentiviren mit einer genetischen Verpackungskapazität bis 8 kbp (Dong und Kantor 2021). Bisher erfolgten auf das Genome Editing basierende Therapieansätze unter Nutzung des körpereigenen DSB-Reparaturmechanismus HR, da dieser im Gegensatz zu dem fehlerbasierten NHEJ durch die Verwendung von Homologien zu einer präzisen nahezu fehlerfreien Genkorrektur führt. Sakuma et al. zeigten, dass der Einbau einer gewünschten Gensequenz durch die Verwendung kürzerer Homologien im Rahmen des erst kürzlich beschriebenen körpereigenen DSB-Reparaturmechanismus MMEJ möglich sei. MMEJ als körpereigener DSB-Reparaturmechanismus benötigt im Gegensatz zu HR keine langen homologen Sequenzregionen über 100 bp. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten fand sich die höchste Reparatureffizienz bei Einsatz von MMEJ im Bereich

von 10-30 bp bei der Verwendung von 15 bp langen Mikrohomologien, sodass die Herstellung der Donor-Plasmide einfacher und schneller erfolgen kann und die genetische Verpackungskapazität durch diesen alternativen DSB-Reparaturmechanismus reduziert werden kann. Durch die Verwendung von einzelsträngigen Oligodesoxynukleotiden (ssODN) als Template für HR ist eine Reduktion der Länge der benötigten Templates möglich, jedoch sind diese für das Einbringen längerer Gensequenzen, wie das im Fall der ORF-15 Region im Rahmen der XLRP (567 Aminosäuren) notwendig wäre, nicht geeignet (Chen et al. 2011).

Ein weiterer die Gentherapie einschränkender Faktor ist das limitierte Zeitfenster zur Behandlung von degenerativen Erkrankungen. Die frühe physiologische Alteration und die folgende Degeneration der Photorezeptoren limitieren das therapeutische Zeitfenster zur Durchführung der korrigierenden Gentherapie. Der Einsatz des Genome Editing *in vivo* kann nur in funktionell aktiven Zellen stattfinden. Die Anzahl der lebensfähigen Zellen variiert in Abhängigkeit der mutierten Gensequenz und der resultierenden Erkrankung (Hung et al. 2016). Dabei wird die Effizienz des induzierten DSB-Reparaturmechanismus und damit die Effizienz der Genkorrektur von der Aktivität der Zelle im Zellzyklus beeinflusst. Veränderungen und Modifikationen der Gensequenz können durch die stattfindende Teilung der Zelle umgesetzt werden. Es kann jedoch nach einem gewissen Zeitraum zu einer Reduktion der Genexpression kommen. Die Photorezeptoren sind als post-mitotische differenzierte Zellen nicht mehr teilungsfähig, wodurch die Genexpression der eingebrachten Vektoren erhalten bleibt. Aufgrund der reduzierten Zellaktivität besteht jedoch eine verminderte zelluläre Aufnahme der Vektoren in die Zielzellen.

Die Aktivitäten der einzelnen DSB-Reparaturmechanismen und die daraus resultierende Effizienz des Genome Editing in Abhängigkeit von der vorliegenden Zellzyklusphase werden in der Literatur divers diskutiert. MMEJ stellt als DSB-Reparaturmechanismus eine Alternative zum bisher verwendeten DSB-Reparaturmechanismus HR zur zielgerichteten Genkorrektur dar. Li et al. wiesen nach, dass ein DSB-induzierender Vektor mit langen homologen Sequenzen über 400 bp eine höhere Effizienz in menschlichen iPS-Zellen (teilungsfähigen Zellen) aufweisen als Vektoren mit mikrohomologen Sequenzen der Länge von 50 bp im Rahmen des MMEJ. Yao et al. zeigten jedoch, dass eine auf MMEJ basierende Integration *in vivo* in nicht-teilungsfähigen Zellen eine höhere Effizienz aufweisen als eine auf HR basierende

Integration, sodass die weitere Evaluierung dieses *in vitro* auf den DSB-Reparaturmechanismus MMEJ basierenden Reportersystems nach Etablierung der besten Therapiestrategie in Tiermodellen und in post-mitotischen Zellen angezeigt wäre.

Das oberste Ziel der Gentherapie ist die Wahrung der Sicherheit des Genoms. Der medizinische Einsatz von CRISPR/Cas9 sollte unter Berücksichtigung der *off-target* Aktivitäten erfolgen. Das spezielle Design der *sgRNA* des CRISPR/Cas9-Systems wie z. B. durch die Verwendung einer *double nick sgRNA* oder einer *truncated sgRNA* kann zu einer signifikanten Reduktion der *off-target* Ereignisse führen (Miyaoka et al. 2016; Slaymaker et al. 2016; Kleinstiver et al. 2016). Die Optimierung des CRISPR/Cas9-Systems zur Generierung optimaler Bedingungen für Genmodifikationen und zur Reduktion der *off-target* Ereignisse sind zur Wahrung des Genoms weiterhin entscheidend und Ziel weiterführender Studien (Hung et al. 2016; Han et al. 2020).

#### **4.5 Vergleich Genome Editing mit Genaddition**

Die kürzliche Zulassung eines Gentherapeutikum zur Behandlung der erblichen Netzhauterkrankung „Leber‘sche kongenitale Amaurose (LCA)“, bei der eine Mutation des für die Produktion des Enzyms RPE65 zuständigen Gens vorliegt, repräsentiert einen Fortschritt in der klinischen Medizin und bietet Potenzial zur Behandlung anderer monogenetischer Erberkrankungen mittels der Genadditionstherapie. Durch die subretinale Injektion eines die *RPE65*-Gensequenz kodierenden AAV2-Vektors konnte eine klinische Verbesserung der Beschwerdesymptomatik aufgezeigt werden (Russell et al. 2017).

Die Entwicklung eines therapeutischen Vektors zum gentherapeutischen Einsatz für die XLRP stellt eine Herausforderung dar, da die ORF15-Region des *RPGR*-Gens aufgrund seiner repetitiven Purin-reichen Sequenz weniger stabil und damit anfällig für spontane Mutationen während der Klonierung des rekombinanten viralen Vektors ist (La Martinez-Fernandez de Camara et al. 2020). Durch die Optimierung der kodierenden Gensequenz des *RPGR*-Gens konnte eine höhere Stabilität/Integrität der *RPGR*-Gensequenz und eine höhere Effizienz der über AAV8-Vektoren vermittelten Gentherapie in Tiermodellen aufgezeigt werden (Fischer et al. 2017). Durch Nightstar, Prof. MacLaren und Kollegen erfolgte die Einleitung einer interventionellen Studie der Phase II/III (XIRIUS-Studie) zur Evaluation der Sicherheit, der Verträglichkeit und Effizienz einer einmaligen subretinalen Injektion eines AAV8-Vektors (BIIB112), der die kodierende

*RPGR*-Gensequenz enthält (A Clinical Trial of Retinal Gene Therapy for X-linked Retinitis Pigmentosa Using BIIB112 - Full Text View - ClinicalTrials.gov 2021.000Z). Dabei wurden Patienten aus der XOLARIS-Studie, die klinisch die Progression der XLRP-Erkrankung ohne therapeutische Intervention erfasst, bei Erfüllung der relevanten Einschlusskriterien für die Phase III eingeschlossen (Hu et al. 2020). Erste Daten der Gentherapie mittels BIIB112 zeigen über einen Beobachtungszeitraum von 12 Monaten eine gute therapeutische Toleranz und in Kohorten mit höherer Dosierung des Vektors eine frühe und anhaltende Verbesserung der zentralen Netzhautsensibilität, der primäre Studienendpunkt konnte jedoch nicht erreicht werden (Robert E MacLaren et al. 2021).

Durch die Verwendung der Genadditionstherapie kann zwar das benötigte Protein mittels Verwendung eines AAV-Vektors in die Zelle gebracht werden, jedoch führt diese Art der Gentherapie nicht zur Behandlung der Krankheitsursache. Da bei der XLRP ebenfalls fehlerhafte Proteine produziert werden, die die Funktionalität der für den Sehprozess entscheidenden Proteine beeinflussen kann, bietet das Genome editing den idealeren therapeutischen Ansatz durch die Korrektur der fehlerhaften Gensequenz mit resultierender intrazellulärer und physiologischer Steuerung des Proteinexpressionslevels.

#### **4.6 Schlussfolgerung/Fazit**

In dieser Doktorarbeit erfolgt die Etablierung und Validierung eines Reportersystem zur Identifikation mikrohomologer DNA-Rekombination *in vitro* in HEK293-Zellen. Durch die gezielte Induktion von Doppelstrangbrüchen im Bereich der mutierten Gensequenz, soll der körpereigene DSB-Reparaturmechanismus MMEJ durch das Anbieten von Mikrohomologien, die die gewünschte Gensequenz flankieren, stimuliert werden und die mutierte Gensequenz durch den Einbau der gewünschten Gensequenz korrigiert werden. Es kann gezeigt werden, dass das Reportersystem Signalaktivitäten aufweist und dass mittels der Messung der Luziferase-Aktivität die Effizienz des korrekten Einbaus der gewünschten Gensequenz getestet und durch Variation der Komponenten des Systems optimiert werden kann.

In den erhobenen Daten kann durch die Reduktion der Signalaktivität der Luziferase bei Suppression des MMEJ-Schlüsselproteins nachgewiesen werden, dass bei der Verwendung von mikrohomologen Sequenzen der DSB-Reparaturmechanismus MMEJ induziert wird und der Einbau der gewünschten Gensequenz über die mhS in das Genom

stattfindet. Die Messung der Luziferase-Aktivität bei Variation der Längen der Mikrohomologien im Bereich von 10 bp bis 30 bp zeigt eine Diversität der Aktivitäten auf. Die höchste Aktivität von MMEJ war bei der Verwendung von 15 bp langen Mikrohomologien zu verzeichnen. MMEJ bietet damit als körpereigener DSB-Reparaturmechanismus zum Einsatz im Genome Editing eine Möglichkeit zur gezielten Korrektur einer krankheitsverursachenden Gensequenz. Des Weiteren ist durch den gezielten Knockout einzelner Schlüsselproteine der DSB-Reparaturmechanismen die Bestimmung und die Beeinflussung der Aktivitäten der einzelnen DSB-Reparaturmechanismen möglich. Der DSB-Reparaturmechanismus NHEJ hat aufgrund seiner hohen Aktivität einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivitäten der anderen DSB-Reparaturmechanismen. Durch die gezielte Suppression von NHEJ kann eine Steigerung der Aktivität des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ und damit eine Steigerung der Effizienz des korrekten Einbaus der gewünschten Gensequenz durch MMEJ erzielt werden. Die effizienteste Suppression des DSB-Reparaturmechanismus NHEJ zeigte sich bei Inhibition des endständigen Schlüsselproteins, der Ligase 4.

Das Reportersystem bietet durch die Möglichkeit der Veränderung einzelner Komponenten und der Messung des erfolgten Einbaus der Gensequenz durch die Bestimmung der Luziferase-Aktivität ein Werkzeug zur Erforschung der zell-spezifischen Aktivitäten der DSB-Reparaturmechanismen, hier in HEK-Zellen *in vitro*. Dieses Reportersystem wurde für die ORF-15 Region des *RPGR*-Gens entwickelt, in welcher der Großteil der die XLRP verursachenden Mutationen lokalisiert sind. Aufgrund der einfachen Programmierbarkeit von CRISPR/Cas9 und der individuellen Gestaltung der gewünschten einzubringenden Gensequenz ist dieses System bei weiterer Etablierung und Optimierung multipel einsetzbar. Durch die Ausstattung dieses System mit jeder therapeutisch relevanten DNA-Sequenz ist es möglich, dieses Modell auf andere monogenetische Erkrankungen auszuweiten, bei denen der die Krankheit verursachende Genlocus identifiziert ist. Durch den Einsatz von Genome Editing kann durch den Austausch der mutierten Gensequenz mit der gewünschten Gensequenz eine Genkorrektur stattfinden, die zur physiologischen Expression der Gensequenz und damit zu einem physiologischen Level des benötigten/funktionserhaltenden Proteins führt. Damit bietet dieses Reportersystem mittels Genome Editing unter Nutzung des

körper eigenen DSB-Reparaturmechanismus MMEJ einen möglichen Ansatz zur Therapie monogenetischer Erkrankungen.

## 4.7 Ausblick

Zur weiteren Etablierung und Optimierung des in dieser Doktorarbeit entwickelten auf die Messung der Luziferase-Aktivität basierenden Reportersystem zur Studie des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ und zur Ermittlung der notwendigen Länge der mhS zum effektiven Ersatz der mutierten ORF15-Region in humanen Patienten sind weiterführende Untersuchungen notwendig. Die bereits durchgeführten Suppressionen der Schlüsselproteine der körpereigenen DSB-Reparaturmechanismen führen tlw. zu einer quantitativ erfassten Reduktion der Luziferase-Aktivität und damit zur Suppression des jeweiligen DSB-Reparaturmechanismus. Weiterführend sollten qualitative Analysen der Suppression der Schlüsselproteine der DSB-Reparaturmechanismen NHEJ und HR zur Verifizierung der Proteinknockouts und zur weiteren Optimierung dieser erfolgen, um die Aktivität des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ in den Zellen zu begünstigen.

Nur durch die vollständige Integration der notwendigen Plasmide ist eine fehlerfreie, sichere und effiziente Genkorrektur zu erwarten. Durch die Reduktion der Anzahl der zu transfizierenden Plasmide z. Bsp. in Form der Erstellung eines *all-in-one* Vektors wäre eine Steigerung der Transfektionseffizienz und damit eine Erhöhung der Effizienz des Reportersystems denkbar.

Nach Etablierung der geeignetsten Strategie für das entsprechende Krankheitsmodell, kann das System in Zukunft in *in vivo* Modellen verschiedener neu generierter Tiermodelle evaluiert werden.

Die Wahrung der Sicherheit und der Integrität des eigenen Genoms hat im Einsatz des Genome Editing oberste Priorität. Deshalb ist das Monitoring der *off-targets* mittels Durchführung von *off-target*-Analysen von fundamentaler Bedeutung.

Die oben genannten weiterführenden Schritte sollten jedoch immer in der Notwendigkeit der Reevaluation ethischer Aspekte erfolgen.



## 5. Zusammenfassung

Die X-chromosomale Form der Retinitis pigmentosa (XLRP) stellt aufgrund der progredienten Degeneration der Photorezeptoren mit Erblindung innerhalb der zweiten Lebensdekade eine der schwerwiegenderen Formen der RP dar und ist aktuell nicht heilbar. 80 % der die XLRP verursachenden Mutationen sind im terminalen Exon des RPGR-Gens (*Retinitis pigmentosa GTPase regulator*), der ORF15-Region, lokalisiert, weshalb die Korrektur der mutierten Gensequenz durch Genome Editing einen kurativen Therapieansatz bietet. Der körpereigene DNA-DSB-Reparaturmechanismus MMEJ (*microhomology mediated end-joining*) ist in Kombination mit hochspezifischen Endonukleasen wie CRISPR/Cas9 eine Alternative zu den bereits im Genome Editing eingesetzten HR (*homologous recombination*) und NHEJ (*non-homologous end joining*). Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Etablierung eines Reportersystem *in vitro* zur Testung und Effizienzsteigerung von MMEJ, das durch den Einsatz in der ORF15-Region des RPGR-Genlokus einen kurativen Therapieansatz für die XLRP bietet.

Es erfolgte die Generierung eines auf Fluoreszenz-basierenden Reportersystem für MMEJ zur Testung in HEK293-Zellen, die die RPGR-ORF15 Sequenz mit einem vorgeschalteten CMV-Promoter enthalten. Über mikrohomologe DNA-Rekombination, induziert durch das gezielte Einbringen von DSB durch CRISPR/Cas9, kann die Luziferase-Gensequenz flankiert von mikrohomologen Sequenzen (mhS), die komplementär zur RPGR-ORF15 Region sind, in das Genom integriert und durch den CMV-Promoter exprimiert werden. Es erfolgte die Messung der Luziferase-Aktivität unter Variation der Länge der mhS (10, 15, 20 und 30 bp).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Reportersystem ein wertvolles Werkzeug zur Etablierung und Validierung der Aktivität des DSB-Reparaturmechanismus MMEJ ist. Die geringere Signalaktivität bei Suppression der Ligase 3 (Schlüsselprotein von MMEJ) zeigt, dass MMEJ durch das Reportersystem induziert wird. Unter Variation der Längen der mhS fand sich die höchste Luziferase-Aktivität bei 15 bp langen mhS. Durch die gezielte Suppression der konkurrierenden DSB-Reparaturmechanismen kann MMEJ favorisiert werden. Die effizienteste Suppression von NHEJ fand sich bei Knockdown der endständigen Ligase 4.

Weiterführende Analysen der Knockdown-Strategien der konkurrierenden DSB-Reparaturmechanismen und die Evaluation des Reportersystems in *in vivo* Modellen sind erforderlich.

## 6. Abstract

The X-linked Retinitis pigmentosa (XLRP) is one of the most severe forms of the RP which leads to a progressive loss of vision with full blindness in the second decade of life due to the degeneration of the rod photoreceptors followed by the degeneration of cone photoreceptors. XLRP has been incurable thus far. The majority (80 %) of the XLRP causing mutations are localized in the terminal exon ORF15 of the RPGR-gene (Retinitis pigmentosa GTPase regulator) therefore the correction of the mutated DNA sequence by using genome editing is a promising therapeutic approach. NHEJ (non-homologous end joining) and HR (homologous recombination) are the common gene editing strategies. MMEJ (microhomology mediated end-joining) in combination with the high-specific endonuclease CRISPR/Cas9 is supposed to be an alternative mechanism.

The aim of this study was to develop a reporter system to test and increase the efficacy of the genome editing mechanism MMEJ after CRISPR/Cas9-mediated cleavage in cell culture. This could be achieved by using it at the ORF 15 region of the RPGR gene locus a curative therapeutic approach for the XLRP patients.

A fluorescence-based reporter system for MMEJ was generated to test in HEK293 cells containing the RPGR-ORF15 sequence with an upstream localized ubiquitous CMV promoter. A vector containing the luciferase sequence flanked by microhomology sequences (mhs) which are complementary to the RPGR-ORF15 gene was transfected. The double strand breaks were induced by co-transfection of a CRISPR/Cas9 system. Based on the provided complementary microhomology sequences the luciferase sequence was integrated and expressed by the upstream localized CMV promoter. The generated luminescence was measured by using different lengths of mhs (10, 15, 20 and 30 bp).

The results of the study show that the developed reporter system is a valuable tool to study the efficacy of MMEJ. The knockout of the key regulator of the MMEJ repair pathway (Ligase 3) leads to a lower luciferase activity and confirm that MMEJ is induced. The highest luciferase activity was detected by using mhs of 15 bp. By knocking out the competitive repair mechanism NHEJ and HR, MMEJ could be favoured. The activity of the error-prone repair mechanism NHEJ could be reduced by knocking down the terminal key regulator protein (Ligase 4).

Further analyses of the knock down strategies of the involved repair mechanisms and the transfer to in vivo models are necessary

## Literaturverzeichnis

- A Clinical Trial of Retinal Gene Therapy for X-linked Retinitis Pigmentosa Using BIIB112 - Full Text View - ClinicalTrials.gov (2021.000Z). Online verfügbar unter <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03116113?term=NCT03116113&rank=1>, zuletzt aktualisiert am 01.11.2021.000Z, zuletzt geprüft am 01.11.2021.140Z.
- Barrangou, Rodolphe; Marraffini, Luciano A. (2014): CRISPR-Cas systems: Prokaryotes upgrade to adaptive immunity. In: *Molecular cell* 54 (2), S. 234–244. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.011.
- Beltran, William A.; Cideciyan, Artur V.; Lewin, Alfred S.; Hauswirth, William W.; Jacobson, Samuel G.; Aguirre, Gustavo D. (2014): Gene augmentation for X-linked retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 5 (2), a017392. DOI: 10.1101/cshperspect.a017392.
- Birch, David G.; Bennett, Lea D.; Duncan, Jacque L.; Weleber, Richard G.; Pennesi, Mark E. (2016): Long-term Follow-up of Patients With Retinitis Pigmentosa Receiving Intraocular Ciliary Neurotrophic Factor Implants. In: *American journal of ophthalmology* 170, S. 10–14. DOI: 10.1016/j.ajo.2016.07.013.
- Brandsma, Inger; Gent, Dik C. (2012): Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. In: *Genome integrity* 3 (1), S. 9. DOI: 10.1186/2041-9414-3-9.
- Cannan, Wendy J.; Pederson, David S. (2016): Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. In: *Journal of cellular physiology* 231 (1), S. 3–14. DOI: 10.1002/jcp.25048.
- Chan, Fung; Hauswirth, William W.; Wensel, Theodore G.; Wilson, John H. (2011): Efficient mutagenesis of the rhodopsin gene in rod photoreceptor neurons in mice. In: *Nucleic acids research* 39 (14), S. 5955–5966. DOI: 10.1093/nar/gkr196.
- Chang, Howard H. Y.; Pannunzio, Nicholas R.; Adachi, Noritaka; Lieber, Michael R. (2017): Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 18 (8), S. 495–506. DOI: 10.1038/nrm.2017.48.
- Chen, Fuqiang; Pruett-Miller, Shondra M.; Huang, Yuping; Gjoka, Monika; Duda, Katarzyna; Taunton, Jack et al. (2011): High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases. In: *Nat Methods* 8 (9), S. 753–755. DOI: 10.1038/nmeth.1653.
- Cox, David Benjamin Turitz; Platt, Randall Jeffrey; Zhang, Feng (2015): Therapeutic genome editing: prospects and challenges. In: *Nature medicine* 21 (2), S. 121–131. DOI: 10.1038/nm.3793.
- Crane, Ryan; Conley, Shannon M.; Al-Ubaidi, Muayyad R.; Naash, Muna I. (2021): Gene Therapy to the Retina and the Cochlea. In: *Frontiers in neuroscience* 15, S. 652215. DOI: 10.3389/fnins.2021.652215.
- Cristea, Sandra; Freyvert, Yevgeniy; Santiago, Yolanda; Holmes, Michael C.; Urnov, Fyodor D.; Gregory, Philip D.; Cost, Gregory J. (2013): In vivo cleavage of transgene donors promotes nuclease-

- mediated targeted integration. In: *Biotechnology and bioengineering* 110 (3), S. 871–880. DOI: 10.1002/bit.24733.
- Cuenca, Nicolás; Fernández-Sánchez, Laura; Campello, Laura; Maneu, Victoria; La Villa, Pedro de; Lax, Pedro; Pinilla, Isabel (2014): Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. In: *Progress in retinal and eye research* 43, S. 17–75. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2014.07.001.
- Daiger, S. P.; Sullivan, L. S.; Bowne, S. J. (2013): Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. In: *Clinical genetics* 84 (2), S. 132–141. DOI: 10.1111/cge.12203.
- Davidson, Beverly L.; McCray, Paul B. (2011): Current prospects for RNA interference-based therapies. In: *Nature reviews. Genetics* 12 (5), S. 329–340. DOI: 10.1038/nrg2968.
- Deltcheva, Elitza; Chylinski, Krzysztof; Sharma, Cynthia M.; Gonzales, Karine; Chao, Yanjie; Pirzada, Zaid A. et al. (2011): CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. In: *Nature* 471 (7340), S. 602–607. DOI: 10.1038/nature09886.
- Deng, Sarah K.; Gibb, Bryan; Almeida, Mariana Justino de; Greene, Eric C.; Symington, Lorraine S. (2014): RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks. In: *Nature structural & molecular biology* 21 (4), S. 405–412. DOI: 10.1038/nsmb.2786.
- Deng, Wen-Tao; Dyka, Frank M.; Dinculescu, Astra; Li, Jie; Zhu, Ping; Chiodo, Vince A. et al. (2015): Stability and Safety of an AAV Vector for Treating RPGR-ORF15 X-Linked Retinitis Pigmentosa. In: *Human gene therapy* 26 (9), S. 593–602. DOI: 10.1089/hum.2015.035.
- Dong, Wendy; Kantor, Boris (2021): Lentiviral Vectors for Delivery of Gene-Editing Systems Based on CRISPR/Cas: Current State and Perspectives. In: *Viruses* 13 (7), S. 1288. DOI: 10.3390/v13071288.
- Doudna, Jennifer A.; Charpentier, Emmanuelle (2014): Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. In: *Science (New York, N.Y.)* 346 (6213), S. 1258096. DOI: 10.1126/science.1258096.
- Fischer, M. Dominik; McClements, Michelle E.; La Martinez-Fernandez de Camara, Cristina; Bellingrath, Julia-Sophia; Dauletbekov, Daniyar; Ramsden, Simon C. et al. (2017): Codon-Optimized RPGR Improves Stability and Efficacy of AAV8 Gene Therapy in Two Mouse Models of X-Linked Retinitis Pigmentosa. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 25 (8), S. 1854–1865. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.05.005.
- Frohns, Antonia; Frohns, Florian; Naumann, Steffen C.; Layer, Paul G.; Löbrich, Markus (2014): Inefficient double-strand break repair in murine rod photoreceptors with inverted heterochromatin organization. In: *Current biology : CB* 24 (10), S. 1080–1090. DOI: 10.1016/j.cub.2014.03.061.
- Fu, Yanfang; Sander, Jeffrey D.; Reyon, Deepak; Cascio, Vincent M.; Joung, J. Keith (2014): Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. In: *Nature biotechnology* 32 (3), S. 279–284. DOI: 10.1038/nbt.2808.

- Guadagni, Viviana; Novelli, Elena; Piano, Ilaria; Gargini, Claudia; Strettoi, Enrica (2015): Pharmacological approaches to retinitis pigmentosa: A laboratory perspective. In: *Progress in retinal and eye research* 48, S. 62–81. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.005.
- Hamel, Christian (2006): Retinitis pigmentosa. In: *Orphanet journal of rare diseases* 1, S. 40. DOI: 10.1186/1750-1172-1-40.
- Han, H. A.; Pang, J. K.S.; Soh, B. S. (2020): Mitigating off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated in vivo gene editing. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 98 (5). DOI: 10.1007/s00109-020-01893-z.
- Hanna, Eve; Rémuzat, Cécile; Auquier, Pascal; Toumi, Mondher (2017): Gene therapies development: slow progress and promising prospect. In: *Journal of market access & health policy* 5 (1), S. 1265293. DOI: 10.1080/20016689.2017.1265293.
- Hartong, Dyonne T.; Berson, Eliot L.; Dryja, Thaddeus P. (2006): Retinitis pigmentosa. In: *Lancet (London, England)* 368 (9549), S. 1795–1809. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)69740-7.
- Hong, Dong-Hyun; Pawlyk, Basil; Sokolov, Maxim; Strissel, Katherine J.; Yang, Jun; Tulloch, Brian et al. (2003): RPGR isoforms in photoreceptor connecting cilia and the transitional zone of motile cilia. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 44 (6), S. 2413–2421. DOI: 10.1167/iovs.02-1206.
- Horvath, Philippe; Barrangou, Rodolphe (2010): CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. In: *Science (New York, N.Y.)* 327 (5962), S. 167–170. DOI: 10.1126/science.1179555.
- Hu, S.; Du, J.; Chen, N.; Jia, R.; Zhang, J.; Liu, X.; Yang, L. (2020): In Vivo CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing Mitigates Photoreceptor Degeneration in a Mouse Model of X-Linked Retinitis Pigmentosa. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 61 (4). DOI: 10.1167/iovs.61.4.31.
- Hung, Sandy S. C.; Chrysostomou, Vicki; Li, Fan; Lim, Jeremiah K. H.; Wang, Jiang-Hui; Powell, Joseph E. et al. (2016): AAV-Mediated CRISPR/Cas Gene Editing of Retinal Cells In Vivo. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 57 (7), S. 3470–3476. DOI: 10.1167/iovs.16-19316.
- Ishino, Yoshizumi; Krupovic, Mart; Forterre, Patrick (2018): History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. In: *Journal of bacteriology* 200 (7). DOI: 10.1128/JB.00580-17.
- Jasin, Maria; Haber, James E. (2016): The democratization of gene editing: Insights from site-specific cleavage and double-strand break repair. In: *DNA repair* 44, S. 6–16. DOI: 10.1016/j.dnarep.2016.05.001.
- Jinek, Martin; Chylinski, Krzysztof; Fonfara, Ines; Hauer, Michael; Doudna, Jennifer A.; Charpentier, Emmanuelle (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096), S. 816–821. DOI: 10.1126/science.1225829.
- Jinek, Martin; East, Alexandra; Cheng, Aaron; Lin, Steven; Ma, Enbo; Doudna, Jennifer (2013): RNA-programmed genome editing in human cells. In: *eLife* 2, e00471. DOI: 10.7554/eLife.00471.

- Jolly, Jasleen K.; Wagner, Siegfried K.; Martus, Peter; MacLaren, Robert E.; Wilhelm, Barbara; Webster, Andrew R. et al. (2020): Transcorneal Electrical Stimulation for the Treatment of Retinitis Pigmentosa: A Multicenter Safety Study of the OkuStim® System (TESOLA-Study). In: *Ophthalmic research* 63 (3), S. 234–243. DOI: 10.1159/000505001.
- Kleinstiver, Benjamin P.; Pattanayak, Vikram; Prew, Michelle S.; Tsai, Shengdar Q.; Nguyen, Nhu T.; Zheng, Zongli; Joung, J. Keith (2016): High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. In: *Nature* 529 (7587), S. 490–495. DOI: 10.1038/nature16526.
- Kostyrko, Kaja; Mermoud, Nicolas (2016): Assays for DNA double-strand break repair by microhomology-based end-joining repair mechanisms. In: *Nucleic acids research* 44 (6), e56. DOI: 10.1093/nar/gkv1349.
- La Martinez-Fernandez de Camara, Cristina; Cehajic-Kapetanovic, Jasmina; MacLaren, Robert E. (2020): RPGR gene therapy presents challenges in cloning the coding sequence. In: *Expert opinion on biological therapy* 20 (1), S. 63–71. DOI: 10.1080/14712598.2020.1680635.
- Le Cong; Ran, F. Ann; Cox, David; Lin, Shuailiang; Barretto, Robert; Habib, Naomi et al. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121), S. 819–823. DOI: 10.1126/science.1231143.
- Lemay, Marie-Laurence; Horvath, Philippe; Moineau, Sylvain (2017): The CRISPR-Cas app goes viral. In: *Current opinion in microbiology* 37, S. 103–109. DOI: 10.1016/j.mib.2017.06.001.
- Li, Jia; Zhang, Baibing; Bu, Jiwen; Du, Jiulin (2015): Intron-based genomic editing: a highly efficient method for generating knockin zebrafish. In: *Oncotarget* 6 (20), S. 17891–17894. DOI: 10.18632/oncotarget.4547.
- Liang, Li; Deng, Li; Nguyen, Son C.; Zhao, Xin; Maulion, Christopher D.; Shao, Changshun; Tischfield, Jay A. (2008): Human DNA ligases I and III, but not ligase IV, are required for microhomology-mediated end joining of DNA double-strand breaks. In: *Nucleic acids research* 36 (10), S. 3297–3310. DOI: 10.1093/nar/gkn184.
- Lieber, Michael R. (2010): The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. In: *Annual review of biochemistry* 79, S. 181–211. DOI: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131.
- Lipinski, Daniel M.; Thake, Miriam; MacLaren, Robert E. (2013): Clinical applications of retinal gene therapy. In: *Progress in retinal and eye research* 32, S. 22–47. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2012.09.001.
- Lyraki, Rodanthi; Megaw, Roly; Hurd, Toby (2016): Disease mechanisms of X-linked retinitis pigmentosa due to RP2 and RPGR mutations. In: *Biochemical Society transactions* 44 (5), S. 1235–1244. DOI: 10.1042/BST20160148.
- Ma, Yuanwu; Zhang, Lianfeng; Huang, Xingxu (2014): Genome modification by CRISPR/Cas9. In: *The FEBS journal* 281 (23), S. 5186–5193. DOI: 10.1111/febs.13110.

- Makarova, Kira S.; Koonin, Eugene V. (2015): Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1311, S. 47–75. DOI: 10.1007/978-1-4939-2687-9\_4.
- Makarova, Kira S.; Wolf, Yuri I.; Alkhnbashi, Omer S.; Costa, Fabrizio; Shah, Shiraz A.; Saunders, Sita J. et al. (2015): An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. In: *Nature reviews. Microbiology* 13 (11), S. 722–736. DOI: 10.1038/nrmicro3569.
- Mali, Prashant; Yang, Luhan; Esvelt, Kevin M.; Aach, John; Guell, Marc; DiCarlo, James E. et al. (2013): RNA-guided human genome engineering via Cas9. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121), S. 823–826. DOI: 10.1126/science.1232033.
- McVey, Mitch (2014): RPA puts the brakes on MMEJ. In: *Nature structural & molecular biology* 21 (4), S. 348–349. DOI: 10.1038/nsmb.2802.
- McVey, Mitch; Lee, Sang Eun (2008): MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. In: *Trends in genetics : TIG* 24 (11), S. 529–538. DOI: 10.1016/j.tig.2008.08.007.
- Megaw, Roly D.; Soares, Dinesh C.; Wright, Alan F. (2015): RPGR: Its role in photoreceptor physiology, human disease, and future therapies. In: *Experimental eye research* 138, S. 32–41. DOI: 10.1016/j.exer.2015.06.007.
- Mei, Yue; Wang, Yan; Chen, Huiqian; Sun, Zhong Sheng; Ju, Xing-Da (2016): Recent Progress in CRISPR/Cas9 Technology. In: *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* 43 (2), S. 63–75. DOI: 10.1016/j.jgg.2016.01.001.
- Mills, J. O.; Jalil, A.; Stanga, P. E. (2017): Electronic retinal implants and artificial vision: journey and present. In: *Eye (London, England)* 31 (10), S. 1383–1398. DOI: 10.1038/eye.2017.65.
- Misteli, Tom; Soutoglou, Evi (2009): The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 10 (4), S. 243–254. DOI: 10.1038/nrm2651.
- Miyaoka, Yuichiro; Berman, Jennifer R.; Cooper, Samantha B.; Mayerl, Steven J.; Chan, Amanda H.; Zhang, Bin et al. (2016): Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing. In: *Scientific reports* 6, S. 23549. DOI: 10.1038/srep23549.
- Müller, Carina (2016): Etablierung eines Reportersystems zur Identifikation von mikro-homologer und homologer DNA-Rekombination.
- Nakade, Shota; Tsubota, Takuya; Sakane, Yuto; Kume, Satoshi; Sakamoto, Naoaki; Obara, Masanobu et al. (2014): Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. In: *Nature communications* 5, S. 5560. DOI: 10.1038/ncomms6560.

- NobelPrize.org (2021.000Z): All 2020 Nobel Prizes. Online verfügbar unter <https://www.nobelprize.org/all-2020-nobel-prizes/>, zuletzt aktualisiert am 09.02.2021.000Z, zuletzt geprüft am 09.02.2021.462Z.
- Pape, Kartz, Silbernagl (2019): Physiologie. 9. vollständig überarbeitete.
- Patnaik, Sarita Rani; Raghupathy, Rakesh Kotapati; Zhang, Xun; Mansfield, David; Shu, Xinhua (2015): The Role of RPGR and Its Interacting Proteins in Ciliopathies. In: *Journal of ophthalmology* 2015, S. 414781. DOI: 10.1155/2015/414781.
- Petit, Lolita; Khanna, Hemant; Punzo, Claudio (2016): Advances in Gene Therapy for Diseases of the Eye. In: *Human gene therapy* 27 (8), S. 563–579. DOI: 10.1089/hum.2016.040.
- Prado, Dominic A.; Acosta-Acero, Marcy; Maldonado, Ramiro S. (2020): Gene therapy beyond luxturna: a new horizon of the treatment for inherited retinal disease. In: *Current opinion in ophthalmology* 31 (3), S. 147–154. DOI: 10.1097/ICU.0000000000000660.
- Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Wright, Jason; Agarwala, Vineeta; Scott, David A.; Zhang, Feng (2013): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. In: *Nature protocols* 8 (11), S. 2281–2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143.
- Rayapudi, Sobharani; Schwartz, Stephen G.; Wang, Xue; Chavis, Pamela (2013): Vitamin A and fish oils for retinitis pigmentosa. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (12), CD008428. DOI: 10.1002/14651858.CD008428.pub2.
- Retinitis pigmentosa (RP) | PRO RETINA Deutschland e. V. Online verfügbar unter <https://www.pro-retina.de/netzhauterkrankungen/retinitis-pigmentosa>, zuletzt geprüft am 22.07.2019.
- RetNet - Retinal Information Network (2019). Online verfügbar unter <https://sph.uth.edu/retnet/>, zuletzt aktualisiert am 24.01.2019, zuletzt geprüft am 21.07.2019.
- RetNet: Disease Table (2021.000Z). Online verfügbar unter <https://sph.uth.edu/retnet/disease.htm#23.107d>, zuletzt aktualisiert am 22.01.2021.000Z, zuletzt geprüft am 20.03.2021.103Z.
- Sakuma, Tetsushi; Nakade, Shota; Sakane, Yuto; Suzuki, Ken-Ichi T.; Yamamoto, Takashi (2016): MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR-Cas9 with the PITCh systems. In: *Nature protocols* 11 (1), S. 118–133. DOI: 10.1038/nprot.2015.140.
- Schmid, Fabian; Glaus, Esther; Cremers, Frans P. M.; Kloeckener-Gruissem, Barbara; Berger, Wolfgang; Neidhardt, John (2010): Mutation- and tissue-specific alterations of RPGR transcripts. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 51 (3), S. 1628–1635. DOI: 10.1167/iovs.09-4031.
- Schünke, Schulte, Schumacher, Voll, Wesker (2012): Prometheus Lernatlas der Anatomie - Kopf, Hals und Neuroanatomie: Georg Thieme Verlag.
- Seol, Ja-Hwan; Shim, Eun Yong; Lee, Sang Eun (2018): Microhomology-mediated end joining: Good, bad and ugly. In: *Mutation research* 809, S. 81–87. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2017.07.002.



- Sharon, Dror; Sandberg, Michael A.; Rabe, Vivian W.; Stillberger, Melissa; Dryja, Thaddeus P.; Berson, Eliot L. (2003): RP2 and RPGR mutations and clinical correlations in patients with X-linked retinitis pigmentosa. In: *American journal of human genetics* 73 (5), S. 1131–1146. DOI: 10.1086/379379.
- Shu, Xinhua; Black, Graeme C.; Rice, Jacqueline M.; Hart-Holden, Niki; Jones, Alison; O'Grady, Anna et al. (2007): RPGR mutation analysis and disease: an update. In: *Human mutation* 28 (4), S. 322–328. DOI: 10.1002/humu.20461.
- Sinha, Supriya; Villarreal, Diana; Shim, Eun Yong; Lee, Sang Eun (2016): Risky business: Microhomology-mediated end joining. In: *Mutation research* 788, S. 17–24. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2015.12.005.
- Slymaker, Ian M.; Gao, Linyi; Zetsche, Bernd; Scott, David A.; Yan, Winston X.; Zhang, Feng (2016): Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. In: *Science (New York, N.Y.)* 351 (6268), S. 84–88. DOI: 10.1126/science.aad5227.
- Srivastava, Mrinal; Raghavan, Sathees C. (2015): DNA double-strand break repair inhibitors as cancer therapeutics. In: *Chemistry & biology* 22 (1), S. 17–29. DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.11.013.
- Sternberg, Samuel H.; Richter, Hagen; Charpentier, Emmanuelle; Qimron, Udi (2016): Adaptation in CRISPR-Cas Systems. In: *Molecular cell* 61 (6), S. 797–808. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.01.030.
- Stieger, K.; Lorenz, B. (2014): Spezifische Gentherapie bei erblichen Netzhauterkrankungen - ein Update. In: *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 231 (3), S. 210–215. DOI: 10.1055/s-0033-1351059.
- Stieger, Knut; Chauveau, Christine; Rolling, Fabienne (2010): Preclinical studies on specific gene therapy for recessive retinal degenerative diseases. In: *Current gene therapy* 10 (5), S. 389–403.
- Stingl, Katarina; Schippert, Ruth; Bartz-Schmidt, Karl U.; Besch, Dorothea; Cottrill, Charles L.; Edwards, Thomas L. et al. (2017): Interim Results of a Multicenter Trial with the New Electronic Subretinal Implant Alpha AMS in 15 Patients Blind from Inherited Retinal Degenerations. In: *Frontiers in neuroscience* 11, S. 445. DOI: 10.3389/fnins.2017.00445.
- Tadi, Satish Kumar; Sebastian, Robin; Dahal, Sumedha; Babu, Ravi K.; Choudhary, Bibha; Raghavan, Sathees C. (2016): Microhomology-mediated end joining is the principal mediator of double-strand break repair during mitochondrial DNA lesions. In: *Molecular biology of the cell* 27 (2), S. 223–235. DOI: 10.1091/mbc.E15-05-0260.
- Taleei, Reza; Nikjoo, Hooshang (2013): Biochemical DSB-repair model for mammalian cells in G1 and early S phases of the cell cycle. In: *Mutation research* 756 (1-2), S. 206–212. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2013.06.004.
- Tee, James J. L.; Smith, Alexander J.; Hardcastle, Alison J.; Michaelides, Michel (2016): RPGR-associated retinopathy: clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. In: *The British journal of ophthalmology* 100 (8), S. 1022–1027. DOI: 10.1136/bjophthalmol-2015-307698.

- Trapani (2019): Adeno-Associated Viral Vectors as a Tool for Large Gene Delivery to the Retina. In: *Genes* 10 (4), S. 287. DOI: 10.3390/genes10040287.
- Truong, Lan N.; Li, Yongjiang; Shi, Linda Z.; Hwang, Patty Yi-Hwa; He, Jing; Wang, Hailong et al. (2013): Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (19), S. 7720–7725. DOI: 10.1073/pnas.1213431110.
- Verbakel, Sanne K.; van Huet, Ramon A. C.; Boon, Camiel J. F.; den Hollander, Anneke I.; Collin, Rob W. J.; Klaver, Caroline C. W. et al. (2018): Non-syndromic retinitis pigmentosa. In: *Progress in retinal and eye research* 66, S. 157–186. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2018.03.005.
- Vervoort, R.; Lennon, A.; Bird, A. C.; Tulloch, B.; Axton, R.; Miano, M. G. et al. (2000): Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa. In: *Nature genetics* 25 (4), S. 462–466. DOI: 10.1038/78182.
- Vervoort, Raf; Wright, Alan F. (2002): Mutations of RPGR in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). In: *Human mutation* 19 (5), S. 486–500. DOI: 10.1002/humu.10057.
- Villarreal, Diana D.; Lee, Kihoon; Deem, Angela; Shim, Eun Yong; Malkova, Anna; Lee, Sang Eun (2012): Microhomology directs diverse DNA break repair pathways and chromosomal translocations. In: *PLoS genetics* 8 (11), e1003026. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003026.
- Wang, Hailong; Xu, Xingzhi (2017): Microhomology-mediated end joining: new players join the team. In: *Cell & bioscience* 7, S. 6. DOI: 10.1186/s13578-017-0136-8.
- Wright, Alan F.; Chakarova, Christina F.; Abd El-Aziz, Mai M.; Bhattacharya, Shomi S. (2010): Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. In: *Nature reviews. Genetics* 11 (4), S. 273–284. DOI: 10.1038/nrg2717.
- Wright, Rachel N.; Hong, Dong-Hyun; Perkins, Brian (2011): Misexpression of the constitutive Rpgr(ex1-19) variant leads to severe photoreceptor degeneration. In: *Investigative ophthalmology & visual science* 52 (8), S. 5189–5201. DOI: 10.1167/iovs.11-7470.
- Wu, Zhijian; Yang, Hongyan; Colosi, Peter (2010): Effect of genome size on AAV vector packaging. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (1), S. 80–86. DOI: 10.1038/mt.2009.255.
- Yanik, Mert; Muller, Brigitte; Song, Fei; Gall, Jacqueline; Wagner, Franziska; Wende, Wolfgang et al. (2017): In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies. In: *Progress in retinal and eye research* 56, S. 1–18. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2016.09.001.
- Yanik, Mert; Ponnampalani, Surya Prakash Goud; Wimmer, Tobias; Trimborn, Lennart; Müller, Carina; Gambert, Isabel et al. (2018): Development of a Reporter System to Explore MMEJ in the Context of Replacing Large Genomic Fragments. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 11, S. 407–415. DOI: 10.1016/j.omtn.2018.03.010.

Yao, Xuan; Wang, Xing; Hu, Xinde; Liu, Zhen; Liu, Junlai; Zhou, Haibo et al. (2017): Homology-mediated end joining-based targeted integration using CRISPR/Cas9. In: *Cell research* 27 (6), S. 801–814. DOI: 10.1038/cr.2017.76.

Yiu, Glenn; Chung, Sook Hyun; Mollhoff, Iris N.; Nguyen, Uyen Tu; Thomasy, Sara M.; Yoo, Jesse et al. (2020): Suprachoroidal and Subretinal Injections of AAV Using Transscleral Microneedles for Retinal Gene Delivery in Nonhuman Primates. In: *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 16, S. 179–191. DOI: 10.1016/j.omtm.2020.01.002.

Zhao, Junhua; Bacolla, Albino; Wang, Guliang; Vasquez, Karen M. (2010): Non-B DNA structure-induced genetic instability and evolution. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 67 (1), S. 43–62. DOI: 10.1007/s00018-009-0131-2.

## Publikationsverzeichnis

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

## **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.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## **Danksagung**

Abschließend möchte ich allen, die mich während dieser Arbeit zu jederzeit tatkräftig unterstützt haben meinen Dank aussprechen:

... Prof. Dr. Dr. Knut Stieger für die Aufnahme als Doktorandin in sein tolles Forschungsteam, die Bereitstellung des Themas meiner Dissertation und die großartige Betreuung und Unterstützung bis zu guter Letzt, vor allem nach dem Mert uns verlassen hat. Deine Bürotür stand auch mir jederzeit offen, dafür danke ich dir!

... Mert Yanik für die harmonische Zusammenarbeit, die Einarbeitung in das Thema und Arbeitsmethodik sowie die Betreuung und die geduldvolle Beantwortung meiner Fragen.

... Mitarbeiter des Labors für die freundliche und familiäre Atmosphäre, das immer offene Ohr und die stetige Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

... für die Möglichkeit der Teilnahme am Prägraduiertenkolleg der JLU Gießen zum Erlernen des wissenschaftlichen Arbeitens, den Austausch mit Studienkollegen sowie die finanzielle Unterstützung während der Durchführung der Experimente im Labor.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Ich danke euch für den enormen Rückhalt, den ihr mir gegeben habt und dass ihr mir immer zur Seite gestanden habt. Durch eure Unterstützung und unermüdliche Motivation konnte ich die notwendige Kraft tanken, um meine Dissertation abzuschließen.