

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD WEBER

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

HAPLOTYP-SPEZIFISCHE DELETIONEN AM GENORT DES MORBUS BEST
MITTELS CRISPR-CAS9 GENOM-EDITIERUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Diana Eisner

2020

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR HUMANGENETIK
PROF. DR. BERNHARD WEBER

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

HAPLOTYP-SPEZIFISCHE DELETIONEN AM GENORT DES MORBUS BEST
MITTELS CRISPR-CAS9 GENOM-EDITIERUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Diana Eisner

2020

Dekan:

Prof. Dr. med. Dirk Hellwig

Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber

2. Berichterstatterin:

PD Dr. med. habil. Caroline Brandl

Tag der mündlichen Prüfung:

18.12.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Charakteristik des Bestrophin-1	3
2.2	Pathologie der Best'schen vitelliformen Makuladystrophie	4
2.3	Gentherapie hereditärer Retinopathien	6
2.4	Genom-Editierung mittels CRISPR/Cas9	8
2.5	Zielsetzung dieser Arbeit	13
3	Material	15
3.1	Bakterienstämme	15
3.2	Zelllinien	15
3.3	Vektoren	15
3.4	Klonierte Vektorkonstrukte	16
3.5	Oligonukleotide	16
3.5.1	Oligonukleotide für sgRNA	16
3.5.2	Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung	18
3.6	Enzyme	19
3.7	Reaktionssysteme	19
3.8	Molekularmassenstandard	20
3.9	Chemikalien	20
3.10	Puffer und Medien	21
3.11	Geräte	22
3.12	Software	23
4	Methoden	24
4.1	Software-gestützte Analyse	24
4.1.1	Auffinden repetitiver Sequenzen im BEST1-Genlocus	24
4.1.1.1	UCSC Genome Browser	24
4.1.1.2	NCBI Nucleotide BLAST	24
4.1.1.3	Repeat Masker	24
4.1.2	Auswahl SNP-spezifischer sgRNAs	25

4.1.2.1	Optimized CRISPR Design	25
4.1.3	Identifizierung der Haplotypen	25
4.1.3.1	Haploview	25
4.2	Klonierung der Konstrukte	25
4.2.1	Amplifizierung der DNA-Fragmente mittels PCR	26
4.2.2	Agarosegelelektrophorese	27
4.2.3	Extraktion und Aufreinigung der PCR-Produkte aus dem Agarosegel	27
4.2.4	Ligation in den pGem®-T-Vektor	28
4.2.5	Transformation der E. coli-Bakterien	28
4.2.6	Colony-PCR	29
4.2.7	Plasmid-Präparation aus 5mL Übernachtskulturen – Minipräp	29
4.2.8	Sangersequenzierung	29
4.2.9	Restriktionsverdau	31
4.2.10	Ligation in die Expressionsvektoren	31
4.2.10.1	Ligation der Zielsequenz in den pCAG-EGxxFP-Vektor	31
4.2.10.2	Ligation der sgRNA in den BB-PX459-Vektor	32
4.2.11	Plasmid-Präparation aus 100mL Übernachtskulturen – Midipräp	34
4.2.12	Herstellung von Glycerolstocks	34
4.3	Zellkultur	34
4.3.1	Kultivierung von HEK293T-Zellen	34
4.3.2	Kalziumphosphat-Transfektion von HEK293T-Zellen	35
5	Vorarbeiten	37
5.1	Bioinformatische Daten basierend auf dem 1000 Genomes Project	37
5.2	Sangersequenzierung der Patientenkohorte	38
6	Ergebnisse	39
6.1	Bioinformatische Auswertung	39
6.1.1	Übersicht der analysierten BEST1-Genregion	39
6.1.2	Kriterien für die Analyse der SNPs	40
6.1.3	Auswahl der SNP-spezifischen sgRNAs	45
6.1.4	Identifikation der Haplotypen	47

6.1.4.1	Identifikation der häufigen europäischen Haplotypen	47
6.1.4.2	Identifikation der Haplotypen der eigenen Patientenkohorte	48
6.2	Experimenteller Arbeitsteil	50
6.2.1	Genotypisierung der Patienten zur Phasenbestimmung der Mutation	50
6.2.2	Testung der bioinformatisch ermittelten sgRNAs	52
6.2.3	Optimierungsprozess der bioinformatisch ermittelten sgRNAs	54
6.2.3.1	Optimierungsversuch der sgRNA für SNP 581G (rs195161)	55
6.2.3.2	Optimierungsversuch der sgRNA für SNP 756T (rs1800008)	56
6.2.3.3	Optimierungsversuch der sgRNA für SNP 756C (rs1800008)	57
6.2.3.4	Optimierungsversuch der sgRNA für SNP 749A (rs149698)	58
6.2.4	Transfektionsergebnisse unter Verwendung der optimierten sgRNAs	60
7	Diskussion	62
7.1	Evaluation der bioinformatisch ermittelten sgRNAs und der angewandten Optimierungsstrategien	62
7.2	Erörterung alternativer Optimierungsstrategien zur Spezifitätssteigerung von CRISPR/Cas9	67
7.3	Evaluation des Haplotyp-spezifischen Ansatzes mittels CRISPR/Cas9 und Vorstellung alternativer CRISPR-Systeme	72
7.4	Weiterführende Aspekte dieser Arbeit	80
8	Abkürzungsverzeichnis	82
9	Abbildungsverzeichnis	84
10	Tabellenverzeichnis	85
11	Literaturverzeichnis	87
12	Danksagung	105
13	Eidesstattliche Erklärung	106

1 Zusammenfassung

Bestrophin-1 (BEST1) ist ein integrales Membranprotein, das sich beim Menschen ausschließlich an der basolateralen Membran des retinalen Pigmentepithels (RPE) befindet. Das Protein setzt sich aus fünf identischen Untereinheiten zusammen und fungiert als Volumen-gesteuerter Kalzium-abhängiger Chlorid-Kanal. Bislang wurden über 200 Mutationen im BEST1-Gen entdeckt, die mit verschiedenen hereditären Augenerkrankungen, den sogenannten Bestrophinopathien, assoziiert sind. Hierbei stellt die autosomal dominante juvenile Best'sche vitelliforme Makuladystrophie (BVMD) die häufigste Form dar. Im Krankheitsverlauf führt dabei eine Ansammlung von Lipofuszin im RPE allmählich zur atrophischen Vernarbung des RPE und bewirkt einen progredienten Sehverlust. Da der genaue Pathomechanismus der Erkrankung bislang noch ungeklärt ist, lassen sich gegenwärtig auch keine möglichen Therapieoptionen ableiten. Die Mutationen im BEST1-Gen lassen bei heterozygotem Vorliegen auf einen dominant-negativen Effekt auf die Funktion des homo-pentameren Kanals schließen. Bereits eine einzige defekte Proteinuntereinheit führt dabei vermutlich zu einer beeinträchtigten Kanalfunktionalität. Somit erscheint es zur Steigerung der Kanalfunktionalität therapeutisch als sinnvoll, jenes mutierte Allel gezielt auszuschalten, das zur Transkription defekter Proteine führt. Dadurch wäre die Proteinexpression zugunsten des wildtypischen Allels verschoben und die Oligomerisierung des Kanals könnte vermehrt aus intakten Proteinuntereinheiten erfolgen. Eine vielversprechende Methode für eine derartige Genveränderung basiert auf dem CRISPR/Cas9-System. Dieses System nutzt eine Cas9-Nuklease, die mithilfe einer Sequenz-spezifischen sgRNA zu einer bestimmten Ziel-DNA navigiert wird und dort einen Doppelstrangbruch auslöst.

Diese Arbeit verfolgte das Ziel, mittels CRISPR-Cas9 einen Knock-Out des pathologischen BEST1-Allels durch spezifische Deletion des Mutations-tragenden Haplotypen herbeizuführen. Für diesen Mutations-unabhängigen Ansatz sollte ein minimales Set an spezifischen sgRNAs entworfen werden, das ein Ausschalten der häufigsten BVMD-assoziierten Haplotypen der europäischen Bevölkerung ermöglicht. Eine derartige Haplotypendeletion kann unter Zuhilfenahme häufiger genomischer Polymorphismen (SNPs) der europäischen Population erreicht werden, indem zwei SNP-spezifische sgRNAs zwei heterozygote SNPs in cis-Lage zur Mutation binden und so das Schneiden der DNA durch die Cas9-Nuklease ermöglichen. Auf diese

Weise können Exon-überspannende Doppelstrangbrüche in der mutierten DNA-Sequenz und vorzeitige Stopp-Codons erzeugt werden, die konsekutiv in einem Knock-Out des mutierten BEST1-Gens resultieren.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte hierzu die Identifikation der häufigsten europäischen Haplotypen und eine anschließende Zuordnung der Patientenkohorte. Diese Haplotypen wurden auf Grundlage von 22 SNPs mit einer Häufigkeit >5% im BEST1-Genlocus generiert. Als nächstes wurden zur Durchführung der Haplotyp-spezifischen Deletion geeignete SNPs ausgewählt und SNP-spezifische sgRNAs bioinformatisch ermittelt und hergestellt. Diese sgRNAs wurden im Anschluss in HEK293T-Zell-Transfektionen auf ihre Effizienzen und Spezifitäten hin untersucht, Allel-spezifische Doppelstrangbrüche in der Ziel-DNA zu induzieren. Die Transfektionsergebnisse zeigten allerdings, dass sich die bioinformatischen Berechnungen für scheinbar hohe Effizienz- und Spezifitätseigenschaften der sgRNAs experimentell nicht immer bestätigen ließen und somit auch potentielle genomweite off-target-Ereignisse nicht zuverlässig vorhergesagt werden können. In einem finalen Schritt wurde versucht, die sgRNAs durch verschiedenste Sequenzmodifikationen, wie Sequenzverkürzungen oder eingefügte Nukleotidvariationen, in ihren Spezifitäten gegenüber der Ziel-DNA zu verbessern. Nach Abschluss des Optimierungsprozesses konnten für alle sgRNAs erhöhte Spezifitäten beobachtet werden. Erwähnenswerter Weise führten dabei jeweils Zielsequenz-abhängig unterschiedliche Sequenzmodifizierungen zum spezifischsten Transfektionsergebnis einer sgRNA, weshalb keine allgemein gültige Aussage über die Optimierungsstrategien von sgRNAs getroffen werden konnte.

Nach erfolgreicher Spezifizierung der sgRNAs und Reduktion genomweiter off-target-Sequenzen könnte der Haplotyp-spezifische Ansatz durchaus eine sinnvolle Strategie für das Ausschalten krankhafter Transkripte am Genort der BVMD sein. Bereits mit etwa 10-15 SNPs könnte ein Großteil der europäischen Patientenpopulation „behandelt“ werden, ohne jede der über 200 möglichen BVMD-Mutationen gesondert ausschalten zu müssen. Langfristig müsste jedoch erst das Ausmaß der tatsächlich stattgefundenen Haplotypendeletion in von Patienten abstammenden Zelllinien erfasst werden, das mit Hilfe der in dieser Arbeit detektierten SNPs und entwickelten sgRNAs erzielt werden konnte. Die Tolerierung einer daraus resultierenden Haploinsuffizienz und eine zu erwartende Wiederherstellung der BEST1-Kanalfunktionalität müsste aber letztendlich noch in differenzierten RPE-Zellen aus CRISPR/Cas9-behandelten Patienten-Stammzellen mit funktionellen Analysen in vitro bestätigt werden.

2 Einleitung

2.1 Charakteristik des Bestrophin-1

Bestrophin-1 (BEST1) ist Teil einer evolutionär konservierten Familie aus insgesamt vier paralogon Bestrophin-Genen (Stöhr et al., 2002). BEST1 ist auf dem Chromosomenabschnitt 11q13 lokalisiert, besitzt eine genomische Ausdehnung von ca. 15 Kilobasen (kb) und setzt sich aus 11 Exonen zusammen, wovon die Exone 2 bis 11 für das BEST1-Protein kodieren (Marquardt et al., 1998; Petrukhin et al., 1998). BEST1 ist ein integrales Membranprotein, das sich beim Menschen ausschließlich an der basolateralen Membran des retinalen Pigmentepithels (RPE) befindet (Marmorstein et al., 2000).

Die Funktion des Proteins wurde bis heute weitestgehend geklärt, wobei überwiegend die Eigenschaft eines Kalzium (Ca^{2+})-abhängigen Chlorid (Cl^-)-Kanals angenommen wird (Sun et al., 2001), die von grundlegender Bedeutung für die Funktion des RPE zu sein scheint (Li et al., 2017). Neuere Ergebnisse weisen zusätzlich auf die Komponente eines Volumen-gesteuerten Kanals hin (Milenkovic et al., 2015). Zudem könnten neben Chlorid noch weitere monovalente Ionen durch den Kanal transportiert werden (Hartzell et al., 2008). Schließlich wäre auch eine regulatorische Rolle des BEST1 bezogen auf andere Kanäle denkbar (Hartzell et al., 2008).

Obwohl in den vergangenen Jahren sowohl eine tetramere (Sun et al., 2001) als auch dimere Kristallstruktur des BEST1-Ionenkanals (Stanton et al., 2006) diskutiert wurde, konnte kürzlich eine homo-pentamere Oligomerisierung des Kanals (**Abbildung 1**) mittels Röntgenstrukturanalyse und Kryo-Elektronenmikroskopie gezeigt werden (Kane Dickson et al., 2014; Miller et al., 2019; Yang et al., 2014).

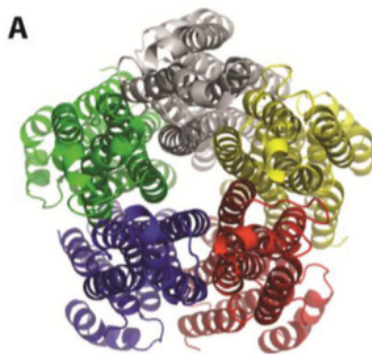


Abbildung 1: homo-pentamere Struktur des Bestrophin-1

Dargestellt ist die Oligomerisierung des Bestrophins zu einem Ionenkanal aus je fünf identischen Untereinheiten; Abbildung entnommen aus Yang et al., 2014

2.2 Pathologie der Best'schen vitelliformen Makuladystrophie

Bislang wurden über 200 Mutationen im BEST1-Gen entdeckt, welche mit verschiedenen Augenerkrankungen, den sogenannten Bestrophinopathien, assoziiert sind (http://www-huge.uni-regensburg.de/BEST1_database/). Darunter befinden sich die juvenile Best'sche vitelliforme Makuladystrophie (BVMD) (Marquardt et al., 1998; Petrukhin et al., 1998), die adulte vitelliforme Makuladystrophie (AVMD) (Krämer et al., 2000), die autosomal dominante Vitreoretinchoroidopathie (ADVIRC) (Yardley et al., 2004) und die autosomal rezessive Bestrophinopathie (ARB) (Burgess et al., 2008). Die häufigste Bestrophinopathie ist die BVMD oder auch Morbus Best (M. Best) genannt. Die Namensgebung erfolgte nach dem deutschen Ophthalmologen Friedrich Best, der die Erkrankung erstmals 1905 beschrieb (Best, 1905). In den meisten Fällen handelt es sich bei den Veränderungen im Protein um Missense-Mutationen im N-Terminus, die zum pathologischen Bild der BVMD führen (Stöhr et al., 2002). M. Best ist eine progrediente autosomal dominant vererbte Makulopathie mit variabler Penetranz, die sich meist schon im frühen Alter manifestiert (Marquardt et al., 1998; Petrukhin et al., 1998). Das zeitliche Einsetzen der Pathologie ist jedoch variabel und kann zwischen dem ersten und sechsten Lebensjahrzehnt erfolgen (Mohler & Fine, 1981; Renner et al., 2005).

Die Diagnose der BVMD wird unter anderem durch Familienanamnese, Funduskopie und Elektrookulogramm (EOG) gesichert (Kellner et al., 2015). Hierbei orientiert sich die Stadieneinteilung (**Abbildung 2**) der Erkrankung weitestgehend an den Befunden der Ophthalmoskopie nach Mohler & Fine, 1981. In einem frühen Stadium wird das klassische Bild einer vitelliformen „Eidotter“-Läsion sichtbar. Diese Erscheinung wird durch akkumuliertes gelbliches Lipofuszin sowohl im RPE als auch subretinal hervorgerufen. Im weiteren Verlauf bricht diese Lipofuszinansammlung auf und führt zur sogenannten „Röhre“-Phase. Letztendlich atrophiert und vernarbt das Pigmentepithel. Diese Veränderungen führen zur allmählichen Degradation der Photorezeptoren und zum fortschreitenden Verlust der Sehkraft (Mohler & Fine, 1981).

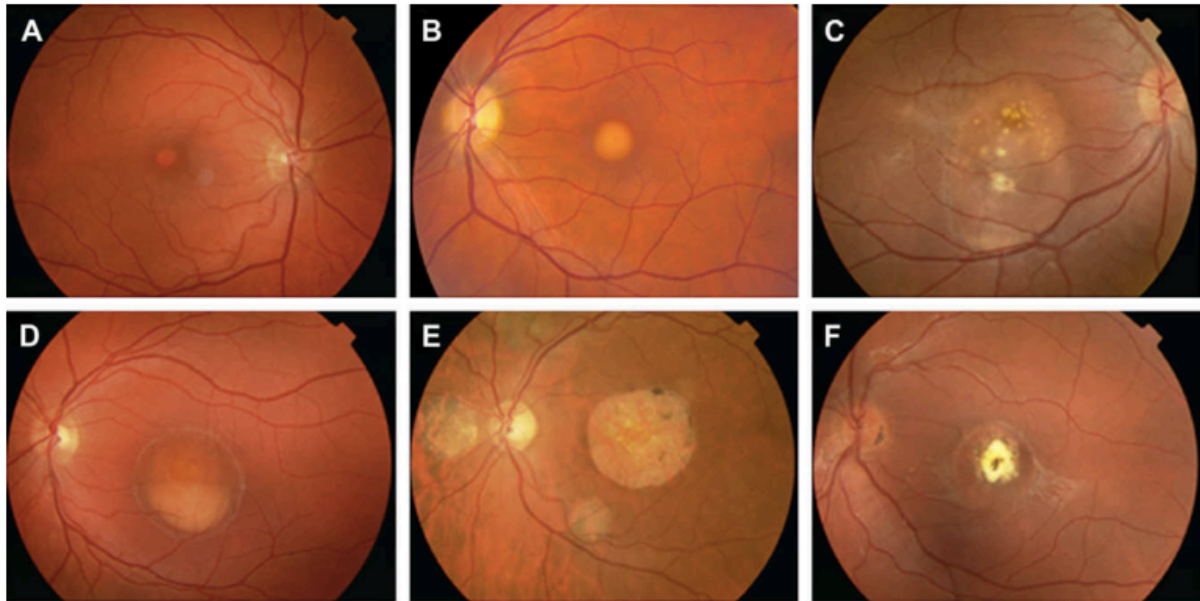


Abbildung 2: Stadieneinteilung der Best'schen Vitelliformen Makuladystrophie

(A) previtelliformes Stadium: leicht verändertes RPE der Fovea, (B) vitelliformes Stadium: „Eidotter“-Läsion durch akkumuliertes Lipofuszin, (C) vitelliruptives Stadium: „Röhrei“-Phase durch Aufbrechen der Lipofuszin-Ansammlung, (D) Stadium des Pseudohypopyons: Ansammlung des vitelliformen gelblichen Materials im unteren Teil der Läsion mit darüber liegender transparenter Flüssigkeit, (E) atrophisches Stadium: Atrophie des RPE, (F) Stadium der Neovaskularisation: Narbenbildung und Neovaskularisation; Abbildung entnommen aus Boon et al., 2009

Zusätzlich ist bei den Erkrankten regelhaft eine Abnormalität im EOG zu beobachten, welche sich in Form eines herabgesetzten oder gar fehlenden Hellanstiegs äußert (Cross & Bard, 1974). Diese Auffälligkeit zeigen auch sonst asymptomatische Merkmalsträger der Erkrankung, noch bevor bei den Betroffenen Veränderungen des Augenfundus sichtbar werden. Dieser Effekt wird einer verminderten Ca^{2+} -aktivierten Cl^- -Leitfähigkeit des basolateralen RPE zugeschrieben (Gallemore, Hughes, & Miller, 1997), dem Lokalisationsort des BEST1-Proteins. Damit steht die Vermutung, BEST1 fungiere als Ca^{2+} -sensitiver Cl^- -Kanal, im direkten Zusammenhang (Hartzell et al., 2008; Sun et al., 2001; Xiao et al., 2010).

In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass eine Mislokalisierung des mutierten Bestrophins zu einem fehlerhaften Cl^- -Transport im RPE führt (Hartzell et al., 2008). Die genauen Pathomechanismen der zugrundeliegenden Erkrankung sind jedoch bisher nicht vollständig geklärt. Allerdings werden dem RPE zahlreiche regulatorische Rollen zugesprochen, die für die Funktion des Auges und des Sehens unabdingbar sind. Es ist also durchaus denkbar, dass ein defektes BEST1 über eine veränderte

Zusammensetzung des Ionen- und Flüssigkeitshaushalts auf diese Vorgänge Einfluss nimmt (Hartzell et al., 2008).

Die durch Mutationen im BEST1-Gen hervorgerufenen Veränderungen lassen auf einen dominant-negativen Effekt des mutierten Proteins schließen. In Anbetracht der homo-pentameren Oligomerisierung des Proteins scheint dieser Gedanke sinnvoll: Bei einer Expression von mutierten und wildtypischen Proteinen zu gleichen Teilen im heterozygoten M. Best-Patienten ergeben sich zahlreiche Möglichkeiten für die Zusammensetzung des Kanals. Schon eine einzige defekte Untereinheit führt dabei vermutlich zu einem beeinträchtigten Protein. Tatsächlich konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass bei einer Co-Expression von mutiertem und wildtypischem BEST1 die Funktion des Cl-Kanals inhibiert wurde, wodurch der dominant-negative Einfluss des mutierten Bestrophins weiter unterstützt werden konnte (Krämer et al., 2003; Marchant et al., 2007; Milenkovic et al., 2015; Sun et al., 2001).

2.3 Gentherapie hereditärer Retinopathien

Aufgrund der noch weitgehend unklaren Pathomechanismen der Bestrophinopathien sind auch keine daraus möglicherweise ableitbaren Therapieoptionen bekannt. So war das Auffinden potentieller Therapien für erbliche retinale Erkrankungen vermehrt Forschungsgegenstand der letzten Jahre. Dabei hat sich die Gentherapie als vielversprechender Ansatz herausgestellt, welcher bereits in einigen klinischen Studien evaluiert wurde.

Insbesondere das Auge eignet sich gewissermaßen für gentherapeutische Anwendungen (Smith et al., 2009). Zu den Vorzügen, die das Auge im besonderen Maße für eine Gentherapie prädisponieren, gehört unter anderem die Abgeschlossenheit des Auges zu anderen körperlichen Strukturen. Die verschiedenen Kompartimente dieses Organs ermöglichen eine gezielte Anwendung therapeutischer Substanzen in geringen Mengen unter Umgehung einer Streuung in den gesamten Körper. Zudem schützt die Blut-Retina-Schranke vor überschüssiger immunologischer Reaktion gegenüber den eingeschleusten Konstrukten. Zuletzt ist zu erwähnen, dass der Therapieerfolg am Auge mit relativ einfachen Mitteln beurteilt werden kann. Die transparenten organischen Strukturen der Hornhaut und des Glaskörpers erlauben die direkte Sicht auf den Fundus. Auch gibt es zahlreiche physiologische Tests, die eine

umfassende Evaluation des Auges ermöglichen. Dabei kann das unbehandelte kontralaterale Auge als Kontrolle dienen.

Einige durch *loss-of-function*-Mutationen verursachte Retinopathien können heutzutage mittels Gensatztherapie behandelt werden (Smith et al., 2009). Ein Erfolgsbeispiel hierfür ist die Behandlung der Leber'schen kongenitalen Amaurose (LCA) (Bainbridge et al., 2008). Hierbei handelt es sich um eine schwerwiegende Dystrophie des RPE, die durch Mutationen im RPE65-Gen verursacht wird. Betroffene Patienten kommen bereits mit erheblicher Sehbehinderung zur Welt und erblinden im frühen Erwachsenenalter (Lorenz et al., 2000). In der Studie von Bainbridge et al. wurden Betroffenen einmalig subretinale Injektionen mit RPE65-kodierender cDNA verabreicht, exprimiert auf Vektoren von Adeno-assoziierten Viren (AAV). Auf diese Weise konnten bereits Erfolge in Form einer verbesserten Sehfunktion in einem natürlich vorkommenden Hundemodell mit mutiertem RPE65-Gen, dem Briard-Hund, erzielt werden (Narfström et al., 2003). Seit Ende 2017 ist *Luxturna* (fda.gov/Luxturna) zur Behandlung von LCA-Patienten mit mutiertem RPE65-Gen zugelassen, nachdem sich subretinale Injektionen mit diesem Wirkstoff in klinischen Studien als wirksam erwiesen haben (Russell et al., 2017). Dabei handelt es sich um eine Gensatztherapie, bei der mithilfe von AAV funktionsfähige Kopien des RPE65-Gens in vivo an Patienten übermittelt werden. Damit gilt *Luxturna* als das erste zugelassene gentherapeutische Medikament zur direkten Behandlung einer monogenen Erbkrankheit.

Eine derartige Gensatztherapie lässt sich allerdings nur bei Erkrankungen durchführen, die auf *loss-of-function*-Mutationen beruhen. Dieser Ansatz kann hingegen nicht für Erbkrankheiten übernommen werden, die bei heterozygotem Vorliegen dominant zu einem Funktionsgewinn eines Proteins führen oder eine Proteinfunktion dominant-negativ inhibieren. Für die beiden letztgenannten Mutationsformen müssen folglich alternative Therapiestrategien erarbeitet werden.

Vor einigen Jahren ist es gelungen, ausgehend von adulten humanen Zellen die Generierung von undifferenzierten pluripotenten Stammzellen zu induzieren (hiPSC) (Takahashi et al., 2007). Seit diesem Zeitpunkt werden hiPSC weltweit als vielversprechende Quelle für mögliche Therapien degenerativer Erkrankungen betrachtet (Okano et al., 2013; Yamanaka, 2009). Darüber hinaus besteht die

Möglichkeit, hiPSC weiter in RPE auszudifferenzieren (Buchholz et al., 2013; Maruotti et al., 2013). Das hiPSC-abstammende RPE weist sowohl typische funktionelle als auch strukturelle Eigenschaften des nativen RPE Gewebes auf (Brandl et al., 2014; Krohne et al., 2012; Singh et al., 2013), weshalb es heutzutage große Verwendung in der Forschung der Retinopathien findet (Bassuk et al., 2016; C. Smith et al., 2015). Die mithilfe von hiPSC generierten RPE-Zellen tragen die genetische Information des jeweiligen Spenders und liefern ein Modell, in dem bestimmte Manipulationen vorgenommen und deren Auswirkungen evaluiert werden können (Du et al., 2011; Singh et al., 2013).

Diese Technologie erlaubt ebenfalls Rückschlüsse auf die Mechanismen dominanter *gain-of-function*-Mutationen oder dominant-negativer Mutationen, sodass zukünftig auch Therapiestrategien für diese beiden Mutationsformen abgeleitet werden könnten. Ein denkbarer Therapieansatz zur Wiederherstellung der regelrechten Proteinfunktion könnte dabei in der gezielten Auslöschung der Mutationen liegen, die zur Transkription defekter Proteine führen, sodass eine anschließende fehlerhafte Proteinexpression verhindert wird. Eine derzeit vielversprechende Methode für eine solche Genveränderung basiert auf dem CRISPR/Cas9-System.

2.4 Genom-Editierung mittels CRISPR/Cas9

Bereits im Jahre 1987 (Ishino et al., 1987) wurde der erste Grundstein für etwas gelegt, das sich erst einige Jahre später als großer Gewinn für die Genforschung herausstellen sollte. Die einfache Anwendung des CRISPR/Cas9-Systems erlaubt vielfältige Einsatzmöglichkeiten auf den unterschiedlichsten Gebieten, von der Biotechnologie über die Medizin bis hin zur Landwirtschaft (Hsu et al., 2014).

Der Genforschung ermöglicht diese Technologie durch gezielte Manipulationen des Genoms verschiedenster Organismen *in vitro* und *in vivo*, kausale genetische Zusammenhänge und Genfunktionen besser verstehen zu können. Diese nützlichen Erkenntnisse können daraufhin u.a. für die Entwicklung geeigneter Therapien hereditärer Erkrankungen, in Form von Medikamenten oder Gentechnik, verwendet werden (Hsu et al., 2014).

Das CRISPR/Cas-System ist Teil des Immunsystems und der adaptiven Abwehr von Prokaryoten gegenüber fremdartiger DNA. Im Rahmen genomischer Analysen von

Bakterien und Archaeen wurden repetitive Strukturen mit kurzen intermittierenden variablen Sequenzen (*spacer*) gefunden und fortan als *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) bezeichnet (Jansen et al., 2002; Mojica et al., 2000). Die *spacer* entsprechen dabei fremden DNA-Sequenzen von Plasmiden und Viren (Bolotin et al., 2005), die nach erfolgtem Kontakt zum Prokaryoten Cas-Protein vermittelt in die CRISPR-Region des prokaryotischen Wirts integriert werden (Deltcheva et al., 2011). Bei erneuter Infektion des Prokaryoten mit den bereits bekannten Viren werden die jeweils korrespondierenden Sequenzen des CRISPR-Bereichs in CRISPR-RNA (crRNA) transkribiert (Deltcheva et al., 2011). Die crRNA hybridisiert anschließend mit einer zweiten sogenannten transaktivierenden RNA (tracrRNA), wodurch eine *single-guide* RNA (sgRNA) entsteht (Deltcheva et al., 2011). Diese sgRNA navigiert anschließend die Cas9-Nuklease durch Bindung an die komplementäre Fremd-DNA an den Ort des zu induzierenden Doppelstrangbruchs (Deltcheva et al., 2011). Daraufhin erfolgt durch die beiden katalytischen Domänen der Nuklease, RuvC und HNH, ein Doppelstrangbruch in der Ziel-DNA (Nishimasu et al., 2014). Für das erfolgreiche Schneiden dieser Fremd-DNA durch die Nuklease muss zudem die gewünschte Zielsequenz am 5'-Ende eines bestimmten Erkennungsmotivs, dem sogenannten *protospacer adjacent motif* (PAM) der Form 5'-NGG, lokalisiert sein (Jiang, et al., 2013) (**Abbildung 3**).

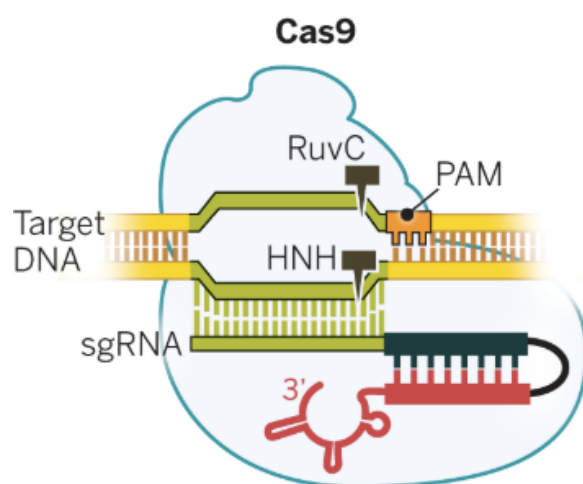


Abbildung 3: Schematische Darstellung des sgRNA-Cas9-Komplexes an der Ziel-DNA

Dargestellt ist ein vereinfachtes Schema zur Bindung der Ziel-DNA durch den CRISPR/Cas9-Enzymkomplex in unmittelbarer Nähe zum PAM-Motiv. Der Enzymkomplex besteht aus einer Cas9-Nuklease und einer sgRNA, die die komplementäre Sequenz der Ziel-DNA bindet. Die beiden katalytischen Domänen der Cas9-Nuklease, RuvC und HNH, induzieren den Doppelstrangbruch am 5'-Ende des PAM-Motivs (schwarze Pfeile); Abbildung entnommen aus Doudna & Charpentier, 2014

Schließlich gelang es im Jahre 2013 die CRISPR-Systeme verschiedener Bakterien zu isolieren und die Anwendung in vitro auf Säugerzellen zu übertragen (Cong et al., 2013). Heutzutage wird hauptsächlich die Cas9-Nuklease vom Typ II des CRISPR-

Cas-Systems des *Streptococcus Pyogenes* (spCas9) zur Induktion Sequenz-spezifischer Doppelstrangbrüche verwendet (Jinek et al., 2012), obwohl gegenwärtig auch zunehmend andere Varianten des CRISPR/Cas-Systems an Bedeutung gewinnen (Ran et al., 2015; Zetsche, Gootenberg, et al., 2015). Mithilfe des CRISPR-Systems, bestehend aus nur zwei Komponenten, der sgRNA und der Nuklease, ist es prinzipiell möglich, jede beliebige Ziel-DNA mit benachbarter PAM-Sequenz im Genom zu schneiden und zu verändern.

Durch diese Technologie könnten sich zukünftig auch neue Möglichkeiten in der Therapie heterozygot vorliegender dominant-negativer Erbkrankheiten, wie z.B. M. Best, ergeben. Das Mutations-behaftete Allel müsste dabei gezielt mithilfe einer komplementären sgRNA gebunden und Cas9-vermittelt exzidiert werden. Dadurch könnte der Anteil der pathologischen Proteintranskription minimiert und somit der negative Effekt des mutierten Allels auf die BEST1-Kanalfunktionalität reduziert werden. Da gleichzeitig aber das wildtypische Allel nicht durch dieselbe sgRNA gebunden und dort somit kein Doppelstrangbruch induziert werden würde, könnte weiterhin wildtypisches Protein exprimiert werden. Infolgedessen fände eine Expressionsverschiebung zugunsten des funktionsfähigen Proteins statt. Nennenswert in diesem Zusammenhang ist eine Studie aus dem Jahre 2019 am Mausmodell zur gentherapeutischen Behandlung einer Unterform der Leber'schen kongenitalen Amaurose, ausgelöst durch eine Pathologie im CEP290-Gen (Maeder et al., 2019). Der Erkrankungsmechanismus liegt hier einer bestimmten Punktmutation zugrunde, die zum fehlerhaften Gen-Splicing und zur Bildung eines vorzeitigen Stopp-Codons im CEP290-Gen führt. Einer Forschergruppe gelang es, einen CRISPR/Cas-basierten Wirkstoff zu entwickeln, der die Mutation im Mausmodell zum Großteil ausschalten konnte und auf diese Weise eine partielle Wiederherstellung der Genfunktion ermöglichte. Aufgrund des großen Potentials für eine gentherapeutische Anwendung am Menschen befindet sich die subretinale Injektion des Wirkstoffs gegenwärtig in der klinischen Testung (s. ClinicalTrials.gov: NCT03872479).

Für den Knock-Out des pathologischen Allels existieren im Allgemeinen zwei Möglichkeiten: Ein Ansatz wäre, die Mutation gesondert auszuschalten. Dadurch gelang es beispielweise, Allel-spezifische DNA-Veränderungen an heterozygoten Genorten in hiPSC vorzunehmen (Smith et al., 2015). Hierbei wurde eine zur Mutation komplementäre sgRNA entworfen, die effizient an das betroffene Allel binden konnte, ohne jedoch das wildtypische Allel zu erkennen. Ein ähnliches Resultat konnte in einer

anderen Arbeit in einem Mausmodell erzielt werden: Ein sgRNA-Cas9-Komplex, gegen eine zur Taubheit führende Mutation gerichtet, wurde in die Cochlea der heterozygoten Mutations-tragenden Mäuse injiziert (Gao et al., 2018). Obwohl sich das mutierte und wildtypische Allel nur in einem einzigen Basenpaar voneinander unterschieden, konnte aufgrund der hohen Spezifität der sgRNA das mutierte Allel gezielt soweit ausgeschaltet werden, sodass im weiteren Verlauf ein deutlich reduziertes Voranschreiten des Hörverlusts beobachtet werden konnte. Eine andere Arbeit zeigte, wie eine heterozygot vorliegende Mutation in der Neubildung einer PAM-Sequenz resultierte und auf diese Weise selektiv mittels CRISPR/Cas9 die mutierte Proteinexpression in vitro und in vivo reduziert werden konnte (Courtney et al., 2016). Ein im Vergleich zu den eben genannten Beispielen etwas allgemeinerer Versuch wäre hingegen, den gesamten Mutations-assoziierten Haplotypen zu entfernen. Einen derartigen gentherapeutischen Ansatz verfolgte bereits vor einiger Zeit zum Beispiel die Arbeit über den Haplotyp-spezifischen Knock-Out des mutierten Huntington Gens (Carroll et al., 2011). Carroll et al. identifizierten in dieser Arbeit SNPs, die mit den Chorea Huntington assoziierten Mutationen im Zusammenhang standen. Anschließend wurden SNP-spezifische antisense oligonucleotides (ASOs) entwickelt. Indem die ASOs zwischen den SNPs wildtypischer und mutierter Allele differenzieren konnten, war die spezifische Unterdrückung des betroffenen Haplotypen mitsamt der darauf befindlichen Mutation möglich. Dieser Haplotyp-spezifische Ansatz stellt für das Erkrankungsbild des Chorea Huntington eine vielversprechende gentherapeutische Therapieoption dar, sodass gegenwärtig zwei verschiedene ASOs-Kandidaten in der Phase 1 von klinischen Studien getestet werden (s. ClinicalTrials.gov: NCT03225833 und NCT03225846). Dies lässt vermuten, dass solch ein SNP-vermittelter Haplotyp-spezifischer Knock-Out grundsätzlich auch zur Behandlung anderer dominant vererbten Erkrankungen mit negativer Auswirkung auf eine regelrechte Proteinfunktion, wie zum Beispiel M. Best, geeignet sein könnte.

Im Anschluss an einen induzierten Doppelstrangbruch können zwei unterschiedliche zelluläre Reparaturmechanismen in Kraft treten (**Abbildung 4**). Die DNA-Reparatur kann zum einen über die weniger effiziente homologe Rekombination (*homology-directed repair*, HDR) erfolgen, bei der entweder das wildtypische Allel oder eine speziell konstruierte Sequenz (*donor template*) als Reparaturvorlage dient. Zum anderen gibt es den Mechanismus der nicht-homologen Reparatur (*non-homologous*

end joining, NHEJ), bei dem die Enden des Doppelstrangbruchs ohne homologe Vorlage verknüpft werden. Dabei bilden sich meist Mutationen in Form von Baseninsertionen und -deletionen (Indels). Kämen diese Indels in einer Proteinkodierenden DNA-Sequenz zu liegen, so verursachten sie durch Verschiebung des Leserasters ein frühzeitiges Stopp-Codon und führten konsekutiv zur Proteindegradation.

Durch beide Reparaturmechanismen könnte ein therapeutischer Nutzen für dominant-negative genetische Erkrankungen entstehen, wobei die Reparatur mittels HDR aufgrund einer niedrigen Effizienz (Doudna & Charpentier, 2014) gegenwärtig eher eine untergeordnete Rolle spielt. Zukünftig könnte aber die HDR aufgrund der Möglichkeit einer gerichteten und präzisen Genmodifikation eine wichtige Stellung in der Gentechnik einnehmen. Allerdings kann auch der Mechanismus des NHEJ für gentechnische Anwendungen genutzt werden. Dieser Reparaturweg findet in humanen Zellen mit hoher Geschwindigkeit und Effizienz statt und eignet sich beispielsweise für das Generieren eines Knock-Outs mutierter Allele.

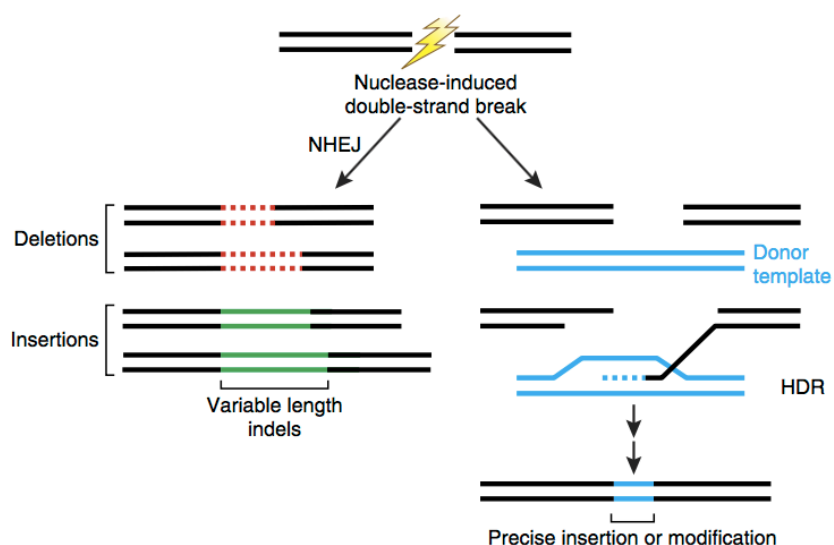


Abbildung 4: Zelluläre Reparaturmechanismen eines DNA-Doppelstrangbruchs

Die Reparatur eines Nukleasen-induzierten Doppelstrangbruchs kann entweder über den Mechanismus des NHEJ oder des HDR erfolgen. Beim NHEJ entstehen dabei Indels von variabler Größe, wohingegen beim HDR mithilfe eines donor templates gezielte Rekombinationen vorgenommen werden können; Abbildung entnommen aus Sander & Young, 2014

2.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Führt man sich die homo-pentamere Struktur des BEST1-Proteins vor Augen und bedenkt den dominant-negativen Einfluss eines mutierten Proteins auf die Funktion des Kanals, erscheint ein spezifischer Knock-Out des betroffenen Allels analog zur Arbeit von Maeder et al. als eine sinnvolle neuartige Therapieoption zur Steigerung der Kanalfunktionalität. Dies liegt darin begründet, dass die Proteinexpression zugunsten des wildtypischen Allels verschoben wäre und die Zusammensetzung des Kanals vermehrt aus wildtypischen Untereinheiten erfolgen würde. Schließlich führt vermutlich bereits eine einzige mutierte BEST1-Untereinheit des Proteins zu einer Funktionseinschränkung des homo-pentameren Kanals. Könnte man jedoch CRISPR-Cas9-vermittelt die Expression des mutierten Allels weitestgehend unterdrücken oder ausschalten, wäre auch der Einbau defekter Untereinheiten in den Kanal reduziert. Dieser Theorie sei vorausgesetzt, ein Knock-Out resultierte in keiner Haploinsuffizienz und ein einzelnes wildtypisches Allel wäre zur Produktion eines funktionstüchtigen Proteins ausreichend. Dieser Sachverhalt wurde für das BEST1-Gen bisher noch nicht vollständig geklärt. Es besteht dennoch Grund zur Annahme, dass eine auftretende Haploinsuffizienz bei gezieltem Knock-Out des mutierten Allels toleriert werden würde.

Ein Knock-Out des pathologischen BEST1-Allels kann wiederum über zwei verschiedene Strategien erreicht werden: Zum einen können zur Mutation komplementäre sgRNAs entwickelt werden, die in ihrer Sequenzabfolge die mutierte DNA beinhalten und so gezielt die Cas9-Nuklease zum betroffenen Ziel-Allel navigieren. Zum anderen kann mithilfe von zwei SNP-spezifischen sgRNAs in cis-Lage zur Mutation der gesamte Mutations-tragende Haplotyp eliminiert werden. Durch eine sinnvolle Kombination aus zwei heterozygot vorliegenden SNPs kann zwischen dem mutierten und intakten Haplotypen eines Patienten differenziert werden. Letztere Strategie hätte dabei den Vorteil, dass vollkommen unabhängig von der Mutationslokalisierung der betroffene Haplotyp mitsamt der darauf befindlichen Mutation exzidiert werden könnte, während der intakte Haplotyp erhalten bliebe. Im Gegensatz dazu wäre die erstgenannte Variante, die verschiedenen BEST1-Mutationen alle direkt und gesondert auszuschalten, aufgrund der hohen Mutationsvielfalt ein verhältnismäßig aufwändiger und kostspieliger Ansatz.

Diese Arbeit zielte darauf ab, einem möglichst allgemeinen Anspruch in Anlehnung an die Arbeit von Carroll et al. gerecht zu werden und verfolgte den Ansatz der Haplotyp-spezifischen Deletion des pathologischen BEST1-Gens. Für diesen Mutations-unabhängigen Ansatz sollte ein minimales Set an spezifischen sgRNAs entworfen werden, das ein Ausschalten der häufigsten BVMD-assoziierten Haplotypen der europäischen Bevölkerung ermöglicht. Eine derartige Haplotypendeletion kann unter Zuhilfenahme häufiger genomischer Polymorphismen der europäischen Population durchgeführt werden. In kodierenden DNA-Sequenzen ist vermutlich bereits die Anwendung lediglich einer einzigen SNP-spezifischen sgRNA zur Haplotypendeletion ausreichend. Im Gegensatz dazu werden für intronische SNPs zwei sgRNAs benötigt, um Exon-überspannende Doppelstrangbrüche in der mutierten DNA-Sequenz zu erzeugen. Aufgrund der anschließend einsetzenden fehlerhaften zellulären Reparaturmechanismen mittels NHEJ und der dabei entstehenden vorzeitigen Stopp-Codons käme es anschließend zum Knock-Out des mutierten BEST1-Gens. Für jede individuelle Haplotypenkombination eines Patienten muss dabei ein entsprechendes SNP-Paar gewählt werden, das eine Abgrenzung der beiden Haplotypen eines Patienten und damit eine selektive Deletion des Mutations-tragenden Haplotypen zulässt. Dadurch soll gewährleistet werden, dass Doppelstrangbrüche lediglich im betroffenen, aber nicht im wildtypischen, Haplotypen erzeugt werden. Für beide Ausprägungen eines SNPs muss deshalb eine Allel-spezifische sgRNA hergestellt werden, sodass je nach betroffenem Haplotypen eines Patienten die entsprechende Kombination aus Allel-spezifischen sgRNAs angewendet werden kann.

Im Rahmen dieser Arbeit muss folglich als wichtiger Schritt die Identifikation der häufigsten Haplotypen der europäischen Gesamtbevölkerung und der vorliegenden Patientenkohorte erfolgen. Als Grundlage für diese Haplotypen sollen bestimmte SNPs dienen, die zuvor im Rahmen einer Analyse des BEST1-Genlocus ausgewählt werden müssen. Anschließend sollen zur Durchführung der Haplotyp-spezifischen Deletionen geeignete SNPs ausgewählt und SNP-spezifische sgRNAs bioinformatisch ermittelt und hergestellt werden. Diese sgRNAs müssen im weiteren Verlauf auf ihre Effizienz- und Spezifitätseigenschaften hin untersucht werden, Allel-spezifische Doppelstrangbrüche zu induzieren. Zuletzt sollen die sgRNAs durch Modifikationen im Rahmen eines Optimierungsprozesses in ihren Spezifitäten verbessert werden.

3 Material

3.1 Bakterienstämme

Tabelle 1: verwendete Bakterienstämme

Stamm	Referenz
Escherichia coli DH5 α	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Escherichia coli Stbl3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3.2 Zelllinien

Tabelle 2: verwendete Zelllinie

Zelllinie	Organismus	Ursprungsgewebe	Referenz
HEK293T	Homo sapiens	embryonale Nierenzelle	ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland

3.3 Vektoren

Tabelle 3: verwendete Vektoren

Vektorbezeichnung	Verwendung	Referenz
pGem®-T	Amplifikation und Selektion klonierter SNP-Sequenzen in E. coli	Promega Corporation, Madison, WI, USA
pCEP4	Positivkontrolle bei Transfektionen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pCAG-EGxxFP	Träger der SNP-spezifischen Zielsequenz zwischen EGxxFP- Kassette; als Leervektor Negativkontrolle bei Transfektionen	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK
pSpCas9(BB)-2A- Puro (PX459) V2	Träger der Cas9-Endonuklease und SNP-spezifischen sgRNA*	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK

*detaillierte Auflistung der sgRNAs, s. Tabelle 5

3.4 Klonierte Vektorkonstrukte

Tabelle 4: durch Klonierung hergestellte Zielkonstrukte

Name des Vektorkonstrukts	Eigenschaft	Verwendung
pCAG-EGxxFP-581G	zwischen die EGFP-Kassette des Zielvektors klonierte SNP-spezifische Sequenz	Transfektion
pCAG-EGxxFP-581T		
pCAG-EGxxFP-749A		
pCAG-EGxxFP-749G		
pCAG-EGxxFP-756T		
pCAG-EGxxFP-756C		

3.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion, Planegg, DE bezogen.

3.5.1 Oligonukleotide für sgRNA

Tabelle 5: als sgRNA verwendete Oligonukleotide

Ziel-SNP	sgRNA-Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Hinweis
581 G	sgRNA_581G_20mer_F	CACCGcctgaggggtcttccgagagc	ermittelt, 20mer
	sgRNA_581G_20mer_R	AAACgctctcgggaagaccctcaggC	
	sgRNA_581G_17mer_F	CACCGgaggggtcttccgagagc	verkürzt, 17mer
	sgRNA_581G_17mer_R	AAACgctctcgggaagaccctcC	
581 T	sgRNA_581T_20mer_F	CACCGgaggggtcttccgagagcctg	ermittelt, 20mer
	sgRNA_581T_20mer_R	AAACcaggctctcgggaagaccctcC	
	sgRNA_749A_20mer_F	CACCGtggggctgaggggtgtctgt	
	sgRNA_749A_20mer_R	AAACacagacaccccctcagccccC	
749 A	sgRNA_749A_19mer_F	CACCGggggctgaggggtgtctgt	verkürzt, 19mer
	sgRNA_749A_19mer_R	AAACacagacaccccctcagccccC	
	sgRNA_749A_18mer_F	CACCGgggctgaggggtgtctgt	verkürzt, 18mer
	sgRNA_749A_18mer_R	AAACacagacaccccctcagcccC	
	sgRNA_749A_17mer_F	CACCGggctgaggggtgtctgt	verkürzt, 17mer
	sgRNA_749A_17mer_R	AAACacagacaccccctcagccC	
	sgRNA_749A_17.Base_G>C_17mer_F	CACCGcgctgaggggtgtctgt	verkürzt mit Basenab-
	sgRNA_749A_17.Base_G>C_17mer_R	AAACacagacaccccctcagcgC	
	sgRNA_749A_17.Base_G>A_17mer_F	CACCGagctgaggggtgtctgt	
	sgRNA_749A_17.Base_G>A_17mer_R	AAACacagacaccccctcagtC	

	sgRNA_749A_16.Base_G>C_17mer_F	CACCGg ^c ctgaggggtgtctgt	weichung 17mer
	sgRNA_749A_16.Base_G>C_17mer_R	AAACacagacaccccctcag ^g cC	
	sgRNA_749A_16.Base_G>A_17mer_F	CACCGg ^a ctgaggggtgtctgt	
	sgRNA_749A_16.Base_G>A_17mer_R	AAACacagacaccccctcag ^t cC	
	sgRNA_749A_19.Base_G>C_20mer_F	CACCGt ^c gggctgaggggtgtctgt	Basenab- weichung 20mer
	sgRNA_749A_19.Base_G>C_20mer_R	AAACacagacaccccctcagccc ^g aC	
	sgRNA_749A_19/18Base_G>C_20mer_F	CACCGt ^{cc} gggctgaggggtgtctgt	Basenab- weichung 20mer
	sgRNA_749A_19/18Base_G>C_20mer_R	AAACacagacaccccctcagcc ^{gg} aC	
749 G	sgRNA_749G_20mer_F	CACCGtggggctgaggggctgtgt	
	sgRNA_749G_20mer_R	AAACacagacgcccctcagccccaC	
	sgRNA_756T_20mer_F	CACCGattgctctcagagagtgtg	ermittelt, 20mer
	sgRNA_756T_20mer_R	AAACcatcactctctgagagcaatC	
	sgRNA_756T_20mer_F	CACCGgctctcagagagtgtg	verkürzt, 17mer
	sgRNA_756T_20mer_R	AAACcatcactctctgagagcC	
	sgRNA_756T_6.Base_G>C_20mer_F	CACCGattgctctcagaga ^t gtg	Basenab- weichung 20mer
	sgRNA_756T_6.Base_G>C_20mer_R	AAACcatca ^g tctctgagagcaatC	
756 T	sgRNA_756T_17.Base_G>A_20mer_F	CACCGatt ^a ctctcagagagtgtg	
	sgRNA_756T_17.Base_G>A_20mer_R	AAACcatcactctctgagag ^t aatC	
	sgRNA_756T_19.Base_T>A_20mer_F	CACCGa ^a tgtctcagagagtgtg	
	sgRNA_756T_19.Base_T>A_20mer_R	AAACcatcactctctgagagca ^t tC	
	sgRNA_756T_19.Base_T>G_20mer_F	CACCGa ^g tgtctcagagagtgtg	
	sgRNA_756T_19.Base_T>G_20mer_R	AAACcatcactctctgagagca ^t cC	
	sgRNA_756C_20mer_F	CACCGgaattgctctcagagagcga	ermittelt, 20mer
	sgRNA_756C_20mer_R	AAACtcgctctctgagagcaattcC	
756 C	sgRNA_756C_2_20mer_F	CACCGattgctctcagagagcgatg	alternativ ermittelt, 20mer
	sgRNA_756C_2_20mer_R	AAACcatcgctctctgagagcaatC	
	sgRNA_756C_2_17mer_F	CACCGgctctcagagagcgatg	verkürzt, 17mer
	sgRNA_756C_2_17mer_R	AAACcatcgctctctgagagcC	

Tabelle 5: Großgeschriebene Basen: zur Ligation in den Expressionsvektor benötigte Oligonukleotide, kleingeschriebene Basen: Oligonukleotide der sgRNA; ermittelt: über Optimized CRISPR-Design-Tool ermittelte sgRNA, verkürzt: im Rahmen der Optimierungsversuche gekürzte Version der bioinformatisch ermittelten sgRNA, Basenabweichung: im Rahmen der Optimierungsversuche zusätzlich eingefügte Basenabweichung in virtuell ermittelte sgRNA (rot markiert)

3.5.2 Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung

Tabelle 6: für PCR und Sequenzierung verwendete Oligonukleotide

Primerbezeichnung	5'-3' Sequenz	Verwendung
M13-F	cacgacgttgtaaaacgac	Sequenzierung von pGem-T-Konstrukten
M13-R	ggataacaatttcacacagg	
LKO1_5_primer	gactatcatatgcttaccg	Sequenzierung von BB-PX459-Konstrukten
VMD2-IVS5-F	gtacagacagggctgccgc	Genotypisierung des Patienten HK, PCR
581_R_BamHI	GGATCCcctgtgagaccttccttcct	
VMD2-IVS5-F2	cctgaggggtcttcgagag	Genotypisierung des Patienten DK, PCR
Q238R_BamHI_R2	GGATCCgggagccacttagcctctag	
I295del_EcoRI F	GAATTCggaaggactggctcagaaga	Genotypisierung des Patienten AP, PCR
Tu15_NEW_R2	atctcatccacagccaacag	
Best1-ex3-F-EcoRI	GAATTCcagtctcagccatctcctcg	Genotypisierung des Patienten SK, PCR
VMD2-Ex7-R	tgacactgcacctcgtctcag	
VMD2-5'UTR-F4	gagtttcaggatgtgttggtg	Genotypisierung der Patienten MD & MHW, PCR
VMD2-5'UTR-R4	gcacctgtcaacccatcatc	
VMD2-5'UTR-F7	ttccaagcaacaccatcct	
VMD2-5'UTR-R6	ttcttgagggtgttgggct	
Tu15_NEW_F1	gaccttctgtgggatcatcg	
VMD2-IVS1-R	caaaggcagtaacagcagc	
N11K-EcoRI-F	GAATTCatccctacaaacccccaatc	
Tu15_Race_2	ccacggcaggttctcgtact	
VMD2ex20II-F3	cctcagccccactcccatg	Colony-PCR, Patient SK
I295del_BamHI_R	GGATCCgcctgtgaaatggggagat	Colony-PCR, Patient AP
IVS5-R	tctgaacaccacctgcccc	Colony-PCR, Patienten HK & DK
749_F_EcoRI	GAATTCgaagcttaaggctgtggacg	PCR der Zielsequenz SNP 749 A/G für pCAG-EGxXFP-Vektor
749_R_BamHI	GGATCCggtttctcctcacttgagatac	
756_759_F_EcoRI	GAATTCcctcagccccactcccatg	PCR der Zielsequenz SNP 756 C/T und 759 T/C für pCAG-EGxxFP-Vektor
756_759_R_BamHI	GGATCCcagacctgtttccaaggcc	
581_587_F_EcoRI	GAATTCcctgaggggtcttcgagag	PCR der Zielsequenz SNP 581 G/T für pCAG-EGxxFP-Vektor
581_587_R_BamHI	GGATCCtctgaacaccacctgcccc	

Tabelle 6: Großgeschriebene Basen entsprechenden den angehängten Restriktionsschnittstellen, GAATTC: EcoRI, GGATCC: BamHI; kleingeschriebene Basen stellen die Oligonukleotide der Primer dar

3.6 Enzyme

Tabelle 7: verwendete Enzyme

Enzym	Referenz
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
BamHI-HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
EcoRI-HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Exonuclease	Affymetrix, USB Products, Santa Clara, CA, USA
FastDigest Bpil	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Quick CIP	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
GoTaq® DNA Polymerase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Haus-Taq	Institut für Humangenetik, Uniklinikum, Regensburg, DE
PstI-HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4 PNK Kinase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Trypsin	GE Healthcare, Galfont St Giles, GB

3.7 Reaktionssysteme

Tabelle 8: verwendete Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Referenz
BigDye Terminator v1.1, v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GoTaq® Long Expand PCR Master Mix	Promega Corporation, Madison, WI, USA
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, GE
NucleoSpin® Plasmid	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, GE
NucleoBond® XtraMidi	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, GE

3.8 Molekularmassenstandard

Tabelle 9: verwendeter Molekularmassenstandard

Molekularmassenstandard	Verwendung	Referenz
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Beurteilung gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3.9 Chemikalien

Tabelle 10: verwendete Chemikalien

Chemikalien	Referenz
Agarose (Biozym LE)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Bromphenolblau Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Calciumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Chloroquin	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, DE
dNTPs	Genaxxon Bioscience, Ulm, DE
Ethanol C ₂ H ₆ O	Chemikalienlager der Universität Regensburg, DE
Ethidiumbromidlösung	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, DE
Glycerol 87%, C ₃ H ₈ O ₃	Chemikalienlager der Universität Regensburg, DE
Gel Loading Dye Purple (6x)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
HiDi™ Formamid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Isopropanol	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, DE
Penicillin/ Streptomycin (Pen/Strep)	GE Healthcare, Galfont St Giles, GB
Poly-L-Lysin Hydrobromid (0.1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin (0,5%) - EDTA (0,2%) 1x in PBS	GE Healthcare, Galfont St Giles, GB

3.10 Puffer und Medien

Tabelle 11: verwendete Puffer und Medien

Puffer und Medien	Zusammensetzung/ Referenz
5x TBE	Tris 0,5 M Borsäure 0,5 M EDTA 10mM H ₂ O dest.
2x HBS	NaCl 280 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1.5 mM HEPES 50 mM H ₂ O dest.
Dulbecco's PBS	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
LB-Medium	Trypton 1% w/v (10g) Hefeextrakt 0,5% w/v (5g) NaCL 1% w/v (10g) H ₂ O dest. 1L
LB-Platten	Trypton 1% w/v (10g) Hefeextrakt 0,5% W/V (5g) NaCL 1% w/v (10g) Bacto-Agar 15% w/v (15g) H ₂ O dest. 1L
SOC-Medium	Trypton 2 % (w/v) (20 g/l) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) (5 g/l) NaCl 10 mM (0,5 g/l) KCl 2,5 mM (0,2 g/l) Glukose 20mM (20ml) H ₂ O dest. 1L
DMEM High Glucose Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA FCS 10% Pen/Strep 1%
FCS	GE Healthcare, Galfont St. Giles, GB

3.11 Geräte

Tabelle 12: verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Accu-Jet Pipittiergerät	Brand, Wertheim, Deutschland
BlueMarine 200 Gelkammer	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
BluePower Plus Netzgerät	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Brutschrank 37°C Bakterien	Memmert GmbH, Schwabach, DE
Ceromat R Schüttelinkubator	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, DE
Eismaschine AF 100	Scotsman, VerNicht Hills, IL, USA
FLUOstar OPTIMA	BMG LABTECH, Ortenberg, DE
Inkubator Zellen 37 °C	Kendro Lab Products, Langenselbold, DE
Leica DMIL Mikroskop	Leica Mikrosystems, Wetzlar, DE
NanoDrop ND1000 Spektrophotometer	NanoDrop, Wilmington, DE, USA
Nikon Eclipse TE2000-S Mikroskop	Nikon Instruments Europe BV, NE
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Thermocycler T3	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Thermocycler T Gradient	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Thermomixer compact Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Transilluminator UST-30M-8R	BioView Ltd., Billerica, MA, USA
Sterilbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE
Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Vortex Microspin FV-2400	Biosan, Riga, Latvia
Waage	SCALTEC Instruments GmbH, Heiligenstadt, DE
Wasserbad W12	Labortechnik Medingen, Arnsdorf, DE
Zentrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE

3.12 Software

Tabelle 13: verwendete Software

Software	Referenz
Chromas 2.4.3	Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, Australia
CorelDRAW X8	Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada
Corel PHOTO PAINT X8	
HaploView 4.2	Daly Lab at the Broad Institute, Cambridge, MA, USA
ImageJ 1.49v	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, WA, USA
NIS-Elements BR 3.0	Laboratory Imaging, Nikon Instruments Europe BV, Netherlands
SigmaPlot 12.5	Systat Software GmbH, Erkrath, DE
SnapGene 2.8.2	GSL Biotech LLC, Chicago, USA

4 Methoden

4.1 Software-gestützte Analyse

4.1.1 Auffinden repetitiver Sequenzen im BEST1-Genlocus

Für die bioinformatische Analyse des BEST1-Genlocus bezüglich repetitiver Sequenzen (*repeats*) wurden im Folgenden aufgelistete Online-Tools und Softwares genutzt.

4.1.1.1 UCSC Genome Browser

Mithilfe des *UCSC Genome Browsers* (<https://genome.ucsc.edu>) konnten alle SNPs über die Angabe ihrer rs-Nummer hinsichtlich ihrer Position im Genom und umgebender Sequenzen analysiert werden. Auf diese Weise konnten in einem *repeat* befindliche SNPs herausgefiltert und das *repeat* hinsichtlich seiner Struktur näher charakterisiert werden. Hierbei wurde mit der humanen Referenzsequenz *Genome Reference Consortium Human Build 37* (GRCh37) aus dem Jahre 2009 gearbeitet.

4.1.1.2 NCBI Nucleotide BLAST

Des Weiteren wurde der Web-Server *NCBI Nukleotide BLAST* genutzt (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch), um die SNP-umgebenden Sequenzen auf Ähnlichkeit zu anderen genomischen Sequenzen zu überprüfen. Diese Information wurde zur Auswahl und Erstellung geeigneter PCR-Primer und sgRNA benötigt.

4.1.1.3 Repeat Masker

Mithilfe des *Repeat Masker* Web-Servers konnte zusätzlich Auskunft über Vorliegen und Charakter potentieller *Repeats* innerhalb der untersuchten Sequenzen gegeben werden (<http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>).

4.1.2 Auswahl SNP-spezifischer sgRNAs

4.1.2.1 Optimized CRISPR Design

Im Anschluss der Sequenzanalyse wurden geeignete SNPs in *repeat*-freien Sequenzen ausgewählt und für diese jeweils SNP-spezifische sgRNAs ermittelt. Dies erfolgte unter Verwendung des Web-basierten *Optimized CRISPR Design* (<http://crispr.mit.edu>). Es wurden bestimmte Kriterien für die sgRNA aufgestellt, die bei einer Distanz zwischen SNP und PAM unter 10 Nukleotiden und einem *on-target-score* der sgRNA über 50% als erfüllt galten.

4.1.3 Identifizierung der Haplotypen

4.1.3.1 Haploview

Nach Überprüfung aller SNPs auf repetitive Sequenzen und Eignung ihrer bioinformatisch ermittelten sgRNAs, wurden auf Grundlage aller selektierten SNPs die sich daraus ergebenden Haplotypen der europäischen Gesamtbevölkerung ermittelt. Im Anschluss erfolgte eine Zuordnung der Patientenkohorte zu den zuvor ermittelten Haplotypen. Für diesen Vorgang wurde die *Haploview*-Software benutzt, welche durch Abgleichen der Daten aus dem *1000 Genomes Project* alle potentiell vorkommenden Haplotypen der Europäer auflistete.

4.2 Klonierung der Konstrukte

Ziel des Klonierungsprozesses war zum einen, Zielsequenzen für jeweils beide Allel-Varianten eines SNPs herzustellen und diese in die Zielvektoren zwischen die Fragmente des grün fluoreszierenden Proteins (EGFP) zu klonieren. Zum anderen sollten Vektoren generiert werden, welche sowohl die korrespondierenden Allel-spezifischen sgRNAs eines SNPs als auch die Cas9-Nuklease exprimierten.

Im Folgenden wird die schrittweise Herstellung der Zielsequenzen und deren anschließende Ligation in den pCAG-EGxxFP-Zielvektor beschrieben. Die Klonierung der SNP-spezifischen sgRNA in den BB-PX459-Vektor wird unter 4.2.10.2 dargestellt.

4.2.1 Amplifizierung der DNA-Fragmente mittels PCR

Die für die Klonierung benötigten DNA-Sequenzen wurden zuerst mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Zusätzlich wurden diese mit Restriktionsschnittstellen versehen, um eine spätere Ligation in die Zielvektoren zu ermöglichen. Die dazu verwendeten Primer finden sich in **Tabelle 6**. In Abhängigkeit der zu erwarteten PCR-Größe mussten verschiedene Ansätze verwendet werden. Bis zu einer Größe von zwei Kilobasen (kb) wurde der 25µl-Ansatz aus **Tabelle 14** benötigt. Größere Fragmente >2kb konnten mittels der Long-Rage-PCR gewonnen werden (**Tabelle 15**):

Tabelle 14: PCR-Ansatz < 2kb

Komponente	Menge
DNA-Template (50-100 ng/µl)	2µl
5x Go-Taq-Puffer	5µl
dNTP's (5 mM)	2µl
Forward-Primer (10 µM)	1µl
Reverse-Primer (10 µM)	1µl
Go-Taq-Polymerase	0,1µl
Aqua destillata (A.d.)	13,9µl

Tabelle 15: PCR-Ansatz > 2kb

Komponente	Menge
DNA-Template (50-100 ng/µl)	2µl
2x MasterMix Puffer	12,5µl
Forward-Primer (10 µM)	1µl
Reverse-Primer (10 µM)	1µl
A.d.	8,5µl

Anschließend wurde die jeweilige PCR im Thermocycler bei den folgenden Einstellungen durchgeführt (**Tabelle 16**):

Tabelle 16: PCR-Einstellung des Thermocyclers

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	95°C	2min
2. Denaturierung	94°C	30s
3. Annealing	57°C	30s
4. Elongation	72°C	variabel*
5. Finale Elongation	72°C	5min
6. Pause	15°C	∞

*Dauer abhängig von PCR-Größe: 1min/ 1kb; 33-fache Wiederholung der Schritte 2-5

4.2.2 Agarosegelelektrophorese

Die Beurteilung der amplifizierten PCR-Fragmente erfolgte daraufhin durch die Gelelektrophorese. Hierfür wurde ein 1%-Agarosegel (**Tabelle 17**) mit Taschen gegossen, in welche nach Aushärtung des Gels die PCR-Proben und ein Molekularenmassenstandard (**Tabelle 9**) gefüllt wurden. Die einzelnen PCR-Produkte trennten sich entsprechend ihrem Molekulargewicht auf und wurden nach Zugabe von Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar. Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 200 Volt (V) für eine Dauer von ungefähr 20 Minuten.

Tabelle 17: Herstellung eines 1%-Agarosegels

Komponente	Menge
Biozym Agarose	1,5g
1x TBE-Puffer	150ml
Ethidiumbromid (0,07%)	1 Tropfen

4.2.3 Extraktion und Aufreinigung der PCR-Produkte aus dem Agarosegel

Für weitere Zwecke mussten die benötigten PCR-Produkte mittels Skalpell unter Einsatz von UV-Licht aus dem Gel extrahiert werden. Diese wurden unter Zuhilfenahme des NucleoSpin® Gel und PCR Clean-Up-Kits unter Berücksichtigung der Herstellerangaben bereinigt und in 35µl destilliertem Wasser (A.d) eluiert.

4.2.4 Ligation in den pGem®-T-Vektor

Vor der Ligation der DNA-Fragmente in die eigentlichen Expressionsvektoren, erfolgte zuerst eine Klonierung in den pGem®-T-Vektor. Die anschließende Transformation dieser Konstrukte in *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien erlaubte eine Selektion bestimmter merkmals tragender Klone.

Die Ligation eines PCR-Produktes in den pGem®-T-Vektor erfolgt über die Interaktion des Thyminüberhangs des Vektors und des Adenosinüberhangs der PCR-Sequenz. Letzterer wurde bereits im Zuge der PCR durch die Go-Taq-Polymerase generiert. Nach folgendem Schema wurden die nötigen Komponenten für die Ligation pipettiert und anschließend über Nacht im Thermocycler bei 14°C deponiert (**Tabelle 18**):

Tabelle 18: Ligationsansatz für pGem®-T

Komponente	Menge
pGem®-T	0,5µl
T4-DNA-Ligase	0,5µl
2x Rapid Puffer	5µl
DNA-Insert	4µl

4.2.5 Transformation der *E. coli*-Bakterien

Der Ligationsansatz wurde als nächstes per Hitzeschock-Verfahren in *E. coli*-Bakterien des DH5α-Stamms (Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.) transformiert. Ein 100µl-Aliquot der kompetenten *E. coli*-Bakterien wurde hierfür schonend auf Eis aufgetaut und die Hälfte des obigen Ligationsansatzes wurde hinzugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurde die Bakterienkultur für 40 Sekunden bei 42°C in den Heizblock gestellt. Nach dem Hitzeschock folgte erneut eine kurze Inkubation auf Eis und daraufhin die Zugabe von 900µl SOC-Medium. Das Gemisch verblieb ungefähr eine Stunde im Schüttelinkubator bei 37°C. 200µl dieser Kultur wurden auf LB-beschichtete Platten ausgestrichen und über Nacht im Bakterienbrutschrank inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die bereits deutlich sichtbaren Bakterienkolonien mittels Pipettenspitzen von der Platte isoliert und in mit Ampicilin versetztem LB-Medium im Brutschrank inkubiert.

4.2.6 Colony-PCR

Zur Überprüfung der ausgewählten Bakterienkolonien auf ein vorhandenes Insert wurden Colony-PCRs (C-PCR), wie aus **Tabelle 19** zu entnehmen, angesetzt. Die benötigten Primer lassen sich aus **Tabelle 6** entnehmen.

Tabelle 19: Colony-PCR-Ansatz

Komponente	Menge
Plasmid-Template	2µl
10x Haus-Taq-Puffer (15 mM)	2,5µl
dNTP's (5 mM)	2µl
Forward-Primer (10 µM)	1µl
Reverse-Primer (10 µM)	1µl
Haus-Taq-Polymerase	0,5µl
A.d.	16µl

Die elektrophoretisch aufgetrennten Fragmente lassen sich wie bereits beschrieben erneut unter UV-Licht beurteilen. Kolonien mit erfolgter Ligation wurden daraufhin ausgewählt und in eine 5mL-Übernachtskultur überführt.

4.2.7 Plasmid-Präparation aus 5mL Übernachtskulturen – Minipräp

Die erfolgreich transformierten E. coli wurden in 5ml LB-Medium unter Zugabe von 5µl Ampicillin (100mM Stock) über Nacht im Schüttelinkubator belassen, sodass diese am Folgetag für eine Plasmid-Mini-Präparation bereitstanden. Die Plasmidisolierung wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid-Kit nach Empfehlungen des Herstellers durchgeführt und das gewonnene Plasmid wurde anschließend in 35µl A.d. eluiert. Nach Konzentrationsmessung der Plasmide am NanoDrop® Spectrophotometer wurden diese für die nachfolgende Sequenzierung auf 50ng/µl verdünnt.

4.2.8 Sangersequenzierung

Anschließend wurden die Sequenzen der isolierten Plasmide auf die Ausprägung der darin lokalisierten SNPs untersucht. Im Weiteren ist die Sequenzierungs-Reaktion

dargestellt (**Tabelle 20**), welche unter Verwendung des BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kits v1.1, v3.1 erfolgte.

Tabelle 20: Cycle Sequencing Reaktion

Komponente	Menge
Plasmidverdünnung (50ng)	2µl
5x-BigDye® Terminator Puffer	2µl
F-oder R-Primer (10 µM)	1µl
BigDye® Terminator Reaktionsmix	0,3µl
A.d.	4,7µl

Die untenstehende **Tabelle 21** beschreibt das Sequenzierungs-Programm am Thermocycler:

Tabelle 21: Sequenziereinstellung am Thermocycler

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
1. Initiale Denaturierung	94°C	3min
2. Denaturierung	94°C	30s
3. Annealing	58°C	30s
4. Elongation	60°C	3min
5. Finale Elongation	60°C	5min
6. Pause	15°C	∞

26-fache Wiederholung der Schritte 2-5

Der Sequenzierung folgte stets eine Fällung mit EDTA. Hierbei wurden 4µl EDTA (125mM) und 50µl 100%-Ethanol zum Reaktionsansatz gegeben, gevortext und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde das Reagenz für 30min bei 4000 Umdrehungen, bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Behältnis inklusive Pellet kurz kopfüber zentrifugiert, um mögliche Flüssigkeitsreste zu eliminieren. 70µl 70%-Ethanol wurden erneut zum Pellet gegeben. Nach wiederholtem 30-minütigen Zentrifugieren, Abkippen des Überstands und über Kopf Zentrifugieren, wurden 15µl HiDi-Formamid zur Resuspension des Pellets beigefügt. Die

Sequenzierung fand anschließend im Abi3130x1 Genetic Analyser statt. Auswertungen der Sequenzen erfolgten mittels Chromas und SnapGene.

4.2.9 Restriktionsverdau

Es wurden jeweils zwei positive Klone eines jeden SNPs, je einer für die beiden Allelvarianten, ausgewählt und mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI (**Tabelle 7**) verdaut. Der Pipettieransatz war wie in **Tabelle 22** dargestellt:

Tabelle 22: Ansatz für Restriktionsverdau

Komponente	Menge
unverdünntes Plasmid	15µl
10xPuffer (Cutsmart)	3µl
EcoRI	0,5µl
BamHI	0,5µl
A.d.	11µl

Nach zwei bis drei stündiger Inkubation im Brutschrank, wurden die Verdaue auf Agarosegele geladen. Bei erfolgter Restriktion durch die Enzyme wurden eine große Bande um 3kb für den pGem®-T-Vektor und eine kleinere Bande um 500 Basen für die Zielsequenz sichtbar. Letztere wurde nach dem zuvor beschriebenen Muster aus dem Gel extrahiert und mit dem NucleoSpin® Gel und PCR Clean-Up-Kit isoliert.

4.2.10 Ligation in die Expressionsvektoren

4.2.10.1 Ligation der Zielsequenz in den pCAG-EGxxFP-Vektor

Der Zielvektor pCAG-EGxxFP wurde zuvor mit den selbigen Enzymen über Nacht verdaut und das Plasmid aus dem Gel isoliert. Die Mengenverhältnisse für den Ansatz lassen sich aus **Tabelle 23** entnehmen.

Tabelle 23: Ansatz Zielvektorverdau

Komponente	Menge
pCAG-EGxxFP	0,5µl
10xPuffer (Cutsmart)	3µl
EcoRI	0,5µl
BamHI	0,5µl
A.d.	25,5µl

Über die identischen Schnittstellen konnte letztendlich eine Ligation von Zielsequenz und Zielvektor stattfinden (**Tabelle 24**).

Tabelle 24: Ligationsansatz für Zielsequenz in Zielvektor

Komponente	Menge
pCAG-EGxxFP	2µl
T4-DNA-Ligase	1µl
10xT4-Ligationspuffer	2µl
Insert (Sequenz)	8µl
A.d.	7µl

Am darauffolgenden Tag erfolgte erneut eine Transformation in DH5α-E. coli. Das weitere Vorgehen war analog zu Abschnitt 4.2.6.

4.2.10.2 Ligation der sgRNA in den BB-PX459-Vektor

Die Klonierung der als sgRNA verwendeten Oligonukleotide folgte einem anderen Protokoll. In einem ersten Schritt musste der BB-PX459-Vektor über die Schnittstelle BbsI verdaut werden (**Tabelle 25**):

Tabelle 25: Verdau des BB-PX459-Expressionsvektors

Komponente	Menge
BB-PX459	1µg
Fast Digest Bpil	1µl
Quick CIP	1µl
10xFast Digest Puffer	2µl
A.d.	15µl

Der Verdau erfolgte für 30 Minuten bei 37°C im Thermocycler mit anschließender 10-minütiger Denaturierung der Enzyme bei 80°C. Anschließend wurde der verdaute Vektor auf Agarosegel aufgetragen und isoliert. Die Elution des Plasmids erfolgte in 50µl A.d.

Im weiteren Vorgehen mussten die synthetisierten Oligonukleotidpaare der sgRNAs (s.**Tabelle 5**) phosphoryliert und annealed werden (**Tabelle 26**):

Tabelle 26: Phosphorylierung und Annealing der Oligonukleotide

Komponente	Menge
Oligonukleotid 1 (100µM)	1µl
Oligonukleotid 2 (100µM)	1µl
10xT4-Ligationspuffer	1µl
A.d.	7µl

Dieser Vorgang erfolgte im Thermocycler im RAMP-Programm. Dieses verharrte zu Beginn eine halbe Stunde bei 37°C und erhitzte anschließend auf 95°C. In einem 5-minütigen Takt sank die Temperatur um 5°C bis ein Endwert von 25°C erreicht war. Im letzten Schritt konnten Vektor und sgRNA, wie in **Tabelle 27** folgt, ligiert werden:

Tabelle 27: Ligation von sgRNA und BB-PX459-Vektor

Komponente	Menge
verdauter BB-PX459-Vektor	1µl
Oligonukleotid-Duplex	1µl
T4-DNA-Ligase	1µl
2x Rapid Puffer	5µl
A.d.	2µl

Diese Konstrukte wurden diesmal in E. coli des Stbl3-Stamms (**Tabelle 1**) transformiert und auf LB-Platten ausgesät. Die am Folgetag angeimpften Klone wurden in 5ml-Kulturen überführt und zur Überprüfung auf ein Insert sequenziert.

4.2.11 Plasmid-Präparation aus 100mL Übernachtskulturen – Midipräp

Die weitere Vorgehensweise zur Erstellung der Expressions- und Zielvektoren verlief identisch.

Die positiven Klone wurden in eine 100ml-Kultur überführt und mit Hilfe des NucleoBond® XtraMidi Kits die darin befindlichen Plasmide isoliert. Anschließend wurden die Konzentrationen auf ca. 1000ng/µl gebracht.

4.2.12 Herstellung von Glycerolstocks

Zur Langzeitaufbewahrung bei -80°C wurden Glycerolstocks der Konstrukte-tragenden E. coli-Klone angelegt. Dies geschah unter Beisetzung von 170µl 100%-Glycerols zu 830µl der Bakterienkultur. Bei Bedarf konnten daraus neue Plasmid-präparationen erfolgen.

4.3 Zellkultur

4.3.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen

Bei der in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zellenlinie handelt es sich um HEK293T-Zellen. Diese wurden bei einer konstanten Temperatur von 37°C und einem CO₂ Gehalt von 5% inkubiert. Kultiviert wurden die Zellen in Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM) unter Zugabe von 1%-Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) und 10%-Fetal Calf Serum (FCS) in einem Gesamtvolumen von 10ml. Alle verwendeten Lösungen und Medien wurden vor Gebrauch entweder im Wasserbad oder durch Inkubation bei Raumluft erwärmt.

Die Zellen wurden je nach Konfluenz mehrmals wöchentlich gesplittet und auf neue Schalen ausgesät. Hierbei wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit frischem Medium von der Platte gelöst und abzentrifugiert. Je nach gewünschtem Teilungsverhältnis wurde die Zellsuspension auf unterschiedlich viele neuen Platten verteilt und mit frischem Medium auf ein 10ml-Gesamtvolumen gebracht.

4.3.2 Kalziumphosphat-Transfektion von HEK293T-Zellen

Die unter dem Punkt 4.2 beschriebenen hergestellten Vektorkonstrukte aus DNA-Zielsequenz einerseits und Sequenz-spezifischer sgRNA andererseits wurden zur Überprüfung der CRISPR-Effizienz letztendlich in HEK293T-Zellen transfiziert.

Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen auf mit Polylysin beschichtete 6-Well-Platten ausgesät, sodass diese am Folgetag eine Konfluenz von ca. 70% aufwiesen. Zur Vorbereitung auf die Transfektion wurden die Zellen für eine Stunde mit 25µM-Chloroquin in DMEM inkubiert, um die Transfektionseffizienz zu erhöhen.

In der Zwischenzeit wurden die zur Transfektion benötigten Komponenten in einem 500µl-Ansatz vorbereitet (**Tabelle 28**).

Tabelle 28: Transfektionsansatz der Kalziumphosphat-Methode

Komponente	Menge
Plasmide (je 1,5µl)	3µl
Kalziumchlorid (2M)	31µl
A.d.	216µl*
2x HBS	250µl

*Menge des Wassers variabel in Abhängigkeit der erzielten Plasmidkonzentration

Analog zur Aufreihung der Komponenten in obiger Tabelle wurden diese in selbiger Reihenfolge in 1,5 ml Röhrchen pipettiert. Nach Zugabe des 2x HBS-Puffers wurde der Ansatz für 25 min inkubiert.

Nach einstündiger Inkubation der HEK293T-Zellen mit dem Chloroquin-versetzten Medium wurde dieses abgesaugt und frisches DMEM zugegeben. Der Transfektionsansatz wurde vorsichtig tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach einer Zeit von 7-11 Stunden wurde das Medium erneut abgesaugt und die Zellen mit frischem DMEM versorgt.

Nach 48 h konnten anschließend der Transfektionserfolg mittels UV-Licht am Nikon Mikroskop betrachtet und zugleich Fluoreszenzaufnahmen der Zellen gemacht werden. Anschließend wurden die Zellen auf mit Polylysin-beschichtete schwarze 96-

Well-Platten überführt. Hierzu mussten die Zellen erst von den 6-Well-Platten gelöst werden. Dies erfolgte im ersten Schritt durch 7-minütige Inkubation in PBS mit zugesetztem 1%-EDTA. Im zweiten Schritt wurde Trypsin für 5 Minuten zugegeben. Anschließend konnten die Zellen mit frischem DMEM aus den Platten in Falcons überführt und zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen, jedes Zellpellet in Medium resuspendiert und gleichmäßig in eine Reihe der 96-Well-Platten verteilt.

72 Stunden nach erfolgter Transfektion konnte das Ergebnis am FluoSTAR OPTIMA Platten-Reader quantifiziert werden. Davor erfolgte eine DNA-Färbung der Zellkerne mittels DAPI. Dieses wurde im Verhältnis von 1:2000 in PBS gelöst und 15 Minuten auf den Zellen belassen.

5 Vorarbeiten

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden einige Vorarbeiten am Institut für Humangenetik geleistet. Diese lassen sich in einen informatischen und experimentellen Teil aufteilen.

5.1 Bioinformatische Daten basierend auf dem 1000 Genomes Project

Das *1000 Genomes Project* verfolgte das Ziel, durch Sequenzierung des Genoms humane Polymorphismen zu identifizieren und die verschiedenen Kombinationen dieser SNPs in Form von Haplotypen zu charakterisieren (Durbin et al., 2010). Hierbei wurden über 2.500 Personen unterschiedlichster Ethnizitäten sequenziert (Auton et al., 2015).

Auf Grundlage dieser Datenbank war es nun möglich, alle für die BEST1-Genregion detektierten 1.191 SNPs herauszufiltern. In einem weiteren Schritt wurde diese Liste auf die europäischen SNPs mit einer Häufigkeit >5% reduziert. Letztendlich lag eine Sammlung von 69 häufigen SNPs vor (**Abbildung 5**). Ausgehend von diesen Daten fand die weitere bioinformatische Analyse im Rahmen dieser Arbeit statt.

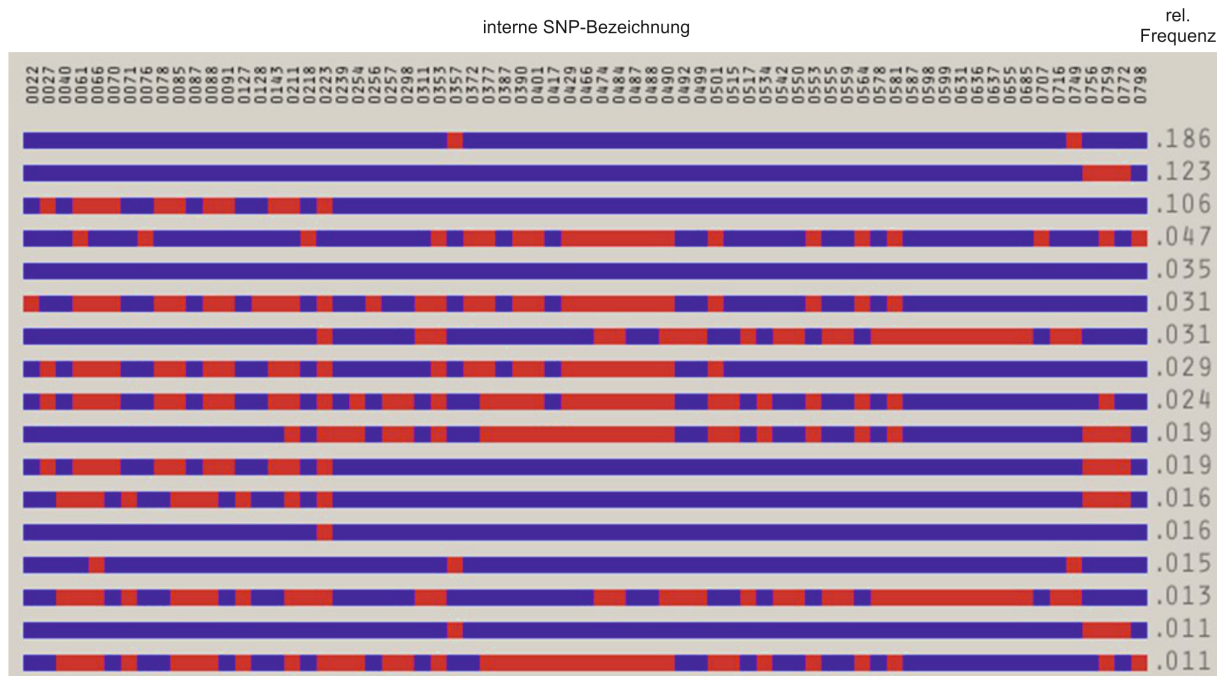


Abbildung 5: 69 SNPs der europäischen Bevölkerung >5%-Frequenz im BEST1-Genlocus und daraus resultierende Haplotypen

Ausgehend von 69 SNPs sind die daraus resultierenden Haplotypen mit ihrer relativen Häufigkeitsverteilung dargestellt. Jeder horizontale Balken repräsentiert einen Haplotypen. Blaue Markierungen kennzeichnen zum Referenzhaplotypen identische Basen. Rote Felder weisen Nukleotidabweichungen zur Referenzsequenz auf.

5.2 Sangersequenzierung der Patientenkohorte

Im Rahmen der Vorarbeiten wurden am Institut für Humangenetik 14 Studienteilnehmern, davon 2 gesunden Kontrollpersonen und 12 M. Best Patienten, Hautstanzen entnommen, hieraus zunächst Fibroblasten gezüchtet und anschließend induzierte pluripotente Stammzelllinien generiert. Zusätzlich wurden DNA-Proben einiger Eltern betroffener Patienten entnommen, wodurch auf den jeweils Mutations-tragenden Elternteil geschlossen werden konnte. Anschließend wurden alle 14 DNA-Proben an bestimmten Lokalisationen im BEST1-Gen sequenziert. Diese selektierten Stellen resultierten aus einer groben Vorauswahl der 69 SNPs in der obigen Abbildung.

Mithilfe der Sequenzierungsergebnisse konnten im weiteren Verlauf dieser Arbeit unter anderem die individuellen Haplotypen eines Patienten bestimmt werden, wie bereits unter Punkt 4.1.3 aufgelistet.

6 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich in einen bioinformatischen und einen experimentellen Teil untergliedern. Zunächst wird die computerbasierte Analyse näher beschrieben.

6.1 Bioinformatische Auswertung

Hierfür wurden die unter Absatz 4.1 im Methodenteil beschriebenen Online-Tools und Softwares genutzt.

6.1.1 Übersicht der analysierten BEST1-Genregion

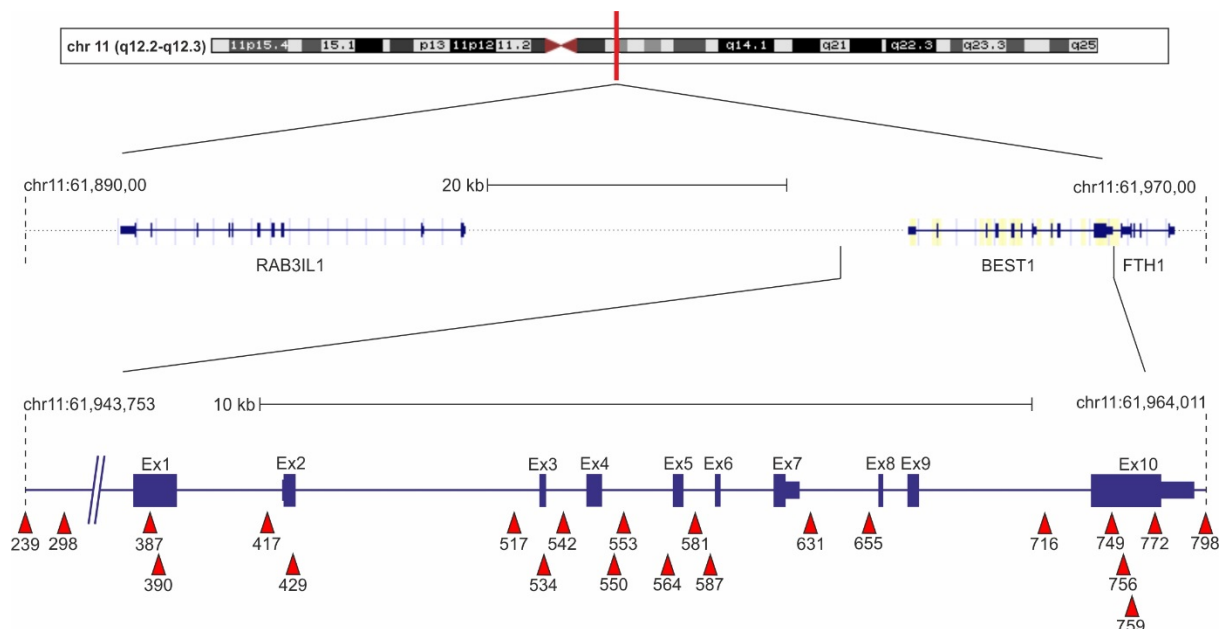


Abbildung 6: Analytierte BEST1-Genregion und Lokalisation der finalen SNP-Auswahl

Gene: RAB3IL1, BEST1, FTH1; Ex: Exon 1-10; rote Dreiecke: Position der finalen SNP-Auswahl innerhalb des BEST1-Gens

Die **Abbildung 6** stellt die analysierte Genregion und Endauswahl der darin befindlichen SNPs dar. Der rote Balken im oberen Teil der Grafik markiert die ungefähre Lage der untersuchten Region auf dem langen Arm des Chromosoms 11, dem Abschnitt q12.2-q12.3. In der ersten Vergrößerungsebene, mittig innerhalb der Grafik, lässt sich neben dem BEST1-Gen auch die umliegende Region inklusive der angrenzenden Genloci RAB3IL1 und FTH1 erkennen. Die um das BEST1-Gen eingezeichneten Begrenzungen deuten auf die näher untersuchten Bereiche hin, in

denen im Rahmen der bioinformatischen Vorarbeit insgesamt 1.191 SNPs identifiziert werden konnten. Nach Begrenzung der SNP-Häufigkeiten auf >5% in der europäischen Bevölkerung verblieben lediglich 69 SNPs (s. Tabelle 29). Die zweite Vergrößerungsebene zeigt das Ergebnis nach der weiteren Analyse im Laufe dieser Arbeit. Es lassen sich die Positionen jener 22 finalen SNPs im und vor dem BEST1-Gen erkennen, die nach weiterer Analyse allen im Folgenden näher dargestellten Kriterien entsprachen. Hierbei liegen die ersten fünf aufgezeigten SNPs noch vor dem Start-Codon im Exon 2 und befinden sich somit in nicht kodierenden Sequenzen. Nennenswert sind weiterhin die SNPs mit Lokalisationen in den kodierenden Exonen: SNP 429 in Exon 2, SNP 534 in Exon 5 und die SNPs 749-772 in Exon 10. Auf Grundlage dieser 22 SNPs wurden später die Haplotypen in der untersuchten Patientenkohorte bestimmt und geeignete SNPs für die weiteren Untersuchungen zum gewählten Haplotyp-spezifischen Ansatzes bestimmt.

6.1.2 Kriterien für die Analyse der SNPs

Ausgehend von den 69 Polymorphismen mit einer Häufigkeit >5% in der europäischen Bevölkerung fand eine ausgedehnte Analyse unter Berücksichtigung bestimmter Kriterien statt. Nur diejenigen SNPs wurden im weiteren Verlauf der Arbeit berücksichtigt, die die nachstehend aufgeführten Merkmale aufwiesen.

- SNPs müssen außerhalb repetitiver Sequenzen (*repeats*) lokalisiert sein.
- Die Distanz zwischen SNP und angrenzendem PAM-Motiv darf eine Länge von maximal 10 Basen nicht überschreiten.
- Der betrachtete SNP darf nicht gleichzeitig die N-Base des 5'-NGG PAM-Motivs sein.
- Die korrespondierenden sgRNAs sollen hohe *on-target-scores* >50% und möglichst niedrige *off-target-scores* aufweisen.

Das Ziel der Arbeit war es, sgRNAs zu entwickeln, die mit hoher Spezifität an eine bestimmte Zielsequenz binden und an dieser Stelle einen Cas9-induzierten Doppelstrangbruch einleiten würden. Um zu gewährleisten, dass eine sgRNA nur diese eine Stelle im Genom erkennt, *darf sich die gewünschte Zielsequenz folglich nicht in einer repetitiven Sequenzstruktur befinden*. Darum wurden mittels des GCSC *Genome Browsers* in einem ersten Schritt alle SNPs inklusive der angrenzenden

Areale bezüglich eines vorliegenden *repeats* untersucht. Außerdem wurde die genaue Klassifikation des *repeats* über den *Repeat Masker* Web-Server ermittelt. 43 SNPs erfüllten nach der Untersuchung dieses eine Kriterium bereits nicht und wurden aus der engeren Auswahl genommen.

Für die Spezifität der sgRNAs gegenüber einer Zielsequenz spielt weiterhin die Distanz des SNPs zum sogenannten *protospacer adjacent motif* (PAM) der Form 5'-NGG eine Rolle. Die Funktion der Cas9-Nuklease ist auf die Erkennung eines solchen Motivs in unmittelbarer Nähe zur Ziel-DNA angewiesen. Studien zeigten, dass für die Erkennung und Bindung der sgRNA an diese Zielsequenz die zum PAM-Motiv angrenzenden Nukleotide, eine Art Kernsequenz, von großer Bedeutung sind (Cong et al., 2013). Da sich in dieser Arbeit die Ziel- und Nicht-Zielsequenz in nur einem Nukleotid unterscheiden, kann eine möglichst hohe Spezifität der sgRNAs vor allem durch eine geringe Distanz zwischen SNP und PAM erreicht werden. Abweichungen zwischen Ziel-DNA und sgRNA werden schließlich bereits ab einer Entfernung von ca. 10 Nukleotiden zur PAM mit hoher Wahrscheinlichkeit toleriert. Folglich steigt mit Entfernung des SNPs zum PAM-Motiv die Gefahr, dass die Cas9-Nuklease sowohl Zielallel als auch Nicht-Zielallel schneidet. Deshalb wurde als nächstes Kriterium die *maximale Entfernung eines SNP von 10 Basen zur PAM-Sequenz definiert*.

Des Weiteren wurde *eine sgRNA eines Ziel-SNPs als ungeeignet erachtet, wenn sie an eine PAM-Sequenz angrenzte, deren variable N-Base sich an Position des selbigen SNPs befand*. Die Ausprägung dieses Nukleotids der PAM hat für die Funktion der Nuklease keine Bedeutung, sodass jede beliebige Base an dieser Position zu einer Nukleasenaktivität führen würde. Aus diesem Grund könnte bei deckungsgleicher Position des SNPs und der N-Base des PAM-Motivs keine Unterscheidung zwischen Ziel- und Nicht-Zielsequenz durch die Nuklease stattfinden, da beide Sequenzen an selbiger Stelle ein PAM-Motiv ausbilden und sich ansonsten in ihrer weiteren Nukleotidabfolge vollkommen gleichen würden.

Mithilfe des Web-basierten *Optimized CRISPR Design Tools*, konnten weiterhin Berechnungen darüber angestellt werden, mit welcher Wahrscheinlichkeit Doppelstrangbrüche in einer beliebigen Zielsequenz mittels einer sgRNA bewirkt werden würden (*on-target-score*). Ebenso wird aufgezeigt, inwiefern alternative

Sequenzen im Genom mit hoher Ähnlichkeit zur Ziel-DNA geschnitten werden würden (*off-target-score*). Nur *sgRNAs* mit vorhergesagten *on-target-scores* von 50% oder höher und möglichst geringen *off-target-scores* wurden für das weitere Vorgehen berücksichtigt.

Am Ende dieser Analyse standen insgesamt 22 SNPs fest, die weiterhin für den Haplotyp-spezifischen Ansatz dieser Arbeit geeignet waren. Der Selektionsprozess geeigneter SNPs ist in der nachstehenden **Abbildung 7** zusammengefasst.

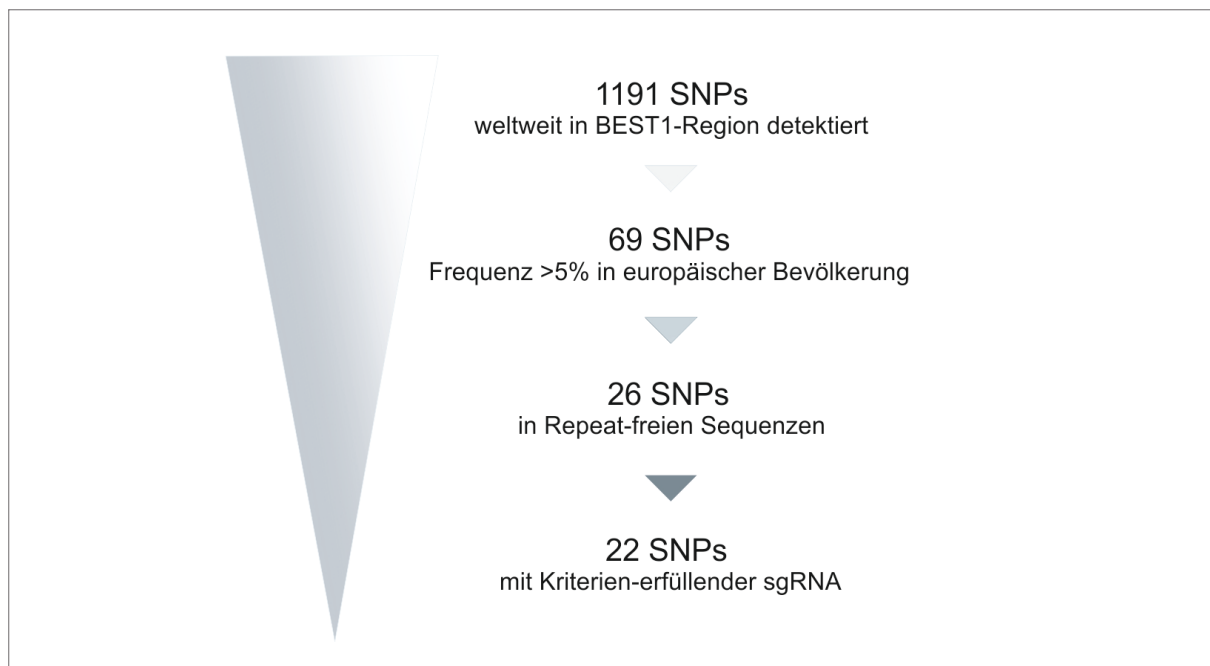


Abbildung 7: Selektionsprozess geeigneter SNPs im BEST1-Genlocus

Darstellung des Filterprozesses geeigneter SNPs im BEST1-Genlocus von ursprünglich 1.191 bis hin zur finalen Auswahl von 22.

Aus **Tabelle 29** lassen sich für die 69 hochfrequenten SNPs zusammengefasst alle Parameter entnehmen, die im Rahmen der Analyse auf Grundlage der aufgestellten Kriterien erhoben wurden.

Tabelle 29: Übersicht der 69 häufigsten (>5%) europäischen SNPs im BEST1-Lokus und Darstellung ausgewählter Merkmale

Interne SNP-Nr	rs-Nr	Rel. Häufigkeit	repeat-Struktur	Allel	guide -Nr	on-target-score (%)	Entfernung zu PAM
22	rs61898622	0,053	LINE, L1, L1M4				
27	rs7939370	0,255	SINE, Alu, AluSz6				
40	rs2727266	0,066	LINE, L1, L1M4				
61	rs2158027	0,455	LINE, L1, L1M4				
66	rs2736603	0,418	LINE, L1, L1M4				
70	rs2736602	0,329	LINE, L1, L1M4				
71	rs2736601	0,066	LINE, L1, L1M4				
76	rs80243286	0,063	SINE, Alu, AluJr				
78	rs7947322	0,308	SINE, Alu, AluJr				
85	rs2736600	0,382	LINE, L1, L1M4				
87	rs2727267	0,066	SINE, Alu, AluSx				
88	rs2736598	0,389	SINE, Alu, AluSx				
91	rs4963277	0,308	SINE, Alu, AluSx				
127	rs2727268	0,066	SINE, Alu, AluSp				
128	rs61898623	0,053	SINE, Alu, AluSp				
143	rs6591676	0,297	SINE, Alu, AluSz				
211	rs2524293	0,416	LINE, L1, L1M4				
218	rs7121586	0,097	LINE, L1, L1M4				
223	rs2727269	0,487	LINE, L1, L1M4				
239	rs2521572	0,055		G	1	52	7
				T	1	48	7
254	rs2727261	0,116	DNA, hAT, MER53				
256	rs12288004	0,068	SINE, Alu, AluSq2				
257	rs2727260	0,116	SINE, Alu, AluSq2				
298	rs1534842	0,108		A	2	62	10
				G	1	57	PAM (NGG)
311	rs2009875	0,147	SINE, Alu, AluSz				
353	rs974121	0,374		T	1	8	12
				G	1	20	12
357	rs174481	0,245	LINE, L1, L1PA8				
372	rs3758976	0,179		C	1	50	15
				G	2	41	2
377	rs972355	0,289	SINE, MIR, MIR3				
387	rs972354	0,095		C	3	60	PAM (NGG)
				T	2	42	18
390	rs972353	0,289		T	2	59	7
				C	2	70	PAM (NGG)
401	rs2736597	0,289		G	1	68	11
				A	1	69	11
417	rs2736596	0,05		G	1	83	7
				A	1	54	7
429	rs1800007	0,289		T	-	-	-

				C	1	47	PAM (NGG)
466	rs2736595	0,271	SINE, Alu, AluJb				
474	rs168991	0,368	SINE, Alu, AluJo				
484	rs195169	0,366	SINE, Alu, AluSg				
487	rs2727272	0,271	SINE, Alu, AluSg				
488	rs2524294	0,287	SINE, Alu, AluJo				
490	rs195168	0,368	SINE, Alu, AluJo				
492	rs195167	0,082	SINE, Alu, AluJo				
499	rs195166	0,082	LINE, L1, L1MC5a				
501	rs2668899	0,271	LINE, L1, L1MC1				
515	rs2736594	0,082	SINE, Alu, AluJo				
517	rs183176	0,082		A	1	64	5
				C	2	70	5
534	rs1109748	0,082		C	1	54	PAM (NGG)
				A	-	-	-
542	rs195165	0,082		A	1	51	2
				T	1	74	2
550	rs195164	0,079		G	1	50	10
				A	1	79	10
553	rs909268	0,224		A	2	71	2
				T	2	65	2
555	rs168990	0,082	SINE, Alu, AluJo				
559	rs195163	0,082	SINE, Alu, AluJo				
564	rs760306	0,224		C	1	61	3
				T	1	36	7
578	rs195162	0,082		T	1	48	3
				C	1	61	11
581	rs195161	0,324		G	1	76	PAM (NGG)
				T	4	60	2
587	rs741886	0,079		G	2	58	11
				T	1	57	7
598	rs2955684	0,082	SINE, Alu, AluSx				
599	rs2955683	0,084	SINE, Alu, AluSx				
631	rs195160	0,095		G	1	49	14
				T	5	54	1
636	rs10897187	0,092	simple repeat				
637	rs1735379	0,097	simple repeat				
655	rs195158	0,097		T	1	51	5
				G	1	79	5
685	rs195157	0,095	SINE, MIR, MIRb				
707	rs111509315	0,068	SINE, Alu, AluSq				
716	rs195156	0,097		T	2	49	4
				C	2	65	PAM (NGG)
749	rs149698	0,324		G	1	67	7
				A	1	46	7

756	rs1800008	0,229	C	2	81	3
			T	1	53	5
759	rs1800009	0,353	T	2	45	2
			C	1	76	PAM (NG <u>G</u>)
772	rs17185413	0,237	T	2	75	2
			C	1	60	PAM (NG <u>G</u>)
798	rs2668897	0,082	C	2	66	1
			A	1	57	7

Aus der Tabelle sind neben den 69 SNPs ebenso ihre rs-Nummern (bezogen auf hg19), ihre relativen Häufigkeiten und ggf. Vorliegen und Art eines repeats ersichtlich. Zudem ist für beide Allele eines repeat-freien SNPs die am besten geeignete sgRNA inklusive Angaben über die guide-Nr in der Software (*Optimized CRISPR Design*), den on-target-score (%) und die Entfernung des zugehörigen SNPs zum PAM-Motiv bzw. die Position des SNPs innerhalb der PAM-Sequenz angegeben. Bedeutung der Markierungen; grün: für beide Allele eines SNPs sind Kriterien-erfüllende sgRNAs vorhanden, orange: nur für eines der Allele ist eine geeignete sgRNA vorhanden; Unterstrichenes G in PAM-Sequenz entspricht der Position des SNPs.

6.1.3 Auswahl der SNP-spezifischen sgRNAs

Analog zu den beschriebenen Kriterien folgt nachstehend eine exemplarische Erklärung zur Auswahl einer geeigneten sgRNA am Beispiel für SNP 581G (rs195161). Nach Eingabe einer beliebigen Zielsequenz in das Suchfeld des *Optimized CRISPR Design-Tools* (<http://crispr.mit.edu>), werden verschiedenste Daten zu den Parametern aller potentiellen sgRNAs innerhalb der gesuchten Zielsequenz generiert. Alle diese Vorhersagen beziehen sich auf eine sgRNA mit einer Länge von 20 Nukleotiden.

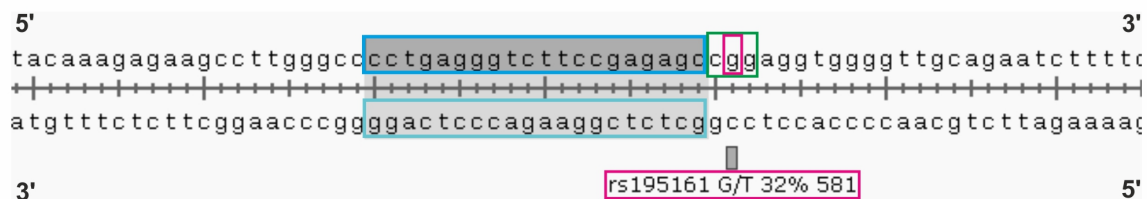
Aus **Abbildung 8A** geht die Anzahl aller für eine Sequenz ermittelten sgRNAs hervor, welche in diesem Fall 10 Stück beträgt. Jede dieser sgRNAs muss nun auf das Zutreffen der aufgestellten Kriterien überprüft werden, sodass im Anschluss die geeignetste aller sgRNAs ausgewählt werden kann. Für den Ziel-SNP 581G ist auf der nächsten Seite eine sgRNA dargestellt, die den erarbeiteten Merkmalen in hohem Maße entspricht. Zum einen liegt ein *on-target-score* von 76% vor, wodurch mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ziel-DNA effizient geschnitten wird. Zum anderen fällt der höchste *off-target-score* mit 2,6% im Chromosom 4 relativ gering aus, was theoretisch auf eine hohe Spezifität der sgRNA hindeutet. Zusätzlich bildet SNP 581G mit dem Basenaustausch von Thymin nach Guanin einen Teil des sgRNA-zugehörigen PAM-Motivs aus, ist jedoch nicht die N-Base der PAM (**Abbildung 8B**). Dieses PAM-Motiv existiert im Nicht-Zielallel 581T somit nicht, was wiederum zur Allelspezifität der sgRNA beiträgt. Eine sgRNA kann sowohl im Plus- als auch im Minusstrang liegen. In beiden Fällen liegt der sgRNA eine komplementäre Sequenz im gegenläufigen Strang

vor (**Abbildung 8B**). Die entstehenden Oligonukleotidpaare werden anschließend im Klonierungsprozess durch Annealing miteinander verbunden (**Abbildung 8C**). In **Tabelle 5** sind diese Paare detailliert aufgelistet.

A Optimized CRISPR Design



B SnapGene DNA-Sequenz



C Annealing der Oligonukleotide

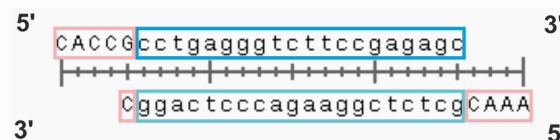


Abbildung 8: exemplarische Auswahl einer sgRNA am Beispiel des SNP 581G (rs195161)

Teil A der Darstellung zeigt die Ergebnisse des *Optimized CRISPR Design*-Tools nach Eingabe der gewünschten Zielsequenz um SNP 581G. Teil B stellt die Zielsequenz und ermittelte sgRNA mit zugehörigem PAM-Motiv in SnapGene dar. Die Darstellung C zeigt die entstandene sgRNA nach Annealing der Oligonukleotide. Farbige Markierungen: pink: Ziel-SNP 581G, blau: ermittelte sgRNA-Sequenz, hellblau: zur sgRNA komplementäre Sequenz, grün: PAM-Sequenz zur ermittelten sgRNA; orange: on-target-score für Zielsequenz (%), gelb: off-target-score (%), rosa: für Annealing und Ligation benötigte Oligonukleotide

6.1.4 Identifikation der Haplotypen

6.1.4.1 Identifikation der häufigen europäischen Haplotypen

Nach Analyse der BVMD-Genregion standen 22 SNPs zur Verfügung, die den erforderlichen Kriterien entsprachen. Im nächsten Schritt galt es, basierend auf allen daraus resultierenden SNP-Kombinationen die daraus möglichen Haplotypen zu ermitteln. Dies gelang mithilfe der *HaploView-Software*, welche hierzu die Daten der europäischen Gesamtbevölkerung aus dem *1000 Genomes Project* zugrunde legte. Anschließend wurden die verschiedenen Haplotypen mit Angabe ihrer Häufigkeitsverteilung in der Population ermittelt. Durch Abgleichen der Ergebnisse aus den Sangersequenzierungen der Patientenkohorte mit den Sequenzen der häufigen europäischen Haplotypen konnte den Patienten anschließend eine bestimmte Haplotypenkombination zugeordnet werden.

Interne SNP-Bezeichnung																							
239	298	387	390	417	429	517	534	542	550	553	564	581	587	631	655	716	749	756	759	772	798	Frequenz	Haplotyp
G	A	C	T	G	T	A	C	A	G	A	C	G	G	G	T	T	A	C	T	T	C	(0.239)	H1
G	A	C	T	G	T	A	C	A	G	A	C	G	G	G	T	T	G	T	C	C	C	(0.202)	H2
G	A	C	T	G	T	A	C	A	G	A	C	G	G	G	T	T	G	C	T	T	C	(0.176)	H3
G	A	C	C	G	C	A	C	A	G	T	T	T	G	G	T	T	G	C	T	T	C	(0.063)	H4
G	A	C	T	G	T	C	C	T	A	A	C	T	T	T	G	C	A	C	T	T	C	(0.057)	H5
G	A	C	C	G	C	A	C	A	G	T	T	T	G	G	T	T	G	C	C	T	A	(0.044)	H6
G	A	C	C	G	C	A	C	A	G	A	C	G	G	G	T	T	G	C	T	T	C	(0.041)	H7
G	G	T	C	G	C	A	A	A	G	T	T	T	G	G	T	T	G	C	C	T	C	(0.026)	H8
T	G	T	C	A	C	A	A	A	G	T	T	T	G	G	T	T	G	T	C	C	C	(0.023)	H9
T	G	T	C	A	C	A	A	A	G	T	T	T	G	G	T	T	G	C	C	T	A	(0.016)	H10
G	A	C	C	G	C	A	C	A	G	T	T	T	G	G	T	T	A	C	T	T	C	(0.016)	H11
G	A	C	T	G	T	C	C	T	A	A	C	T	T	T	G	C	G	C	T	T	C	(0.013)	H12
G	G	C	C	G	C	A	C	A	G	A	C	T	G	T	G	C	G	C	T	T	C	(0.011)	H13
G	G	T	C	G	C	A	C	A	G	T	T	T	G	G	T	T	G	C	T	T	C	(0.011)	H14
T	G	T	C	A	C	A	A	A	G	T	T	T	G	G	T	T	A	C	T	T	C	(0.006)	H15
G	G	T	C	G	C	A	A	A	G	T	T	T	G	G	T	T	G	C	T	T	C	(0.005)	H16
G	A	C	T	G	T	A	C	A	G	A	C	G	G	G	T	T	G	C	C	C	C	(0.005)	H17
G	A	T	C	A	C	A	A	A	G	T	T	T	G	G	T	T	G	C	C	T	A	(0.005)	H18
T	A	C	T	G	T	A	C	A	G	A	C	G	G	G	T	T	A	C	T	T	C	(0.005)	H19
T	A	C	C	G	C	A	C	A	G	A	C	G	G	G	T	T	G	C	T	T	C	(0.005)	H20
G	A	C	T	G	T	C	C	T	A	A	C	T	T	T	G	C	G	C	C	T	A	(0.005)	H21
G	G	C	C	G	C	A	C	A	G	A	C	T	G	T	G	C	G	C	C	T	A	(0.005)	H22
G	A	C	C	G	C	A	C	A	G	T	T	T	G	G	T	T	G	T	C	C	C	(0.003)	H23
G	A	C	T	G	T	A	C	A	G	A	C	G	G	G	T	T	G	C	C	T	C	(0.003)	H24
G	G	T	C	G	C	A	C	A	G	T	T	T	G	G	T	T	G	C	C	T	C	(0.003)	H25
G	A	C	T	G	T	C	C	T	G	A	C	T	G	G	G	C	G	C	C	C	C	(0.003)	H26
G	G	C	T	G	T	C	C	T	A	A	C	T	T	T	G	C	G	C	C	T	A	(0.003)	H27
G	A	C	C	G	C	A	C	A	G	A	C	T	G	G	T	T	G	C	C	T	A	(0.003)	H28
G	A	C	C	G	C	A	C	A	G	T	T	T	G	G	T	T	G	C	C	T	C	(0.003)	H29
G	A	C	C	G	C	C	C	T	A	A	C	T	T	T	G	C	G	C	C	T	A	(0.002)	H30

Abbildung 9: europäische Haplotypenverteilung und -frequenz auf Basis von 22 SNPs im BEST1-Locus

Dargestellt sind die durch *HaploView* ermittelten Haplotypen und deren relativen Häufigkeiten basierend auf 22 SNPs im BEST1-Lokus. Jede Zeile entspricht einem Haplotypen. Die farbige Markierung korreliert mit der nachstehenden Abbildung 10 und deutet auf die vorhandenen Haplotypen in der vorliegenden Patientenkohorte hin.

In der ersten Zeile der **Abbildung 9** sind diejenigen 22 ausgewählten SNPs dargestellt, die zur Konstruktion der Haplotypen benutzt wurden. Zudem sind rechts in der Grafik die jeweiligen Frequenzen der Haplotypen abgebildet, mit denen sie unter den Europäern verbreitet sind. Wie sich diesen Daten entnehmen lässt, wurden im Gesamten 30 Haplotypen durch *HaploView* erfasst. Davon weisen 14 mindestens eine 1-% Häufigkeit auf. Entsprechend der zu erwarteten Häufigkeitsverteilung können die häufigsten 5 Haplotypen mit einer Frequenz >5% auch in der hier rekrutierten Patientenkohorte gefunden werden. Nur vereinzelt liegen dort seltenere Haplotypen vor. Aus nachstehender Abbildung lässt sich die Haplotypenverteilung innerhalb der vorliegenden Patientenkohorte entnehmen.

6.1.4.2 Identifikation der Haplotypen der eigenen Patientenkohorte

Interne SNP-Bezeichnung																									
Patient	239	298	387	390	417	429	517	534	542	550	553	564	581	587	631	655	716	749	756	759	772	798	Frequenz	Haplotyp	Mutation
HK				T		T					A	C	G						T	C	C		(0.202)	H2	
				C		C					T	T	T						C	T	T		(0.063)	H4	A243V
SK		A	C					C															(0.063)	H4	
		G	T					A															(0.026)	H8	A243V
MD							A		A	G			G	G	G	T	T	G					(0.176)	H3	I295del
Mutter							C		T	A			T	T	T	G	C	A					(0.057)	H5	
LD							A		A	G			G	G	G	T	T						(0.239)	H1	
							C		T	A			T	T	T	G	C						(0.057)	H5	S108R
LD							A		A	G			G	G	G	T	T	G	T	C	C		(0.202)	H2	
Mutter							C		T	A			T	T	T	G	C	A	C	T	T		(0.057)	H5	S108R
AP							A		A	G			G	G	G	T	T						(0.176)	H3	I295del
							C		T	A			T	T	T	G	C						(0.013)	H12	
DK							C		T	A			T	T	T	G	C			T	T		(0.013)	H12	Q238R
							A		A	G			G	G	G	T	T			C	T		(0.003)	H24	
JS			T	G	T			C	A			A	C	G				A		T		C	(0.239)	H1	V86M
			C	A	C			A	T			T	T	T				G		C		A	?	?	
MHW							C		T	A			T	T	T	G	C	A	C	T	T		(0.057)	H5	N11K
							C		A	G			G	G	G	T	T	G	T	C	C		?	?	
JS																							(0.239)	H1	V86M
Mutter																							(0.239)	H1	
CH																							(0.176)	H3	I295del
																							(0.176)	H3	
DH		A	C																				(0.063)	H4	
		G	T																				(0.011)	H14	
MD																		A					(0.239)	H1	
																		G					(0.176)	H3	I295del

Abbildung 10: Haplotypenverteilung und Mutationslokalisationen innerhalb der Patientenkohorte

Dargestellt sind die Haplotypen der rekrutierten Patientenkohorte und die Lokalisation der Mutationen. Die Farbgebung ist analog zur vorherigen Abbildung 9 und veranschaulicht die jeweilige Haplotypenposition innerhalb der europäischen Bevölkerung.

In **Abbildung 10** sind die Patienten-IDs unter Angabe ihrer beiden Haplotypen aufgeführt. Erneut sind die 22 SNPs in der obersten Zeile aufgeführt, während rechts

im Bild Frequenz und Haplotypenbezeichnung Platz finden. Die Initialen am linken Rand der Abbildung geben nun zusätzlich Auskunft über die ID des zugehörigen Patienten. Zu erwähnen ist, dass in jener Darstellung lediglich die heterozygoten SNPs eines Patienten farbig hinterlegt sind. Für die anderen SNPs weisen die Patienten jeweils Homozygotie in den untersuchten Merkmalen auf, weshalb diese hier nicht weiter dargestellt sind. Der Grund hierfür liegt darin, dass nur die heterozygoten SNPs eine Differenzierung der beiden individuellen Haplotypen eines Patienten erlauben und nur anhand dieser der Haplotyp-spezifische Ansatz durchführbar ist. Die Haplotypen der Patienten unterscheiden sich jeweils in unterschiedlichen SNPs voneinander, sodass je nach Haplotypenkombination eines Patienten für die Deletion des betroffenen Haplotypen eine individuelle SNP-Kombination gewählt werden muss. Dies lässt sich an folgendem Beispiel verdeutlichen: Der Patient HK besitzt die beiden Haplotypen H2 und H4, der Patient SK hingegen H4 und H8. Obwohl beide Patienten den Haplotypen H4 besitzen, kann nicht in beiden Fällen dasselbe Set an SNPs bzw. sgRNAs zum Knock-Out des Mutations-tragenden Haplotypen verwendet werden. Folglich lassen sich die Haplotypen H2, H4 und H8 durch unterschiedliche SNPs sehr gut differenzieren.

Die Patienten JS und MHW konnten lediglich bezüglich eines der beiden Haplotypen klassifiziert werden. Dies liegt darin begründet, dass der zweite Haplotyp dieser Patienten aufgrund seines seltenen Vorkommens innerhalb der europäischen Bevölkerung zuvor nicht durch *HaploView* erfasst wurde. Wie aus der Grafik hervorgeht, weist sowohl die Mutter des Patienten JS als auch der Patient CH je ein homozygotes Set an Haplotypen (2x H1 bzw. 2x H3) auf, weshalb beide in all ihren SNPs am Genort des M. Best identisch sind. Aus diesem Grund können diese beiden Patienten nicht mit dem allgemeinen Haplotyp-spezifischen Ansatz adressiert werden.

Für die Entscheidung darüber, welcher der beiden Haplotypen eines Patienten deletiert werden muss, spielt die Kenntnis über die Phase der BEST1-Mutation eine wichtige Rolle. Diese Information konnte in dieser Arbeit auf zwei verschiedenen Wegen eingeholt werden. Bei drei Patienten (MD, LD und JS) gelang es, über die Haplotypen eines Elternteils die Phase für das defekte BEST1-Allel zu bestimmen. Da alle korrespondierenden Mütter ebenso erkrankt waren, musste zwangsläufig das gemeinsame Allel von Mutter und Kind mit der Mutation behaftet sein. Bei den

restlichen Patienten erfolgte die Identifikation des krankhaften Allels über Klonierung des Genortes und damit eine Separierung der Allele, wie später näher beschrieben wird.

Für den Knock-Out eines Haplotypen benötigt man ein Set aus zwei sgRNAs, das auf das mutierte Allel gerichtet ist. Dabei wählt man zwei SNPs in möglichst weiter Entfernung zueinander, sodass Exon-überspannende Doppelstrangbrüche durch die Cas9-Nuklease generiert werden können. Alternativ könnte bereits der Einsatz einer einzigen sgRNA genügen, sofern der korrespondierende SNP in einem kodierenden Exon läge. Durch die Induktion von DNA-Brüchen innerhalb kodierender Sequenzen gingen für die korrekte Genfunktion erforderliche Informationen verloren. Dieses fehlerhafte Protein würde folglich vom Reparaturmechanismus der Zelle erkannt und mitsamt der darauf befindlichen BEST1-Mutation abgebaut werden. Erzeugte man hingegen einen einzelnen Bruch in einer nicht-kodierenden Region, käme dies einer gewöhnlichen Punktmutation gleich und der gewünschte Effekt der Proteindegradation käme sehr wahrscheinlich nicht zustande.

Nach dieser Theorie können die Patienten MD und DH mittels dieses Ansatzes nicht adressiert werden. MD weist nur einen heterozygoten SNP auf, wohingegen DH nur zwei benachbarte heterozygote SNPs in nicht-kodierenden Sequenzen besitzt. Auch die bereits erwähnten homozygoten Personen CH und JS Mutter fallen für die weiteren Zwecke aus dieser Studie heraus.

6.2 Experimenteller Arbeitsteil

Alle bisher präsentierten Ergebnisse resultieren aus einer reinen bioinformatischen Analyse. Der folgende Teil widmet sich nun der experimentellen Arbeit, die im Anschluss an die computergestützte Auswertung folgte.

6.2.1 Genotypisierung der Patienten zur Phasenbestimmung der Mutation

Nach der Bestimmung der beiden Haplotypen eines Patienten musste die Phase, also Lokalisation der Mutation, einem der beiden Allele zugeordnet werden. Für diejenigen fünf Patienten, für die eine Zuordnung nicht über die Eltern möglich war, musste eine experimentelle Auswertung erfolgen. Die Mutation eines jeden Patienten war bereits

bekannt. Über PCR wurden daraufhin die entsprechenden DNA-Fragmente amplifiziert, welche den Mutationsort und den dazu nächstgelegenen SNP beinhalteten (**Tabelle 30**). Die dafür verwendeten Primer lassen sich aus **Tabelle 6** entnehmen.

Tabelle 30: Patientenangaben zur experimentellen Phasenbestimmung

Patienten-ID	Mutation	nächstgelegener SNP	PCR-Größe (bp)
HK	Ala243Val	581	1518
SK	Ala243Val	534	4855
DK	Glu238Arg	587	683
AP	Ile295del	655	638
MHW	Asn11Lys	542	3800

Der weitere Ablauf war wie unter 4.2.1-4.2.8 im Methodenteil beschrieben. Die amplifizierten Fragmente wurden in *E. coli* (DH5 α) kloniert und vermehrt. Anschließend wurden die positiven Klone selektiert und sequenziert. Das gleichzeitige Vorliegen des SNP-Allels gemeinsam mit der Mutation in derselben Sequenz lieferten Aufschluss über den betroffenen Haplotypen (**Tabelle 31**). Auf diese Weise konnten die verbliebenen fünf Patienten bezüglich ihres Mutations-tragenden Haplotypen charakterisiert werden. Letztendlich wiesen also 9 von 13 Probanden geeignete Exon-überspannende SNPs auf und ließen sich in Bezug auf ihr pathologisches Allel bestimmen.

Tabelle 31: Ergebnis der Phasenbestimmung

Patienten-ID	Mutation	Ausprägung des SNPs	betroffener Haplotyp
HK	Ala243Val	581 T	H4
SK	Ala243Val	534 A	H8
DK	Glu238Arg	587 T	H12
AP	Ile295del	655 T	H3
MHW	ASN11Lys	542 T	H5

6.2.2 Testung der bioinformatisch ermittelten sgRNAs

Es erfolgte eine Auswahl an SNPs, die sowohl heterozygot in der Patientenkohorte vorkamen als auch von einem repräsentativen Wert für die europäische Gesamtbevölkerung waren. Anhand dieser SNPs wurde eine Testung der zuvor bioinformatisch ermittelten sgRNAs vorgenommen.

Wie bereits erwähnt, sollte die Haplotyp-spezifische Deletion mithilfe von großen Exon-überspannenden Doppelstrangbrüchen zustande gebracht werden. Aus diesem Grund wurden zwei SNPs am Ende des Gens, SNP 749 (rs149698) und 756 (rs1800008), ausgewählt. Diese weisen zudem eine allgemeine Häufigkeit von 32% bzw. 23% auf und sind ebenfalls heterozygot in einigen Patienten der Kohorte. Kombiniert mit einem SNP der vorderen oder mittleren Genregion, lassen sich damit nun große Teile des Gens ausschneiden. So wurde zusätzlich SNP 581 (rs195161) ausgewählt, der ebenfalls mit einer Frequenz von 32% in der Allgemeinbevölkerung auftritt und bei der Mehrheit der Patienten heterozygot vorliegt. Mit einem Set aus zwei sgRNAs, entweder für SNP 581 und 749 oder SNP 581 und 756, lassen sich die Haplotypen von 5 der 9 Patienten dieser Kohorte unterscheiden und voneinander abgrenzen. Je nachdem auf welchem der beiden Haplotypen nun die Mutation lokalisiert ist, soll das gesunde Allel erhalten bleiben, während das betroffene deletiert werden soll. Deshalb wurde jeweils für beide Ausprägungen eines SNPs je eine sgRNA synthetisiert und in vitro getestet.

Die Testung der zuvor ermittelten SNP-spezifischen sgRNAs erfolgte im Rahmen der HEK293T-Transfektionen. Dabei wurden die Effizienz- und Spezifitätseigenschaften der sgRNAs gegenüber ihren korrespondierenden Zielsequenzen näher betrachtet. Mithilfe des *Optimized CRISPR Design-Tools* wurden unter Einhaltung der zuvor aufgestellten Kriterien Sequenz-spezifische sgRNAs mit einer Länge von 20 Basen ausgewählt. Diese wurden anschließend auf die bioinformatisch vorhergesagten *on-* und *off-target-scores* gegenüber ihren Ziel- und Nicht-Zielallelen überprüft. Die **Abbildung 11** zeigt das Ergebnis der ersten Transfektionsrunde unter Verwendung der sgRNAs in der ermittelten Form.

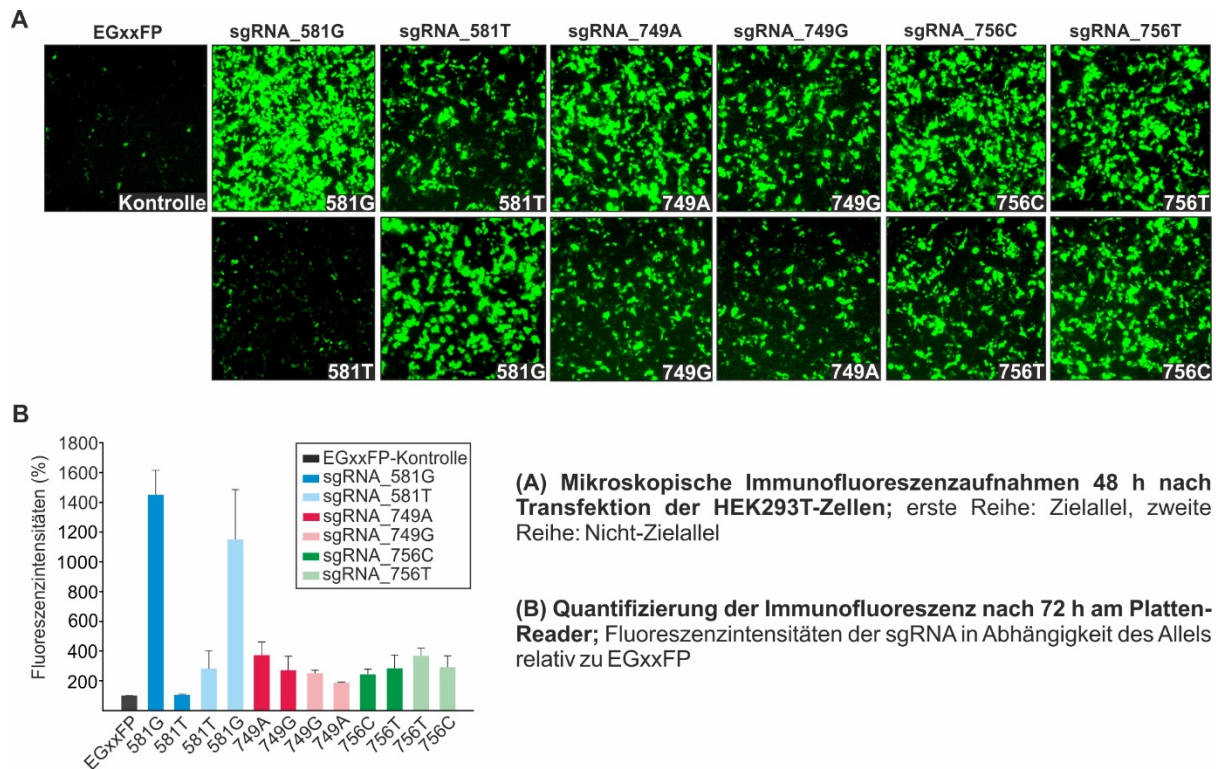


Abbildung 11: Transfektionsergebnisse unter Verwendung der bioinformatisch ermittelten sgRNAs

Abbildung 11A zeigt die mikroskopischen Immunfluoreszenzaufnahmen der HEK293T-Zellen bei 48 h nach erfolgter Transfektion. Das Balkendiagramm in **Abbildung 11B** stellt die quantifizierten Fluoreszenzintensitäten am Platten-Reader bei 72 h nach der Transfektion dar. Vor der Zell-Transfektion wurden sogenannte Zielkonstrukte hergestellt, indem genomische Sequenzabschnitte mit einer Größe von etwa 500 Basenpaaren, je eine von beiden möglichen Ausprägungen eines SNPs enthaltend, zwischen die Fragmente des EGxxFP-Proteins in den pCAG-EGxxFP-Vektor kloniert wurden. In einem weiteren Schritt sind die Expressionsvektoren BB-PX459 entstanden, die jeweils eine Cas9-Nuklease und eine SNP-korrespondierende sgRNA enthielten. Anschließend erfolgte die Co-Transfektion der HEK-Zellen mit je einem Zielkonstrukt und dem entsprechenden Expressionsvektoren. Bei jedem erfolgreichem Schnitt der Zielsequenz durch die Cas9-Nuklease fand eine homologe Reparatur der EGxxFP-Kassette statt und erlaubte auf diese Weise eine Messung der entstandenen Fluoreszenzen.

Die erste Bilderreihe in **Abbildung 11A** zeigt die Zielallele, die darunterliegende Reihe stellt die Nicht-Zielallele dar. Zum Vergleich ist ebenso die Grundfluoreszenz der EGxxFP-Leerkontrolle dargestellt. Hieraus können nun Rückschlüsse auf die

CRISPR-Effizienz und die Allelspezifität der sgRNAs gezogen werden. So wiesen beinahe alle sgRNAs höhere Affinitäten für ihr Zielallel verglichen mit dem Nicht-Zielallel auf. Entgegen aller Erwartungen zeigte die für SNP 581T konzipierte sgRNA_581T_20mer eine höhere Spezifität für das Nicht-Zielallel 581G. Ebenso wurde das Nicht-Zielallel 756T etwas häufiger von der sgRNA_756C_20mer geschnitten als das eigentliche Zielallel 756C. Hervorzuheben ist außerdem auch die sgRNA_581G_20mer für SNP 581G, welche schon bereits in dieser Runde und vorliegenden Form höchste Effizienz und Spezifität für das Zielallel zeigte. Die Fluoreszenzintensität zwischen dieser sgRNA und dem Nicht-Zielallel SNP 581T war vergleichbar mit der des Leervektors und deutet daher auf eine sehr niedrige Reaktivität der sgRNA gegenüber dem Nicht-Zielallel hin. Bis auf diese einzige Ausnahme stellten sich alle anderen bioinformatisch ermittelten sgRNAs als durchaus verbesserungswürdig in ihren Effizienz- und Spezifitätseigenschaften dar. Zusammenfassend konnte in diesem Versuch also gezeigt werden, dass die experimentell gewonnenen Ergebnisse von den virtuellen Berechnungen der Software bezüglich den vorhergesagten Effizienz- und Spezifitätsergebnissen der sgRNAs abwichen.

6.2.3 Optimierungsprozess der bioinformatisch ermittelten sgRNAs

Nach Auswertung der Transfektionsergebnisse der ersten Runde bestand der nächste Schritt darin, die ermittelten sgRNAs einem Optimierungsprozess zu unterziehen, um bessere Ergebnisse hinsichtlich der Allelspezifität zu erhalten. Zu diesem Zweck fanden verschiedenste Sequenzmodifikationen der ursprünglichen sgRNAs statt. Für dieses Unterfangen wurden zwei verschiedene Methoden in Betracht gezogen: Zum einen wurden zusätzliche Nukleotidabweichungen in die sgRNAs eingefügt, um die Bindung zum Nicht-Zielallel zu schwächen. Auf diese Weise entsteht zwar auch eine Basenabweichung zur Zielsequenz, aber gleichzeitig liegen bereits zwei nicht-komplementäre Basen zur Nicht-Zielsequenz vor. Dadurch soll die Reaktivität der sgRNAs gegenüber den Nicht-Zielsequenzen gesenkt werden, während weiterhin genügend Affinität zu den Zielsequenzen erhalten bleibt. Dabei wurde sowohl die Position und Art der Nukleotidsubstitution verändert, um einen möglicherweise vorliegenden Effekt feststellen zu können.

Zum anderen wurde im Sinne einer möglichen Spezifitätssteigerung die Strategie angewandt, die Sequenzlängen der sgRNAs zu verkürzen. Durch schrittweise Verkürzung der sgRNAs von 20 auf 17 Basen, sollten die Auswirkungen auf die Spezifitätseigenschaften der sgRNAs untersucht werden. In einer anderen Publikation wirkte sich diese Maßnahme positiv auf die Spezifität aus (Fu et al., 2014). Die Erklärung hierfür ist, dass die Sequenzbindung durch eine nicht-komplementäre Base in einer kurzen sgRNA stärker energetisch destabilisiert wird als in einer langen sgRNA. In der kurzen sgRNA kommt der abweichenden Base eine stärkere energetische Gewichtung zu, da insgesamt weniger komplementäre Basen zur Stabilität der Bindung der beitragen können. Dadurch sollte die Bindung zur Nicht-Zielsequenz geschwächt und die Zielsequenz spezifischer gebunden werden.

In einem weiteren Schritt dieser Arbeit wurden beide Optimierungsstrategien kombiniert angewandt, um einen daraus potentiell resultierenden Mehrgewinn zu erfassen. Die vorgenommenen Modifikationen der bioinformatisch ermittelten sgRNAs sind detailliert in den nachfolgenden Graphen aufgeführt (**Abbildungen 12-16**). Der Optimierungsprozess umfasste sgRNA-Modifikationen für folgende Zielsequenzen: SNP 581G, SNP 749A, SNP 756C und SNP 756T.

6.2.3.1 Optimierungsversuch der sgRNA für SNP 581G (rs195161)

Obwohl die sgRNA_581G_20mer bereits in ihrer ursprünglichen Form eine hohe Spezifität und Sensitivität für SNP 581G aufwies, sollte im nächsten Versuch überprüft werden, ob eine Sequenzverkürzung (sgRNA_581G_17mer) einen positiven Effekt in Form einer Spezifitätssteigerung erzielen könnte (**Abbildung 12**). In diesem speziellen Fall war durch Verkürzung der sgRNA eher Gegenteiliges zu beobachten: Die relativen Fluoreszenzwerte sprechen für eine dezent erhöhte Reaktivität gegenüber beiden Allelen (**Abbildung 12A**). Betrachtet man die Balken in **Abbildung 12B**, so fällt eine leicht reduzierte Spezifität gegenüber dem Zielallel SNP 581G auf. Die Verkürzung der sgRNA resultierte hier in keiner Besserung der Spezifität, weshalb die sgRNA_581G_20mer in ihrer Ursprungsform beibehalten wurde und als geeignetere Variante für SNP 581G bestimmt wurde. Für das Allel 581T fand im Rahmen dieser Arbeit keine Modifikation der sgRNA statt.

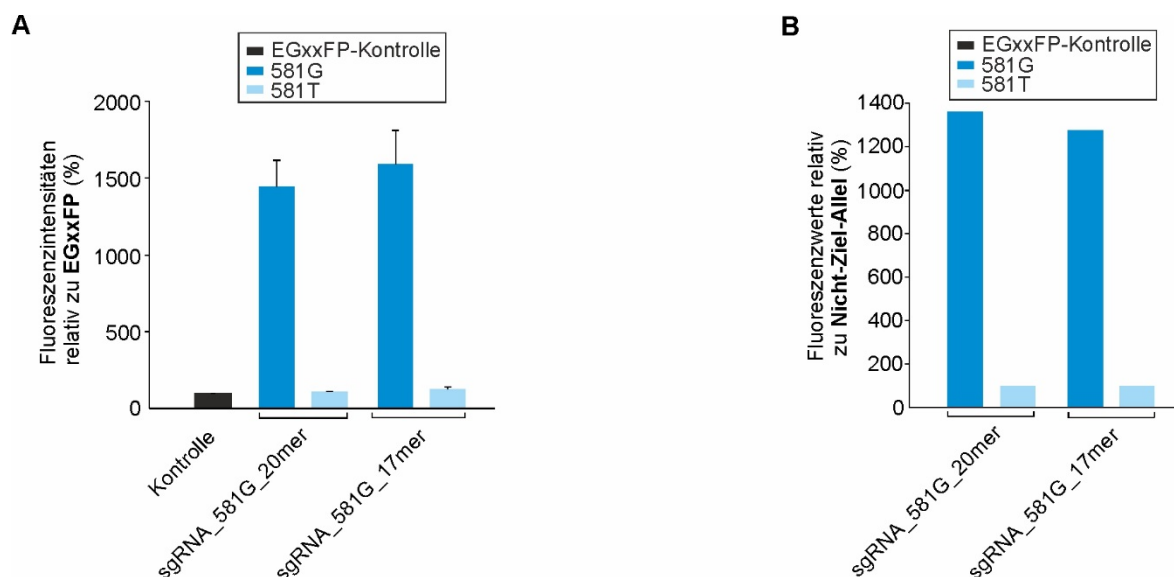


Abbildung 12: Effizienz und Spezifität der modifizierten sgRNA_581G

(A) Darstellung der Fluoreszenzintensitäten (%) bezogen auf den Leervektor EGxxFP, entspricht der Effizienz (B) Darstellung der Fluoreszenzintensitäten (%) bezogen auf das Nicht-Zielallel, entspricht der Spezifität; y-Achse: Fluoreszenzintensitäten; x-Achse: getestete sgRNA; Farbschema: dunkelblau: Zielallel 581G; hellblau: Nicht-Zielallel 581T; Versuchswiederholungen: n=3; Messung am Platten-reader 72 h nach HEK293T-Transfektion

6.2.3.2 Optimierungsversuch der sgRNA für SNP 756T (rs1800008)

Die bioinformatisch ermittelte sgRNA_756T_20mer für das Zielallel SNP 756T wurde ebenfalls in ihrer Sequenz modifiziert (**Abbildung 13**). Eine Reduktion der Sequenzlänge von ursprünglich 20 auf 17 Nukleotide (sgRNA_756T_17mer), übte in diesem Beispiel tatsächlich einen positiven Effekt auf die Spezifität aus. Zudem wurden hier auch die unterschiedlichen Auswirkungen zusätzlich eingefügter Basenabweichungen an verschiedenen Nukleotidpositionen innerhalb der sgRNA_756T_20mer näher betrachtet. Eine eingefügte Basenabweichung in einer Entfernung von nur 6 Nukleotiden zur PAM-Sequenz (sgRNA_756T_6.Base_G>C) führte dabei zum völligen Effizienzverlust der sgRNA. Wie aus der **Abbildung 13A** ersichtlich wird, sind die hier Balken für die Fluoreszenzergebnisse beider Allele auf das Niveau des Leervektors gesunken.

Anschließend wurden verschiedene Nukleotidsubstitutionen in weiterer Entfernung zum PAM-Motiv, an der 17. und 19. Position, vorgenommen. An 19. Position wurde untersucht, ob eine Basenkonversion von Thymin (T) nach Adenin (A) (sgRNA_756T_19.Base_T>A_20mer) im Vergleich zu Thymin nach Guanin (G) (sgRNA_756T_19.Base_T>G_20mer) ein unterschiedliches Resultat bringen würde.

Hier resultierte die letztgenannte Modifikation in einem etwas spezifischeren Ergebnis gegenüber dem Zielallel. Das beste Ergebnis dieser Versuchsreihe wurde jedoch mit einem Basenaustausch von Guanin nach Cytosin (C) an 17. Stelle der sgRNA-Sequenz erzielt (sgRNA_756T_17.Base_G>C_20mer) (**Abbildung 13B**).

Zusammenfassend konnte in diesem Fall gezeigt werden, dass sich eine verkürzte sgRNA in der Tat positiv auf die Spezifität gegenüber dem Zielallel auswirken kann. Die Effizienz der sgRNA wurde von der durchgeführten Maßnahme dabei kaum negativ beeinflusst. Grundsätzlich führte jede Nukleotidabweichung in einer PAM-fernen Position stets zu einer gesteigerten Spezifität der sgRNA, führte aber gleichzeitig zu einem merklichen Abfall der Gesamteffizienz.

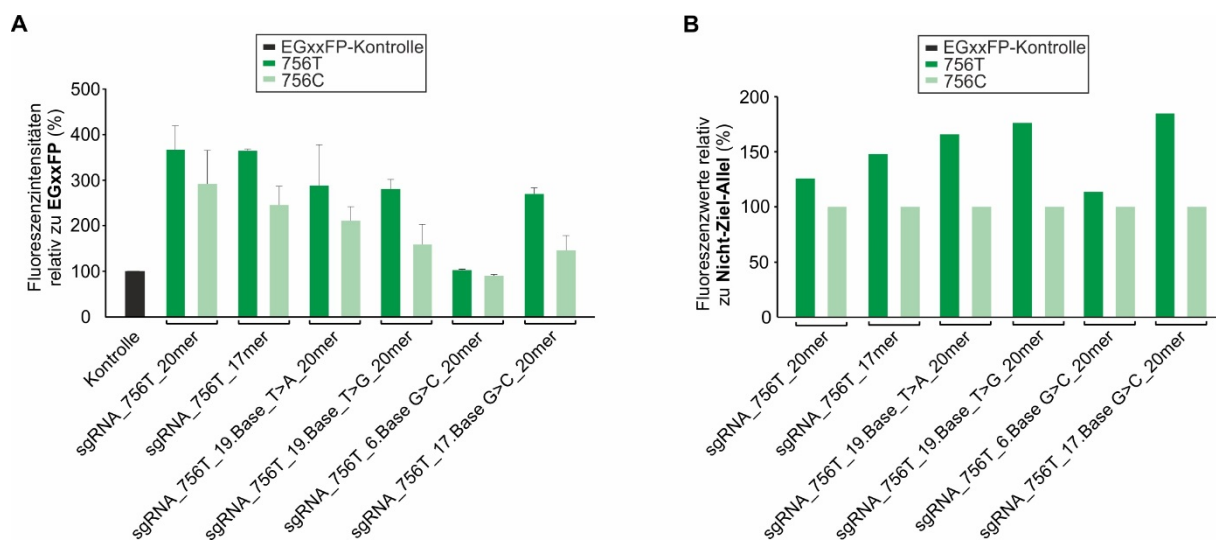


Abbildung 13: Effizienz und Spezifität der modifizierten sgRNA_756T

A) Darstellung der Fluoreszenzintensitäten (%) bezogen auf den Leervektor EGxxFP, entspricht der Effizienz (B) Darstellung der Fluoreszenzintensitäten (%) bezogen auf das Nicht-Zielallel, entspricht der Spezifität; y-Achse: Fluoreszenzintensitäten; x-Achse: getestete sgRNA; Farbschema: dunkelgrün: Zielallel 756T; hellgrün: Nicht-Zielallel 756C; Versuchswiederholungen: n=3; Messung am Platten-reader 72 h nach HEK293T-Transfektion

6.2.3.3 Optimierungsversuch der sgRNA für SNP 756C (rs1800008)

Interessanterweise war die bioinformatisch ermittelte sgRNA_756C_20mer spezifischer für das Nicht-Zielallel 756T als für das eigentliche Zielallel 756C. Aufgrund eines angenommenen Konstruktionsfehlers wurde anschließend eine alternative sgRNA mit einer Länge von 20 Basen ermittelt (sgRNA_756C_2_20mer), synthetisiert und erneut getestet (**Abbildung 14A**). Aber auch diese sgRNA schien nicht zwischen den beiden Allelen differenzieren zu können und wies eine etwas höhere Spezifität

gegenüber dem Nicht-Zielallel 756T auf. Auffällig war jedoch, dass eine Verkürzung dieser sgRNA auf eine Länge von 17 Basen (sgRNA_756C_2_17mer) eine deutliche Umkehr der Spezifität zugunsten des Zielallels 756C zur Folge hatte (**Abbildung 14B**).

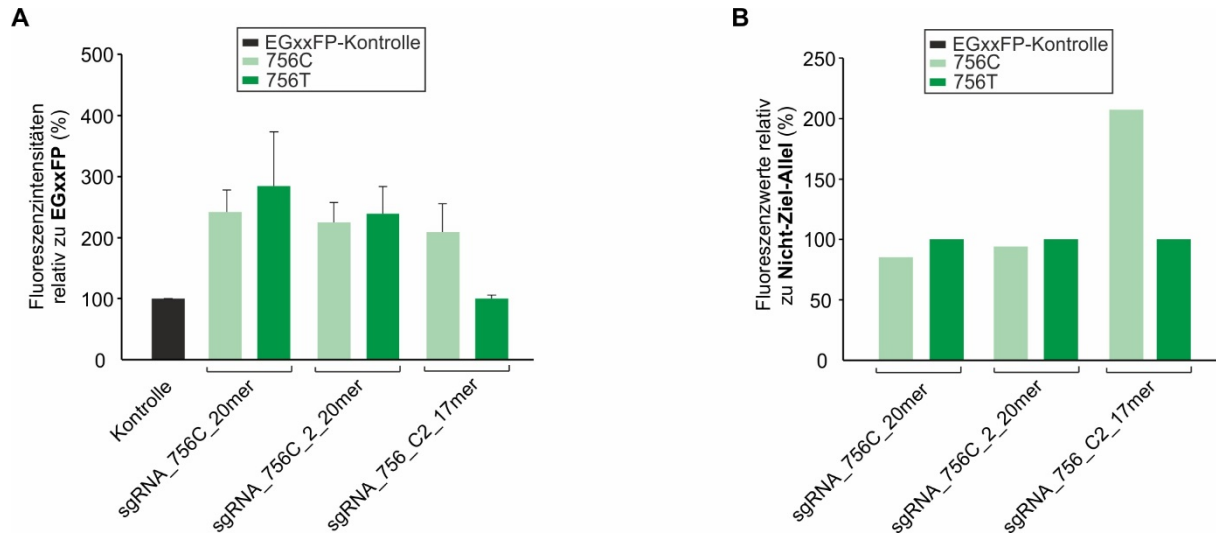


Abbildung 14: Effizienz und Spezifität der modifizierten sgRNA_756C

A) Darstellung der Fluoreszenzintensitäten (%) bezogen auf den Leervektor EGxxFP, entspricht der Effizienz (B) Darstellung der Fluoreszenzintensitäten (%) bezogen auf das Nicht-Zielallel, entspricht der Spezifität; y-Achse: Fluoreszenzintensitäten; x-Achse: getestete sgRNA; Farbschema: dunkelgrün: Nicht-Zielallel 756T; hellgrün: Zielallel 756C; Versuchswiederholungen: n=3; Messung am Platten-reader 72 h nach HEK293T-Transfektion

6.2.3.4 Optimierungsversuch der sgRNA für SNP 749A (rs149698)

Abschließend werden die zahlreichen durchgeführten Modifikationen der sgRNA für SNP 749A näher erläutert (**Abbildung 15**). Durch schrittweise Verkürzung der ursprünglichen sgRNA sollten hier die Eigenschaften zweier sgRNAs mit einer Nukleotidlänge von 19 bzw. 18 Basen untersucht werden (sgRNA_749A_19mer und sgRNA_749A_18mer). Es konnte gezeigt werden, dass keine der verkürzten Sequenzen die Ausgangssituation (sgRNA_749A_20mer) verbessern konnte. Die sgRNAs mit einer Nukleotidlänge von 19 und 18 Basen machten keine Unterscheidung zwischen Zielallel und Nicht-Zielallel. Erst ab einer Länge von 17 Nukleotiden (sgRNA_749A_17mer) nahm die Spezifität gegenüber dem Zielallel wieder etwas zu, ohne aber an das Niveau der ursprünglichen sgRNA heranreichen zu können.

Da eine reine Verkürzung der sgRNA keine Verbesserung bringen konnte, war die nächste Überlegung, eine Kombination aus Sequenzreduktion und Basenaustausch

anzuwenden. Hier war es von Interesse, mögliche Effekte sowohl in Abhängigkeit der Basensubstitution als auch der Nukleotidposition aufzudecken.

Zunächst erfolgte eine nähere Untersuchung der 17. Position relativ zur PAM innerhalb der sgRNA_749A_17mer: Hier erfolgte eine Basenkonversion von Guanin nach Cytosin (sgRNA_749A_17.Base_G>C_17mer) und von Guanin nach Adenin (sgRNA_749A_17.Base_G>A_17mer). Die gleiche Basensubstitution fand ebenso an der 16. Position der sgRNA_749A_17mer statt (sgRNA_749A_16.Base_G>C_17mer und sgRNA_749A_16.Base_G>A_17mer). Mit Ausnahme einer einzigen sgRNA hatten alle diese Veränderungen einen kompletten Effizienzverlust der sgRNA zur Folge (**Abbildung 15A**). Einzig der Austausch von Guanin nach Adenin an der 16. Nukleotidposition (sgRNA_749A_16.Base_G>A_17mer) konnte die Spezifität der ursprünglichen sgRNA übertreffen, aber nicht dasselbe Effizienzniveau erreichen (**Abbildung 15B**).

Das beste Ergebnis in dieser Versuchsreihe wurde allerdings durch einen Austausch von Guanin nach Cytosin an 19. Position (sgRNA_749A_19.Base_G>C_20mer) der ursprünglichen 20 Basen langen sgRNA (sgRNA_749A_20mer) erzielt. Diese Modifikation erzielte im Vergleich zur Ursprungsform die höchste Spezifität, die in etwa doppelt so hoch zugunsten des Zielallels 749A ausfiel (**Abbildung 15B**). Diese Spezifitätssteigerung erfolgte jedoch gleichzeitig zulasten des Effizienzniveaus. Der gleichzeitige Austausch zweier Basen innerhalb derselben sgRNA_749A_20mer, an 18. und 19. Position, (sgRNA_749A_18./19.Base_G>C_20mer), verschaffte keinen Mehrgewinn im Vergleich zum alleinigen Basenaustausch an der 19. Nukleotidposition (sgRNA_749A_19.Base_G>C_20mer).

Für das Allel 749G wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Modifikationen der sgRNA durchgeführt.

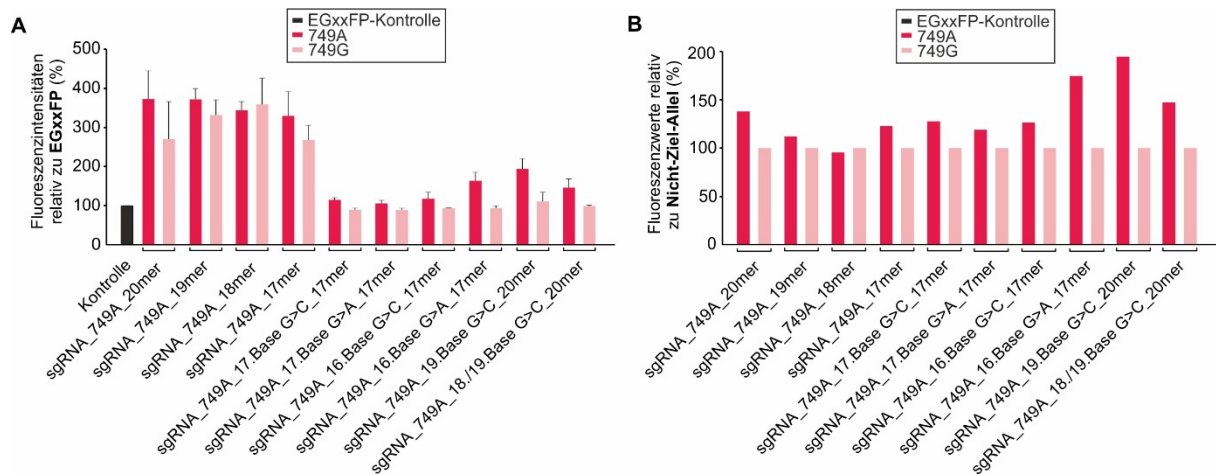


Abbildung 15: Effizienz und Spezifität der modifizierten sgRNA_749A

A) Darstellung der Fluoreszenzintensitäten (%) bezogen auf den Leervektor EGxxFP, entspricht der Effizienz (B) Darstellung der Fluoreszenzintensitäten (%) bezogen auf das Nicht-Zielallel, entspricht der Spezifität; y-Achse: Fluoreszenzintensitäten; x-Achse: getestete sgRNA; Farbschema: dunkelrot: Zielallel 749A; hellrot: Nicht-Zielallel 749G; Versuchswiederholungen: n=3; Messung am Platten-reader 72 h nach HEK293T-Transfektion

6.2.4 Transfektionsergebnisse unter Verwendung der optimierten sgRNAs

Analog zu **Abbildung 11** sind in der untenstehenden **Abbildung 16** die Transfektionsergebnisse unter Verwendung der modifizierten und optimierten sgRNAs aufgeführt. In dieser Übersicht sind lediglich die Mikroskopieaufnahmen und Fluoreszenzquantifizierungen derjenigen Transfektionsergebnisse dargestellt, die mithilfe der bestmöglich modifizierten sgRNAs für ein Allel produziert werden konnten. Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass es für mindestens ein Allel eines jeden SNPs gelang, durch Nukleotidverkürzung oder zusätzlich eingefügte Basenabweichung in die ursprüngliche sgRNA-Sequenz, die Spezifitäten der sgRNAs zu verbessern (**Abbildung 16A**). Die angewandten Modifizierungsmaßnahmen im Rahmen des Optimierungsprozesses variierten hierbei allerdings für jede sgRNA in Abhängigkeit der Zielsequenz.

Schlussendlich wiesen die optimierten sgRNAs für die Zielallele 749A, 756C und 756T eine in etwa doppelt so hohe Spezifität im Vergleich zur Nicht-Zielsequenz auf (**Abbildung 16B**). Dieser Effekt kam allerdings in allen Fällen unter deutlichen Einbußen der Effizienz zustande. Lediglich die sgRNA für SNP 581G wies bereits zu Beginn eine ca. 14-fach höhere Spezifität gegenüber der Zielsequenz auf.

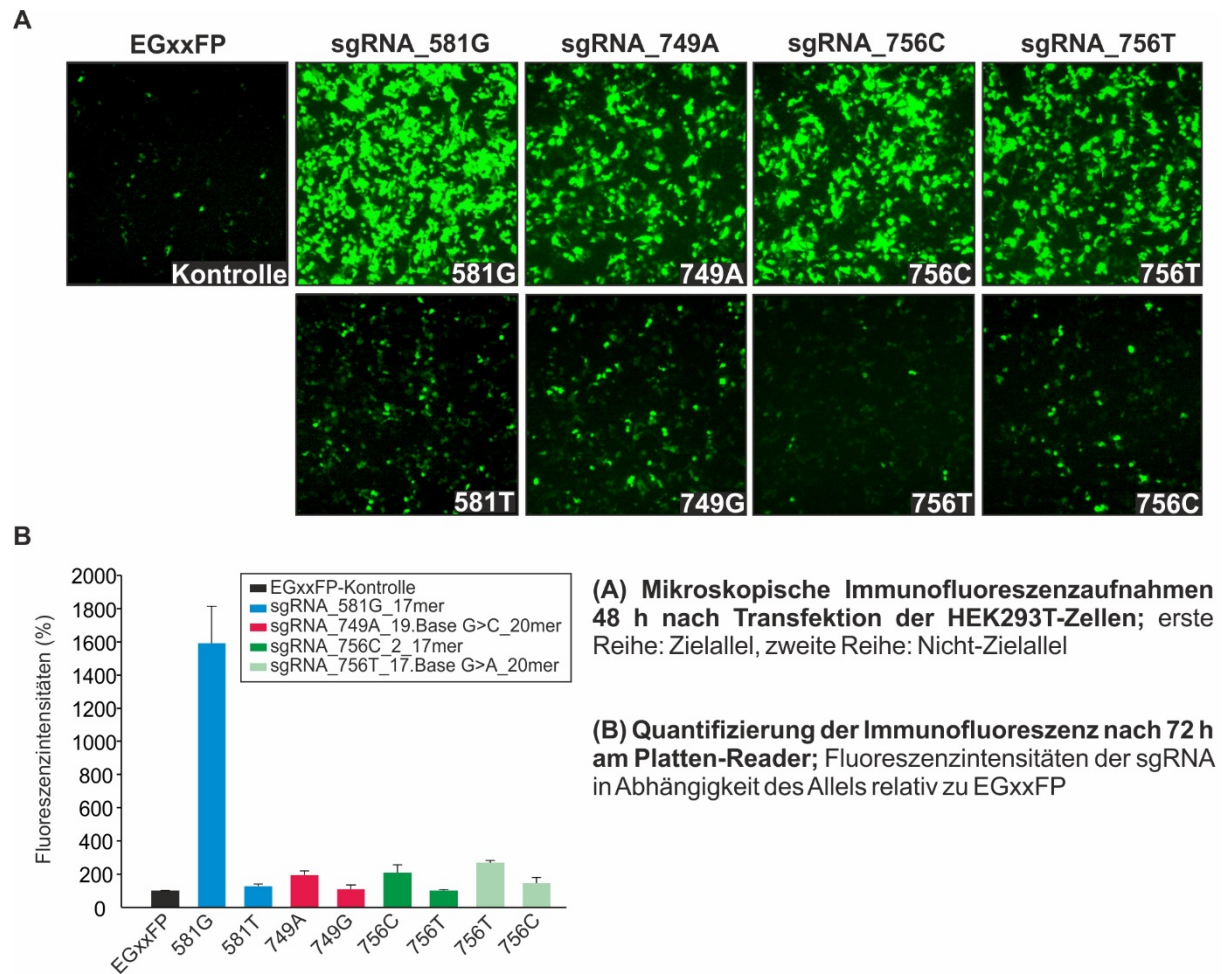


Abbildung 16: Transfektionsergebnis nach Optimierung der sgRNAs

7 Diskussion

7.1 Evaluation der bioinformatisch ermittelten sgRNAs und der angewandten Optimierungsstrategien

Die experimentellen Transfektionsergebnisse zeigen deutlich, dass sich die bioinformatisch ermittelten sgRNAs in den meisten Fällen in vitro als suboptimal in ihren Effizienz- und Spezifitätseigenschaften erwiesen haben (**Abbildung 11**). SgRNAs mit scheinbar hohen vorhergesagten *on-target-scores* erzielten in vitro relativ geringe Effizienzen in der Bindung der Ziel-DNA. Trotz zuvor als gering eingestufte Wahrscheinlichkeiten für *off-target*-Aktivitäten konnte in diesem Versuchsaufbau oftmals eine deutliche Reaktivität gegenüber den Nicht-Zielsequenzen festgestellt werden.

In der ersten Transfektionsrunde wurde stets diejenige SNP-spezifische sgRNA ausgewählt, die bezogen auf die zuvor aufgestellten Kriterien am zutreffendsten erschien. Diese sgRNA hätte eine hohe Spezifität zum zugehörigen Ziel-Allel sowie eine hohe Effizienz bei der Induktion von Doppelstrangbrüchen aufweisen müssen. Nur eine von sechs ermittelten sgRNAs, sgRNA_581G_20mer für SNP 581G, zeigte bereits im ersten Designansatz den erhofften Effekt. Insbesondere im Vergleich dieser sgRNA mit den restlichen fünf sgRNAs für die SNPs 749A/G, 756C/T und 581T werden deutliche Defizite anhand der Fluoreszenzergebnisse sichtbar. Alle fünf sgRNAs erkannten in deutlichem Ausmaß die entsprechenden Nicht-Zielallele, welche anschließend als *off-target*-Sequenzen durch die Cas9-Nuklease geschnitten wurden. Betrachtet man darüber hinaus die Fluoreszenzintensitäten für die eigentlichen Ziel-Allele, so fällt mit Ausnahme für das Ziel-Allel SNP 581G auf, dass es zudem in allen Fällen durchaus noch an Steigerung der Effizienz bedarf. Aus unklaren Gründen interagiert die für das Ziel-Allel SNP 581T konzipierte sgRNA zwar mit dem Nicht-Zielallel SNP 581G, im Vergleich dazu jedoch nur in verminderter Form mit der eigentlichen Zielsequenz.

Scheinbar bedingt das Vorhandensein einer zur Ziel-DNA komplementären sgRNA und eines angrenzenden PAM-Motivs nicht alleinig den Editierungserfolg einer genomischen Sequenz und erlaubt keine präzise Vorhersage der Spezifität und Sensitivität eines sgRNA-Cas9-Komplexes mittels bioinformatischer Algorithmen. Es

entsteht der Eindruck, als wären manche Zielsequenzen grundsätzlich schwieriger zu binden und zu schneiden als andere. Diese Sequenzabhängigkeit wird ebenso durch die unterschiedlichen Modifikationsstrategien verdeutlicht, die im Rahmen des Optimierungsprozesses der sgRNAs in dieser Arbeit zur Anwendung kamen, um das jeweils bestmögliche Transfektionsergebnis zu erreichen. Früh deuteten Studien auf einen Zusammenhang zwischen den Effizienz- und Spezifitätseigenschaften von sgRNAs und der Sequenzkomposition einer gegebenen Zielsequenz hin (Doench et al., 2014; Mali et al., 2013; Wang et al., 2014; Wu et al., 2014; Xu et al., 2015). Grundsätzlich scheinen GC-reiche Strukturen einen stabilisierenden Effekt auf die RNA-DNA-Hybridisierung zu haben, während AT-reiche Sequenzabfolgen als destabilisierend gelten (Labuhn et al., 2017; Moreno-Mateos et al., 2015). Darüber hinaus wurde auch die Bedeutung einzelner Nukleotidpositionen innerhalb der Zielsequenz sichtbar: So bevorzugt CRISPR-Cas beispielsweise an der DNA-Schnittstelle, also drei Nukleotide proximal der PAM-Sequenz, insbesondere Cytosine (Cong et al., 2013; Xu et al., 2015). Thymine in Nähe des PAM-Motivs wirken sich dabei negativ auf die Bindeaffinität der sgRNA aus (Wu et al., 2014).

Im Rahmen des Optimierungsprozesses der virtuell ermittelten sgRNAs wurde in dieser Arbeit u.a. die Strategie angewandt, zur Zielsequenz abweichende Nukleotide in die Sequenzabfolge der sgRNAs einzufügen, um eine Spezifitätssteigerung gegenüber dem Zielallel zu erreichen. Diese Überlegung beruht auf der Tatsache, dass grundsätzlich bis zu fünf Basenabweichungen zur Zielsequenz toleriert werden können und weiterhin eine ausreichende DNA-Bindung durch eine nicht gänzlich komplementäre sgRNA erfolgen kann (Fu et al., 2013). Somit sollte die Veränderung eines einzigen Nukleotids innerhalb der sgRNA-Sequenz keinen großen Affinitätsverlust für die Ziel-DNA zur Folge haben, während die zusätzlich eingefügte Nukleotidabweichung jedoch einen destabilisierenden Effekt auf die Bindung zur Nicht-Zielsequenz ausüben könnte. Es bestünden also zwei Basenabweichungen zur Nicht-Zielsequenz, hingegen nur eine einzige zur Zielsequenz. Allerdings spielt die Positionierung der Nukleotidabweichung innerhalb der Sequenz eine Rolle. Studien zeigten, dass die zum PAM-Motiv angrenzenden 8-12 Nukleotide einer sgRNA für die Erkennung und Bindung der Zielsequenz von elementarer Funktion sind (Cong et al., 2013; Jiang et al., 2013; Jinek et al., 2012; Semenova et al., 2011; Wiedenheft et al., 2011). Dementsprechend sollten zusätzlich eingefügte Basenabweichungen nur in

größerer Entfernung zur PAM-Sequenz und somit am distalen 3'-Ende der sgRNA erfolgen, da diese besser toleriert werden und einen geringeren negativen Effekt auf die Gesamt-Effizienz der sgRNA-Bindung ausüben (Cong et al., 2013; Fu et al., 2013; Hsu et al., 2013). Derartige Beobachtungen konnten jedoch nicht konstant für alle sgRNAs angestellt werden (Fu et al., 2013) und unterschiedliche Effekte wurden je nach Art der Nukleotidsubstitution an einer bestimmten Position sichtbar (Hsu et al., 2013).

Ähnliche Resultate zeigten sich auch im Rahmen dieser Studie, wie am Beispiel der sgRNA für SNP 756T deutlich wird (**Abbildung 13**): Eine Abweichung zur Zielsequenz in Nähe des PAM-Motivs, hier am 6. Nukleotid (sgRNA_756T_6.Base_G>C_20mer), führt zum kompletten Bindungsverlust der sgRNA. Durch Einfügen von Basenabweichungen am 3'-Ende der sgRNA, an den Nukleotidpositionen 17 (sgRNA_756T_17.Base_G>C_20mer) und 19 (sgRNA_756T_19.Base_T>G_20mer), konnten mit derselben sgRNA hingegen die höchsten Spezifitäten erzielt werden. Anhand dieser sgRNA wurden darüber hinaus die Auswirkungen unterschiedlicher Nukleotidsubstitutionen an der 19. Nukleotidposition untersucht. Der Basenaustausch von Thymin zu jeweils Adenin und Guanin führte an dieser Stelle zu deutlichen Spezifitätsunterschieden der sgRNA (sgRNA_756T_19.Base_T>A_20mer und sgRNA_756T_19.Base_T>G_20mer). Die unterschiedlichen Auswirkungen je nach Art der Basensubstitution werden auch am Beispiel der sgRNA für das Ziel-Allel SNP 749A deutlich (**Abbildung 15**): Es zeigten alle sgRNAs mit eingefügten Mutationen an 16. oder 17. Nukleotidposition, unabhängig von der Chemie der substituierten Base, ähnlich ineffiziente Ergebnisse. Einzig der Basenaustausch an 16. Stelle von Guanin nach Adenin erhöhte die Spezifität (sgRNA_749A_16.Base_G>A_17mer) überraschenderweise. Als erfolgreichste Modifikation erwies sich jedoch auch für diesen SNP eine sgRNA mit Variation am 19. Nukleotid und somit in größerer Entfernung zum PAM-Motiv (sgRNA_749A_19.Base_G>C_20mer). In diesem Fall ging man sogar noch einen Schritt weiter und fügte eine zweite zusätzliche Variation (sgRNA_749A_18./19.Base_G>C_20mer) an Position 18 ein. Diese Veränderung der sgRNA führte zwar zu einer sichtbar abgeschwächten Bindung der Nicht-Zielsequenz, reduzierte allerdings ebenso deutlich die Bindeaffinität zum Zielallel.

Bei Verwendung dieser Strategie sollte der potentielle Schaden nicht ignoriert werden, der mit den zusätzlich eingefügten Basenabweichungen einhergehen könnte. Je mehr genetische Veränderungen in der sgRNA-Sequenzabfolge zur eigentlichen Ziel-

Sequenz vorgenommen werden, umso mehr mögliche unvorhersehbare *off-targets* könnten an anderen Loci im Genom generiert werden, die in einem darauffolgenden Prozess evaluiert werden müssten. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind die Möglichkeiten der Identifizierung dieser *off-targets* limitiert, wodurch ein Nukleotidaustausch als denkbare Optimierungsstrategie einer sgRNA einen zu hinterfragenden Mehrgewinn bietet.

Eine weitere potentielle Optimierungsstrategie der sgRNAs könnte in der Verkürzung der Sequenzlänge von 20 auf maximal 17 Nukleotide an deren 3'-Ende bestehen (Fu et al., 2014). Die Erklärung für diesen Effekt liegt darin begründet, dass verkürzte sgRNAs eine höhere Sensitivität gegenüber Basenabweichungen zu einer Zielsequenz aufweisen als längere sgRNAs. Führt man sich nun zwei zu einer bestimmten Ziel-DNA komplementären sgRNAs vor Augen, bestehend aus entweder 20 oder 17 Nukleotiden, so weisen beide sgRNAs je eine Abweichung zur Nicht-Ziel-DNA auf. Hierbei kommt allerdings der Basenabweichung in der kürzeren sgRNA proportional eine größere Bedeutung zu, was sich in einer verminderten Bindung der Nicht-Zielsequenz und einer gesteigerten Spezifität gegenüber der Ziel-DNA äußern kann. Die Effizienzen der verkürzten sgRNAs Doppelstrangbrüche in der Zielsequenz zu induzieren, sollten jedoch weitestgehend erhalten bleiben (Fu et al., 2014). Eine zusätzlich erstrebenswerte Wirkung derartiger Nukleotidverkürzungen stellt die gleichzeitige Senkung möglicher genomweiter *off-targets* dar. Die verkürzten sgRNAs bieten schließlich weniger korrespondierende Genomsequenzen mit hoher Ähnlichkeit zur eigentlichen Zielsequenz, die als unerwünschte Folge ebenfalls durch die Nuklease geschnitten werden könnten.

Derartige Nukleotidverkürzungen wurden auch in dieser Arbeit vorgenommen und führten ebenfalls sequenzabhängig zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die verkürzte sgRNA_756T_17mer für SNP 756T (**Abbildung 13**) zeigte tatsächlich bei einem gut erhaltenem Effizienzniveau gleichzeitig den erhofften Effekt einer gesteigerten Spezifität. Im Gegensatz dazu führte die Kürzung der sgRNA_581G_17mer für SNP 581G (**Abbildung 12**) zu einem umgekehrten Effekt: Die Effizienz konnte im Vergleich zur längeren sgRNA zwar etwas erhöht werden, dies erfolgte jedoch auf Kosten der Spezifität. Ein interessantes Ergebnis brachte auch die Kürzung der alternativen sgRNA (sgRNA_756C_2_17mer) für SNP 756C: Während sgRNA_756C_2_20mer bestehend aus 20 Nukleotiden zuvor sogar spezifischer mit dem Nicht-Zielallel 756T

interagierte, wies dieselbe auf 17 Basen verkürzte sgRNA dagegen eine deutliche Spezifität für das Ziel-Allel 756C auf (**Abbildung 14**). Ein Beispiel für eine sgRNA, bei der trotz schrittweiser Verringerung der Sequenzlänge keine verbesserte Spezifität gegenüber dem Zielallel eintrat, war die sgRNA für SNP 749A (**Abbildung 15**). In diesem Fall war sogar Gegenteiliges zu beobachten und eine Kürzung der sgRNA führte zu einer verminderten Spezifität gegenüber dem Zielallel. Nennenswert in diesem Zusammenhang ist die besonders GC-reiche Nukleotidsequenz am 3'-Ende der sgRNA für SNP 749A. An 20. Nukleotidstelle und somit letzter Position der Sequenz befindet sich ein Thymin, welchem vier Guanine vorangehen. Bei Kürzung der ursprünglichen sgRNA um die letzte Position (sgRNA_749A_19mer) befinden sich an den letzten vier Stellen nur noch GC-Basenpaare, welchen laut Literatur, wie bereits erwähnt, ein stabilisierender Effekt auf die DNA-RNA-Hybridisierung zugeschrieben wird (Sugimoto et al., 1995). Durch Verlust des Thymins an letzter Position könnte die Stabilisierung durch die GC-reiche Sequenz in der nun verkürzten sgRNA dermaßen überhandgenommen haben, dass keine Differenzierung mehr zwischen beiden Allelen möglich war. Weitere schrittweise Verkürzungen bis auf 17 Basen (sgRNA_749A_18mer und sgRNA_749A_17mer) konnten diesem Effekt kaum entgegenwirken. Aufgrund bereits in der Literatur beschriebener Funktionsverluste einer sgRNA ab einer Länge von 16 Nukleotiden (Fu et al., 2014), wurde auf eine weitere Reduktion der sgRNA-Länge verzichtet.

Am Beispiel des SNPs 749A konnte eine weitere Erkenntnis gewonnen werden: Es wurde untersucht, ob sich die gleichzeitige Verkürzung der sgRNA und Nukleotidabwandlung an Position 16 oder 17 möglicherweise positiv auf die Spezifität ausüben könnte. Zumindest für diese Sequenz war dies kein vielversprechender Ansatz, da alle getesteten Basensubstitutionen in einem erheblichen Effizienzverlust der sgRNA-Bindeaffinität resultierten (**Abbildung 15**). Lediglich der Austausch an 16. Stelle von Guanin nach Adenin (sgRNA_749A_16.Base_G>A_17mer) erzielte eine nennenswerte Spezifitätssteigerung gegenüber dem Ziel-Allel und sogar das zweitbeste Ergebnis dieser Versuchsreihe.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es trotz zahlreicher Versuche nicht gelang, eine allgemein gültige Aussage zur sinnvollen Anwendung von Optimierungsmaßnahmen von sgRNAs zu treffen. Lediglich Tendenzen wurden im Laufe dieser Arbeit sichtbar. Analog zu anderen Studien konnte auch in dieser Arbeit

der Einfluss einer bestimmten Nukleotidposition innerhalb der sgRNA auf die Effizienz- und Spezifitätseigenschaften aufgezeigt werden. So führen zusätzlich eingefügte Basenabweichungen in Nähe des PAM-Motivs zum Funktionsverlust der sgRNA. Die Positionierung eines Nukleotidaustausches in größerer Entfernung zum PAM-Motiv bewirkt hingegen häufig eine deutliche Spezifitätssteigerung gegenüber der Ziel-DNA. Gleichzeitig nimmt dabei jedoch das Effizienzniveau der Sequenzbindung merklich ab. Darüber hinaus kann die Verkürzung einer sgRNA unter Umständen ebenfalls zur verbesserten Spezifität führen, wenngleich dieser Effekt nicht so deutlich ausgeprägt ist wie bei erstgenannter Optimierungsmethode. Dem gegenüber zu stellen sind allerdings hierbei die meist erhaltenen hohen Effizienzen der verkürzten sgRNAs. Diese Feststellungen erlauben die Folgerung, dass es zur Identifikation der jeweils besten Optimierungsstrategie für eine gegebene sgRNA einer systematischen Testung bedarf. Bei dieser sollte eine schrittweise Substitution der letzten Nukleotidpositionen am 3'-Ende der sgRNA vorgenommen und eine anschließende Evaluation der modifizierten sgRNAs durchgeführt werden. Selbiges sollte im Rahmen der Verkürzung einer sgRNA erfolgen, da nur durch systematisches schrittweises Herangehen die jeweils beste Modifikation einer sgRNA entdeckt werden kann. Darüber hinaus könnten alternative virtuell ermittelte sgRNAs erprobt werden, da für jede Zielsequenz meist eine Auswahl an potentiellen sgRNAs mit unterschiedlichen Parametern bezüglich PAM-Motiv und Nukleotidsequenz zu Verfügung steht.

7.2 Erörterung alternativer Optimierungsstrategien zur Spezifitätssteigerung von CRISPR/Cas9

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Versuche unternommen, diejenigen Parameter aufzudecken, die im direkten Zusammenhang mit der Sensitivität und Spezifität eines sgRNA-Cas9-Komplexes gegenüber einer bestimmten Zielsequenz stehen. Daraus resultierten mitunter überraschende Ergebnisse: So wurden einige DNA-Sequenzen als *off-target*-Sequenzen identifiziert, die trotz mehrfacher Basenabweichung zur Zielsequenz vom sgRNA-Cas9-Komplex erkannt und geschnitten wurden, während andere Genomabschnitte mit weniger Abweichungen nicht modifiziert wurden (Tsai et al., 2015). Gleichzeitig wurden in Abhängigkeit des Versuchsaufbaus und der untersuchten Zell- und Tierart Unterschiede in den Effizienz- und Spezifitätseigenschaften des sgRNA-Cas9-Komplexes deutlich (Chari et al., 2015;

Cong et al., 2013; Fu et al., 2013; Hsu et al., 2013; Wang et al., 2014). Diese Erkenntnisse lassen neben der individuellen Sequenzkomposition der zu modifizierenden DNA und der verwendeten sgRNA noch weitere Faktoren vermuten, die für den Editierungserfolg einer Genomsequenz mitverantwortlich sind. Nachforschungen weisen auf eine Bedeutung genetischer bzw. epigenetischer Faktoren sowie energetischer Eigenschaften des Enzymkomplexes hin. So ist beispielsweise in Abhängigkeit der Chromatinstruktur und Histonbindung eine bestimmte DNA mehr oder weniger für die verabreichten Editierungsreagenzien und Genomeditierung zugänglich (Horlbeck et al., 2016; Jensen et al., 2017; Wu et al., 2014). Andere Studien deuten auf die Relevanz energetischer Kräfte hin, die mit der Bildung, Konformationsänderung und Aktivierung des Enzymkomplexes assoziiert sind. Neben der komplementären Basenpaarung zwischen sgRNA und DNA-Sequenz spielen dabei auch die Schmelztemperatur, freie Energie und Sekundärstruktur der sgRNA wichtige Rollen (Fu et al., 2014; Liu et al., 2016; Szczelkun et al., 2014; Xut al., 2017; Zhang et al., 2019). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden verschiedenste Strategien zur Spezifitätssteigerung des CRISPR/Cas9-Systems erarbeitet. Grundsätzlich folgen all diese Strategien dem Prinzip, eine möglichst hohe Effizienz und Stabilität in der Zielsequenzbindung zu gewähren, während Bindungen zu Nicht-Zielsequenzen maximal reduziert und destabilisiert werden sollen.

Ein Ansatz liegt in der Aufteilung des sgRNA-Cas9-Komplexes in mehrere Bestandteile, um die Wahrscheinlichkeit für eine gleichzeitige Bindung aller Komponenten an *off-target*-Sequenzen zu reduzieren. Durch Inaktivierung einer der beiden katalytischen Domänen von Cas9 entstehen sogenannte Nickasen, die zur Induktion von Einzelstrangbrüchen fähig sind (Cong et al., 2013; Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012). Unter Einsatz zweier sgRNAs können dabei zwei Nickasen unabhängig voneinander zu einer gewünschten Zielsequenz navigiert werden und dort bei zeitgleicher Bindung einen Doppelstrangbruch induzieren (Mali et al., 2013; Ran et al., 2013; Trevino et al., 2014). In diesem Zusammenhang sind weitere Studien mit einem ähnlichen Ansatz zu erwähnen: Es erfolgte die vollständige katalytische Stilllegung der Cas9-Nuklease und Kopplung an eine FokI-Nuklease, die für eine katalytische Aktivität eine Dimerisierung mit einer zweiten FokI-Nuklease und die gleichzeitige Bindung zweier sgRNAs an die Ziel-DNA erfordert. (Guilinger et al., 2014; Tsai et al., 2014). Durch Erhöhung der erforderlichen Bindeereignisse konnte in diesen

Studien zwar erfolgreich die Rate an unerwünschten genomweiten Sequenzmodifikationen gesenkt werden, gleichzeitig wurden aber auch Einbußen in den Editierungseffizienzen der Zielsequenzen sichtbar. Darüber hinaus erhöht jeder zusätzliche Baustein den technischen Anspruch der Konstruktion und erschwert die Verabreichung der Reagenzien.

Eine weitere Strategie zur Steigerung der Spezifität und Reduktion von *off-target*-Ereignissen beruht auf einer Begrenzung der Interaktionsdauer zwischen Genom und sgRNA-Cas9-Komplex. Dahinter steht die Überlegung, dass nach vollständigem Substratverbrauch und abgeschlossener Modifikation der Ziel-DNA bei anhaltender Exposition des Genoms mit dem Enzymkomplex vermehrt Doppelstrangbrüche in *off-target-Sequenzen* ausgelöst werden. Eine naheliegende Lösung für diese Problematik liegt in einer reduzierten Verabreichungsmenge der zugeführten Reagenzien, die in der praktischen Anwendung jedoch häufig zu deutlichen Einbußen in den Effizienzergebnissen führt (Fu et al., 2013; Hsu et al., 2013). Daraufhin wurden Methoden entwickelt, die eine externe Aktivierung des Enzymkomplexes und Regulation der intrazellulär aktiven Enzymmenge erlauben. Diese Forschungsbemühungen resultierten unter anderem in modifizierten Cas9-Nukleasen, die durch Einfluss von Licht (Hemphill et al., 2015; Nihongaki et al., 2015) oder exogen zugeführten Molekülen (Davis et al., 2015) temporär aktiviert werden können. Andere Cas9-Varianten, bestehend aus einzelnen inaktiven Fragmenten, können zu einem gegebenen Zeitpunkt zur aktiven Nuklease zusammengesetzt werden (Wright et al., 2015; Zetsche et al., 2015). Eine weitere Möglichkeit, um das Aktivitätsfenster des Enzymkomplexes intrazellulär zu kontrollieren, stellt die Verabreichungsform der sgRNA und Nuklease in Form eines Ribonukleoproteinkomplexes (RNP-Komplex) dar. Im Vergleich zu anderen Darreichungsformen, wie Plasmiden oder viralen Vektoren, wird mithilfe eines RNP-Komplexes eine kürzere Expression der Konstrukte in den Zellen ermöglicht, wodurch seltener unerwünschte *off-target*-Ereignisse auftreten (Kim et al., 2014; Zuris et al., 2015). Obwohl die bisher genannten Methoden alle in einer deutlichen Spezifitätssteigerung des sgRNA-Cas9-Komplexes gegenüber einer bestimmten Zielsequenz resultieren, erreichen sie oftmals nicht das wildtypische Effizienzniveau und stellen keine zufriedenstellende Alternative zum ursprünglichen CRISPR/Cas9-System dar.

Als besonders vielsprechend erwiesen sich dagegen Ansätze, die auf Überlegungen zur Bindeaffinität eines Enzymkomplexes für eine bestimmte DNA-Sequenz beruhen. Studien zu strukturellen Eigenschaften von CRISPR/Cas9 identifizierten neben spezifischen Bindungen zwischen der Nuklease und DNA auch unspezifische Kontakte mit stabilisierender Wirkung (Nishimasu et al., 2014). Es wurde vermutet, dass die erforderliche Energie für eine stabile Bindung zwischen Zielsequenz und Enzymkomplex eine niedrigere ist, als tatsächlich durch den Enzymkomplex erzeugt wird (Fu et al., 2014). Weiterhin wurde die Hypothese aufgestellt, dass diese überschüssige Energie für die Toleranz von Basenabweichungen in Nicht-Zielsequenzen mitverantwortlich sei und dass die gezielte Inhibierung dieser unspezifischen Kontakte zur verbesserten Enzymspezifität beitragen könne (Kleinstiver, et al., 2016). Hierbei sollte die Zielsequenz bei aufrechterhaltener energetischer Stabilität aufgrund von komplementärer Basenpaarung weiterhin gebunden und geschnitten werden, während Bindungen von *off-target*-Sequenzen in Folge der elektrostatischen Destabilisierung minimiert werden sollen. Basierend auf diesen Überlegungen gelang es verschiedenen Forschergruppen, Cas9-Nukleasen mit intrinsisch verbesserten Spezifitätseigenschaften zu entwickeln (Casini et al., 2018; Chen et al., 2017; Kleinstiver et al., 2016; Slaymaker et al., 2016). Es folgten Studien zur Identifikation von Cas9-Varianten, die im Gegensatz zu den eben genannten Varianten auch bei Verabreichung im RNP-Komplex hohe Effizienz- und Spezifitätsergebnisse in der Genom-Editierung erzielen können (Lee et al., 2018; Vakulskas et al., 2018). Während die bisher beschriebenen Untersuchungen die Modifikation der Nuklease in den Vordergrund stellten, um eine Destabilisierung in der Bindung von *off-target*-Sequenzen herbeizuführen, erzielte eine andere Studie durch Veränderung der Sekundärstruktur der sgRNA Erfolge. In dieser Studie wird das Anfügen einer sogenannten Haarnadel-Formation an das 5'-Ende der sgRNA beschrieben, das in einer sterischen Behinderung der Nuklease resultierte (Kocak et al., 2019). Aufgrund ungünstiger elektrostatischer Verhältnisse bleibt auf diese Weise bei Bindung einer Nicht-Zielsequenz die Konformationsänderung der Nuklease aus. Einer anderen Gruppe gelang es durch chemische Modifikation der sgRNAs die Schmelztemperatur des RNA-DNA-Heteroduplex so zu verändern, dass Bindungen zu *off-target*-Sequenzen aufgrund thermodynamischer Instabilität erschwert wurden (Ryan et al., 2018).

Im Rahmen des Optimierungsprozesses des CRISPR/Cas9-Systems konnten bis zum heutigen Zeitpunkt die besten Spezifitätsergebnisse bei Wildtyp-ähnlichen Effizienzniveaus mithilfe von Ansätzen erzielt werden, die sich mit der Veränderung der Bindeenergie zwischen Enzymkomplex und DNA-Sequenz auseinandersetzen. Nennenswerte Maßnahmen sind hier insbesondere Verkürzungen der sgRNA, die im vorherigen Kapitel erörtert wurden, sowie die Entwicklung mutierter Cas9-Varianten mit reduzierten unspezifischen Kontakten zu DNA-Sequenzen. Durch sinnvolle Kombination verschiedener Strategien können bemerkenswerte Ergebnisse in der Genom-Editierung mittels CRISPR/Cas9 ermöglicht werden. Besonders vielversprechend für medizinische Anwendungen erscheint hierbei die Kombination aus Verkürzung und chemischer Modifikation einer sgRNA, Verwendung einer Cas9-Variante mit einer intrinsisch hohen Spezifität sowie die Einschränkung des Aktivitätsfensters des Enzymkomplexes, bspw. durch Verabreichung der Reagenzien in Form eines RNP-Komplexes (Vakulskas et al., 2018).

In jedem Fall geht einer erfolgreichen Anwendung dieser Strategien die sorgfältige Ermittlung und Auswahl einer geeigneten Zielsequenz und dazu passenden sgRNA voran. Hierfür widmeten sich großangelegte Studien der systematischen experimentellen Testung von sgRNAs und anschließenden Ermittlung genomweit stattgefundenener *off-target*-Ereignisse (Cho et al., 2014; Frock et al., 2015; Hsu et al., 2013; Kim et al., 2016; Tsai et al., 2015). Basierend auf diesen experimentellen Datenbanken und den zuvor geschilderten Hypothesen wurden verschiedenste Algorithmen und maschinelle Lernprozesse zur präzisen Vorhersage der Spezifitäts- und Effizienzeigenschaften einer sgRNA entwickelt (Chuai et al., 2018; Haeussler et al., 2016; Hsu et al., 2013; Labun et al., 2019). Diese Web-basierten Werkzeuge liefern unterschiedliche Ergebnisse für eine sgRNA in Abhängigkeit der gewünschten Anwendung, des zu modifizierenden Genoms und der gewählten Nuklease unter Berücksichtigung verschiedener PAM-Motive in Nähe zur Zielsequenz. Anschließend kann der Benutzer aus der Gegenüberstellung verschiedener sgRNAs die passende Wahl für sein Experiment treffen. Darüber hinaus gibt es mittlerweile einige Programme, die konkrete Aussagen zur erwarteten Sequenzmodifikation einer bestimmten Genomsequenz in Abhängigkeit der verwendeten sgRNA treffen können (Allen et al., 2019; Chen et al., 2019; Shen et al., 2018). Obwohl diese Werkzeuge viele potentielle *off-target*-Sequenzen einer sgRNA aufdecken können, spiegeln die

Vorhersagen dennoch nur annäherungsweise die experimentell zu erwartenden Ergebnisse wieder und sind nicht immer verlässlich, wie auch in dieser Arbeit deutlich wurde. Umso wichtiger ist im Anschluss eines jeden Experiments die Ermittlung der tatsächlich genomweit stattgefundenen Doppelstrangbrüche in *off-target*-Sequenzen. Hierfür stehen unterschiedliche Sequenziermethoden zur Verfügung (Kim et al., 2015; Tsai et al., 2017; Wienert et al., 2019; Yan et al., 2017), von denen sich insbesondere die *Guide-Seq*-Methode bewährt hat (Tsai et al., 2015).

7.3 Evaluation des Haplotyp-spezifischen Ansatzes mittels CRISPR/Cas9 und Vorstellung alternativer CRISPR-Systeme

Bis heute kennt man über 200 Mutationen im BEST1-Gen, die das Krankheitsbild des M. Best hervorrufen. Möchte man nun jede dieser Veränderungen zu therapeutischen Zwecken gesondert mittels CRISPR-Cas9 ausschalten, so wäre dies ein langwieriges und kostspieliges Unterfangen. Sinnvoller erscheint daher der hier vorgeschlagene Haplotyp-spezifische Ansatz, mithilfe dessen eine Mutations-unabhängige genomische Deletion des pathologischen BEST1-Gens erfolgen kann. Im Gegensatz zur erstgenannten Methode benötigt man für letztere lediglich ein überschaubares Set an spezifischen sgRNAs für heterozygote SNPs mit hohem Vorkommen in der Zielpopulation.

In der Patientenkohorte dieser Arbeit können prinzipiell 9 von 13 Patienten über diesen Ansatz „behandelt“ werden. Überträgt man diese Zahlen nun auf die europäische Gesamtbevölkerung erkrankter Patienten, so könnte man ca. 70% dieser Patientenpopulation erreichen. Dies gelingt mithilfe der 22 identifizierten SNPs mit einer Frequenz über 5% unter den Europäern. Davon wiederum genügt ungefähr bereits die Hälfte der SNPs, um die 30 häufigsten europäischen Haplotypen voneinander abzugrenzen. Grund hierfür ist, dass einige dieser SNPs häufig gekoppelt zusammen vererbt werden und aufgrund dieses Kopplungsungleichgewichts nur ein einziger SNP aus der jeweiligen Gruppierung der gemeinsam vererbten SNPs zur eindeutigen Charakterisierung der verschiedenen Haplotypen ausreicht. Dadurch sinkt die Anzahl der zu konstruierenden sgRNAs im Vergleich zur alternativen Strategie, die jede Mutation gesondert auszuschalten versucht, um ein Vielfaches.

Jedoch ist auch dieser Ansatz durch einige Faktoren limitiert. So muss unter anderem die Bestimmung der Haplotypen eines Patienten möglich sein. Dies könnte problematisch werden, wenn ein Patient eine Kombination aus zwei relativ seltenen Haplotypen aufweist, sodass keine Zuordnung zu den häufigen europäischen Haplotypen stattfinden kann. Die Identifikation der Haplotypen ist jedoch von elementarer Bedeutung für die individuelle Auswahl eines geeigneten SNP-Paares, das eine Differenzierung der beiden Haplotypen eines Patienten ermöglicht. Zudem muss die eindeutige Identifikation des Mutations-tragenden Haplotypen möglich sein. In dieser Arbeit erfolgte der Schritt durch Klonierung und Sequenzierung eines Fragments, das sowohl die Lokalisation der zu erwartenden Mutation als auch den dazu nächstgelegenen SNP enthielt. Der Mutations-assoziierte SNP gab daraufhin Aufschluss über die Phase der Mutation auf einem der beiden Haplotypen. Falls bei einem Patienten jedoch kein zur Mutation angrenzender SNP vorliegen würde, käme eine Bestimmung nach obigem Muster nicht in Frage. Alternativ gäbe es aber noch die Möglichkeit über die Sequenzierungsergebnisse der Eltern oder Kinder des Patienten Rückschlüsse auf den Mutations-tragenden Haplotypen des Patienten zu ziehen. Selbst bei erfolgreicher Haplotypen- und Mutationszuordnung ist dieser Ansatz dennoch nicht für alle Patienten geeignet. Dies wäre bei homozygoten Haplotypen der Fall, die keine Unterschiede in den SNPs aufwiesen und keine selektive Deletion eines der beiden Haplotypen erlaubten. Eine ähnliche Problematik bietet eine ungünstige Haplotypenkonstellation, bei der nur ein einziger SNP oder nur SNPs in geringer Entfernung zueinander zur Trennung der Haplotypen zur Verfügung stünden. Durch die fehlende Möglichkeit Exon-überspannende Doppelstrangbrüche zu generieren, könnte der gewünschte Effekt eines Gen-Knock-Outs verfehlt werden. Nicht zu vergessen als begrenzenden Faktor für diesen Ansatz, wäre zudem der Pathomechanismus der zugrundeliegenden Mutation. Eine solche Vorgehensweise erscheint nur dann besonders sinnvoll, wenn die Mutation in einem Funktionsgewinn resultiert oder sich dominant-negativ auf eine bestimmte Funktion auswirkt. Durch die Unterdrückung des pathologischen Transkripts erhofft man sich im weiteren Aufbau des pentamerischen BEST1-Kanals eine Rekonstitution der regelrechten Proteinfunktion. Selbst wenn auf diesem Wege die Proteintranskription hauptsächlich vom wildtypischen Allel erfolgte, muss eine Haploinsuffizienz toleriert werden, sodass funktionstüchtiges Protein in ausreichender physiologischer Menge entstehen kann.

Schlussfolgernd kann die Erkenntnis gezogen werden, dass der Haplotyp-spezifische Ansatz durchaus eine sinnvolle Strategie für das Ausschalten krankhafter Transkripte am Genort der Best'schen Makuladystrophie sein könnte. Die Tolerierung der resultierenden Haploinsuffizienz und die zu erwartende Wiederherstellung der BEST1-Kanalfunktion muss aber letztendlich in differenzierten RPE-Zellen aus CRISPR-behandelten Patienten-Stammzellen mit funktionellen Analysen in vitro bestätigt werden.

Weiterhin gilt es zu hinterfragen, ob das CRISPR-Cas-System eine geeignete Methode darstellt, um den obigen Ansatz im Sinne einer potentiellen Gentherapie auszuführen. Bei CRISPR handelt es sich um ein verhältnismäßig kürzlich entdecktes und genutztes Werkzeug in der Genomforschung. Trotz aller bisherigen Fortschritte und Erkenntnisse auf diesem Gebiet gibt es eine Vielzahl an Unwägbarkeiten für diese Methodik, die jedoch kontinuierlich entschlüsselt werden.

Neben der in dieser Arbeit verwendeten bewährten Nuklease des *Streptococcus Pyogenes* (spCas9), welche bisher überwiegend zu Forschungszwecken eingesetzt wurde, gewinnen allmählich auch alternative bakterielle Systeme an Bedeutung (Abudayyeh et al., 2017; Harrington et al., 2018; Hou et al., 2013; Z. Hu et al., 2020; Kim et al., 2017; Müller et al., 2016; Ran et al., 2015; Strecker et al., 2019; Zetsche, Gootenberg, et al., 2015). Die Nukleasen der natürlich vorkommenden Bakterien variieren u.a. in ihrer Größe, der PAM-Voraussetzung und der präferierten Nukleotidkomposition der Zielsequenz. Die Verwendung alternativer Nukleasen ermöglicht es, neue potentielle Zielsequenzen und Anwendungen von CRISPR zu erschließen. Die geringe Nukleasengröße des *Staphylococcus Aureus* (saCas9) erlaubt beispielsweise eine vereinfachte therapeutische Applikation in vivo mithilfe der häufig verwendeten Adeno-assoziierten Viren (AAV) (Ran et al., 2015). Aufgrund der hohen Relevanz von AAV für gentherapeutische Anwendungen werden gegenwärtig auch Varianten für saCas9 mit verbesserten Spezifitätseigenschaften erarbeitet (Tan et al., 2019). Weitere Vorteile gegenüber spCas9 bietet zum Beispiel auch die Nuklease Cas12a (Cpf1) aufgrund einer intrinsisch höheren Spezifität gegenüber ihren Zielsequenzen und der Bevorzugung AT-reicher Sequenzstrukturen (Kim et al., 2016). Darüber hinaus werden Modifikationen für die häufig verwendeten Nukleasen spCas9, saCas9 und Cas12a beschrieben, die eine Kompatibilität der Nukleasen mit anderen PAM-Motiven und eine Anwendungsausweitung auf neue potentielle Zielsequenzen

ermöglichen (Gao et al., 2017; Hu et al., 2018; Kleinstiver et al., 2015; Nishimasu, 2018).

In den letzten Jahren erfolgte eine stetige Weiterentwicklung des CRISPR-Cas-Systems. Neben verbesserten Spezifitäts- und Effizienzeigenschaften sowie neuen potentiellen Zielsequenzen gewann CRISPR im Vergleich zur Ursprungsform auch an neuen Funktionen dazu. Seit langer Zeit gilt das Generieren von Gen-Knock-Outs als eine häufige Anwendung von CRISPR. Nach Induktion von Doppelstrangbrüchen in der Ziel-DNA führt in der Regel anschließend der fehlerhafte Reparaturmechanismus des NHEJ durch Baseninsertionen oder -deletionen (Indels) zum vorzeitigen Stopp der Proteinsynthese. Dieser Ansatz könnte grundsätzlich eine geeignete Therapieoption für Erbkrankheiten darstellen, die durch Genmutationen mit einem dominant-negativen Effekt auf die regelrechte Proteinfunktion oder pathologischen Funktionsgewinn verursacht werden. Induzierte DNA-Doppelstrangbrüche bergen jedoch auch die Gefahr, große Insertionen, Deletionen und Translokationen mit pathologischem Potential in der Ziel-Zelle zu verursachen, ohne dass eine Abschaltung des Gens vermittelt wird (Kosicki et al., 2018; Shin et al., 2017; Zhang et al., 2015). Des Weiteren wurde eine intrazelluläre Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 bei Verwendung von CRISPR/Cas9 beobachtet. Eine intakte intrazelluläre p53-vermittelte DNA-Schadensantwort führt nach gentechnischer Modifizierung der Zellen häufig zum Zyklusarrest oder zur Zellapoptose (Haapaniemi et al., 2018; Ihry et al., 2018). Aufgrund des Selektionsvorteils modifizierter Zellen mit einer gestörten DNA-Schadensantwort gegenüber Zellen mit einer intakten p53-Funktion, ist somit große Vorsicht bei der Verwendung von CRISPR/Cas9-veränderten Zellen für gentherapeutische Zwecke geboten.

Aus den genannten Gründen wurde in den letzten Jahren viel Mühe in die Entwicklung alternativer gentechnischer Verfahren investiert, die eine direkte und präzise Korrektur pathologischer Sequenzmutationen unter Umgehung des NHEJ-Reparaturmechanismus ermöglichen. Ein zusätzlicher Vorteil der präzisen Genmodifizierung liegt in dem erweiterten Behandlungsspektrum genetischer Erkrankungen, da auch diejenigen Erbkrankheiten durch eine gezielte Nukleotidveränderung potentiell behandelt werden könnten, die auf einem *loss-of-function* Mechanismus beruhen.

Ein Forschungsschwerpunkt lag auf der Entwicklung von Strategien, die eine effiziente Reparatur von Doppelstrangbrüchen über den HDR-Mechanismus fördern. Es konnten partielle Erfolge auf diesem Gebiet erzielt werden, indem u.a. der NHEJ-Reparaturweg inhibiert wurde (Chu et al., 2015; Maruyama et al., 2015), das Design der HDR-Vorlage verbessert wurde (Richardson et al., 2016) oder blockierende Signale in die HDR-Vorlage eingefügt wurden, die nach bereits erfolgter HDR-Reparatur ein wiederholtes Schneiden durch die Nuklease verhindern sollten (Paquet et al., 2016). Obwohl für einige mitotisch aktive Zellarten auf diese Weise zufriedenstellende Effizienzniveaus in der Genom-Editierung erreicht werden konnten, ließen sich diese Ergebnisse oftmals nicht auf andere Zellarten, wie das postmitotische RPE, übertragen.

Parallel wurde auch nach Alternativen gesucht, die eine effiziente und präzise Genom-Editierung unter Umgehung von Doppelstrangbrüchen und externen Reparaturvorlagen ermöglichen. Ein erster Durchbruch gelang mit der Entwicklung von *base editing*: Bei dieser Technologie handelt es sich um Cas9-Nickasen, die an Deaminasen gekoppelt sind und zur direkten Basenkonversion von Cytosin nach Thymin und Adenin nach Guanin in der Ziel-DNA fähig sind (Komor et al., 2016; Gaudelli et al., 2017; Nishida et al., 2016). Neben der gezielten Veränderung einzelner Nukleotide und Mutationen ermöglicht diese Technologie außerdem das Generieren von Stopp-Codons in DNA-Sequenzen, die konsekutiv zum Gen-Knock-Out führen können (Billon et al., 2017; Kuscu et al., 2017). Im Vergleich zur bisherigen Methode Knock-Outs zu erzeugen, stellt diese Variante aufgrund der selteneren Bildung von Indels einen weniger riskanten Ansatz dar. Limitierend für die Benutzung von *base editing* ist allerdings u.a. die fehlende Möglichkeit jeder beliebigen Basenkonversion sowie die ungenaue Differenzierung zwischen verschiedenen Cytosinen und Adeninen innerhalb der Editierungssequenz. Weitere Nachteile leiten sich von der Benutzung der Cas9-Nuklease ab: Es besteht weiterhin die Notwendigkeit eines angrenzenden PAM-Motivs und das Risiko für genomweite Modifikationen von Nicht-Zielsequenzen. Zusätzlich werden auch sgRNA-unabhängige *off-target*-Ereignisse geschildert, die den Deaminasen zugeschrieben werden. Analog zu CRISPR-Cas9 konnte aber auch *base editing* durch verschiedenste Modifikationen in seiner Spezifitätseigenschaft gesteigert werden (Cheng et al., 2019; Gehrke et al., 2018; Jiang et al., 2018; Kim et al., 2017; Komor et al., 2017; Tan et al., 2019; Thuronyi et al., 2019). Zusätzlich lässt sich der Anwendungsbereich von *base editing* unter Verwendung alternativer

Nukleasen und modifizierter Cas9-Varianten weiter ausdehnen (Endo et al., 2019; Hu et al., 2018; Li et al., 2018; Rees et al., 2017).

Erst kürzlich gelang mit der Entwicklung von *prime editing* ein weiterer Durchbruch auf dem Gebiet der präzisen Genmodifizierung (Anzalone et al., 2019). Diese Methode macht sich eine katalytisch inaktive Cas9-Nuklease zu Nutze, die mit einer reversen Transkriptase fusioniert ist und RNA-gesteuert (pegRNA) zu einer bestimmten Zielsequenz navigiert werden kann. Im Vergleich zu *base editing* können alle 12 Basenkonversionen vorgenommen werden und mithilfe einer integrierten Sequenzvorlage in der pegRNA gezielte Nukleotidinsertionen und -deletionen am Zielort durchgeführt werden. Diese Technik umgeht ebenfalls die Induktion von Doppelstrangbrüchen, zeigt höhere Reparatureffizienzen als der HDR-Mechanismus bei gleichzeitig geringerer Bildung von Indels und erzeugt weniger genomweite off-target-Ereignisse im Vergleich zu WT-Cas9. Aufgrund der kürzlichen Entwicklung von *prime editing* fehlen bislang jedoch weitere Studien, die die Wirksamkeit in verschiedenen Zellarten und Tiermodellen belegen.

Diese Weiterentwicklungen erlauben erstmals eine effiziente und präzise Genmodifikation durch gezielte Veränderung einzelner Nukleotide unter Verwendung des CRISPR-Cas-Systems. *Base editing* und *prime editing* haben das Potential, auf direktem Wege pathologische Punktmutationen im Genom zu beseitigen und durch Erzeugen von Stopp-Codons einen vorzeitigen Translationsstopp krankhafter Gene herbeizuführen. Zahlreiche Untersuchungen belegen eine grundsätzliche Machbarkeit solcher Ansätze unter experimentellen Bedingungen und lassen auf eine zukünftige gentherapeutische Anwendung bei erkrankten Patienten hoffen (Liu et al., 2018; Ryu et al., 2018). Bevor diese neuartigen Technologien jedoch in therapeutischer Intention zugelassen werden können, muss vorerst eine weitere Evaluation in klinischen Studien erfolgen. Das Einführen von Stopp-Codons durch direkte Basenkonversion könnte jedoch auch eine sinnvolle Alternative für die Erzeugung eines Haplotyp-spezifischen Knock-Outs in dieser Arbeit darstellen. Nichtsdestotrotz gilt CRISPR-Cas9 bis zum heutigen Zeitpunkt aufgrund der zahlreichen Optimierungsmöglichkeiten und hohen Erfahrungswerte in der Anwendung weiterhin als beliebtes und effizientes Werkzeug in der Erzeugung von Gen-Knock-Outs.

Eine der großen Herausforderungen von CRISPR liegt jedoch weiterhin in der Erkennung und Reduktion potentieller genomweiter *off-targets*. Es haben sich zwar diverse Vorhersageprogramme als äußerst hilfreich hierfür erwiesen, dennoch

verdeutlichen die Ergebnisse der hier durchgeführten Experimente, dass die virtuell getroffenen Berechnungen oftmals nicht der Realität entsprechen und somit auch *off-targets* nicht mit zufriedenstellender Sicherheit vorhergesagt werden können. Aus diesem Grund muss bei Anwendung von CRISPR trotz Benutzung von vermeintlich optimierten sgRNAs oder spezifischeren Cas-Nukleasen das gesamte Genom der Zielzelle zur Feststellung aller induzierten Doppelstrangbrüche untersucht werden, bevor die Konstrukte die nächste Etappe einer klinischen Studie beschreiten könnten.

Abgesehen von den bereits genannten Schwachstellen des CRISPR/Cas-Systems, bleibt weiterhin die Frage der effizienten Übermittlung der Konstrukte an den Patienten im Sinne einer gentherapeutischen Anwendung. Prinzipiell existieren hierfür zwei Möglichkeiten: eine Genmodifikation *ex vivo* oder *in vivo* (Yanik et al., 2017). Sollte die Übermittlung der Konstrukte auf einem der beiden Wege erfolgreich stattfinden können, so gelinge ein permanenter Eingriff in die DNA mit dauerhafter Beseitigung des Pathologieherdes.

Die Methode *ex vivo* verfolgt die Idee, Zellen genetisch erkrankter Patienten zu entnehmen, diese in pluripotente Stammzellen zu überführen und anschließend gentechnisch so zu modifizieren, sodass sie anstelle des mutierten Gens das wildtypische exprimieren (Hoban et al., 2016). Im nächsten Schritt können die veränderten hiPSC zu Gewebszellen ausdifferenziert und dem Patienten reimplantiert werden. Der Vorteil der *ex vivo*-Methodik ergibt sich aus der Möglichkeit, die erfolgreich modifizierten Zellen im Vorfeld auf ihre Eigenschaften hin zu untersuchen und gezielt für die Implantation auszuwählen. Gleichzeitig ist diese Methodik jedoch im Vergleich zur *in vivo*-Technik aufgrund der vielen notwendigen Einzelschritte, wie der Zellentnahme, der anschließenden Zellmodifikation, -selektion und Zelltransplantation deutlich aufwändiger. Gegenwärtig werden derartige Ansätze zur *ex vivo*-Gentherapie insbesondere an hämatologischen und onkologischen Krankheitsbildern mit einem genetischen Hintergrund klinisch getestet. So wird beispielsweise ein möglicher therapeutischer Nutzen von CRISPR/Cas modifizierten hiPSC in der Behandlung von β -Hämoglobinopathien, wie der Sichelzellanämie und β -Thalassämie, evaluiert (s. Clinicaltrials.gov: NCT03745287 und NCT03655678). Ersten Auswertungen nach zufolge, befindet sich eine Patientin mit β -Thalassämie seit Studienteilnahme bereits in Remission, was grundsätzlich für eine erfolgreiche Übermittlung der Konstrukte und therapeutische Wirksamkeit zu sprechen scheint.

Eine *ex vivo* Gentherapie nach dem beschriebenen Muster wäre auch für eine Anwendung am Auge denkbar, indem aus Hautproben der Patienten Fibroblasten gewonnen werden, diese zu pluripotenten Stammzellen reprogrammiert und anschließend genetisch modifiziert werden. Nach einer Ausdifferenzierung der hiPSC zu RPE-Zellen könnten diese anschließend in das Patientenauge implantiert werden. Die alternative *in vivo*-Strategie liegt hingegen in der direkten Behandlung der pathologischen Zellen *in situ*. Hierbei sollen die benötigten Konstrukte über Transportvehikel, wie beispielsweise durch AAV oder Nanopartikel, an den Zielort gebracht werden. Die größte Problematik ergibt sich in diesem Fall dadurch, dass der Effekt der Genveränderung auf die Zielzellen nicht unmittelbar untersucht werden und keine Zellselektion erfolgen kann. Somit ist bei letzterer Strategie eine genaue Kenntnis über das Wirkungsprofil der gentechnischen Maßnahmen unabdingbar, da andernfalls schwerwiegende Nebenwirkungen auftreten könnten. Von diesem Wissensstand ist man heutzutage jedoch noch weit entfernt. Dennoch wurden bereits bemerkenswerte Erfolge in der *in vivo*-Gentherapie am Mausmodell, unter anderem anhand des Krankheitsbildes der Duchenne Muskeldystrophie, erzielt (Nelson et al., 2016). Diese Studie zeigt, wie durch einen AAV-gekoppelten Transfer von CRISPR-Cas9 die pathologische Mutation in bedeutendem Maße gesenkt und auf diese Weise die Muskelfunktion verbessert werden konnte. Dabei traten kaum unerwünschte genomweite *off-target*-Ereignisse auf. Eine weitere erfolgreiche gentherapeutische Anwendung *in vivo* erfolgte durch die Übermittlung von CRISPR/Cas9 als RNP-Komplex, die in einer Reduktion pathologischer Transkripte resultierte und eine partielle Wiederherstellung des Hörvermögens der Mäuse ermöglichte (Gao et al., 2018). Nennenswert in diesem Zusammenhang ist auch eine Studie am Mausmodell zur gentherapeutischen *in vivo*-Behandlung von Chorea Huntington (Ekman et al., 2019). Auch dieser Forschergruppe gelang die erfolgreiche Übermittlung einer Mutations-spezifischen sgRNA gemeinsam mit einer Nuklease des *Staphylococcus Aureus* mithilfe von AAV-Vektoren. Durch eine effiziente Induktion von Doppelstrangbrüchen im mutierten Huntington Gen konnte eine Besserung der motorischen Defizite sowie eine höhere Lebenserwartung der Mäuse erreicht werden. All diese Studien konnten mithilfe einer *in vivo*-Applikation der Konstrukte eine deutliche Reduktion des pathologischen Transkripts sowie eine teilweise Wiederherstellung der regelrechten Proteinfunktion am Mausmodell bewerkstelligen. In einem nächsten Schritt gilt es nun, die Machbarkeit solcher Ansätze auch für

menschliche Anwendungen zu belegen. Eine klinische Studie zur Testung einer Gentherapie *in vivo* erfolgt gegenwärtig am Erkrankungsbild der Leber'schen kongenitalen Amaurose (Maeder et al., 2019). Hierbei wird die subretinale Injektion eines Wirkstoffs, bestehend aus einer Nuklease des *Staphylococcus Aureus* und zwei sgRNAs, gekoppelt an einen AAV-Vektor, hinsichtlich Sicherheit, Verträglichkeit und Wirksamkeit am Patienten getestet (s. ClinicalTrials.gov: NCT03872479). Trotz aller bisherigen Fortschritte ist jedoch unabhängig der Verabreichungsform der Konstrukte, entweder über die direkte Applikation der Konstrukte *in vivo* oder die Verabreichung zuvor *in vitro*-modifizierter Zellen, eine mögliche Abstoßungsreaktion des Patienten in Form der körpereigenen Immunabwehr nicht auszuschließen und sollte daher ebenfalls näher in klinischen Studien untersucht werden.

All diese Punkte führen zusammenfassend zu der Erkenntnis, dass es sich beim CRISPR-Cas-System um eine vielversprechende Methode handelt mit dem Potential, neuartige Therapieoptionen genetischer Erkrankungen zu eröffnen. Trotz zahlreicher Forschungsbemühungen bleiben bis heute dennoch einige wichtige Fragestellungen unzureichend geklärt. Gleichzeitig ist diese Thematik aktuell wichtiger Gegenstand der Forschung und neue Erkenntnisse werden in fortschreitendem Tempo erlangt. Die stetige Weiterentwicklung von CRISPR hat bereits viele nützliche Neuerungen, wie spezifischere Nukleasen oder zusätzliche Editierungsfunktionen, hervorgebracht und trägt kontinuierlich zur Ausweitung der Anwendungsbereiche bei. Darüber hinaus wurden bereits erste Erfolge in gentherapeutischen Anwendungen mittels CRISPR/Cas, insbesondere in Tiermodellen oder klinischen Studien zu *ex vivo*-Gentherapien, erzielt. Dies lässt die Hoffnung entstehen, dass zukünftig weitere Durchbrüche in der Gentherapie und somit auch in der Behandlung monogener Erbkrankheiten mittels CRISPR zu erwarten sind.

7.4 Weiterführende Aspekte dieser Arbeit

Abschließend gilt es noch die weiteren Perspektiven dieser Arbeit zu erläutern. Alle bisherigen Ergebnisse basieren auf den Transfektionen von HEK293T-Zellen in der Zellkultur. Bekanntermaßen hat sich die Zellkultur als geeignetes Modell für die Analyse von zellulären Mechanismen und Auswirkungen bestimmter Genmodifikationen erwiesen. Dennoch bleibt die Frage, ob das *in vitro*

herangezöchtete Gewebe dem Zustand lebendiger Zellen *in situ* gerecht wird oder ob gravierende Unterschiede im Verhalten dieser beiden Zellpopulationen vorliegen. Zudem ist unklar, wie sich die in den HEK-Zellen getesteten Konstrukte in anderen Zellarten, wie dem RPE, verhalten würden. Das Ausmaß der induzierten Doppelstrangbröche hängt schließlich neben der Effizienz der Konstrukte auch erheblich von der Zellart ab. Auch die zellulären Reparaturmechanismen variieren stark innerhalb verschiedener Zellarten, u.a. in Abhängigkeit von Gewebe und Stadium der Zellteilung (Yanik et al., 2017). So ist beispielweise verhältnismäßig wenig über die Reparatur von Doppelstrangbröchen im postmitotischen RPE bekannt. Generell ist postmitotisches Gewebe bezogen auf die Reparaturmechanismen jedoch als eher reaktionsträge einzustufen, da DNA-Korrekturen vor allem während der aktiven Zellteilung vorgenommen werden (Yanik et al., 2017). Diese Tatsache erschwert demnach die erfolgreiche Anwendung von gentherapeutischen Maßnahmen, die auf diesen zellulären Reparaturmechanismen beruhen. Somit erscheint der weiterführende Schritt im Anschluss dieser Arbeit als sinnvoll, die bereits getesteten und optimierten Konstrukte weiter an hiPSC der Patientenkohorte zu erproben. Längerfristig sollten diese modifizierten Zellen zu RPE differenziert und näher charakterisiert werden.

Im Laufe dieser Arbeit wurden 22 SNPs als geeignet identifiziert, mithilfe derer eine Haplotyp-spezifische Deletion einzuföhren ist. Aufgrund des zeitlich begrenzten Rahmens erfolgte jedoch lediglich die Austestung und Optimierung der sgRNAs für drei dieser SNPs. Dieses Set an sgRNA bietet allerdings noch keine ausreichende Möglichkeit, um alle denkbaren Haplotypkombinationen eines Patienten voneinander abzugrenzen. Für diesen Zweck müssten zusätzliche SNPs in Betracht gezogen und weitere SNP-spezifische sgRNAs erprobt und optimiert werden. Weiterhin ist von Interesse, inwieweit der Haplotyp-spezifische Ansatz in der Praxis durchführbar wäre. Bisher wurden lediglich die Effizienzen und Spezifitäten der sgRNAs gegenüber einzelnen SNPs überprüft. Als nächstes sollten nun geeignete SNP-Paare für die gezielte Induktion Exon-überspannender Doppelstrangbröche ausgewählt werden und anschließend das Ausmaß der erfolgten Haplotypdeletion in Patienten-Zelllinien evaluiert werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen wäre es ebenfalls von Belang, eine genomweite Analyse aller stattgefundenen Doppelstrangbröche durchzuföhren, um eventuelle *off-target*-Sequenzen der sgRNAs zu identifizieren.

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Adenin
AAV	Adeno-assoziierte Viren
A.d.	Aqua destillata
ADVIRC	autosomal dominante Vitreoretinochoroidopathie
ARB	autosomal rezessive Bestrophinopathie
ASOs	Antisense Oligonucleotides
AVMD	adulte vitelliforme Makuladystrophie
BEST1	Bestrophin-1
Bp	Basenpaare
BVMD	juvenile Best'sche vitelliforme Makuladystrophie
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
cDNA	komplementäre DNA
Cl ⁻	Chlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C-PCR	Colony-PCR
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbeccos's Modified Eagle Medium
dNTP	Nukleosidtriphosphate
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EOG	Elektrookulogramm
et al.	et aliter
FCS	Fetal Calf Serum
g	Gramm

G	Guanin
GRCh37	Genome Reference Consortium Human Build 37
h	Stunde
HDR	Homology-Directed Repair
HEK	Human Embryonic Kidney
hiPSC	humane induzierte pluripotente Stammzellen
Indel	Insertionen und Deletionen
Kb	Kilobasen
l	Liter
LB	Liquid broth
m	mili
M. Best	Morbus Best
M	Molar (mol/l)
min	Minute
n	nano
NHEJ	Non-Homologous End Joining
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PCR	Polymerasekettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphat Buffered Saline
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RPE	retinales Pigmentepithel
saCas9	Cas-Nuklease des Staphylococcus Aureus
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOC	super optimal broth with catabolite repression
spCas9	Cas-Nuklease des Streptococcus Pyogenes
sgRNA	single-guide RNA
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris Borat EDTA
u.a.	unter anderem
V	Volt
WT	Wildtyp

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: homo-pentamere Struktur des Bestrophin-1	3
Abbildung 2: Stadieneinteilung der Best'schen Vitelliformen Makuladystrophie	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung des sgRNA-Cas9-Komplexes an der Ziel-DNA	9
Abbildung 4: Zelluläre Reparaturmechanismen eines DNA-Doppelstrangbruchs	12
Abbildung 5: 69 SNPs der europäischen Bevölkerung >5%-Frequenz im BEST1-Genlocus und daraus resultierende Haplotypen	37
Abbildung 6: Analytierte BEST1-Genregion und Lokalisation der finalen SNP-Auswahl	39
Abbildung 7: Selektionsprozess geeigneter SNPs im BEST1-Genlocus	42
Abbildung 8: exemplarische Auswahl einer sgRNA am Beispiel des SNP 581G (rs195161)	46
Abbildung 9: europäische Haplotypenverteilung und -frequenz auf Basis von 22 SNPs im BEST1-Locus	47
Abbildung 10: Haplotypenverteilung und Mutationslokalisationen innerhalb der Patientenkohorte	48
Abbildung 11: Transfektionsergebnisse unter Verwendung der bioinformatisch ermittelten sgRNAs	53
Abbildung 12: Effizienz und Spezifität der modifizierten sgRNA_581G	56
Abbildung 13: Effizienz und Spezifität der modifizierten sgRNA_756T	57
Abbildung 14: Effizienz und Spezifität der modifizierten sgRNA_756C	58
Abbildung 15: Effizienz und Spezifität der modifizierten sgRNA_749A	60
Abbildung 16: Transfektionsergebnis nach Optimierung der sgRNAs	61

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Bakterienstämme	15
Tabelle 2: verwendete Zelllinie	15
Tabelle 3: verwendete Vektoren	15
Tabelle 4: durch Klonierung hergestellte Zielkonstrukte	16
Tabelle 5: als sgRNA verwendete Oligonukleotide	16
Tabelle 6: für PCR und Sequenzierung verwendete Oligonukleotide	18
Tabelle 7: verwendete Enzyme	19
Tabelle 8: verwendete Reaktionssysteme	19
Tabelle 9: verwendeter Molekularmassenstandard	20
Tabelle 10: verwendete Chemikalien	20
Tabelle 11: verwendete Puffer und Medien	21
Tabelle 12: verwendete Geräte	22
Tabelle 13: verwendete Software	23
Tabelle 14: PCR-Ansatz < 2kb	26
Tabelle 15: PCR-Ansatz > 2kb	26
Tabelle 16: PCR-Einstellung des Thermocyclers	27
Tabelle 17: Herstellung eines 1%-Agarosegels	27
Tabelle 18: Ligationsansatz für pGem®-T	28
Tabelle 19: Colony-PCR-Ansatz	29
Tabelle 20: Cycle Sequencing Reaktion	30
Tabelle 21: Sequenzierereinstellung am Thermocycler	30
Tabelle 22: Ansatz für Restriktionsverdau	31
Tabelle 23: Ansatz Zielvektorverdau	32
Tabelle 24: Ligationsansatz für Zielsequenz in Zielvektor	32
Tabelle 25: Verdau des BB-PX459-Expressionsvektors	32
Tabelle 26: Phosphorylierung und Annealing der Oligonukleotide	33
Tabelle 27: Ligation von sgRNA und BB-PX459-Vektor	33
Tabelle 28: Transfektionsansatz der Kalziumphosphat-Methode	35
Tabelle 29: Übersicht der 69 häufigsten (>5%) europäischen SNPs im BEST1-Lokus und Darstellung ausgewählter Merkmale	43
Tabelle 30: Patientenangaben zur experimentellen Phasenbestimmung	51
Tabelle 31: Ergebnis der Phasenbestimmung	51

11 Literaturverzeichnis

- Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Essletzbichler, P., Han, S., Joungh, J., Belanto, J. J., ... Zhang, F. (2017). RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 550(7675), 280–284. <https://doi.org/10.1038/nature24049>
- Alexis C. Komor, Yongjoo B. Kim, Michael S. Packer, John A. Zuris, and D. R. L. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, (1). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.05.044.HTR7>
- Allen, F., Crepaldi, L., Alsinet, C., Strong, A. J., Kleshchevnikov, V., De Angeli, P., ... Parts, L. (2019). Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. *Nature Biotechnology*, 37(1), 64–82. <https://doi.org/10.1038/nbt.4317>
- Anzalone, A. V., Randolph, P. B., Davis, J. R., Sousa, A. A., Koblan, L. W., Levy, J. M., ... Liu, D. R. (2019). Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576(7785), 149–157. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- Auton, A., Abecasis, G. R., Altshuler, D. M., Durbin, R. M., Abecasis, G. R., Bentley, D. R., ... Abecasis, G. R. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526(7571), 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>
- Bainbridge, J. W. B., Smith, A. J., Barker, S. S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., ... Ali, R. R. (2008). Effect of Gene Therapy on Visual Function in Leber's Congenital Amaurosis. *New England Journal of Medicine*, 358(21), 2231–2239. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802268>
- Bassuk, A. G., Zheng, A., Li, Y., Tsang, S. H., & Mahajan, V. B. (2016). Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. *Scientific Reports*, 6(1), 19969. <https://doi.org/10.1038/srep19969>
- Best, F. (1905). II. Über eine hereditäre maculaaffektion. *Ophthalmologica*, 13(3), 199–212. <https://doi.org/10.1159/000290318>
- Billon, P., Bryant, E. E., Joseph, S. A., Nambiar, T. S., Hayward, S. B., Rothstein, R., & Ciccio, A. (2017). CRISPR-Mediated Base Editing Enables Efficient Disruption of Eukaryotic Genes through Induction of STOP Codons. *Molecular Cell*, 67(6), 1068-1079.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.008>
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., & Dusko Ehrlich, S. (2005). Clustered regularly

- interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151(8), 2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>
- Brandl, C., Zimmermann, S. J., Milenkovic, V. M., Rosendahl, S. M. G., Grassmann, F., Milenkovic, A., ... Weber, B. H. F. (2014). In-depth characterisation of retinal pigment epithelium (RPE) cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC). *NeuroMolecular Medicine*, 16(3), 551–564. <https://doi.org/10.1007/s12017-014-8308-8>
- Buchholz, D. E., Pennington, B. O., Croze, R. H., Hinman, C. R., Coffey, P. J., & Clegg, D. O. (2013). Rapid and Efficient Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Retinal Pigmented Epithelium. *STEM CELLS Translational Medicine*, 2(5), 384–393. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0163>
- Burgess, R., Millar, I. D., Leroy, B. P., Urquhart, J. E., Fearon, I. M., De Baere, E., ... Black, G. C. M. (2008). Biallelic Mutation of BEST1 Causes a Distinct Retinopathy in Humans. *American Journal of Human Genetics*, 82(1), 19–31. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.08.004>
- Carroll, J. B., Warby, S. C., Southwell, A. L., Doty, C. N., Greenlee, S., Skotte, N., ... Hayden, M. R. (2011). Potent and Selective Antisense Oligonucleotides Targeting Single-Nucleotide Polymorphisms in the Huntington Disease Gene / Allele-Specific Silencing of Mutant Huntingtin. *Molecular Therapy*, 19(12), 2178–2185. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.201>
- Casini, A., Olivieri, M., Petris, G., Montagna, C., Reginato, G., Maule, G., ... Cereseto, A. (2018). A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast. *Nature Biotechnology*, 36(3), 265–271. <https://doi.org/10.1038/nbt.4066>
- Chari, R., Mali, P., Moosburner, M., & Church, G. M. (2015). Unraveling CRISPR-Cas9 genome engineering parameters via a library-on-library approach. *Nature Methods*, 12(9), 823–826. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3473>
- Chen, J. S., Dagdas, Y. S., Kleinstiver, B. P., Welch, M. M., Sousa, A. A., Harrington, L. B., ... Doudna, J. A. (2017). Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy. *Nature*, 550(7676), 407–410. <https://doi.org/10.1038/nature24268>
- Chen, W., McKenna, A., Schreiber, J., Haeussler, M., Yin, Y., Agarwal, V., ... Shendure, J. (2019). Massively parallel profiling and predictive modeling of the outcomes of CRISPR/Cas9-mediated double-strand break repair. *Nucleic Acids*

- Research*, 47(15), 7989–8003. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz487>
- Cheng, T. L., Li, S., Yuan, B., Wang, X., Zhou, W., & Qiu, Z. (2019). Expanding C–T base editing toolkit with diversified cytidine deaminases. *Nature Communications*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11562-6>
- Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S., & Kim, J. S. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Research*, 24(1), 132–141. <https://doi.org/10.1101/gr.162339.113>
- Chu, V. T., Weber, T., Wefers, B., Wurst, W., Sander, S., Rajewsky, K., & Kühn, R. (2015). Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 33(5), 543–548. <https://doi.org/10.1038/nbt.3198>
- Chuai, G., Ma, H., Yan, J., Chen, M., Hong, N., Xue, D., ... Liu, Q. (2018). DeepCRISPR: Optimized CRISPR guide RNA design by deep learning. *Genome Biology*, 19(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1459-4>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Hsu, P. D., ... Marraffini, L. A. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Courtney, D. G., Moore, J. E., Atkinson, S. D., Maurizi, E., Allen, E. H. A., Pedrioli, D. M. L., ... Moore, C. B. T. (2016). CRISPR/Cas9 DNA cleavage at SNP-derived PAM enables both in vitro and in vivo KRT12 mutation-specific targeting. *Gene Therapy*, 23(1), 108–112. <https://doi.org/10.1038/gt.2015.82>
- Cross, H. E., & Bard, L. (1974). Electro-oculography in Best's macular dystrophy. *American Journal of Ophthalmology*, 77(1), 46–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4824173>
- Davis, K. M., Pattanayak, V., Thompson, D. B., Zuris, J. A., & Liu, D. R. (2015). Small molecule-triggered Cas9 protein with improved genome-editing specificity. *Nature Chemical Biology*, 11(5), 316–318. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1793>
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., ... Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471(7340), 602–607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>
- Doench, J. G., Hartenian, E., Graham, D. B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., ... Root, D. E. (2014). Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated

- gene inactivation. *Nature Biotechnology*, 32(12), 1262–1267. <https://doi.org/10.1038/nbt.3026>
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213), 1258096–1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Du, H., Lim, S. L., Grob, S., & Zhang, K. (2011). Induced pluripotent stem cell therapies for geographic atrophy of age-related macular degeneration. *Seminars in Ophthalmology*, 26(3), 216–224. <https://doi.org/10.3109/08820538.2011.577498>
- Durbin, R. M., Altshuler, D. L., Durbin, R. M., Abecasis, G. R., Bentley, D. R., Chakravarti, A., ... McVean, G. A. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467(7319), 1061–1073. <https://doi.org/10.1038/nature09534>
- Ekman, F. K., Ojala, D. S., Adil, M. M., Lopez, P. A., Schaffer, D. V., & Gaj, T. (2019). CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing Increases Lifespan and Improves Motor Deficits in a Huntington's Disease Mouse Model. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 17, 829–839. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.07.009>
- Endo, M., Mikami, M., Endo, A., Kaya, H., Itoh, T., Nishimasu, H., ... Toki, S. (2019). Genome editing in plants by engineered CRISPR–Cas9 recognizing NG PAM. *Nature Plants*, 5(1), 14–17. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0321-8>
- Frock, R. L., Hu, J., Meyers, R. M., Ho, Y.-J., Kii, E., & Alt, F. W. (2015). Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. *Nature Biotechnology*, 33(2), 179–186. <https://doi.org/10.1038/nbt.3101>
- Fu, Y., Foden, J. A., Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 31(9), 822–826. <https://doi.org/10.1038/nbt.2623>
- Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M., & Joung, J. K. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnology*, 32(3), 279–284. <https://doi.org/10.1038/nbt.2808>
- Gallimore, R. P., Hughes, B. A., & Miller, S. S. (1997). Retinal pigment epithelial transport mechanisms and their contributions to the electroretinogram. *Progress in Retinal and Eye Research*, 16(4), 509–566. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(96\)00037-7](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(96)00037-7)
- Gao, L., Cox, D. B. T., Yan, W. X., Manteiga, J. C., Schneider, M. W., Yamano, T., ...

- Zhang, F. (2017). Engineered Cpf1 variants with altered PAM specificities increase genome targeting range. *Nature Biotechnology*, 35(8), 789–792. <https://doi.org/10.1038/nbt.3900>
- Gao, X., Tao, Y., Lamas, V., Huang, M., Yeh, W. H., Pan, B., ... Liu, D. R. (2018). Treatment of autosomal dominant hearing loss by in vivo delivery of genome editing agents. *Nature*, 553(7687), 217–221. <https://doi.org/10.1038/nature25164>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(39). <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Gaudelli, N. M., Komor, A. C., Rees, H. A., Packer, M. S., Badran, A. H., Bryson, D. I., & Liu, D. R. (2017). Programmable base editing of A-T to G-C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551(7681), 464–471. <https://doi.org/10.1038/nature24644>
- Gehrke, J. M., Cervantes, O., Clement, M. K., Wu, Y., Zeng, J., Bauer, D. E., ... Joung, J. K. (2018). An apobec3a-cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities. *Nature Biotechnology*, 36(10), 977. <https://doi.org/10.1038/nbt.4199>
- Guilinger, J. P., Thompson, D. B., & Liu, D. R. (2014). Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nature Biotechnology*, 32(6), 577–582. <https://doi.org/10.1038/nbt.2909>
- Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B., & Taipale, J. (2018). CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nature Medicine*, 24(7), 927–930. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0049-z>
- Haeussler, M., Schönig, K., Eckert, H., Eschstruth, A., Mianné, J., Renaud, J. B., ... Concordet, J. P. (2016). Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology*, 17(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2>
- Harrington, L. B., Burstein, D., Chen, J. S., Paez-Espino, D., Ma, E., Witte, I. P., ... Doudna, J. A. (2018). Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*, 362(6416), 839–842. <https://doi.org/10.1126/science.aav4294>
- Hartzell, H. C., Qu, Z., Yu, K., Xiao, Q., & Chien, L.-T. (2008). Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. *Physiological Reviews*, 88(2), 639–672.

<https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2007>

- Hemphill, J., Borchardt, E. K., Brown, K., Asokan, A., & Deiters, A. (2015). Optical control of CRISPR/Cas9 gene editing. *Journal of the American Chemical Society*, 137(17), 5642–5645. <https://doi.org/10.1021/ja512664v>
- Hoban, M. D., Lumaquin, D., Kuo, C. Y., Romero, Z., Long, J., Ho, M., ... Kohn, D. B. (2016). CRISPR/Cas9-mediated correction of the sickle mutation in human CD34+ cells. *Molecular Therapy*, 24(9), 1561–1569. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.148>
- Horlbeck, M. A., Witkowsky, L. B., Guglielmi, B., Replogle, J. M., Gilbert, L. A., Villalta, J. E., ... Weissman, J. S. (2016). Nucleosomes impede cas9 access to DNA in vivo and in vitro. *ELife*, 5(MARCH2016). <https://doi.org/10.7554/eLife.12677>
- Hou, Z., Zhang, Y., Propson, N. E., Howden, S. E., Chu, L.-F., Sontheimer, E. J., & Thomson, J. A. (2013). Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(39), 15644–15649. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313587110>
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Hsu, P. D., Scott, D. A., Weinstein, J. A., Ran, F. A., Konermann, S., Agarwala, V., ... Zhang, F. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology*, 31(9), 827–832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- Hu, J. H., Miller, S. M., Geurts, M. H., Tang, W., Chen, L., Sun, N., ... Liu, D. R. (2018). Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 556(7699), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nature26155>
- Hu, Z., Wang, S., Zhang, C., Gao, N., Li, M., Wang, D., ... Wang, Y. (2020). A compact Cas9 ortholog from *Staphylococcus Auricularis* (SauriCas9) expands the DNA targeting scope. *PLoS Biology*, 18(3), e3000686. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000686>
- Ihry, R. J., Worringer, K. A., Salick, M. R., Frias, E., Ho, D., Theriault, K., ... Kaykas, A. (2018). P53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nature Medicine*, 24(7), 939–946. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0050-6>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme

- conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12), 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gastra, W., & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- Jensen, K. T., Fløe, L., Petersen, T. S., Huang, J., Xu, F., Bolund, L., ... Lin, L. (2017). Chromatin accessibility and guide sequence secondary structure affect CRISPR-Cas9 gene editing efficiency. *FEBS Letters*, 591(13), 1892–1901. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12707>
- Jiang, Wen, Feng, S., Huang, S., Yu, W., Li, G., Yang, G., ... Huang, X. (2018). BE-PLUS: A new base editing tool with broadened editing window and enhanced fidelity. *Cell Research*, 28(8), 855–861. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0052-4>
- Jiang, Wenyan, Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., & Marraffin, L. A. (2013). CRISPR-assisted editing of bacterial genomes. *Nat Biotechnol*, 31(3), 233–239. <https://doi.org/10.1038/nbt.2508>.CRISPR-assisted
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kane Dickson, V., Pedi, L., & Long, S. B. (2014). Structure and insights into the function of a Ca^{2+} -activated Cl^- channel. *Nature*, 516(7530), 213–218. <https://doi.org/10.1038/nature13913>
- Kellner, U., Kellner, S., Weinitz, S., Farmand, G., Weber, B. H. F., & Stohr, H. (2015). Inherited retinal or optic nerve disorders - five steps to diagnosis. *Klin Monatsbl Augenheilkd.*, 232(3), 250–258. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1396211>
- Kim, Y. Bill; Komor, Alexis C.; Levy, Jonathan M.; Packer, M. S. ., & Zhao, Kevin T.; Liu, D. R. (2017). Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions. *Nature Biotechnology*, 176(1), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Kim, D., Bae, S., Park, J., Kim, E., Kim, S., Yu, H. R., ... Kim, J. S. (2015). Digenome-seq: Genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells.

- Nature Methods*, 12(3), 237–243. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3284>
- Kim, D., Kim, J., Hur, J. K., Been, K. W., Yoon, S. H., & Kim, J. S. (2016). Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 34(8), 863–868. <https://doi.org/10.1038/nbt.3609>
- Kim, D., Kim, S., Kim, S., Park, J., & Kim, J. S. (2016). Genome-wide target specificities of CRISPR-Cas9 nucleases revealed by multiplex Digenome-seq. *Genome Research*, 26(3), 406–415. <https://doi.org/10.1101/gr.199588.115>
- Kim, E., Koo, T., Park, S. W., Kim, D., Kim, K., Cho, H. Y., ... Kim, J. S. (2017). In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nature Communications*, 8, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms14500>
- Kim, S., Kim, D., Cho, S., Kim, J., & Kim, J.-S. (2014). Highly Efficient RNA-guide genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research*, 24, 1012–1019. <https://doi.org/10.1101/gr.171322.113>
- Kleinstiver, B. P., Pattanayak, V., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Zheng, Z., & Keith Joung, J. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 variants with undetectable genome-wide off-targets. *Nature*, 528(7587), 490–495. <https://doi.org/10.1038/nature16526>
- Kleinstiver, B. P., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Topkar, V. V, Nguyen, N. T., Zheng, Z., ... Joung, J. K. (2015). Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*, 523(7561), 481–485. <https://doi.org/10.1038/nature14592>
- Kocak, D. D., Josephs, E. A., Bhandarkar, V., Adkar, S. S., Kwon, J. B., & Gersbach, C. A. (2019). Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures. *Nature Biotechnology*, 37(6), 657–666. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0095-1>
- Komor, A. C., Zhao, K. T., Packer, M. S., Gaudelli, N. M., Waterbury, A. L., Koblan, L. W., ... Liu, D. R. (2017). Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C:G-to-T:A base editors with higher efficiency and product purity. *Science Advances*, 3(8), 1–10. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao4774>
- Kosicki, M., Tomberg, K., & Bradley, A. (2018). Repair of double-strand breaks induced by CRISPR–Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nature Biotechnology*, 36(8). <https://doi.org/10.1038/nbt.4192>
- Krämer, F., Mohr, N., Kellner, U., Rudolph, G., & Weber, B. H. F. (2003). Ten novel mutations in VMD2 associated with Best macular dystrophy (BMD). *Human*

- Mutation*, 22(5), 418. <https://doi.org/10.1002/humu.9189>
- Krämer, F., White, K., Pauleikhoff, D., Gehrig, A., Passmore, L., Rivera, A., ... Weber, B. H. (2000). Mutations in the VMD2 gene are associated with juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best disease) and adult vitelliform macular dystrophy but not age-related macular degeneration. *European Journal of Human Genetics*, 8(4), 286–292. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200447>
- Krohne, T. U., Westenskow, P. D., Kurihara, T., Friedlander, D. F., Lehmann, M., Dorsey, A. L., ... Friedlander, M. (2012). Generation of Retinal Pigment Epithelial Cells from Small Molecules and OCT4 Reprogrammed Human Induced Pluripotent Stem Cells. *STEM CELLS Translational Medicine*, 1(2), 96–109. <https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0057>
- Kuscu, C., Parlak, M., Tufan, T., Yang, J., Szlachta, K., Wei, X., ... Adli, M. (2017). CRISPR-STOP: Gene silencing through base-editing-induced nonsense mutations. *Nature Methods*, 14(7), 710–712. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4327>
- Labuhn, M., Adams, F. F., Ng, M., Knoess, S., Schambach, A., Charpentier, E. M., ... Heckl, D. (2017). Refined sgRNA efficacy prediction improves large-and small-scale CRISPR-Cas9 applications. *Nucleic Acids Research*, 46(3), 1375–1385. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1268>
- Labun, K., Montague, T. G., Krause, M., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H., & Valen, E. (2019). CHOPCHOP v3: Expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W171–W174. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz365>
- Lee, J. K., Jeong, E., Lee, J., Jung, M., Shin, E., Kim, Y. hoon, ... Kim, J. S. (2018). Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05477-x>
- Li, X., Wang, Y., Liu, Y., Yang, B., Wang, X., Wei, J., ... Chen, J. (2018). Base editing with a Cpf1-cytidine deaminase fusion. *Nature Biotechnology*, 36(4), 324–327. <https://doi.org/10.1038/nbt.4102>
- Li, Y., Zhang, Y., Xu, Y., Kittredge, A., Ward, N., Chen, S., ... Yang, T. (2017). Patient-specific mutations impair BESTROPHIN1's essential role in mediating Ca²⁺-dependent Cl-currents in human RPE. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.29914>
- Liu, X., Homma, A., Sayadi, J., Yang, S., Ohashi, J., & Takumi, T. (2016). Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system.

- Scientific Reports*, 6(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep19675>
- Liu, Z., Lu, Z., Yang, G., Huang, S., Li, G., Feng, S., ... Huang, X. (2018). Efficient generation of mouse models of human diseases via ABE- and BE-mediated base editing. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04768-7>
- Lorenz, B., Gyurus, P., Preising, M., Bremser, D., Gu, S., Andrassi, M., ... Gal, A. (2000). Early-onset severe rod-cone dystrophy in young children with RPE65 mutations. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41(9), 2735–2742. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10937591>
- Maeder, M. L., Stefanidakis, M., Wilson, C. J., Baral, R., Barrera, L. A., Bounoutas, G. S., ... Jiang, H. (2019). Development of a gene-editing approach to restore vision loss in Leber congenital amaurosis type 10. *Nature Medicine*, 25(2), 229–233. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0327-9>
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P. B., Esvelt, K. M., Moosburner, M., Kosuri, S., ... Church, G. M. (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature Biotechnology*, 31(9), 833–838. <https://doi.org/10.1038/nbt.2675>
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., ... Church, G. M. (2013). RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*, 339(6121), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>
- Marchant, D., Yu, K., Bigot, K., Roche, O., Germain, A., Bonneau, D., ... Abitbol, M. (2007). New VMD2 gene mutations identified in patients affected by Best vitelliform macular dystrophy. *Journal of Medical Genetics*, 44(3), e70. <https://doi.org/10.1136/jmg.2006.044511>
- Marmorstein, a D., Marmorstein, L. Y., Rayborn, M., Wang, X., Hollyfield, J. G., & Petrukhin, K. (2000). Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(23), 12758–12763. <https://doi.org/10.1073/pnas.220402097>
- Marquardt, A., Stöhr, H., Passmore, L. A., Krämer, F., Rivera, A., & Weber, B. H. F. (1998). Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease). *Human Molecular Genetics*, 7(9), 1517–1525.

<https://doi.org/10.1093/hmg/7.9.1517>

- Maruotti, J., Wahlin, K., Gorrell, D., Bhutto, I., Luty, G., & Zack, D. J. (2013). A simple and scalable process for the differentiation of retinal pigment epithelium from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 2(5), 341–354. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0106>
- Maruyama, T., Dougan, S. K., Truttmann, M. C., Bilate, A. M., Ingram, J. R., & Ploegh, H. L. (2015). Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nature Biotechnology*, 33(5), 538–542. <https://doi.org/10.1038/nbt.3190>
- Milenkovic, A., Brandl, C., Milenkovic, V. M., Jendryke, T., Sirianant, L., Wanitchakool, P., ... Weber, B. H. F. (2015). Bestrophin 1 is indispensable for volume regulation in human retinal pigment epithelium cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(20), E2630-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1418840112>
- Miller, A. N., Vaisey, G., & Long, S. B. (2019). Molecular mechanisms of gating in the calcium-activated chloride channel bestrophin. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.43231>
- Mohler, C. W., & Fine, S. L. (1981). Long-term Evaluation of Patients with Best's Vitelliform Dystrophy. *Ophthalmology*, 88(7), 688–692. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(81\)34965-3](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(81)34965-3)
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., & Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 36(1), 244–246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>
- Moreno-Mateos, M. A., Vejnar, C. E., Beaudoin, J. D., Fernandez, J. P., Mis, E. K., Khokha, M. K., & Giraldez, A. J. (2015). CRISPRscan: Designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo. *Nature Methods*, 12(10), 982–988. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3543>
- Müller, M., Lee, C. M., Gasiunas, G., Davis, T. H., Cradick, T. J., Siksnys, V., ... Mussolino, C. (2016). Streptococcus thermophilus CRISPR-Cas9 systems enable specific editing of the human genome. *Molecular Therapy*, 24(3), 636–644. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.218>
- Narfström, K., Katz, M. L., Ford, M., Redmond, T. M., Rakoczy, E., & Bragadóttir, R. (2003). In Vivo Gene Therapy in Young and Adult RPE65-/- Dogs Produces Long-

- Term Visual Improvement. In *Journal of Heredity* (Vol. 94, pp. 31–37). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jhered/esg015>
- Nelson, C. E., Hakim, C. H., Ousterout, D. G., Thakore, P. I., Moreb, E. A., Rivera, R. M. C., ... Gersbach, C. A. (2016). In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 351(6271), 403–407. <https://doi.org/10.1126/science.aad5143>
- Nihongaki, Y., Yamamoto, S., Kawano, F., Suzuki, H., & Sato, M. (2015). CRISPR-Cas9-based photoactivatable transcription system. *Chemistry and Biology*, 22(2), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.12.011>
- Nishida, K., Arazoe, T., Yachie, N., Banno, S., Kakimoto, M., Tabata, M., ... Kondo, A. (2016). Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, 353(6305). <https://doi.org/10.1126/science.aaf8729>
- Nishimasu, H. et al. (2014). Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*. <https://doi.org/doi:10.1016/j.cell.2014.02.001>.
- Nishimasu, H. et al. (2018). Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science*, 176(3), 139–148.
- Okano, H., Nakamura, M., Yoshida, K., Okada, Y., Tsuji, O., Nori, S., ... Miura, K. (2013, February 1). Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.256149>
- Paquet, D., Kwart, D., Chen, A., Sproul, A., Jacob, S., Teo, S., ... Tessier-Lavigne, M. (2016). Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature*, 533(7601), 125–129. <https://doi.org/10.1038/nature17664>
- Petrukhin, K., Koisti, M. J., Bakall, B., Li, W., Xie, G., Marknell, T., ... Wadelius, C. (1998). Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. *Nat Genet*, 19(3), 241–247. <https://doi.org/10.1038/915>
- Ran, F. A., Cong, L., Yan, W. X., Scott, D. A., Gootenberg, J. S., Kriz, A. J., ... Zhang, F. (2015). In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. *Nature*, 520(7546), 186–191. <https://doi.org/10.1038/nature14299>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., ... Zhang, F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380–1389. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>

- Rees, H. A., Komor, A. C., Yeh, W. H., Caetano-Lopes, J., Warman, M., Edge, A. S. B., & Liu, D. R. (2017). Improving the DNA specificity and applicability of base editing through protein engineering and protein delivery. *Nature Communications*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms15790>
- Renner, A. B., Tillack, H., Kraus, H., Kr??mer, F., Mohr, N., Weber, B. H. F., ... Kellner, U. (2005, April). Late onset is common in best macular dystrophy associated with VMD2 gene mutations. *Ophthalmology*. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2004.10.041>
- Richardson, C. D., Ray, G. J., DeWitt, M. A., Curie, G. L., & Corn, J. E. (2016). Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactive CRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA. *Nature Biotechnology*, 34(3), 339–344. <https://doi.org/10.1038/nbt.3481>
- Russell, S., Bennett, J., Wellman, J. A., Chung, D. C., Yu, Z. F., Tillman, A., ... Maguire, A. M. (2017). Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, 390(10097), 849–860. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31868-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31868-8)
- Ryan, D. E., Taussig, D., Steinfeld, I., Phadnis, S. M., Lunstad, B. D., Singh, M., ... Dellinger, D. J. (2018). Improving CRISPR-Cas specificity with chemical modifications in single-guide RNAs. *Nucleic Acids Research*, 46(2), 792–803. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1199>
- Ryu, S. M., Koo, T., Kim, K., Lim, K., Baek, G., Kim, S. T., ... Kim, J. S. (2018). Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Nature Biotechnology*, 36(6), 536–539. <https://doi.org/10.1038/nbt.4148>
- Semenova, E., Jore, M. M., Datsenko, K. A., Semenova, A., Westra, E. R., Wanner, B., ... Severinov, K. (2011). Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(25), 10098–10103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104144108>
- Shen, M. W., Arbab, M., Hsu, J. Y., Worstell, D., Culbertson, S. J., Krabbe, O., ... Sherwood, R. I. (2018). Predictable and precise template-free CRISPR editing of pathogenic variants. *Nature*, 563(7733), 646–651. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0686-x>

- Shin, H. Y., Wang, C., Lee, H. K., Yoo, K. H., Zeng, X., Kuhns, T., ... Hennighausen, L. (2017). CRISPR/Cas9 targeting events cause complex deletions and insertions at 17 sites in the mouse genome. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/ncomms15464>
- Singh, R., Phillips, M. J., Kuai, D., Meyer, J., Martin, J. M., Smith, M. A., ... Gamm, D. M. (2013). Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(10), 6767–6778. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-11943>
- Singh, R., Shen, W., Kuai, D., Martin, J. M., Guo, X., Smith, M. A., ... Gamm, D. M. (2013). iPS cell modeling of best disease: Insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Human Molecular Genetics*, 22(3), 593–607. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt469>
- Slaymaker, I. M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D. A., Yan, W. X., & Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 351(6268), 84–88. <https://doi.org/10.1126/science.aad5227>
- Smith, A. J., Bainbridge, J. W., & Ali, R. R. (2009). Prospects for retinal gene replacement therapy. *Trends in Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2009.02.003>
- Smith, C., Abalde-Atristain, L., He, C., Brodsky, B. R., Braunstein, E. M., Chaudhari, P., ... Ye, Z. (2015). Efficient and Allele-Specific Genome Editing of Disease Loci in Human iPSCs. *Molecular Therapy*, 23(3), 570–577. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.226>
- Stanton, J. B., Goldberg, A. F. X., Hoppe, G., Marmorstein, L. Y., & Marmorstein, A. D. (2006). Hydrodynamic properties of porcine bestrophin-1 in Triton X-100. *Biochim Biophys Acta*, 1758(2), 241–247. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.01.024>
- Stöhr, H., Marquardt, A., Nanda, I., Schmid, M., & Weber, B. H. F. (2002). Three novel human VMD2-like genes are members of the evolutionary highly conserved RFP-TM family. *European Journal of Human Genetics : EJHG*, 10(February), 281–284. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200796>
- Strecker, J., Jones, S., Koopal, B., Schmid-Burgk, J., Zetsche, B., Gao, L., ... Zhang, F. (2019). Engineering of CRISPR-Cas12b for human genome editing. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08224-4>
- Sugimoto, N., Nakano, S. ichi, Katoh, M., Matsumura, A., Nakamuta, H., Ohmichi, T.,

- ... Sasaki, M. (1995). Thermodynamic Parameters To Predict Stability of RNA/DNA Hybrid Duplexes. *Biochemistry*, 34(35), 11211–11216. <https://doi.org/10.1021/bi00035a029>
- Sun, H., Tsunenari, T., Yau, K.-W., & Nathans, J. (2001). The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(6), 4008–4013. <https://doi.org/10.1073/pnas.052692999>
- Szczelkun, M. D., Tikhomirova, M. S., Sinkunas, T., Gasiunas, G., Karvelis, T., Pschera, P., ... Seidel, R. (2014). Direct observation of R-loop formation by single RNA-guided Cas9 and Cascade effector complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(27), 9798–9803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402597111>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Tan, J., Zhang, F., Karcher, D., & Bock, R. (2019). Engineering of high-precision base editors for site-specific single nucleotide replacement. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08034-8>
- Tan, Y., Chu, A. H. Y., Bao, S., Hoang, D. A., Kebede, F. T., Xiong, W., ... Zheng, Z. (2019). Rationally engineered *Staphylococcus aureus* Cas9 nucleases with high genome-wide specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(42), 20969–20976. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906843116>
- Thuronyi, B. W., Koblan, L. W., Levy, J. M., Yeh, W. H., Zheng, C., Newby, G. A., ... Liu, D. R. (2019). Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity. *Nature Biotechnology*, 37(September). <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0193-0>
- Trevino, A. E., & Zhang, F. (2014). Genome editing using cas9 nickases. *Methods in Enzymology*, 546(C), 161–174. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801185-0.00008-8>
- Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Malagon-Lopez, J., Topkar, V. V., Aryee, M. J., & Joung, J. K. (2017). CIRCLE-seq: A highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets. *Nature Methods*, 14(6), 607–614.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.4278>

- Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Malagon-lopez, J., Topkar, V. V., Aryee, M. J., Joung, J. K., ... Hospital, M. G. (2018). CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Malagon-lopez, J., Topkar, V. V., Aryee, M. J., Joung, J. K., ... Hospital, M. G. (2018). CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRI, 14(6), 607–614. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4278.CIRCLE-seq>
- Tsai, S. Q., Wyvekens, N., Khayter, C., Foden, J. A., Thapar, V., Reyon, D., ... Joung, J. K. (2014). Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology*, 32(6), 569–576. <https://doi.org/10.1038/nbt.2908>
- Tsai, S. Q., Zheng, Z., Nguyen, N. T., Liebers, M., Topkar, V. V., Thapar, V., ... Joung, J. K. (2015). GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nature Biotechnology*, 33(2), 187–197. <https://doi.org/10.1038/nbt.3117>
- Vakulskas, C. A., Dever, D. P., Rettig, G. R., Turk, R., Jacobi, A. M., Collingwood, M. A., ... Behlke, M. A. (2018). A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nature Medicine*, 24(8), 1216–1224. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0137-0>
- Wang, T., Wei, J. J., Sabatini, D. M., & Lander, E. S. (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 343(6166), 80–84. <https://doi.org/10.1126/science.1246981>
- Wiedenheft, B., van Duijn, E., Bultema, J. B., Waghmare, S. P., Zhou, K., Barendregt, A., ... Doudna, J. A. (2011). RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(25), 10092–10097. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102716108>
- Wienert, B., Wyman, S. K., Richardson, C. D., Yeh, C. D., Akcakaya, P., Porritt, M. J., ... Corn, J. E. (2019). Unbiased detection of CRISPR off-targets in vivo using DISCOVER-Seq. *Science*, 364(6437), 286–289. <https://doi.org/10.1126/science.aav9023>
- Wright, A. V., Sternberg, S. H., Taylor, D. W., Staahl, B. T., Bardales, J. A., Kornfeld, J. E., & Doudna, J. A. (2015). Rational design of a split-Cas9 enzyme complex.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(10), 2984–2989. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501698112>
- Wu, X., Scott, D. A., Kriz, A. J., Chiu, A. C., Hsu, P. D., Dadon, D. B., ... Sharp, P. A. (2014). Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 32(7), 670–676. <https://doi.org/10.1038/nbt.2889>
- Xiao, Q., Hartzell, H. C., & Yu, K. (2010, July). Bestrophins and retinopathies. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. NIH Public Access. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0821-5>
- Xu, H., Xiao, T., Chen, C. H., Li, W., Meyer, C. A., Wu, Q., ... Liu, X. S. (2015). Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design. *Genome Research*, 25(8), 1147–1157. <https://doi.org/10.1101/gr.191452.115>
- Xu, X., Duan, D., & Chen, S. J. (2017). CRISPR-Cas9 cleavage efficiency correlates strongly with targetsgRNA folding stability: From physical mechanism to off-target assessment. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00180-1>
- Yamanaka, S. (2009, April 3). A Fresh Look at iPS Cells. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.034>
- Yan, W. X., Mirzazadeh, R., Garnerone, S., Scott, D., Schneider, M. W., Kallas, T., ... Crosetto, N. (2017). BLISS is a versatile and quantitative method for genome-wide profiling of DNA double-strand breaks. *Nature Communications*, 8(May), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms15058>
- Yang, T., Liu, Q., Kloss, B., Bruni, R., Kalathur, R. C., Guo, Y., ... Hendrickson, W. A. (2014). Structure and selectivity in bestrophin ion channels. *Science*, 346(6207), 355–359. <https://doi.org/10.1126/science.1259723>
- Yanik, M., Müller, B., Song, F., Gall, J., Wagner, F., Wende, W., ... Stieger, K. (2017). In vivo genome editing as a potential treatment strategy for inherited retinal dystrophies. *Progress in Retinal and Eye Research*, 56, 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2016.09.001>
- Yardley, J., Leroy, B. P., Hart-Holden, N., Lafaut, B. A., Loeys, B., Messiaen, L. M., ... Black, G. C. M. (2004). Mutations of VMD2 splicing regulators cause nanophthalmos and autosomal dominant vitreoretinopathopathy (ADVIRC). *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(10), 3683–3689. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0550>
- Zetsche, B., Gootenberg, J. S., Abudayyeh, O. O., Slaymaker, I. M., Makarova, K. S.,

- Essletzbichler, P., ... Zhang, F. (2015). Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*, 163(3), 759–771. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.038>
- Zetsche, B., Volz, S. E., & Zhang, F. (2015). A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. *Nature Biotechnology*, 33(2), 139–142. <https://doi.org/10.1038/nbt.3149>
- Zhang, D., Hurst, T., Duan, D., & Chen, S. J. (2019). Unified energetics analysis unravels SpCas9 cleavage activity for optimal gRNA design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(18), 8693–8698. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820523116>
- Zhang, L., Jia, R., Palange, N. J., Satheka, A. C., Togo, J., An, Y., ... Zheng, Y. (2015). Large Genomic Fragment Deletions and Insertions in Mouse Using CRISPR/Cas9. *PLOS ONE*, 10(3), e0120396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120396>
- Zuris, J. A., Thompson, D. B., Shu, Y., Guilinger, J. P., Bessen, J. L., Hu, J. H., ... Liu, D. R. (2015). Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nature Biotechnology*, 33(1), 73–80. <https://doi.org/10.1038/nbt.3081>

12 Danksagung

Abschließend möchte ich mich aufrichtig bei allen Personen bedanken, die an dieser Promotionsarbeit beteiligt waren und mich bei diesem Prozess unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Weber für die Möglichkeit, an solch einem spannenden und aktuellen Forschungsthema teilnehmen und auf diesem Gebiet promovieren zu dürfen. Darüber hinaus schätze ich die Erfahrungen, die ich durch meine Teilnahme am Forschungs-Retreat, den zahlreichen Lab-Meetings und Journal Clubs sammeln durfte.

Mein besonderer Dank gilt zudem meiner direkten Betreuerin Andrea, die mich sehr engmaschig bei dieser Arbeit betreut hat und trotz vieler eigener Projekte stets beratend zur Seite stand. Dieser aufmerksamen und freundlichen Betreuung verdanke ich den reibungslosen Ablauf meiner Arbeit. An dieser Stelle möchte ich mich für all die investierte Zeit bedanken!

Ich möchte außerdem Frau PD Dr. med. Brandl für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Nicht zu vergessen sind die restlichen Kollegen am Institut für Humangenetik: Ich danke dem Kollegium für die Hilfsbereitschaft im Labor und die Gestaltung einer angenehmen Zeit am Institut! Mein Dank gilt weiterhin den Kollegen des ärztlichen Dienstes für all die Eindrücke, die mir im Rahmen der humangenetischen Beratungen ermöglicht wurden.

13 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die Promotionsarbeit ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen aus den benutzten Quellen wurden als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Berlin, den 29.06.2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'D. Eisner'.

D. Eisner