

Aus dem Lehrstuhl
für Humangenetik
Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Expression des retinalen *ABCA4* Gens in humanen mononukleären Zellen des
Blutes mittels CRISPR/CAS9 Technologie

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anna Sophie Koschany

2023

Aus dem Institut
für Humangenetik
Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Expression des retinalen *ABCA4* Gens in humanen mononukleären Zellen des
Blutes mittels CRISPR/CAS9 Technologie

Inaugural–Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Anna Sophie Koschany

2023

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. Nat. Bernhard Weber

2. Berichterstatter:

PD Dr. Caroline Brandl

Tag der mündlichen Prüfung:

22.Juni 2023

Für meinen Großvater
Ferdinand Koschany

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	7
2	Einleitung	9
2.1	Morbus Stargardt.....	9
2.1.1	Symptome und klinische Diagnostik	9
2.1.2	Ätiologie	11
2.2	Charakteristik des <i>ABCA4</i>	11
2.2.1	Lokalisation.....	11
2.2.2	Physiologische Funktion des <i>ABCA4-Proteins</i>	12
2.2.3	Pathophysiologie.....	14
2.2.4	Krankheitsassoziierte Mutationen im <i>ABCA4</i>	15
2.3	Diagnostik von <i>ABCA4</i> in Bezug auf STGD	16
2.4	Therapie des STGD.....	18
2.5	Genom-Editierung mittels CRISPR-Cas	19
2.5.1	Das CRISPR-Cas9-System	19
2.5.2	CRISPR-dCas9-VPR-System	20
2.6	Zielsetzung der Arbeit.....	21
3	Material	23
3.1	Bakterienstämme.....	23
3.2	Zelllinien	23
3.3	Vektoren.....	23
3.4	Oligonukleotide.....	24
3.4.1	Oligonukleotide der guideRNAs.....	24
3.4.2	Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung	25
3.4.3	Klonierte Vektorkonstrukte.....	26
3.5	Enzyme	27

Inhaltsverzeichnis

3.6	Reaktionssysteme	27
3.7	Molekularmassenstandard	28
3.8	Chemikalien und Reagenzien.....	28
3.9	Puffer und Medien	29
3.10	Geräte	31
3.11	Software	32
4	Methoden	33
4.1	Software-gestützte Analyse.....	33
4.2	Klonierung von Vektoren	33
4.2.1	Amplifizierung der Zielsequenz mittels PCR.....	34
4.2.2	Agarosegelelektrophorese	35
4.2.3	Extraktion und Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegel	35
4.2.4	Ligation im pGem®-T-Vektor	36
4.2.5	Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen	36
4.2.6	Kolonie-PCR	37
4.2.7	Plasmid-Präparation aus 5 ml Übernachtskulturen - Minipräp.....	37
4.2.8	pGem®-T-Vektor-Kontroll-Verdau.....	38
4.2.9	Sequenzierung nach Sanger	39
4.2.10	Restriktionsverdau von pGem®-T-Vektor und EGxxFP-Vektor	40
4.2.11	Ligation in die Expressionsvektoren	41
4.2.11.1	Ligation der Zielsequenz in den pCAG-EGxxFP-Vektor.....	41
4.2.11.2	Ligation der guideRNAs in den px330_mCherry-Vektor.....	42
4.2.12	Plasmid-Präparation aus 100ml Übernachtskulturen – Midipräp.....	44
4.2.13	Herstellung des Glycerolstocks	44
4.3	Zellkultur.....	44
4.3.1	Kultivierung von HEK293-T-Zellen.....	44
4.3.2	Kalziumphosphat-Transfektion von HEK293-T-Zellen	45

Inhaltsverzeichnis

4.3.2.1	Auswertung der quantifizierten Daten der Kalziumphosphat-Transfektion	47
4.3.3	Transfektion der HEK293T-Zellen mit dem TransIT®-2020 Reagenz ..	47
4.4	Evaluation der Enhancer-Aktivität der erfolgreich getesteten guideRNAs ...	48
4.4.1	RNA-Präparation aus transfizierten HEK293-T-Zellen	49
4.4.2	cDNA-Synthese	50
4.4.3	RT-PCR zur Überprüfung der Enhancer-Aktivität	51
4.4.4	Housekeeper PCR	51
5	Ergebnisse	52
5.1	Bioinformatische Auswertung	52
5.1.1	Kriterien für die Auswahl der guideRNAs und Übersicht der analysierten <i>ABCA4</i> -Promoterregion	52
5.2	In vitro-Test der bioinformatisch ermittelten guideRNAs.....	55
5.2.1	Vektorensystem zur Prüfung der bioinformatisch ermittelten guideRNAs	56
5.2.2	Qualitative und quantitative Resultate der Immunfluoreszenzen	57
5.3	Ergebnisse der in vitro-Experimente zur Expression des <i>ABCA4</i> Transkripts	60
5.3.1	Vektorensystem zur Potenzierung des <i>ABCA4</i> Transkripts	60
5.3.2	Nachweis der verstärkten Expression des <i>ABCA4</i> -Transkripts.....	61
5.3.3	Verschiedene Kombinationen	63
5.3.4	Zeitreihe	65
6	Diskussion.....	67
7	Tabellenverzeichnis	73
8	Abbildungsverzeichnis	75
9	Abkürzungsverzeichnis	76
10	Literaturverzeichnis.....	78
11	Danksagung.....	91

Inhaltsverzeichnis

12	Eidesstaatliche Erklärung	92
13	Curriculum Vitae	93

1 Zusammenfassung

Morbus Stargardt ist eine hereditäre Erkrankung des hinteren Augenabschnittes, die sich klinisch mit einem chronisch progressiven Visusverlust präsentiert. Die Krankheit entsteht durch autosomal-rezessive Mutationen im *ABCA4*-Gen, welches für einen ATP-bindenden Transporter in der Netzhaut kodiert. Ein Defekt des Transporters führt zu einer Akkumulation von zytotoxischen Stoffwechselprodukten in den Pigmentepithelzellen und somit zu einem progredienten Sehverlust.

Die molekulargenetische Diagnostik dieser Erkrankung wird durch eine hohe genotypische und phänotypische Heterogenität erschwert. Dies liegt unter anderem darin begründet, dass sich die krankheits-verursachenden Mutationen in den intronischen Bereichen des *ABCA4* befinden können, welche bei einer routinemäßigen DNA-Diagnostik der kodierenden Gensequenzen nicht erfasst werden. Eine nähere Analyse der intronischen Regionen wird durch die Größe des Gens von 130kb, durch repetitive Sequenzen, sowie durch die spezifische Expression des *ABCA4*-Gens in den Photorezeptorzellen erschwert. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es eine Methode zu entwickeln, die es erlaubt das *ABCA4* Transkript aus den peripher mononukleären Zellen des Blutes von Patienten zu gewinnen, obwohl das Gen dort regulär nicht exprimiert wird. Dies würde es ermöglichen den Einfluss von Mutationen in den nicht kodierenden Bereichen direkt auf Transkriptebeine im Blut der Patienten nachzuweisen.

Eine vielversprechende Möglichkeit das Ziel der Arbeit umzusetzen, basiert auf dem CRISPR/Cas9-System. Die Endonuklease Cas9 wird spezifisch durch eine guideRNA an ihre Zielsequenzen geleitet und induziert dort normalerweise einen Doppelstrangbruch. In der vorliegenden Arbeit wurde ein modifiziertes dCas9-VPR-System verwendet bei der die Endonuklease-Fähigkeit der Cas9 deaktiviert und mit einer dreiteiligen Aktivator-domäne fusioniert wurde. Ein solches System erlaubt eine gezielte Aktivierung einer Genexpression unabhängig von Gewebe-spezifischen Promotorsequenzen.

Unter Verwendung eines bioinformatischen Vorhersageprogrammes und mit Hilfe definierter Auswahlkriterien wurden mehrere guideRNAs für den Promotorbereich des *ABCA4*-Gens konstruiert und unter Einsatz des CRISPR/Cas9-Systems in HEK293T-Zellen auf ihre Spezifität getestet. Nach einer qualitativen und quantitativen Auswertung wurden acht guideRNAs für die weitere Verwendung

Zusammenfassung

ausgewählt. Zusammen mit dem dCas9-VPR Konstrukt wurden die gewählten guideRNAs in HEK293T-Zellen transfiziert, und verstärkten erfolgreich die Expression des *ABCA4*-Gens im Vergleich zur Kontrolle. Es wurde deutlich, dass das bioinformatische Vorhersageprogramm für das initiale Design von guideRNAs geeignet ist, jedoch eine experimentelle Überprüfung zur Minimierung nicht vorhersehbarer Interferenzen unerlässlich bleibt. Zur näheren Analyse und unter dem Aspekt einer möglichen Verbesserung der Resultate wurden Kombinationen aus jeweils drei guideRNA-Vektorkonstrukten gebildet und getestet. Auch wenn teilweise eine Intensitätssteigerung erzielt wurde, so waren die Resultate nur vergleichbar mit der Genexpression von einzelnen guideRNA-Vektorkonstrukten. Für eine zukünftige Entwicklung eines diagnostischen Verfahrens ist die vereinfachte Anwendung von nur einzelnen guideRNA-Vektorsystemen von Vorteil. Weiterhin wurde eine Zeitreihe in Hinsicht auf eine mögliche Verkürzung der Inkubationszeit bis 72 h erstellt. Die Resultate zeigten, dass eine minimale Inkubationszeit von lediglich 36 h gewählt werden kann.

Die erfolgreiche Etablierung eines CRISPR/Cas9-Systems zur Expression des *ABCA4*-Transkriptes in kernhaltigen weißen Blutzellen legt den Grundstein für die Erarbeitung eines diagnostischen Testes basierend auf PBMCs. Ist auch dieses Vorhaben erfolgreich kann eine Bewertung bisher nicht identifizierter, pathogener Varianten in Bezug auf ihre funktionellen Auswirkungen auf das reife Transkript sehr einfach aus einer Blutprobe erfolgen.

2 Einleitung

2.1 Morbus Stargardt

Morbus Stargardt (STGD) ist eine hereditäre Erkrankung der Makula, die autosomal-dominant (STGD3 OMIM: 600110) oder autosomal-rezessiv (STGD1 OMIM: 248200) vererbt wird. Erstmals wurde sie von dem deutschen Ophthalmologen Karl Stargardt im Jahre 1909 beschrieben (Stargardt, 1909). Franceschetti charakterisierte 1962 eine ophthalmologische Krankheit namens Fundus flavimaculatus (Franceschetti, 1965), die später als eine weitere Manifestation der gleichen genetischen Ursache wie Morbus Stargardt erkannt wurde (Fishman et al., 1999).

2.1.1 Symptome und klinische Diagnostik

STGD ist die häufigste juvenile Makuladystrophie mit einer geschätzten Prävalenz von 1:10 000 Lebendgeburten (Riveiro-Alvarez et al., 2009; Tsybovsky et al., 2010). Durch pathologische Netzhautveränderungen können bei den betroffenen Personen bilaterale, chronisch-progressive Visusverschlechterungen auftreten, begleitet von gestörten Farbwahrnehmungen (Dyschromatopsien) und Zentralskotomen (Tanna et al., 2017).

In farbigen Aufnahmen des Augenhintergrundes von STGD-Patienten können sich hellgelbe, fleckenförmige Hyperfluoreszenzen zeigen (**Abbildung 1A**) (Stargardt, 1909). Die meist länglichen Flecken ähneln bei stumpfwinkliger Anlagerung einer Fischflosse (*pisciform*), sind initial in der zentralen Makula lokalisiert und können sich zentrisch über den Fundus ausbreiten (Solberg et al., 2019). Histopathologisch wurde gezeigt, dass die STGD-assoziierten Flecken einen hohen Lipofuszingehalt aufweisen, die sich in Fundusautofluoreszenz-Aufnahmen (FAF) des Auges als hyperfluoreszent darstellen (**Abbildung 1B**) (Smith et al., 2009). Neben den typischen Flecken ist eine bilaterale Atrophie des retinalen Pigmentepithels (RPE) im Bereich der Fovea möglich, die sich im FAF hypofluoreszenzt präsentiert (**Abbildung 1B**) (Smith et al., 2009). Die Atrophie des RPE ist progressiv und kann sich bis zu einer ausgeprägten, geographischen Makulopathie ausbreiten (Lewis et al., 1999).

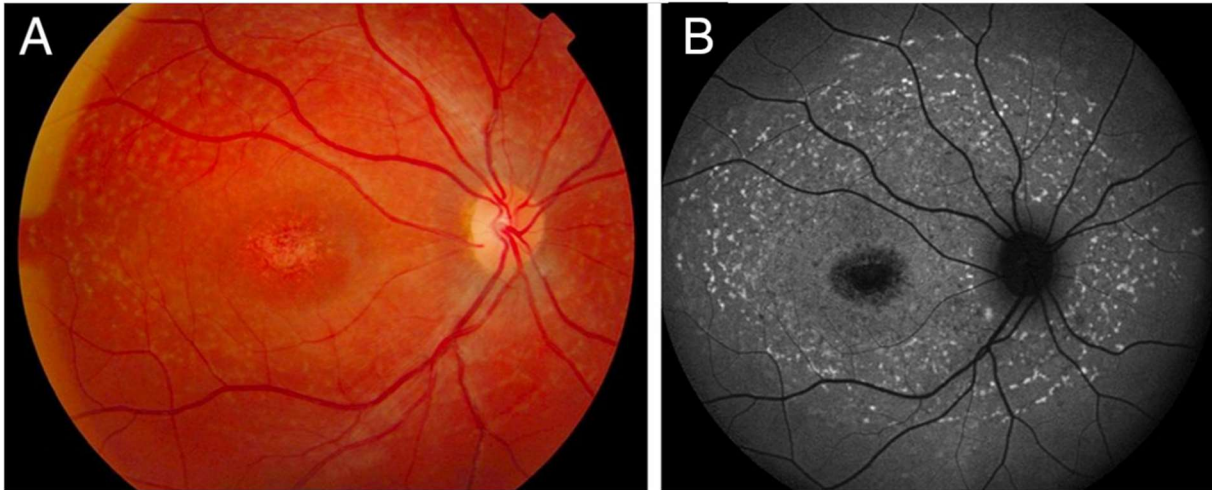


Abbildung 1: Fundusfotografie und FAF eines STGD-Patienten (modifiziert nach Tanna et al., 2017)

(A) Die abgebildete Fundusfotografie zeigt die Papille, sowie die versorgenden Gefäße. Es präsentiert sich eine zentrale Makulaatrophie und typische, hellgelbe Flecken, die sich zentrisch über den Fundus ausbreiten. (B) In der korrespondierenden FAF desselben STGD-Patienten ist neben der Papille und den versorgenden Strukturen das hypofluoreszente Makulareal gezeigt. Dies lässt auf eine Atrophie des RPEs schließen. Die hyperfluoreszenten Flecken korrelieren mit den hellgelben Flecken der Fundusfotografie und präsentieren histopathologisch einen hohen Lipofuszingehalt.

Das Ganzfeld-Elektroretinogram (G-ERG) von STGD-Patienten ist in frühen Stadien typischerweise normal oder nur gering reduziert. Im Verlauf können eindeutig reduzierte Amplituden gemessen werden (Oh et al., 2004; Stephen, 2013). Eine weitere diagnostische Methode ist die optischen Kohärenztomographie (OCT). Mit Hilfe der OCT lässt sich die Reduktion der zentralen Netzhautdicke bei STGD darstellen. Teilweise sind die typischen STGD-Flecken des Fundus als Verdickung sichtbar (Kellner et al., 2008; Stephen, 2013; Wirtitsch et al., 2005).

Das Auftreten von ersten, klinischen Symptomen bei STGD-Patienten ist zeitlich variabel. Vorwiegend zeigen sich erste Krankheitszeichen im Kindesalter, sie können sich aber auch erst in der vierten oder fünften Lebensdekade manifestieren (Lambertus et al., 2015; Westeneng-Van Haften et al., 2012). Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass Patienten, die STGD in jüngeren Jahren entwickeln, eine signifikant schlechtere Prognose haben im Vergleich zu Patienten, bei denen sich die Krankheit erst in späteren Jahren manifestiert (Rotenstreich et al., 2003; Tanna et al., 2017; Westeneng-Van Haften et al., 2012).

Einleitung

Insgesamt ist die Symptomatik von STGD sehr heterogen in Beginn, Symptompräsentation, Verlauf und Fundusaussehen. Die klinische Diagnosestellung ist aufgrund dessen häufig schwierig (Fishman et al., 1999; Stephen, 2013).

2.1.2 Ätiologie

Die autosomal-dominante Form von Morbus Stargardt weist Mutationen im *ELOVL4*-Gen auf. *ELOVL4* wird für die Synthese von langkettigen, gesättigten Fettsäuren und langkettigen, mehrfach-ungesättigten Fettsäuren benötigt. Letztere werden spezifisch in Retina, Ejakulat und Gehirn exprimiert (Agbaga et al., 2008). Die autosomal-dominante Form konnte außerdem mit pathologischen Varianten im Peripherin-2-Gen (*PRPH2*) assoziiert werden (da Palma et al., 2019; Yi et al., 2012). Mutationen im ATP-binding-cassette-subfamily-A-member-4-Gen (*ABCA4*) sind für die häufigere, autosomal-rezessive Form von Morbus Stargardt verantwortlich (Allikmets et al., 1997; Bernstein et al., 2001).

2.2 Charakteristik des *ABCA4*

2.2.1 Lokalisation

ABCA4 ist auf Chromosom 1p21–p22.1 lokalisiert und setzt sich aus 50 Exonen zusammen. Die Exone besitzen eine Länge zwischen 33 und 266 Basenpaaren (bp) und der genomische Locus erstreckt sich über 150 Kilobasenpaare (kb) (Allikmets et al., 1997; Zernant et al., 2014, 2011). Sie kodieren für den 2273 Aminosäuren langen Transporter mit einer molekularen Masse von 256 Kilodalton (kDa) (Molday et al., 2010).

Einleitung

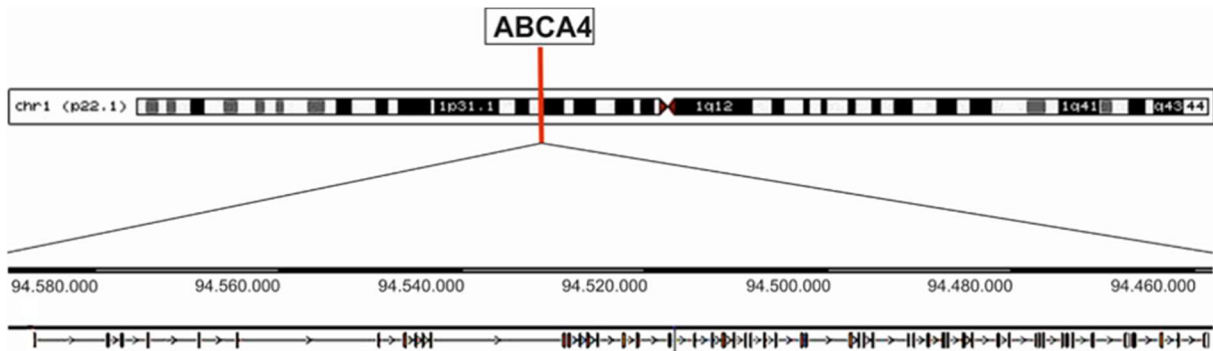


Abbildung 2: Lokalisation von *ABCA4* (modifiziert nach University-of-Santa-Cruz (UCSC) Genome Browser)

Internetadresse:

https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr1%3A93992834%2D94121148&hgsid=1458822131_f9KFAJza5GM4wMkNiztuK3Fpq75s (Aufruf am 29.01.2020)

ABCA4 ist an der Position 22.1 des kurzen Arms von Chromosom 1 lokalisiert (roter Balken). In der Vergrößerung wird *ABCA4* mit dem Verlauf in Richtung 3'-5' schematisch präsentiert. Die kleineren, senkrechten Balken in der darunterliegenden Zeile repräsentieren die Protein-kodierenden Exone.

ABCA4 wird fast ausschließlich in der Retina exprimiert (Illing et al., 1997; Molday et al., 2000). Zunächst konnte das Genprodukt nur in den Stäbchen nachgewiesen werden (Allikmets et al., 1997). Mit Hilfe von Immunhistochemie- und Western-Blot-Analysen belegten Molday et al. das Vorkommen des *ABCA4*-Proteins auch in den Zapfen (Molday et al. 2000). Das Ergebnis stimmt mit einer Studie überein, die schon 1982 das *ABCA4*-Protein in den Außensegmenten der Stäbchen und der Zapfen von Fröschen belegte (Papermaster et al., 1982).

2.2.2 Physiologische Funktion des *ABCA4*-Proteins

Das Genprodukt des *ABCA4* gehört zu den ABC-Transportern. Die ubiquitären, integralen Membranproteine wurden im Wesentlichen in allen lebenden Organismen nachgewiesen und bilden eine vergleichsweise große Proteinfamilie (Holland et al. 2003; Illing und Molday 1997). Das humane Genom kodiert für insgesamt 49 verschiedene ABC-Transporter, die durch einen energieabhängigen Prozess spezifische Substrate über die Zellmembranen transportieren. Die Proteinfamilie wird in 7 große Subfamilien (ABCA bis ABCG) gegliedert. Ein charakteristisches Merkmal der ABCA-Transporter ist die lange, extrazelluläre Domäne am N-Terminus der

Einleitung

Sequenz (Molday et al., 2010). Es wird angenommen, dass die 12 zur Subfamilie A zugehörigen ABC-Transporter, die sich in ihrer Sequenz sowie auch ihrer Proteinstruktur ähneln, dem spezifischen Transport von Lipiden dienen (Kaminski, et al. Piehler und Wenzel 2006; R. S. Molday et al. 2010). Der ABCA4-Transporter besteht aus zwei Transmembrandomänen (TMD) mit je sechs integralen Membransegmenten, zwei extrazellulären Domänen (ECD) und zwei Nukleotidbindenden Intrazellulardomänen (NBD) (**Abbildung 3**). Durch Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) an der NBD kann die Energie für den Transport über die Diskmembran generiert werden (Allikmets et al., 1997).

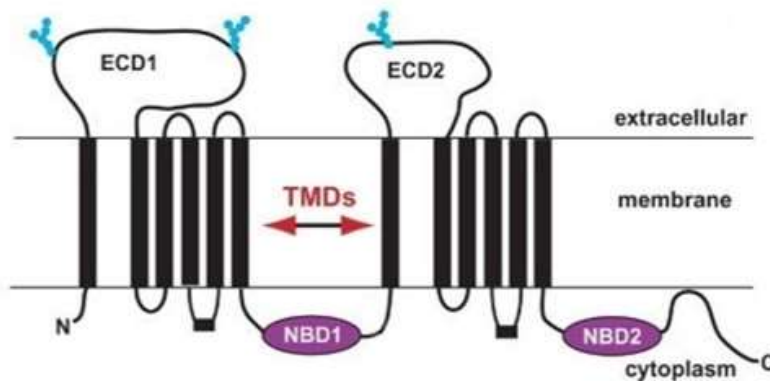


Abbildung 3: Sekundärstruktur des ABCA4 (modifiziert nach Sullivan, 2009)

Gezeigt ist die Sekundärstruktur des ABCA4-Transporters in der Diskmembran mit der ECD1 und der ECD2 und den zwei TMDs, die je 6 integrale Membransegmente enthalten. Die NBD1 und die NBD2 sind lila markiert. Der N- und C-Terminus ist auf der zytoplasmatischen Seite gekennzeichnet.

Das Protein ist für den spezifischen Transport des N-Retinylidene-Phosphatidylethanolamin (N-Retinyl-PE) verantwortlich, das über den Vitamin A Zyklus kontinuierlich aus all-trans-Retinal und Phosphatidylethanolamin (PE) reversibel gebildet wird. N-Retinyl-PE wird aus dem Lumen über die Diskmembran in das Zytoplasma des Photorezeptors transportiert. Es kann im weiteren Prozess der Signaltransduktionskaskade in 11-cis-Retinal zurückgeführt werden und wird dann dem Photorezeptor für eine weitere Signaltransduktionskaskade zur Verfügung gestellt (Tsybovsky et al., 2010).

2.2.3 Pathophysiologie

Mutationen im *ABCA4* bedingen einen Defekt des Transportmechanismus und führen zu einer Akkumulation des N-Retinyl-PE in den Membranscheiben. Durch Bindung an ein weiteres all-trans-Retinal Molekül kann es hier zur Bildung des N-retinylidene-N-retinyl-phosphatidyl-ethanolamine (A2PE) kommen (Mata et al., Weng, and Travis 2000). Im Rahmen des physiologischen Phagozytoseprozesses werden die Außensegmente durch das RPE phagozytiert und durch lysosomale Enzyme zersetzt. A2PE wird hierbei zu dem toxische N-retinylidene-N-retinyl-ethanolamine (A2E) hydrolisiert und als Hauptbestandteil von Lipofuszin in den RPE-Zellen abgelagert (**Abbildung 4**). A2E kann enzymatisch nicht weiter abgebaut werden und akkumuliert als Lipofuszingranula in den Pigmentepithelzellen (Vives-Bauza et al., 2008).

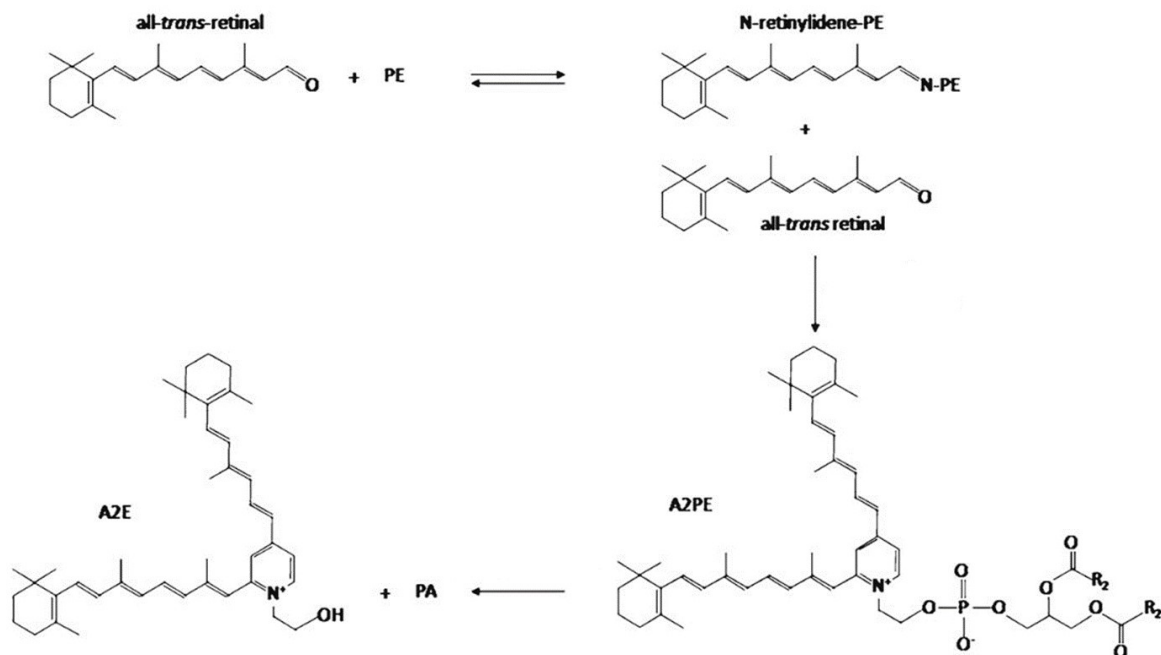


Abbildung 4: Bildung von toxischen A2E (modifiziert nach Tsybovsky et al., 2010)

All-trans-Retinal reagiert reversibel im Außensegment der Photorezeptoren mit Phosphatidylethanolamin (PE) zu N-Retinyl-PE. N-Retinyl-PE kondensiert mit einem weiteren all-trans-Retinal durch Oxidation zu A2PE und akkumuliert im Außensegment. Im sauren Milieu der Phagolysosomen der RPE-Zellen wird im Zuge der normalen Phagozytose A2PE zu A2E und Phosphatidsäure (PA) hydrolysiert.

Über unterschiedliche Mechanismen kann das zytotoxische A2E den Stoffwechsel der Zellen schädigen: Zum Beispiel beeinträchtigt die A2E-Akkumulation in den RPE-

Einleitung

Zellen die Funktion der Mitochondrien und kann die Zellen für oxidativen Stress und lichtabhängige Schäden anfälliger machen (Poliakov et al., 2014; Vives-Bauza et al., 2008). Zudem können sich nicht oder nur unvollständig abgebaute Stoffwechselprodukte durch die A2E-induzierte Hemmung der lysosomalen Aktivität anhäufen (Holz et al., 1999). Weiterhin wird angenommen, dass eine Senkung des pH-Wertes durch das überschüssige A2E erfolgen kann, wobei die Proteolyse dadurch beeinträchtigt werden kann (Finnemann et al., 2002). Schließlich führt der Einfluss von blauem Licht bei A2E-haltigen Zellen zur Einleitung der Apoptose und zum Zelluntergang (Sparrow et al., 2000). Diese Mechanismen führen letztendlich zu einer Funktionseinschränkung bis hin zum Zelluntergang der Pigmentepithelzellen (Sparrow et al., 2003; Tanna et al., 2017).

Zusammenfassend dargestellt bedingen pathogene Mutationen im *ABCA4* eine Funktionseinschränkung des *ABCA4*-Transporters. Dadurch akkumuliert das zelltoxische A2E in den Pigmentepithelzellen und über verschiedene Pathomechanismen führt dies zum Zelluntergang (Tanna et al., 2017).

2.2.4 Krankheitsassoziierte Mutationen im *ABCA4*

Die zelltoxische Akkumulation von A2E, die durch pathologische Varianten im *ABCA4* bedingt ist, wurde neben STGD auch in weiteren Erkrankungen der Netzhaut beschrieben. Ein Beispiel ist der Fundus flavimaculatus (Allikmets et al., 1997), eine spät beginnende, langsam-progressive Form des Morbus Stargardt (Gelissen und de Laey, 1985). Ebenso wurde bei altersbedingter Makuladegeneration (AMD, OMIM:153800) (Allikmets, 2000; Klevering et al., 2004), autosomal-rezessiver Retinitis pigmentosa (arRP19, OMIM: 601718) (Klevering et al., 2004; Mullins et al., 2012) und bei der Zapfen-Stäbchen-Dystrophie (ZSD OMIM: 604116) (Gill et al., 2019; Maugeri et al., 2000) krankheitsverursachende Mutationen im *ABCA4*-Gen beschrieben. Die deutlich unterschiedlichen Phänotypen können in späteren Stadien zu ähnlichen Symptomen führen, die von chorioretinaler Atrophie und starkem Visusverlust gekennzeichnet sind (Klevering et al., 2005).

Zur besseren Einordnung der Phänotypen wurde von mehreren Autoren ein Genotyp-Phänotyp-Modell vorgestellt, das sich auf den Schweregrad der Erkrankung

bezieht, der invers linear von der Restfunktion des *ABCA4*-Transportes abhängig ist. STGD stellt nach diesem Modell den mildesten Phänotyp dar, während die ZSD einem moderaten und die arRP einem schweren Phänotyp zugeordnet wird (Cremers et al., 1998; Rozet et al., 1998; Shroyer et al., 1999; Stephen, 2013).

2.3 Diagnostik von *ABCA4* in Bezug auf STGD

Für viele hereditäre Erkrankung stehen heute molekulargenetische Diagnostikverfahren zur Verfügung. In der routinemäßigen Molekulardiagnostik der STGD-Erkrankung liegt der Schwerpunkt der zu diagnostizierenden Sequenzen bisher auf den Exonen und einigen flankierenden, intronischen Basenpaaren des *ABCA4*-Gens. In diesen Sequenzen können viele, jedoch nicht alle pathogenen Varianten nachgewiesen werden (Sangermano et al., 2019).

Über 900 krankheitsassoziierte *ABCA4*-Varianten wurden bisher identifiziert (Zernant et al., 2014) und eine Korrelation mit einer Reihe von retinalen Dystrophien belegt. 72% dieser identifizierten Varianten wurden in STGD-Patienten nachgewiesen (Schulz et al., 2017). Darunter sind verschiedene Genmutationsarten beschrieben worden, wie Frameshift-, Nonsense-, Missense-, In Frame-Mutationen, Spleiß-Veränderungen, große Deletionen und zum Teil komplexe Rearrangements (Human Gene Mutation Database, <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Größtenteils liegen die Mutationen als sogenannte Missense-Varianten vor (Garces et al., 2018; Lewis et al., 1999). Eine Missense-Mutation ist eine nicht-synonyme Punktmutation, die den Einbau einer anderen Aminosäure in das Protein verursacht. Im Allgemeinen sind Missense-Varianten mit einem spät-einsetzenden, milden Phänotyp assoziiert. (Briggs et al., 2001; Fujinami et al., 2013; Tanna et al., 2017).

Die molekulargenetische Diagnostik von STGD ist durch die hohe genetische Heterogenität und die große Anzahl an Varianten erschwert (Huang et al., 2015). Nur bei maximal 10% der STGD-Patienten wurden die häufigsten der krankheitsassoziierten *ABCA4*-Varianten (z.B. G1961E, G863A/ eIG863 und A1038V) identifiziert (Allikmets, 2000).

Der Phänotyp eines autosomal-rezessiven Erbgangs manifestiert sich, wenn beide Allele von *ABCA4* eine pathogene Mutation aufweisen. Insgesamt sind die

Einleitung

Mutationsidentifikationsraten in Abhängigkeit von mehreren Faktoren, einschließlich des Phänotyps und der verwendeten diagnostischen Methode, sehr unterschiedlich (Downes et al., 2012). So wurden bei etwa 70% der STGD-Patienten homozygote oder compound-heterozygote Mutationen nachgewiesen. Bei 17 - 30% der klinisch diagnostizierten Patienten wurden nur eine der beiden zu erwartenden pathogenen Mutationen identifiziert und bei 10 – 15% keine (Jiang et al., 2016; Zaneveld et al., 2016; Zernant et al., 2014, 2011). Die Mutationserkennungsraten sind sehr unterschiedlich. Trotz der in den letzten Jahren steigenden Nachweisraten von genetischen *ABCA4*-Varianten durch moderne analytische Verfahren wie das Next-Generation-Sequencing (NGS) bleiben viele der klinisch-diagnostizierten STGD-Fälle molekulargenetisch ungelöst (Nassisi et al., 2018).

Die verbleibenden, ungelösten *ABCA4*-Varianten sind Gegenstand der aktuellen Forschung. 2017 konnten Zernant et al. eine kodierende, hypomorphe *ABCA4*-Variante c.5603A>T (p.Asn1868Ile) in 10% der ungelösten STGD-Fälle einer Kohorte mit 643 Patienten überwiegend europäischer Abstammung nachweisen. Zuvor wurde diese Variante als nicht Krankheits-assoziiert (*benign*) gewertet, aufgrund der hohen *Minor-Allele-Frequency* (MAF) (~7%) in der Durchschnittsbevölkerung (Zernant et al., 2017).

Pathogene Mutationen können sich auch in intronischen Bereichen befinden (Sangermano et al., 2019), die bei einer routinemäßigen DNA-Diagnostik in der Regel nicht untersucht werden. Mit Hilfe der Genomsequenzierung besteht die Möglichkeit Mutationen in intronischen Sequenzen zu identifizieren, allerdings ist es schwierig, die kausalen Varianten zu bestimmen, ohne die resultierenden Messenger-RNA- (mRNA) oder Proteindefekte näher zu analysieren (Sangermano et al., 2019). Unter anderem können intronische Varianten eine kryptische Splicestelle aktivieren und damit das korrekte Spleißen der mRNA und infolgedessen die Funktionsfähigkeit des Transporters beeinflussen (Braun et al., 2013; Sullivan, 2009). Es ist zu beachten, dass *ABCA4* spezifisch in Photorezeptoren exprimiert wird, sodass eine Transkriptuntersuchung aus einer Blutprobe nicht möglich erscheint (Zernant et al., 2011).

2.4 Therapie des STGD

Nach aktuellem Stand der Forschung ist eine Prophylaxe oder kurative Therapie für Morbus Stargardt nicht möglich. Studien haben gezeigt, dass in Dunkelheit aufgewachsene Mäuse mit einer Knockout-Mutation in *ABCA4* (*Abca4*^{-/-} Mäuse), kein zytotoxisches A2E akkumulieren. Folglich wird angenommen, dass das Vermeiden von exzessivem Lichteinfluss vorteilhaft sein könnte (Mata et al., 2000). In einem weiteren Ansatz wird vorausgesetzt, dass eine Reduzierung des Vitamin-A-Spiegels die Produktion von all-trans-Retinal und somit von A2E verringert. Unter Verwendung von Deuterium-Vitamin A wird die Dimerisierung von Vitamin A reduziert und die Möglichkeit zur Produktion von A2E eingeschränkt. Bei Mäusen konnte mit Hilfe des Präparates eine Verbesserung des Phänotyps festgestellt werden. Die erforderliche diätetische Kontrolle ist beim Menschen möglicherweise nicht durchführbar. Jedoch zeigte eine klinische Phase-I-Studie bereits eine gute orale Toleranz von Deuterium-Vitamin A. Eine weitere klinische Studie wurde bereits eingeleitet, um die Bewertung von Wirksamkeit und Verträglichkeit zu erweitern (Piotter et al., 2021).

In der Gentherapie konnte humane *ABCA4*-cDNA in *Abca4*^{-/-} Mäuse übertragen werden. Kong et al belegte, dass A2E in den RPE-Zellen der behandelten Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert akkumulierte (Kong et al., 2008). Darüber hinaus wurde eine klinische Studie mittels des lentiviralen Vektors StarGen™ initiiert, der das *ABCA4*-Gen überträgt. Der Vektor wird durch eine subretinale Injektion appliziert mit dem Ziel die retinalen Photorezeptoren zu transfizieren und die Expressierung des *ABCA4*-Proteins in diesen Zellen zu ermöglichen (Carvalho and Vandenberghe, 2015). Trotzdem konnte bisher noch keine kurative Therapie für *ABCA4*-assoziierte Krankheiten entwickelt werden (Zongchao Han et al., 2014). Auch Gentherapie-Ansätze mit nicht-viralen Vektoren werden erforscht (Farjo et al., 2006). Ebenso sind Stammzelltherapien und pharmakologische Ansätze Gegenstand der aktuellen Forschung (Schwartz et al., 2015; Smith et al., 2015; Tanna et al., 2017).

2.5 Genom-Editierung mittels CRISPR-Cas

2.5.1 Das CRISPR-Cas9-System

1987 wurden die clustered regularly interspaced palindromic repeats (CRISPR) im Genom von *Escherichia coli* von japanischen Forschern erstmals beschrieben (Ishino et al., 1987). CRISPR sind Abschnitte sich wiederholender DNA, die regelmäßig von Trenn-DNA-Sequenzen (*Spacern*) unterbrochen werden. In Bakterien und Archaeen wurden später unterschiedliche Subtypen des CRISPRs nachgewiesen (Mojica et al., 2000). Die Subtypen unterscheiden sich in ihrem Ablauf und in den beteiligten CRISPR-assoziierten Proteinen (Cas) und können in drei Hauptgruppen unterteilt werden: Cas3 in Typ I-Systemen, Cas9 in Typ II und Cas10 in Typ III (Jinek et al., 2012; Makarova und Koonin, 2015).

Das Typ II-System mit der Cas9-Endonuklease des *Streptococcus Pyogenes* ist ein dreistufiges Ribonukleinsäure-vermitteltes (RNA) adaptives Immunsystem, welches imstande ist bei einer wiederholten Infektion gezielt Doppelstrangbrüche in Phagen-DNA zu induzieren (Jinek et al., 2012). In der adaptiven Phase dieses Prozesses werden in CRISPR kurze Fragmente (Protospacer) der Phagen-DNA in das Genom des Wirtes integriert (Terns und Terns, 2012). In der Expressionsphase entsteht durch Transkription der Repeat-Elemente die Vorläufer-CRISPR RNA (pre-crRNA) (Deltcheva et al., 2011). Deren weitere Prozessierung zur crRNA erfolgt unter Anwesenheit der Cas9 und mit Hilfe einer partiell zur pre-crRNA komplementären transactivating-crRNA (tracrRNA). Während der Interferenzphase ist die maturierte crRNA innerhalb eines crRNA-tracrRNA Komplexes imstande, die zu den Protospacern komplementären Abschnitte der Phagen-DNA zu erkennen und das Cas9 Protein dorthin zu rekrutieren. Dieses erzeugt anschließend in seiner Funktion als Endonuklease gezielt Doppelstrangbrüche in die Zielsequenz (Jinek et al., 2012). Zusätzlich wird für die spezifische Bindung an die Phagen-DNA das Protospacer-adjactant-motif (PAM) benötigt, das mit einer Länge von zwei bis sechs Basenpaaren unmittelbar am 3'-Ende der Zielregion lokalisiert ist (Deltcheva et al., 2011; Shah et al., 2013)

Durch weitere Forschung an CRISPR/Cas9 ist es gelungen, auch in Eukaryoten gezielt Bereiche der DNA mit Hilfe einer guide-Ribonukleinsäure (guideRNA) in vitro zu modifizieren. Die guideRNA ersetzt funktionell den oben beschriebenen crRNA-

tracrRNA Komplex und enthält eine individuell anpassbare, 20bp lange Nukleotidsequenz, welche komplementär zur gewünschten Zielregion ist (Ma et al., 2014; Mali et al. 2014).

Das beschriebene CRISPR-Cas9-System erlaubt vielfältige Einsatzmöglichkeiten in verschiedenen Bereichen. Zum Beispiel werden in der Genforschung Genome von Organismen *in vitro* und *in vivo* manipuliert. Kausale Zusammenhänge und Genfunktionen können dadurch besser verstanden werden und eröffnen unter anderem neue Möglichkeiten für gentechnische Therapien oder Medikamente hereditärer Erkrankungen (Hsu et al., 2014; Ma et al., 2014).

2.5.2 CRISPR-dCas9-VPR-System

In dieser Doktorarbeit wird CRISPR/Cas9 in einem erweiterten Kontext verwendet. Durch gezielte Mutagenese wurde die Endonuklease-Fähigkeit der Cas9 deaktiviert (dCas9). Die Eigenschaft mit der Zielsequenz zu interagieren, bleibt jedoch erhalten. Die dCas9 wurde mit den Transkriptionsverstärkern VP64, p65 und Rta gekoppelt, indem die Transkriptionsfaktoren p65 und Rta an den C-Terminus von dCas9-Vp64 angefügt wurden (Mali et al., 2014; Perez-Pinera et al., 2013; Wiegand et al., 2015). In einem Komplex formen sie nun einen 3-teiligen Aktivator, den sogenannten dCas9-VPR. Dieser kann mit Hilfe einer guideRNA gezielt an den Promoter bzw. regulatorische Sequenzen eines Gens rekrutiert werden und bewirkt dort eine Steigerung der Genexpression (Maeder et al., 2014; Wiegand et al., 2015).

Einleitung

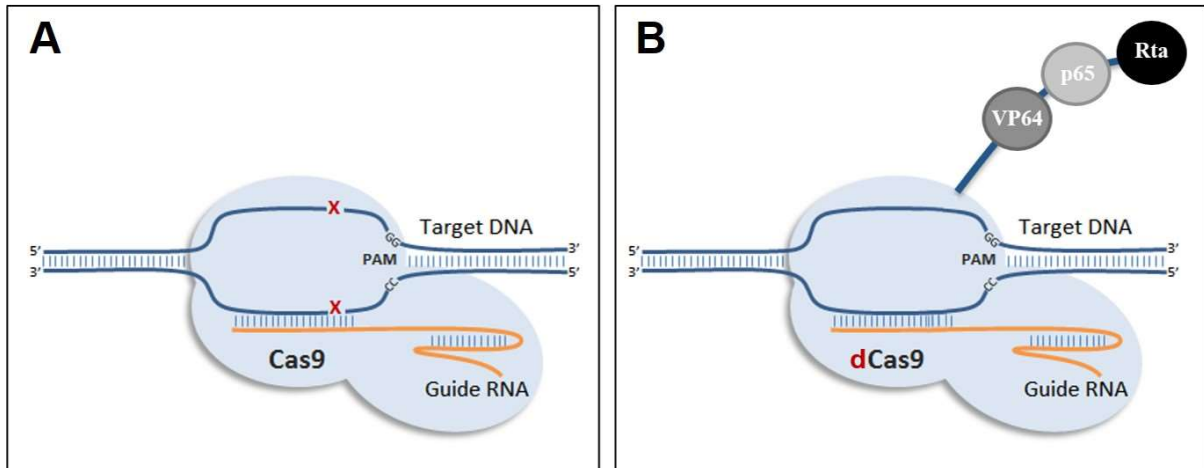


Abbildung 5: Das CRISPR-Cas9-System und das CRISPR-dCas9-VPR-System (modifiziert nach Mohamed Saleem, 2014)

(A) Abgebildet ist das CRISPR-Cas9-System. Die gelb-markierte guideRNA lotst die hellblau dargestellte Endonuklease Cas9 zur Zielsequenz. Für die spezifische Erkennung der Zielsequenz wird die PAM-Sequenz benötigt. Die Endonuklease Cas9 induziert in die gebundene DNA-Doppelstrangbrüche, die mit roten Kreuzen dargestellt sind (B) Dargestellt ist das CRISPR-Cas9-VPR-System. Die guideRNA leitet die dCas9, die aufgrund gezielter Mutagenese keinen Doppelstrangbruch mehr induziert, zur Zielsequenz. Mit Hilfe der Transkriptionsfaktoren VP64, p65 und Rta wird die Genexpression verstärkt.

Das dCas9-VPR-System wurde in mehreren Studien schon erfolgreich angewandt. Beispielsweise wurde in Lungenkrebszellen eine funktionelle Reaktivierung von epigenetisch stillgelegten Tumorsuppressorgenen erreicht (Garcia-Bloj et al., 2016) und Lin et al. beschrieben eine erfolgreiche in vivo-Aktivierung von gewünschten Zielgenen in *Drosophila* (Lin et al., 2015).

In verschiedenen Studien mit CRISPR-dCas9-Systemen wurde nachgewiesen, dass eine kombinierte Zugabe von drei bis vier guideRNAs zu einer Zelllinie eine erhöhte Genaktivierung implizieren kann (Gilbert et al., 2013; Maeder et al., 2013; Perez-Pinera et al., 2013; Wiegand et al., 2015). Moses et al zeigte indessen, dass dasselbe Gen in einer Zelllinie mit Hilfe einer Kombination am stärksten exprimiert wurde und in einer anderen Zelllinien eine einzelne guideRNA die höchste Expression des Gens aufwies (Moses et al., 2019).

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Die molekulargenetische Diagnostik der autosomal-rezessiven Form des Morbus Stargardt wird durch die hohe genotypische und phänotypische Heterogenität

Einleitung

erschwert. Auch nach einer vollständigen Sequenzierung der kodierenden Bereiche von *ABCA4* bleiben viele Fälle ungeklärt (Schulz et al., 2017). Eine nähere Analyse der intronischen Regionen, die nicht durch die routinemäßige Diagnostik abgedeckt ist, wird durch die Größe des Gens von 150 kb, sowie durch repetitive Sequenzen im *ABCA4*-Genort erschwert (Braun et al., 2013). Zusätzlich wird *ABCA4* spezifisch in Photorezeptoren exprimiert (Illing und Molday, 1997), sodass eine Transkriptuntersuchung aus einer Blutprobe nicht möglich erscheint.

Eine bisher nicht existente Methode die mRNA des *ABCA4* aus den peripher mononuklearen Zellen des Blutes (PBMCs) von Patienten zu gewinnen, könnte es erlauben, den Einfluss von genetischen Varianten auf intronische und regulierende Sequenzen des *ABCA4*-Gens direkt auf Transkriptebene nachzuweisen. Diese Doktorarbeit soll als initialen Schritt die Genexpression von *ABCA4* mit Hilfe der CRISPR-Cas9-Technologie gezielt in HEK293-T-Zellen aktivieren und verstärken. Zukünftig soll die entwickelte Methodik auf PBMCs übertragen werden.

Im Rahmen der Arbeit sollen bioinformatisch ermittelte guideRNAs, die den Promoterbereich homogen abdecken, identifiziert und auf ihre Spezifität und Effizienz gegenüber der Zielsequenzen des *ABCA4*-Gens getestet werden. Weiterhin dienen die getesteten guideRNAs dem Nachweis der Aktivierung der Genexpression in HEK293-T-Zellen. Kombinationen aus guideRNAs und eine Zeitreihe sollen erstellt werden, um die Methodik auf weitere Faktoren zu testen.

In ungelösten STGD-Fällen können so möglicherweise die fehlenden krankheitsverursachenden *ABCA4*-Allele identifiziert werden, was der Diagnosesicherung, der Verlaufsprognose und der Risikoabschätzung der Familienplanung dient. Zudem ermöglicht es ein besseres Verständnis des Einflusses von intronischen Varianten auf das *ABCA4*-Transkript und eine Erweiterung des Mutationsspektrums des Gens, um eine breitere Basis für Diagnostik und Forschung in *ABCA4*-assoziierten Erkrankungen zu bilden.

3 Material

3.1 Bakterienstämme

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme

<i>Stamm</i>	<i>Referenz</i>
Escherichia coli DH5 α	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Escherichia coli Stlb3	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3.2 Zelllinien

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien

<i>Zelllinie</i>	<i>Organisms</i>	<i>Ursprungsgewebe</i>	<i>Referenz</i>
HEK293T	Homo sapiens	Embryonale Nierenzelle	ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland

3.3 Vektoren

Tabelle 3: Verwendete Vektoren

<i>Vektorbezeichnung</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Referenz</i>
pGem [®] -T	Amplifikation und Selektion klonierter Sequenzen	Promega Corporation, Madison, WI, USA
pCAG-EGxxFP	Träger der Promotersequenz von ABCA4 zwischen der EGxxFP-Kassette; Leervektor als Negativkontrolle bei Transfektionen	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK
pU6-(BbsI)_CBh-Cas9-T2A-mCherry	Träger der ABCA4-spezifischen guideRNAs und der Cas9-Endonuklease, Leervektor als Negativkontrolle bei	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK

Material

	Transfektionen	
px330_EGFPo	Träger der ABCA4-spezifischen guideRNAs	Modifizierter px330_mCherry Vektor; ohne mCherry - Marker; ohne Cas9-Endonuklease; mit EGFP - Marker
SP-dCas9-VPR	Träger der dCas9, gekoppelt mit den Aktivatoren VP64-p65-Rta	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK

3.4 Oligonukleotide

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

3.4.1 Oligonukleotide der guideRNAs

Tabelle 4: Zur Klonierung der guideRNAs verwendete Oligonukleotide

<i>guideRNA-Bezeichnung</i>	<i>5'-3'- Sequenz</i>
Guide_1_ABCA4_F	CACCGggcctcagctctgaccaatc
Guide_1_ABCA4_R	AAACgattggtcagagctgaggccC
Guide_2_ABCA4_F	CACCGaacgccggttaagagcgcctc
Guide_2_ABCA4_R	AAACgaggcgctcttaacggcggtC
Guide_3_ABCA4_F	CACCGtacacataagcccttagttg
Guide_3_ABCA4_R	AAACcaactaagggttatgtgtaC
Guide_4_ABCA4_F	CACCGaaagggagccaacacagtg
Guide_4_ABCA4_R	AAACacactgtgtggctccctttC
Guide_5_ABCA4_F	CACCGgcccagccacttgtgtc
Guide_5_ABCA4_R	AAACaaagacacaagtggctgggcC
Guide_6_ABCA4_F	CACCGaatgggaaaccaagaccctc
Guide_6_ABCA4_R	AAACgagggtcttggttccattC
Guide_7_ABCA4_F	CACCGtacctaaagacatccccctc
Guide_7_ABCA4_R	AAACgagggggatgtctttaggtaC
Guide_8_ABCA4_F	CACCGctctttgcataaatataggc
Guide_8_ABCA4_R	AAACgcctatattatgcaaagagC
Guide_9_ABCA4_F	CACCGgccggcagtcagggtttgac
Guide_9_ABCA4_R	AAACgtcaaaccctgactgccggcC

Material

Guide_10_ABCA4_F	CACCGgatctgccgagtgagtcgat
Guide_10_ABCA4_R	AAACatcgactcactcggcagatcC
Guide_11_ABCA4_F	CACCGgtcattatggtcagctagtt
Guide_11_ABCA4_R	AAACaactagctgaccataatgacC
Guide_12_ABCA4_F	CACCGtgctgggttgactcatcacc
Guide_12_ABCA4_R	AAACgggtgatgagtcaaccagcaC
Guide_13_ABCA4_F	CACCGcttctgtttggggtgtccct
Guide_13_ABCA4_R	AAACagggacaccccaaacagaagC
Guide_14_ABCA4_F	CACCGaagttccactgcgaagtgcc
Guide_14_ABCA4_R	AAACggcacttcgcagtggaactC
Guide_15_ABCA4_F	CACCGgactctagacccttgagacc
Guide_15_ABCA4_R	AAACgggtctcaagggtctagagtcC
Guide_16_ABCA4_F	CACCGacttcatagagtttgcggtc
Guide_16_ABCA4_R	AAACgaccgcaaactctatgaagtC
Guide_17_ABCA4_F	CACCGgtccttctcctgggtgattaa
Guide_17_ABCA4_R	AAACttaatcaccaggagaaggacC

Großgeschriebene Basen: benötigte Oligonukleotide zur Ligation in den Expressionsvektor, kleingeschriebene Basen: Oligonukleotide der guideRNA

3.4.2 Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung

Tabelle 5: Für PCR und Sequenzierung verwendete Oligonukleotide.

Primerbezeichnung	5' - 3'-Sequenz / Referenz	Verwendung
ABCA4_Forward_1_EcoRI	GAATTCccgtgtttacaaccagaccg	PCR der Zielsequenz ABCA4 zur Klonierung in pGem®-T-Vektor, Kolonie-PCR des pGem®-T-Vektor-Konstruktes
ABCA4_Reverse_1_BamHI	GGATCCgagttccaccacaaagcgaa	
ABCA4_Forward_2_EcoRI	GGATCCacaaccagaccgcaaactct	
ABCA4_Reverse_2_BamHI	GGATCCcaggggtccagttcttcaga	
M13-Forward	cacgacgttgtaaaacgac	Sequenzierung von pGem®-T-Konstrukten
M13-Reverse	ggataacaatttcacacagg	
Hu6F	gagggcctatttccatgatt	Sequenzierung von guideRNA-Konstrukten
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	cDNA-Synthese der isolierten RNA aus HEK293T-Zellen

Material

ABCA4_Ex38_F ABCA4_Ex40_R	ttcctgtttgatgtccccag gttcttccaatcagggtccc	PCR zur Überprüfung der Übereprimierung von <i>ABCA4</i>
GUSB6 GUSB7	gatccacctctgatgttcac cctttagtgtccctgctag	Houskeeper-PCR

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

3.4.3 Klonierte Vektorkonstrukte

Tabelle 6: Durch Klonierung hergestellte Vektorkonstrukte

<i>Name des Vektorkonstrukts</i>	<i>Eigenschaft</i>	<i>Verwendung</i>
<i>ABCA4_pCAG-EGxxFP</i>	Träger der Promotersequenz von <i>ABCA4</i> zwischen der EGxxFP-Kassette	Transfektion in HEK293T-Zellen
<i>ABCA4_px330_mCherry_G1</i>	Träger der guideRNAs, der Cas9-Endonuklease und des mCherry-Fluoreszenz-Markers	Transfektion in HEK293T-Zellen
<i>ABCA4_px330_mCherry_G2</i>		
<i>ABCA4_px330_mCherry_G3</i>		
<i>ABCA4_px330_mCherry_G4</i>		
<i>ABCA4_px330_mCherry_G5</i>		
<i>ABCA4_px330_mCherry_G6</i>		
<i>ABCA4_px330_mCherry_G7</i>		
<i>ABCA4_px330_mCherry_G8</i>		
<i>ABCA4_px330_mCherry_G9</i>		
<i>ABCA4_px330_mCherry_G10</i>		
<i>ABCA4_px330_mCherry_G11</i>		
<i>ABCA4_px330_mCherry_G12</i>		
<i>ABCA4_px330_mCherry_G13</i>		
<i>ABCA4_px330_mCherry_G14</i>		
<i>ABCA4_px330_mCherry_G15</i>		
<i>ABCA4_px330_mCherry_G16</i>		
<i>ABCA4_px330_mCherry_G17</i>		
<i>ABCA4_px330_EGFPo_G1</i>	Träger der guideRNAs und des EGFP-Fluoreszenz-Markers	Transfektion in HEK293-T-Zellen
<i>ABCA4_px330_EGFPo_G2</i>		
<i>ABCA4_px330_EGFPo_G3</i>		
<i>ABCA4_px330_EGFPo_G4</i>		
<i>ABCA4_px330_EGFPo_G7</i>		

ABCA4_px330_EGFPo_G9	
ABCA4_px330_EGFPo_G12	
ABCA4_px330_EGFPo_G16	

3.5 Enzyme

Tabelle 7: Verwendete Enzyme

<i>Enzym</i>	<i>Referenz</i>
BamHI-HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
EcoRI-HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
FastDigest Bpil	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GoTaq® Polymerase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Haus-Taq-Polymerase	Institut für Humangenetik, Uniklinikum, Regensburg, Deutschland
Quick Cip	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Quick Ligase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
RecBCD Exonuclease	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
RevertAid™ Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
RNAse-free DNase I	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4 Polynucleotide Kinase (PNK)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

3.6 Reaktionssysteme

Tabelle 8: Verwendete Reaktionssysteme

<i>Reaktionssystem</i>	<i>Referenz</i>
BigDye Terminator v1.1, v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
NucleoBond® XtraMidi	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG,

Material

	Düren, DEUTSCHLAND
NucleoSpin® Gel and PCR-Clean-up	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, DEUTSCHLAND
PureLink® RNA Mini Kit	Kaneka Eurogentec S.A., Seraing, Belgien
QIAshredder	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
TransIT®-2020 Transfektionsreagenz	Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA

3.7 Molekularmassenstandard

Tabelle 9: Verwendeter Molekularmassenstandard

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

3.8 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien

<i>Chemikalien</i>	<i>Referenz</i>
Agarose Biozym LE	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ampicillin Natriumsalz, C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaO ₄ S	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Bacto Agar	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid, CaCl ₂	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Chloroquin, C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
DNase I, RNase-free	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland
Ethanol, C ₂ H ₆ O	Chemikalienlager der Universität Regensburg, Deutschland
Ethidiumbromid, C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃ in H ₂ O, 0,07 %	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Material

Ethylendiamintetraessigsäure	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Glycerin 99,5 %, C ₃ H ₈ O ₃	Chemikalienlager der Universität Regensburg, Deutschland
HiDi™ Formamid, CH ₃ NO	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol, C ₃ H ₈ O	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin (Pen/Strep)	GE Healthcare, Galfont St Giles, Großbritannien
Poly-L-Lysin Hydrobromid (0.1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β-Mercaptoethanol, HSCH ₂ CH ₂ OH	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin (0,5 %) - Ethylendiamintetraessigsäure (0,2 %) 1x in PBS	GE Healthcare, Galfont St Giles, Großbritannien

3.9 Puffer und Medien

Tabelle 11: Verwendete Puffer und Medien

<i>Puffer / Medien</i>	<i>Zusammensetzung / Referenz</i>	<i>Menge</i>
10x Cutsmart® Puffer	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA	
10x FastDigest Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
10x Haus-Taq-Puffer (15 mM)	Institut für Humangenetik, Uniklinikum, Regensburg, Deutschland	
10x T4 PNK Puffer	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA	
10x T4-Ligationspuffer	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA	
2x HBS	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ HEPES H ₂ O dest.	280 mM 10 mM 1,5 mM 50 mM
2x Quickligase Reaction Puffer	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA	
2x Rapid Ligation Puffer	Promega Corporation, Madison, WI, USA	

Material

5x BigDye® Terminator Puffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
5x GoTaq® Puffer	Promega Corporation, Madison, WI, USA	
5x Reaction Puffer für Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
5x TBE Puffer	Tris Borsäure Ethylendiamintetraessigsäure H ₂ O dest.	0,5 M 0,5 M 10 mM
DMEM High Glucose Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	Fetal Calf Serum 10 % Pen/Strep 1 %
Dulbecco's PBS	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	
Fetal Calf Serum	GE Healthcare, Galfont St. Giles, GB	
Haus-Taq-Polymerase 10x Puffer	KCl Tris, pH 9,0 MgCl ₂ Triton X	500 mM 100 mM 15 mM 1 % (v/v)
LB-Medium	Trypton Hefeextrakt NaCl H ₂ O dest.	1 % w/v (10g) 0,5 % w/v (5g) 1 % w/v (10g) 1 L
LB-Platten	Trypton Hefeextrakt NaCl Bacto-Agar H ₂ O dest.	1 % w/v (10g) 0,5 % W/V (5g) 1 % w/v (10g) 15 % w/v (15g) 1 L
NEBuffer 4	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA	
OptiMEM™ I Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
RDD-Puffer	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland	
SOC-Medium	Trypton Hefeextrakt NaCl KCl	2 % (w/v) (20 g/l) 0,5 % (w/v) (5 g/l) 10 mM (0,5 g/l) 2,5 mM (0,2 g/l)

Material

Glukose	20 mM (20ml)
H ₂ O dest.	1 L

3.10 Geräte

Tabelle 12: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Abzug	Wesemann GmbH – Zentrale, Syk, Deutschland
Accu-Jet Pipittiergerät	Brand, Wertheim, Deutschland
Autoklav V-150	Systec GmbH, Wetttenberg, Deutschland
BlueMarine 200 Gelelektrophoresekammer	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
BluePower Plus Netzgerät	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Brutschrank für Bakterien 37°C	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Ceromat R Schüttelinkubator	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland
Eismaschine AF 100	Scotsman, VerNicht Hills, IL, USA
Feinwaage Explorer	OHAUS, Nänikon, Schweiz
Glasflaschen	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Glaspipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Inkubator Zellen 37 °C	Kendro Lab Products, Langenselbold, Deutschland
NanoDrop® Spectrophotometer ND1000	NanoDrop, Wilmington, USA
Nikon Eclipse TE2000-S Mikroskop	Nikon Instruments Europe BV, NE
Sterilbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Tecan Spark® Microplate Reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Thermocycler T Gradient	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermocycler T3	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Thermomixer compact Heizblock	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transferpipette® 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transferpipette® 100 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Transferpipette® 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Material

Transilluminator UST-30M-8R	BioView Ltd., Billerica, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Vortex Microspin FV-2400	Biosan, Riga, Latvia
Waage	SCALTEC Instruments GmbH, Heiligenstadt, Deutschland
Wasserbad W12	Labortechnik Medingen, Arnsdorf, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R (Kühlzentrifuge Falcontube)	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

3.11 Software

Tabelle 13: Verwendete Software

<i>Software</i>	<i>Referenz</i>
Corel Draw	Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada
Corel PHOTO-PAINT	Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada
ImageJ	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
SnapGene 2.8.2	GSL Biotech LLC, Chicago, USA

4 Methoden

4.1 Software-gestützte Analyse

Das Programm des Zhang Labors, unter der Webadresse <http://crispr.mit.edu>, ermöglicht die Suche von guideRNAs und deren zugehörigen PAMs.

Eine Lokalisation und Prüfung der Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) wurde über den UCSC-Genome-Browser und den Web-Server *Ensembl.org* durchgeführt. Als SNPs werden in der Genetik verschiedene Variationen einzelner Basenpaare innerhalb eines DNA-Strangs bezeichnet.

Gen-spezifische Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) nach den voreingestellten Standardbedingungen für die entsprechende Zielregion generiert und sind in **Tabelle 4** aufgelistet.

Die gesammelten Informationen wurden übersichtlich mit dem Programm SnapGene dargestellt und kontrolliert. Ebenfalls diente dieses Programm der abgleichenden Überprüfung der Sequenzierungen von klonierten Vektoren.

4.2 Klonierung von Vektoren

Zur Überprüfung der guideRNA Spezifität wurde ein System aus zwei unterschiedlichen Vektoren verwendet. In den einen Vektor (pCAG-EGxxFP) ist die Zielsequenz des *ABCA4*-Promoters in die kodierende Sequenz für das grün fluoreszierende Protein EGFP kloniert worden. Diese wurde dadurch unterbrochen. Des Weiteren wurde mit jeder der in **Tabelle 4** aufgelisteten guideRNAs, je ein rot fluoreszierender pU6-(BbsI)_CBh-Cas9-T2A-mCherry-Vektor (px330_mCherry-Vektor) generiert. Neben der einzelnen guideRNA, befindet sich auch die kodierende Sequenz für die Cas9-Endonuklease in diesem Vektor. Bei erfolgreicher Klonierung und anschließender Transfektion in Human Embryonic Kidney (HEK) 293T-Zellen, wurde nach 48 Stunden (h) Grün und Rot fluoreszierendes Licht unter dem Nikon Mikroskop detektiert. Ziel dieses Prozesses war, die verschiedenen guideRNAs auf ihre Spezifität zu überprüfen und gegenüber einer Kontrolle zu vergleichen.

Im Folgenden wird die schrittweise Herstellung des Vektors pCAG-EGxxFP und der px330_mCherry Klone beschrieben.

4.2.1 Amplifizierung der Zielsequenz mittels PCR

Die Promotersequenz des *ABCA4* wurde mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ausgehend von menschlicher, genomischer DNA amplifiziert. Die PCR ist ein gängiges Verfahren, um DNA mit Hilfe des Enzymes DNA-Polymerase, exponentiell zu vervielfältigen. Im gleichen Zuge wurde die Promotersequenz mit Restriktionsschnittstellen versehen, die von Bedeutung für die anschließende Klonierung in die Zielvektoren sind. In **Tabelle 5** sind die verwendeten Primer, die 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt wurden, aufgelistet. Für die zwei synthetisierten Primer wurden je ein Ansatz mit folgenden Komponenten (**Tabelle 14**) und Mengen zusammengestellt, um *ABCA4* ausgehend von einer humanen genomischen DNA zu vervielfältigen.

Tabelle 14: PCR-Ansatz

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
5 x GoTaq® Puffer	5 µl
Primer Forward	1 µl
Primer Reverse	1 µl
GoTaq® Polymerase	0,1 µl
Aqua destillata (A.d.)	13,9 µl
DNA Template (humane genomische DNA)	2 µl

Die PCR erfolgte im Thermocycler unter folgenden Bedingungen (**Tabelle 15**). Der Vorlauf des Heizdeckels wurde auf 99°C eingestellt.

Tabelle 15: Schritte des PCR-Programms

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Wiederholung</i>
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	33 Zyklen
Annealing	58 °C	30 s	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Pause	15 °C	∞ min	

Im weiteren Versuchsverlauf wurden ausschließlich die Primer *ABCA4_Forward_2_EcoRI* und *ABCA4_Reverse_2_BamHI* (**Tabelle 5**) angewendet.

4.2.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Visualisierung von DNA-Fragmenten wurde eine Gelelektrophorese mit einem 1 % - Agarosegel bei 200 Volt (V) durchgeführt. Das Gel wurde mit den Komponenten, welche in **Tabelle 16** dargestellt sind, hergestellt und mit Taschen versehen.

Tabelle 16: Herstellung eines 1 %-Agarosegels

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
Agarose Biozym LE	1,5 g
5x TBE Puffer	150 ml
Ethidiumbromid 0,07 %	2 Tropfen

Nach Aushärtung des Gels, ermöglichten diese Taschen die Ladung mit dem Molekularmassenstandard und den Proben, die jeweils mit 5 µl Bromphenolblau versetzt wurden. Nach einer 25-minütigen Laufzeit, in der sich die Ansätze gemäß ihrem Molekulargewicht auftrennten, konnten die einzelnen Banden unter dem UV-Transilluminator detektiert werden.

4.2.3 Extraktion und Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegel

Mit Hilfe des UV-Transilluminators und eines Skalpells erfolgte das Ausschneiden der entsprechenden Bande. Aufgereinigt wurde das Produkt mit Hilfe des NucleoSpin® Gel and PCR-Clean-up Kits. Hierfür wurden pro 100 Milligramm (mg) Gel 200 µl NTI Puffer pipettiert. Anschließend wurden die Suspension zur vollständigen Lösung bei 50 °C im Thermomixer für 10 Minuten (min) inkubiert und auf eine NucleoSpin®-Säule geladen. Nach Zentrifugation von 1 min bei 11.000 Umdrehungen wurde der gesammelte Durchfluss verworfen. Um die Membran zu waschen erfolgte eine Zugabe von 650 µl NT3 Puffer auf die Säule und eine Zentrifugation von 1 min bei 11.000 Umdrehungen. Der Durchfluss wurde ebenfalls

verworfen. Nicht durchgeführt wurde der optionale zweite Waschvorgang. Eine Trocknung der Membran wurde bei einer erneuten Zentrifugation bei gleichen Einstellungen erreicht. In der Zwischenzeit wurden 15 µl des Lösungspuffers NE auf 70 °C erwärmt und auf die getrocknete Membran appliziert. Nach Zentrifugation für 1 min bei 10.000 Umdrehungen wurde der Schritt zur Maximierung der Ausbeute wiederholt. Die aufgereinigte DNA wurde abschließend auf ein Volumen von 30 µl mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

4.2.4 Ligation im pGem®-T-Vektor

Es folgte eine Ligation des aufgereinigten PCR-Produktes in dem pGem®-T-Vektor. Folgender Ansatz (Tabelle 17: Ligationsansatz für den pGem®-T-Vektor **Tabelle 17**) inkubierte für 1 h bei Raumtemperatur.

Tabelle 17: Ligationsansatz für den pGem®-T-Vektor

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
pGem®-T-Vektor	0,5 µl
T4 DNA Ligase	0,5 µl
2x Rapid Ligation Puffer	5 µl
Aufgereinigtes PCR-Produkt	4 µl

4.2.5 Transformation von *E.coli*-Zellen

Per Hitzeschock-Verfahren fand die Transformation des obigen Ligationsansatzes in kompetente *E.coli*-Zellen des DH5α-Stammes statt. Hierfür wurden die bei -80°C gelagerten 100 µl Aliquots, schonend auf Eis aufgetaut und die Hälfte des Ligationsansatzes (5 µl) hinzugefügt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis, wurde die Bakterienkultur für 40 Sekunden (s) bei 42 °C in den Hitzeblock gestellt und nach diesem Prozess sofort wieder auf Eis zwischengelagert. Versetzt mit 900 µl SOC-Medium, befand sich die Kultur für 1 bis 2 h bei 37 °C im Schüttler. Nach diesem Intervall wurden je 200 µl auf LB-beschichtete Platten ausgestrichen und im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

4.2.6 Kolonie-PCR

Mittels Kolonie-PCR erfolgte eine erste Überprüfung der erstellten *E.coli* Zellen. Je eine über Nacht gewachsene Bakterienkolonie der LB-Platten wurde in 8 µl eines 1:1000 Gemisches von LB-Medium und Ampicillin überführt. Der Ansatz inkubierte für 2 bis 3 h im Bakterienschüttler bei 37 °C. Daraufgehend wurde mit den in der **Tabelle 18** aufgelisteten Elementen, der Kolonie-PCR-Ansatz generiert. Die verwendeten Primer sind der **Tabelle 5** zu entnehmen.

Tabelle 18: Kolonie-PCR-Ansatz

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

Die PCR erfolgte im Thermocycler unter den in **Tabelle 15** beschriebenen Bedingungen. Der Vorlauf des Heizdeckels wurde auf 99 °C festgelegt.

Mit Hilfe des UV-Transilluminators konnten die elektrophoretisch aufgetrennten Fragmente detektiert und selektiert werden.

4.2.7 Plasmid-Präparation aus 5 ml Übernachtskulturen - Minipräp

In ein Gemisch aus 5 Milliliter (ml) LB-Medium und 5 µl Ampicillin (100 mM-Stock) wurden die erfolgreich transformierten *E.coli*-Proben von den LB-Medium-Platten mit der Pipette überführt und über Nacht bei 37 °C im Bakterienschüttler belassen. Zur Isolierung der Plasmide kam das NucleoSpin® Plasmid-Kit gemäß den Herstellerangaben zur Anwendung. Dafür wurde die Übernachtskultur für 30 s bei 11.000 Umdrehungen in einem Reaktionsgefäß zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 µl Puffer A1 resuspendiert und nach Zugabe von 250 µl Puffer A2 mehrfach invertiert. Die Probe inkubierte für 5 bis 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 300 µl Puffer A3 zugegeben und die Probe erneut invertiert. Im Anschluss an

eine Zentrifugation für 10 min bei 11.000 Umdrehungen wurde der Überstand auf eine Anionenaustauscher-Säule geladen und für 1 min bei 11.000 Umdrehungen zentrifugiert. Nach Abwerfen des Durchflusses wurde die Säule mit 600 µl Puffer A4 zur Entfernung von Salzen und makromolekularen Zellrückständen beladen. Nach einer erneuten einminütigen Zentrifugation bei 11.000 Umdrehungen wurde wiederum der Durchfluss verworfen und die Säule für 2 min zentrifugiert. Im letzten Schritt erfolgte eine 2-malige Eluierung mit 40 µl destillierten Wasser. Die Messung der DNA-Konzentration ermöglichte der NanoDrop® Spectrophotometer. Für den pGem®-T-Vektor Plasmid-Verdau und die Sequenzierung nach Sanger, wurden die einzelnen Plasmid-Proben des NucleoSpin® Plasmid-Kits auf eine Konzentration von 20 ng/µl verdünnt.

4.2.8 pGem®-T-Vektor-Kontroll-Verdau

Der Prozess des pGem®-T-Vektor Plasmid-Verdau, diente ebenfalls der Überprüfung des Inserts. Der Ansatz wurde mit den Komponenten der nachfolgenden **Tabelle 19** generiert, bei 37 °C für mindestens 30 Minuten (min) inkubiert und in einem 1 % Agarosegel, das gemäß **Tabelle 16** hergestellt wurde, der Größe nach aufgetrennt.

Tabelle 19: Ansatz des pGem®-T-Vektor - Kontroll-Verdau

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
10x Cutsmart® Puffer	2 µl
BamHI-HF	0,5 µl
EcoRI-HF	0,5 µl
A.d.	15 µl
Template (NucleoSpin® Plasmid)	2 µl

Bei erfolgreicher Restriktion durch die Enzyme wurde eine größere Bande mit circa 3 kb für den pGem®-T-Vektor und eine kleinere Bande zwischen 1000 und 1200 Basen auf der Molekülskala für das Insert sichtbar.

4.2.9 Sequenzierung nach Sanger

Die finale Kontrolle der Klonierungen und Selektion der positiven Klone, fand über die Didesoxymethode nach Sanger (Sanger et al., 1977) statt. Dieses Verfahren dient der exakten Bestimmung der Basenabfolge in einem Molekül. Der Pipettieransatz ist in **Tabelle 20** dargestellt. Für die Überprüfung der EGxxFP-Vektoren wurde ein Ansatz mit dem Primer M13 Forward und dem M13 Reverse erstellt. Es wurde jeweils ein separater Ansatz für den entsprechenden Forward und Reverse Primer angesetzt. Der Primer Hu6F fand Anwendung für die px330_mCherry-Vektoren.

Tabelle 20: Sequenzierungsansatz

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
Plasmidverdünnung (20 ng)	2 µl
5x-BigDye® Terminator Puffer	2 µl
M13 Forward oder M13 Reverse Primer Hu6F	1 µl
BigDye® Terminator Reaktionsmix	0,3 µl
A.d.	4.7 µl

Im Thermocycler durchlief der Ansatz das in **Tabelle 21** festgelegte Programm. Der Heizdeckel wurde auf 99 °C vorgeheizt.

Tabelle 21: Sequenzierereinstellung des Thermocyclers

<i>Schritt</i>	<i>Temperatur</i>	<i>Zeit</i>	<i>Wiederholung</i>
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	
Denaturierung	94 °C	30 s	27 Zyklen
Annealing	58 °C	30 s	
Elongation	60 °C	3 min	
Finale Elongation	60 °C	5 min	
Pause	15 °C	∞ min	

Zur Fällung der sequenzierten DNA-Fragmente wurden 5 µl 125 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) zu dem Reaktionsansatz hinzugefügt und für 10 min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Zeit, wurde der Ansatz mit 50 µl von 100 % Ethanol vermennt und 6-fach stark invertiert. Eine Zentrifugation von mindestens 15 min bei 4 °C und 4000 Umdrehungen folgte

darauhin. Der Überstand wurde unter Beachtung der Lage des Pellets, das durch die Zentrifugation entstand, abpipettiert und verworfen. Das Gefäß wurde mit 100 µl von 70 % Ethanol befüllt und für mindestens weitere 7 min bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach dem wiederholten Verwerfen des Überstandes, konnte die restliche Flüssigkeit durch eine kurze über-Kopf Zentrifugation auf maximal 600 Umdrehungen und eine Kondensationszeit von circa 5 min entfernt werden. Zur Resuspension des Pellets wurden 20 µl HiDi-Formamid hinzugefügt und über den Abi3130x1 Genetic Analyser ausgewertet. Das Abgleichen der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierungen erfolgte über das Programm SnapGene.

4.2.10 Restriktionsverdau von pGem®-T-Vektor und EGxxFP-Vektor

Es fand eine Auswahl für einen positiven pGem®-T-Klon statt. Dieser wurde mit den Restriktionsenzymen (**Tabelle 7**) BamHI und EcoRI verdaut. Der verwendete Ansatz ist in **Tabelle 22** dargestellt. Gleichzeitig wurde in einem separaten Ansatz mit den Komponenten aus **Tabelle 23** der EGxxFP-Vektor verdaut. Hierbei wurden ebenfalls die oben genannten Restriktionsenzyme verwendet. Für die spätere Ligation des Inserts in den Zielvektor sind die identischen Restriktionsschnittstellen beider Vektoren von essenzieller Bedeutung.

Tabelle 22: Ansatz für pGem®-T-Restriktionsverdau

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
pGem®-T-Vektor	6 µl
10x Cutsmart® Puffer	2,5 µl
EcoRI	0,5 µl
BamHI	0,5 µl
A.d. (pGEM®-T-Vektor)	15,5 µl

Tabelle 23: Ansatz für Restriktionsverdau

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
EGxxFP-Vektor	3 µl
10x Cutsmart® Puffer	2,5 µl
EcoRI	0,5 µl
BamHI	0,5 µl
A.d.	18,5 µl

Methoden

Nach einer Inkubation im Brutschrank über Nacht, wurden die Reaktionsansätze auf ein 1 % Agarosegel geladen. Der pGem®-T-Verdau zeigte eine höhermolekulare Bande bei 3kB für den geschnittenen Vektor und eine kleinere Bande um 1000 bis 1200 Basen für das Insert.

Als Kontrolle wurde neben den Verdau des EGxxFP-Vektors noch zusätzlich ein unverdauter EGxxFP-Vektor hinzugefügt. Im Vergleich zu der unverdauten Kontrolle zeigte der geschnittene Vektor eine schmalere Bande, weil eine schnellere Diffusion durch das Agarosegel aufgrund seiner Linearität möglich war. Durch den UV-Transilluminator konnte der verdaute Vektor und das Insert extrahiert und unter Zuhilfenahme des NucleoSpin® and PCR-Clean-Up-Kits, isoliert werden. Es erfolgte eine Messung der Konzentration über den NanoDrop® Spectrophotometer.

4.2.11 Ligation in die Expressionsvektoren

Im Folgenden sind die einzelnen Schritte für die Ligation der Zielsequenz *ABCA4* in den EGxxFP-Vektor beschrieben. Ebenfalls wird das Protokoll für die Klonierung der einzelnen guideRNAs in den px330_mCherry-Vektor schrittweise dargestellt.

4.2.11.1 Ligation der Zielsequenz in den pCAG-EGxxFP-Vektor

Mit den in **Tabelle 24** aufgelisteten Bestandteilen wurde ein 20 µl Ansatz pipettiert, der die Ligation der Zielsequenz in den Zielvektor EGxxFP ermöglichte.

Tabelle 24: Ligationsansatz für Zielsequenz in Zielvektor

Komponente	Menge
pCAG-EGxxFP-Vektor	1 µl
T4 DNA Ligase	1 µl
10x T4-Ligationspuffer	2 µl
Insert	7 µl
A.d.	9 µl

Die Inkubation erfolgte im Thermoblock über Nacht bei 14 °C. Analog zu 4.2.5 Transformation von *E.coli*-Zellen erfolgte die Transformation in DH5α-*E.coli*-Zellen

4.2.11.2 Ligation der guideRNAs in den px330_mCherry-Vektor

Die Klonierung der guideRNA Sequenzen in den px330_mCherry-Vektor folgte dem Target Sequence Cloning Protocol. In einem ersten Schritt wurde der px330_mCherry-Vektor mit der Enzym BbsI verdaut (**Tabelle 25**):

Tabelle 25: Verdau des px330_mCherry-Vektors

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
px330_mCherry-Vektor	1 µg
FastDigest BpiI	1 µl
Quick Cip	1 µl
10x FastDigest Puffer	2 µl
A.d.	15 µl

Der Ansatz wurde bei 37°C für 30 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 4 µl Ladepuffer versetzt, auf ein 1 % Agarosegel geladen und nach einer 25-minütigen Laufzeit mit Hilfe des UV-Transilluminators detektiert.

Im Rahmen des 2. Schrittes des Target Sequence Cloning Protocols, wurde die detektierte Bande des Gels, wie unter *4.2.3 Extraktion und Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarosegel* beschrieben, extrahiert und aufgereinigt.

Als dritter Schritt erfolgte die Phosphorylierung und das Annealen der synthetisierten Oligonukleotidpaare (**Tabelle 4**) mit folgenden Komponenten der **Tabelle 26**.

Tabelle 26: Phosphorylierung and Annealing der Oligonukleotidpaare

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
Oligonukleotid F (100 µM)	1 µl
Oligonukleotid R (100 µM)	1 µl
10x T4 PNK Puffer	1 µl
T4 PNK	0,5 µl
A.d.	5,5 µl

Mit dem RAMP-Programm des Thermocycler erfolgte der Annealingvorgang. Folgende Parameter (**Tabelle 27**) wurden verwendet.

Tabelle 27: RAMP-Programm

<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>
30min	37 °C
5min	95 °C

Methoden

5min	90 °C
Senkung der Temperatur auf 25 °C in 5 min-Schritten	

Im Schritt 4 des Target Sequence Cloning Protocol, folgte die Ligation der guideRNA-Oligonukleotid-Duplikate, wie in **Tabelle 28** beschrieben.

Tabelle 28: Ligation von guideRNA und px330_mCherry-Vektor

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
Verdauter px330_mCherry-Vektor	1 µl
Oligonukleotid-Duplex aus Schritt 3 (1:200 Verdünnung)	1 µl
2x Quickligase Reaction Puffer	5 µl
Quick Ligase	1 µl
A.d.	2,2 µl

Der letzte Schritt des Protokolls, erfolgte nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur. Ziel dieses Prozesses war es, ungewollte Rekombinationen des Ligationsproduktes zu entfernen.

Tabelle 29: Bearbeitung der Ligation zur Entfernung von Rekombinationsprodukten

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
Ligation von Schritt 4	11 µl
NEBuffer 4	1,5 µl
ATP 10mM	1,4 µl
RecBCD Exonuclease	1 µl

Nach einer weiteren Inkubation von 30 min bei 37 °C im Brutschrank wurden die Konstrukte in *E.coli* des Stl13-Stammes transformiert und auf LB-Platten ausgesät (4.2.5 Transformation von *E.coli*-Zellen). Am darauffolgenden Tag wurden angewachsene Klone in 5 ml-Kulturen überführt und abermals über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach einer Plasmid-Präparation wurden die aufgereinigten Vektoren sequenziert.

4.2.12 Plasmid-Präparation aus 100ml Übernachtskulturen – Midipräp

Die Ergebnisse der Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977) konnten mit Hilfe des Programms SnapGene abgeglichen werden. Klone mit einer korrekt ligierten guideRNA wurden in 100 ml LB-Medium, versetzt mit 100 µl Ampicillin über Nacht bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Mittels des NucleoBond® XtraMidi-Kit wurden die Vektoren isoliert. Anschließend wurden die Vektoren mit Hilfe des NanoDrop® Spectrophotometers vermessen und auf eine Konzentration von in etwa 1000 ng/µl mit destilliertem Wasser verdünnt.

4.2.13 Herstellung des Glycerolstocks

Zur Langzeitaufbewahrung der Klone erfolgte eine Lagerung im -80°C Gefrierschrank. Hierfür wurden 830 µl der Konstrukte-tragenden *E.coli* aus den 100 ml Übernachtskulturen entnommen und mit 170 µl 99,5 %-Glycerin vermischt.

4.3 Zellkultur

Im Folgenden wird die Kultivierung der eukaryotischen Zellenlinie HEK293T beschrieben. Die Zellen wurden mit 2 unterschiedlichen Methoden transfiziert, um die Funktionalität der klonierten Vektorkonstrukte zu testen.

4.3.1 Kultivierung von HEK293-T-Zellen

Kultiviert wurden die Zellen bei einem CO₂ – Gehalt von 5 % und einer Temperatur von 37 °C. Das HEK-Medium bestand aus Dulbeccos´ Modified Eagle Medium (DMEM) mit 1 % Pen/Strep und 10 % Fetal Calf Serum (FCS). Vor Gebrauch wurden die Lösungen im Wasserbad oder an der klimatisierten Raumluft erwärmt. Je nach Konfluenz erfolgte eine Passage der Zellen mehrmals wöchentlich. Hierfür wurde die Suspension aus HEK-Medium und den, von der Platte gelösten HEK293-T-Zellen, in ein Falcon übertragen. Zur Trennung von Medium und Zellen, fand eine 4-minütige Zentrifugation statt. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen konnten durch Zugabe von frischem HEK-Medium resuspendiert werden. Je nach gewünschtem

Teilungsverhältnis erfolgte eine Aufteilung der Zellsuspension mit einem Gesamtvolumen von 10 ml auf neue Platten.

4.3.2 Kalziumphosphat-Transfektion von HEK293-T-Zellen

Die erfolgreich klonierten Vektoren wurden mit der Kalziumphosphat-Methode in HEK293-T-Zellen transfiziert. Am Vortag der Transfektion wurde eine 6-Well-Platte mit 1 ml Polylysin beschichtet und für mindestens 1 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die 1 ml-Beschichtung der einzelnen Wells durch 2 ml PBS gewechselt. Durch das anschließende Entfernen des PBS konnte das restliche Polylysin heruntergewaschen werden. Die Auftragung der Zellen erfolgte in einer 1:12 Teilung auf die wieder mit 3 ml normalen HEK-Medium gefüllten Wells, sodass für die Transfektion am Folgetag eine Konfluenz von 70 bis 80 % erreicht wurde.

Am Tag der Transfektion wurde das Kulturmedium durch 3 ml einer 1:1000 Verdünnung von HEK-Medium und 25 μM -Chloroquin, ersetzt. Diese Suspension inkubierte für 1,5 h im Brutschrank. Nach Ablauf der Inkubationszeit, wurde das mit Chloroquin versetzte Medium abgesaugt, und die Zellen wurden mit 2,5 ml HEK-Medium versorgt. In der Inkubationszeit des oben dargestellten Chloroquinansatzes, konnte ein 500 μl -Ansatz, wie im Folgenden beschrieben, generiert werden. Der Transfektionsansatz (**Tabelle 30**), bestehend aus Calciumchlorid, 1,5 μl des generierten pCAG-EGxxFP-Vektors und 1,5 μl eines erfolgreich klonierten px330_mCherry-Vektors, wurde hergestellt. Diese Lösung wurde mit Wasser auf einen Standard von 250 μl aufgefüllt. Nach kurzem Vortexen erfolgte die Zugabe von 2x HBS am Boden des Reaktionsgefäßes. Die einzelnen Komponenten konnten durch mehrmaliges Einbringen von Luftblasen mit Hilfe der Transferpipette® gemischt werden. Dies gewährleistet eine konsistente Kalziumphosphat Niederschlagsbildung, die sich positiv auf die Effizienz der Methode auswirkt. Es folgte eine 25-minütigen Inkubation des Transfektionsansatzes auf Raumtemperatur. Im Anschluss fand die tropfenweise Zugabe des Transfektionsansatzes auf die einzelnen, mit der Chloroquin-Lösung vorbehandelten Wells, statt. Dies erfolgte unter Schwenken der Platten zur gleichmäßigeren Verteilung.

Tabelle 30: Transfektionsansatz der Kalziumphosphat-Methode

Methoden

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
Vektoren (je 1,5 µl)	3 µl
Calziumchlorid	31 µl
A.d.	216 µl*
2x HBS	250 µl

* Menge des Wassers variabel in Abhängigkeit der erzielten Vektorkonzentration

Die transfizierten Zellen inkubierten 7 h im Brutschrank, bevor das Medium zu 3 ml frischem HEK-Medium gewechselt wurde. Eine erste Beurteilung der Transfektion fand nach etwa 24 h über das Nikon Mikroskop mittels UV-Licht statt. Die Transfektionseffizienz wurde über die Fluoreszenzintensität des Markers px330-mCherry erstmalig eingeschätzt.

Für eine standardisierte Auswertung folgte 48 h nach der Transfektion die Überführung der Zellen auf Poly-L beschichtete, schwarze 96-Well-Platten. Hierfür mussten die Zellen von der 6-Well-Platte gelöst werden. Zu diesem Zweck wurde das HEK-Medium abgezogen und die Wells mit PBS gewaschen. Im Anschluss inkubierten die einzelnen Wells für 5 bis 10 min in 1,5 ml PBS, dem 15 µl EDTA zugesetzt war. Nach dem Abziehen der EDTA / PBS – Lösung wurden die Zellen mit einem Gemisch aus 45 ml PBS und 5 ml 10x Trypsin versetzt, und ruhten für 3 bis 4 min bei Raumtemperatur. Daraufhin erfolgte eine Zugabe von 2 ml HEK-Medium auf die einzelnen Wells. Nach einer 3-minütigen Zentrifugation und Resuspension, konnten die Zellen auf die 96-Well-Platte übertragen werden.

72 h nach der Kalziumphosphat-Transfektion, erfolgte die Färbung der Zellkerne mittels Hoechst 33258. Dies erfolgte zur Standardisierung der Zellzahl pro Well. Hierfür wurden die einzelnen Wells, nach Abkippen des Kulturmediums, mit einer 1:10.000 Verdünnung aus Hoechst 33258 und HEK-Medium versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min, fand ein Waschschriff und die Befüllung mit je 100 µl PBS pro Well statt. Daraufhin folgte die Quantifizierung mit Zuhilfenahme des Platten-Reader Tecan Spark®.

4.3.2.1 Auswertung der quantifizierten Daten der Kalziumphosphat-Transfektion

Mit Hilfe der Software Microsoft Excel fand eine Auswertung der quantifizierten Daten des Platten-Reader Tecan Spark® statt. Ziel dieser Auswertung war der Vergleich der Spezifitäten der einzelnen guideRNA-Systeme mit der jeweiligen Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe wurde mit einem Vektorensystem transfiziert, das keine guideRNA enthält. Der Platten-Reader Tecan Spark® ermittelte die Rohdaten der einzelnen Wells über 3 verschiedenen Kanälen (blau, rot, grün). Die Leuchtintensität der Zellkernfärbung mit Hoechst 33258 wurde mit dem Blau-Kanal gemessen und ermöglichte eine Normalisierung der Zellzahl. Die Fluoreszenzen des px330-mCherry-Markers konnten mit dem Rot-Kanal detektiert werden und spiegelten die Effizienz der Transfektion wider. Rohdaten der Fluoreszenz der pCAG-EGxxFP-Vektoren wurden über den grünen Kanal ermittelt und stellen die guideRNA-Spezifität dar. Das Resultat der Berechnungen gibt an, um welchen Faktor die Spezifität der einzelnen guideRNAs im Vergleich zur Kontrollgruppe höher ist.

4.3.3 Transfektion der HEK293T-Zellen mit dem TransIT®-2020 Reagenz

Für spätere Experimente zur Expression des *ABCA4* Transkripts wurde eine hohe Transfektionseffizienz benötigt. Aus diesem Grund wurden HEK293T Zellen in den weiterführenden Experimenten mit dem TransIT® -2020 Reagenz transfiziert.

Die Vorbereitung für die Transfektion mit TransIT® -2020 Reagenz entsprach den Vorkehrungen der Kalziumphosphat Transfektion, die unter dem Kapitel 4.3.2 *Kalziumphosphat-Transfektion von HEK293-T-Zellen*, beschrieben sind. Eine Konfluenz der Zellen von $\geq 80\%$ auf Polylysin-vorbehandelten Platten wurde angestrebt. Die Kulturen wurden mit einer Lösung der Komponenten aus **Tabelle 31** versetzt und inkubierten für 48 h im Brutschrank. Während dieser Zeit erfolgte kein Wechsel des Mediums.

Tabelle 31: Ansatz für die TransIT®-2020 Transfektion

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
OptiMEM™ I	250 µl
Vektor-DNA 1	1,25 µg
Vektor-DNA 2	1,25 µg
TransIT®-2020 Reagenz	5 µl

Wie unter Kapitel 4.3.2 *Kalziumphosphat-Transfektion von HEK293-T-Zellen* beschrieben, erfolgte zur Standardisierung eine Überführung der Zellen auf 96-Well-Platten und die anschließende Evaluation über den Platten-Reader Tecan Spark®.

4.4 Evaluation der Enhancer-Aktivität der erfolgreich getesteten guideRNAs

Im Folgenden wird die Klonierung der ausgewählten, spezifischen guideRNAs in den px330_EGFPo-Vektor und die Transfektion in HEK293T-Zellen beschrieben. Über eine darauffolgende RNA-Präparation der HEK293T-Zellen und den Prozess einer cDNA-Synthese, konnte die Enhancer-Aktivität mit Hilfe einer RT-PCR überprüft werden.

Eine Auswahl von 8 guideRNAs für die Klonierung in den px330_EGFPo-Vektor erfolgte nach ihrer Transfektionseffizienz, Lokalisation und Spezifität gegenüber der korrespondierenden Zielsequenz *ABCA4*. Die ausgewählten guideRNAs wurden nach dem Target Sequence Cloning Protocol in den px330_EGFPo-Vektor kloniert. Die Vorgehensweise erfolgte identisch zur Klonierung der guideRNAs in den px330_mCherry-Vektor, die unter den Abschnitten 4.2.11.2 *Ligation der guideRNAs in den px330_mCherry-Vektor*, 4.2.12 *Plasmid-Präparation aus 100ml Übernachtskulturen – Midipräp* und 4.2.13 *Herstellung des Glycerolstocks*, beschrieben ist.

Für die Transfektion mit dem TransIT®-2020 Reagenz wurden insgesamt 5 Kombinationen (**Tabelle 32**: Zusammenstellung der Kombinationen für die TransIT®-2020 Transfektion) aus jeweils 3 unterschiedlichen, erfolgreich klonierten px330_EGFPo-Vektoren (**Tabelle 6**) erstellt. Die px330_EGFPo-Vektoren tragen entsprechend der Nummerierung der klonierten guideRNAs die interne Nummerierung von 1 bis 4, 9, 12 und 16. Insgesamt enthält eine Lösung 1,25 µg des SP-dCas9-VPR-Vektors und jeweils 0,42 µg eines px330_EGFPo-Vektors.

Tabelle 32: Zusammenstellung der Kombinationen für die TransIT®-2020 Transfektion

<i>Kombination</i>	<i>Enthaltene ABCA4_px330_EGFPo-Vektoren</i>
Kombination 1	1, 3, 7

Methoden

Kombination 2	1, 3, 4
Kombination 3	9, 12, 16
Kombination 4	2, 9, 12
Kombination 5	1, 7, 12

Um die einzelnen px330_EGFPo-Vektorkonstrukte zu testen, wurden 1,25 µg des SP-dCas9-VPR-Vektors und 1,25 µg eines px330_EGFPo-Vektors transfiziert.

Gemäß der **Tabelle 31** und der Beschreibung unter *4.3.3 Transfektion der HEK293T-Zellen mit dem TransIT®-2020 Reagenz*, konnten die unterschiedlichen Kombinationen in die HEK293T-Zellen eingebracht werden. Ab einer Inkubationszeit des Transfektion-Reagenzes von 72 h, wurde das Medium nach 48 h erneuert.

4.4.1 RNA-Präparation aus transfizierten HEK293-T-Zellen

Ziel des Vektorsystems, bestehend aus den Vektoren px330_EGFPo und SP-dCas9-VPR, war die *ABCA4* Transkription mittels Überexpression zu aktivieren. Die RNA-Präparation stellt einen labormethodischen Schritt zur Detektion der Überexprimierung dar. Zur Überprüfung des *ABCA4* Transkriptionsniveaus wurde die RNA aus den kultivierten Zellen mit Hilfe des PureLink® RNA Mini Kits isoliert. Hierfür wurde zu den HEK293T-Zellen 700 µl Lyse Buffer und 40 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt. Die Suspension wurde für 2 min bei 12.000 Umdrehungen zentrifugiert. Anschließend wurde eine Lösung aus 490 µl Ethanol und 210 µl destilliertem Wasser hinzugefügt. Von dieser Suspension wurden nun 700 µl auf eine RNA-Säule pipettiert und bei 12.000 Umdrehungen für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 350 µl Wash Buffer I hinzugefügt. Nach einer 30-sekündigen Zentrifugationszeit inkubierte die Probe mit einer Lösung aus 70 µl RDD-Buffer und 10 µl DNase. Danach wurden erneut 350 µl Wash Buffer I auf die Säule pipettiert und kurz zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues Auffangröhrchen überführt und 2-mal mit jeweils 500 µl Wash Buffer II gewaschen. Zwischen und nach den Waschdurchgängen wurde zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Zur Trocknung der Membran wurde bei 12.000 Umdrehungen für 2 min zentrifugiert. Die RNA haftete nun weitestgehend frei von Verunreinigungen in der Membran der Säule. Für die Eluierung der RNA wurden 30 µl RNase-freies Wasser pipettiert, bei Raumtemperatur für 1 min inkubiert und anschließend für 2 min bei 12.000

Umdrehungen eluiert. Die Schritte der Eluierung wurden zur Maximierung der Ausbeute wiederholt. Es wurde unter ständiger Kühlung auf Eis und unter möglichst RNase-freien Bedingungen gearbeitet. Die Quantifizierung der Isolierten RNA erfolgte spektrophotometrisch mittels dem NanoDrop® Spectrophotometer. Die Proben wurden bei -80°C gelagert.

4.4.2 cDNA-Synthese

Eine Umschreibung der isolierten RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase. Unter RNase freien Bedingungen wurde eine Lösung, bestehend aus 1 µg RNA und RNase-freiem Wasser, von insgesamt 12,5 µl erstellt. 1 µl Random Primer wurde addiert und der Ansatz inkubiert für 5 min bei 70°C im Thermocycler. Nach Ablauf der Inkubationszeit und unter Lagerung auf Eis wurden folgende Komponenten (**Tabelle 33**) der Probe hinzugefügt.

Tabelle 33: Ansatz für die cDNA-Synthese mit Hilfe der Reversen Transkriptase

<i>Komponente</i>	<i>Menge</i>
5x Reaktionspuffer für Reverse Transkriptase	4 µl
NTPs	2 µl
Reverse Transkriptase	0,5 µl

Der Ansatz im Thermocycler durchlief das in **Tabelle 34** festgelegte Programm.

Tabelle 34: Einstellungen des Thermocycler für die cDNA-Synthese

<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>
10 min	25°C
1 Std	42°C
15 min	70°C
Pause	4°C

Nach Vollendung des Programms der **Tabelle 34** wurden 30 µl RNase-freies Wasser zur Probe hinzugefügt.

4.4.3 RT-PCR zur Überprüfung der Enhancer-Aktivität

Zur Überprüfung der Enhancer-Aktivität erfolgte eine RT-PCR mit den Komponenten der **Tabelle 14**. Als Template wurde die im vorherigen Schritt generierte cDNA verwendet. Das Programm des Thermocyclers wurde, wie in **Tabelle 15** beschrieben, festgelegt. Das Annealing erfolgte bei einer Temperatur von 60°C.

Anschließend erfolgten eine Auftrennung gemäß dem Molekulargewicht mit Hilfe eines 2 % Agarosegels und eine Detektion der Banden mit dem UV-Transilluminator. Der Prozess verlief wie unter *4.2.2 Agarosegelelektrophorese* beschrieben.

4.4.4 Housekeeper PCR

Zur Normalisierung der Expressionsergebnisse wurde ein konstant exprimiertes Referenzgen (Housekeeper-Gen) gemessen, das in allen zu vergleichenden Geweben oder Zelltypen möglichst einheitlich exprimiert werden sollte. In den durchgeführten Versuchen wurde hierfür das β -Glucuronidase-Gen verwendet. Die gewählten Primer GUSB6 und GUSB7 (**Tabelle 5**) ermöglichten die Vervielfältigung einer Sequenz mit einer Länge von in etwa 500 bp, die über die PCR detektiert wurde.

Der PCR-Ansatz entspricht den Angaben der **Tabelle 14**. Als DNA-Template wurde cDNA verwendet. Die Annealingstemperatur wurde auf 58 °C festgesetzt. Gemäß den Angaben des Kapitels *4.2.2 Agarosegelelektrophorese* wurde das Agarosegel hergestellt.

5 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit gliedern sich in einen bioinformatischen und einen experimentellen Arbeitsteil: der bioinformatische Teil beschreibt die Analyse des Promoterbereichs von *ABCA4* mit dem Ziel der Auswahl von geeigneten guideRNAs. Der darauffolgende experimentelle Arbeitsteil lässt sich wiederum in zwei Abschnitte untergliedern. Beginnend mit der Präsentation der Resultate der *in vitro* guideRNA-Testung, folgt als letzter Teil der Nachweis der *ABCA4*-Expression.

5.1 Bioinformatische Auswertung

Für die bioinformatische Analyse der guideRNAs wurden die beschriebenen Softwares und Online-Tools des Abschnitts 4.1 *Software-gestützte Analyse* verwendet. Zweck dieses Prozesses war die Auswahl von guideRNAs, die den Promoterbereich homogen abdecken.

5.1.1 Kriterien für die Auswahl der guideRNAs und Übersicht der analysierten *ABCA4*-Promoterregion

Zur Auswahl von geeigneten guideRNAs wurde das Programm *Optimized CRISPR Design Tools* (<http://crispr.mit.edu>) des Feng Zhang Labors (Broad Institute, Massachusetts Institute of Technology) verwendet. Das Programm listet nach Eingabe einer beliebigen Zielsequenz die erwägenswerten guideRNAs und deren zugehörigen PAMs auf. Die vorgeschlagenen Sequenzen werden nach definierten Kriterien überprüft. Das Ziel der Auswahlkriterien war es, guideRNAs zu identifizieren, die mit hoher Präzision die Endonuklease Cas9 an die Zielsequenz navigieren: Zum Beispiel durfte sich die gewünschte Zielsequenz der guideRNA nicht in einer Repeat Sequenzstruktur befinden, sodass die guideRNA nur für eine Stelle im Genom spezifisch ist. Ebenso wurde auf Schnittstellen für das BbsI-Restriktionsenzym geachtet, da diese von essenzieller Bedeutung für die Klonierung waren. Ein weiteres von *Optimized CRISPR Design Tools* errechnetes Kriterium war der *on-target-Score*. Der Zahlenwert des Scores, der auf einen Mindestwert von 60 festgelegt wurde, gab die Wahrscheinlichkeit für Doppelstrangbrüche in einer Zielsequenz wider. Ferner wurde überprüft, ob off-targets der zugehörigen guideRNA

Ergebnisse

im Genom vorlagen. Off-targets sind ungewollte Modifikationen, die durch das CRISPR-Cas9-System eingeführt werden können. Es folgte eine Lokalisation und Prüfung der SNPs, die im Bereich der möglichen guideRNAs lokalisiert waren. Wurde für einen SNP eine Allelfrequenz größer als 1 % in der europäischen Population errechnet, wurde die zugehörige guideRNA ausgeschlossen.

Die hier aufgestellten Kriterien, die zur Auswahl der guideRNAs beitrugen, sind in der nachfolgenden **Tabelle 35** dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 35: Übersicht der ausgewählten 17 guideRNAs und Darstellung ausgewählter Merkmale als Ergebnisse der bioinformatischen Analyse

<i>Interne guideRNA-Nr</i>	<i>Sequenz</i>	<i>Genomische Lokalisation (Human GRCh38/hg38)</i>	<i>On-target-Score (%)</i>	<i>Strang</i>	<i>PAM</i>	<i>rs-Nr des möglichen SNPs</i>	<i>Rel. Häufigkeit des möglichen SNPs (Europäische Bevölkerung)</i>
1	GGCCTCAGCTCTGACCAATC	1:94121068 - 94121087	74	+	TGG		
2	AACGCCGTTAAGAGCGCCTC	1:94121109 - 94121128	89	-	GGT		
3	TACACATAAGCCCTTAGTTG	1:94121203 - 94121222	79	-	GGG		
4	AAAGGGAGCCAACACAGTGT	1:94121237 - 94121256	65	+	CGG		
5	GCCCAGCCACTTGTGTC	1:94121278 - 94121297	71	+	AGG	rs11802887	G: 100% A: 0%
6	AATGGGAAACCAAGACCCTC	1:94121324 - 94121343	71	-	GGA	rs11806223	C: 100% A: 0%
7	TACCTAAAGACATCCCCCTC	1:94121373 - 94121392	81	+	AGG		
8	CTCTTTGCATAAATATAGGC	1:94121420 - 94121439	65	-	GGT		
9	GCCGGCAGTCAGGGTTTGAC	1:94121473 - 94121492	81	-	GGT		
10	GATCTGCCGAGTGAGTCGAT	1:94121509 - 94121528	92	+	TGG		
11	GTCATTATGGTCAGCTAGTT	1:94121581 - 94121600	78	-	GGG		
12	TGCTGGGTTGACTCATCACC	1:94121823 - 94121842	73	-	GGA		
13	CTTCTGTTTGGGGTGTCCCT	1:94121865 - 94121884	72	+	TGG		
14	AAGTTCCACTGCGAAGTGCC	1:94121892 - 94121911	78	+	AGG		
15	GACTCTAGACCCTTGAGACC	1: 94121956 - 94121975	79	-	GGT		
16	ACTTCATAGAGTTTGCGGTC	1:94122018 - 94122037	86	-	GGT		
17	GTCCTTCTCCTGGTGATTAA	1:94121145 - 94121164	72	-	GGT		

5.2.1 Vektorensystem zur Prüfung der bioinformatisch ermittelten guideRNAs

Für die in vitro-Analyse wurde ein aus zwei Vektoren bestehendes Testsystem verwendet (**Abbildung 7**). Die einzelnen Vektorkonstrukte wurden wie unter dem Abschnitt 4.2 *Klonierung von Vektoren* generiert. Ziel des Systems war es die Transfektionseffizienz, sowie die Spezifität der guideRNA gegenüber der korrespondierenden Zielsequenz zu überprüfen.

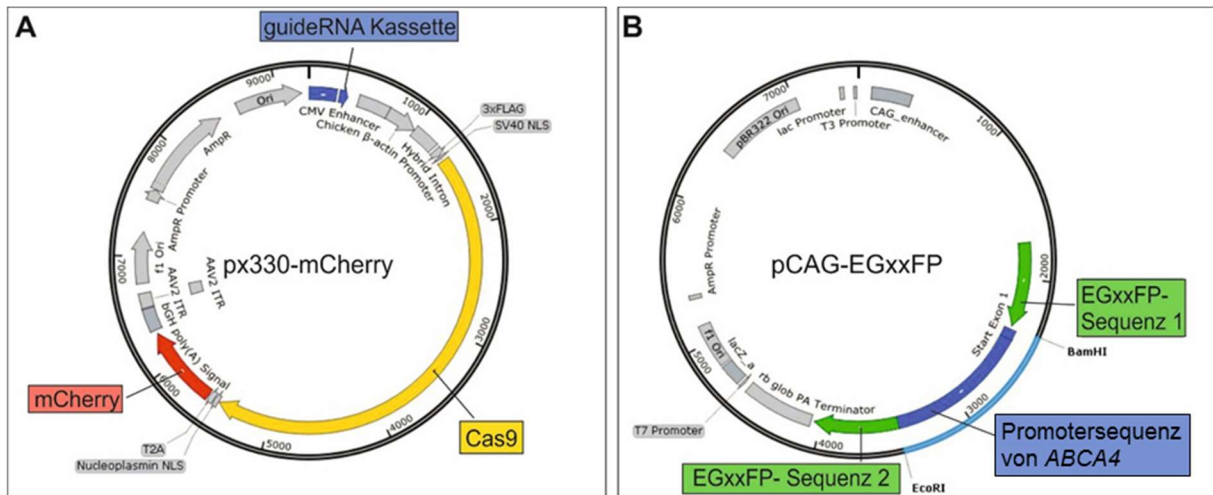


Abbildung 7: Schema der verwendeten Vektoren zur Testung der guideRNAs (modifiziert nach der SnapGene® Software von Insightful Science)

(A) Dargestellt ist der Vektor px330-mCherry, der unter anderem die Expressionskassette des Fluoreszenzmarker mCherry, der Endonuklease Cas9 und einer guideRNA enthält. (B) Abgebildet ist der Vektor pCAG-EGxxFP. Er beinhaltet die Promotersequenz ABCA4, die zwischen EGxxFP- Sequenz 1 und EGxxFP-Sequenz 2 kloniert wurde.

Die in der **Abbildung 7** dargestellten Vektorkonstrukte wurden in die HEK293T-Zellen transfiziert. Nach einer erfolgreichen Transfektion und Translation, konnte die Fluoreszenz des mCherry-Proteins genutzt werden, um die Transfektionseffizienz abzuschätzen. Hierfür wurde mit Hilfe des Nikon-Mikroskops das Fluoreszenzprotein mit einer Wellenlänge von 587 nm angeregt und die Emission mit einer Wellenlänge von 610 nm detektiert. Bei induziertem Doppelstrangbruch der Zielsequenz durch die Endonuklease Cas9 erfolgte eine homologe Reparatur der EGFP-Kassette und die entstehende grüne Fluoreszenz wurde detektiert. Das EGFP-Protein hat sein Anregungsmaximum bei einer Wellenlänge von 488 nm und sein Emissionsmaximum bei 509 nm. Die mikroskopischen Messungen mit dem Grün-Kanal ließen eine Abschätzung der Spezifität der einzelnen guideRNAs zu.

5.2.2 Qualitative und quantitative Resultate der Immunfluoreszenzen

Die qualitativen Messungen der Immunfluoreszenzen erfolgten 72 h nach der Transfektion in die HEK293T-Zellen und der Übertragung auf schwarze 96-Well-Platten. **Abbildung 8** zeigt exemplarisch die Resultate eines der biologischen Replikate. Jede guideRNA wurde mindestens drei Mal getestet, um Abweichungen der Ergebnisse präziser einschätzen zu können. Ebenso wurde zum besseren Vergleich die Hintergrundfluoreszenz einer Leerkontrolle aufgenommen, indem das Vektorensystem mit einem px330_mCherry-Vektor ohne klonierter guideRNA-Expressions-kassette transfiziert wurde. Die jeweils erste Bildspalte der **Abbildung 8** repräsentiert die guideRNA-Spezifität, die jeweils zweite die Transfektionseffizienz.

Ergebnisse

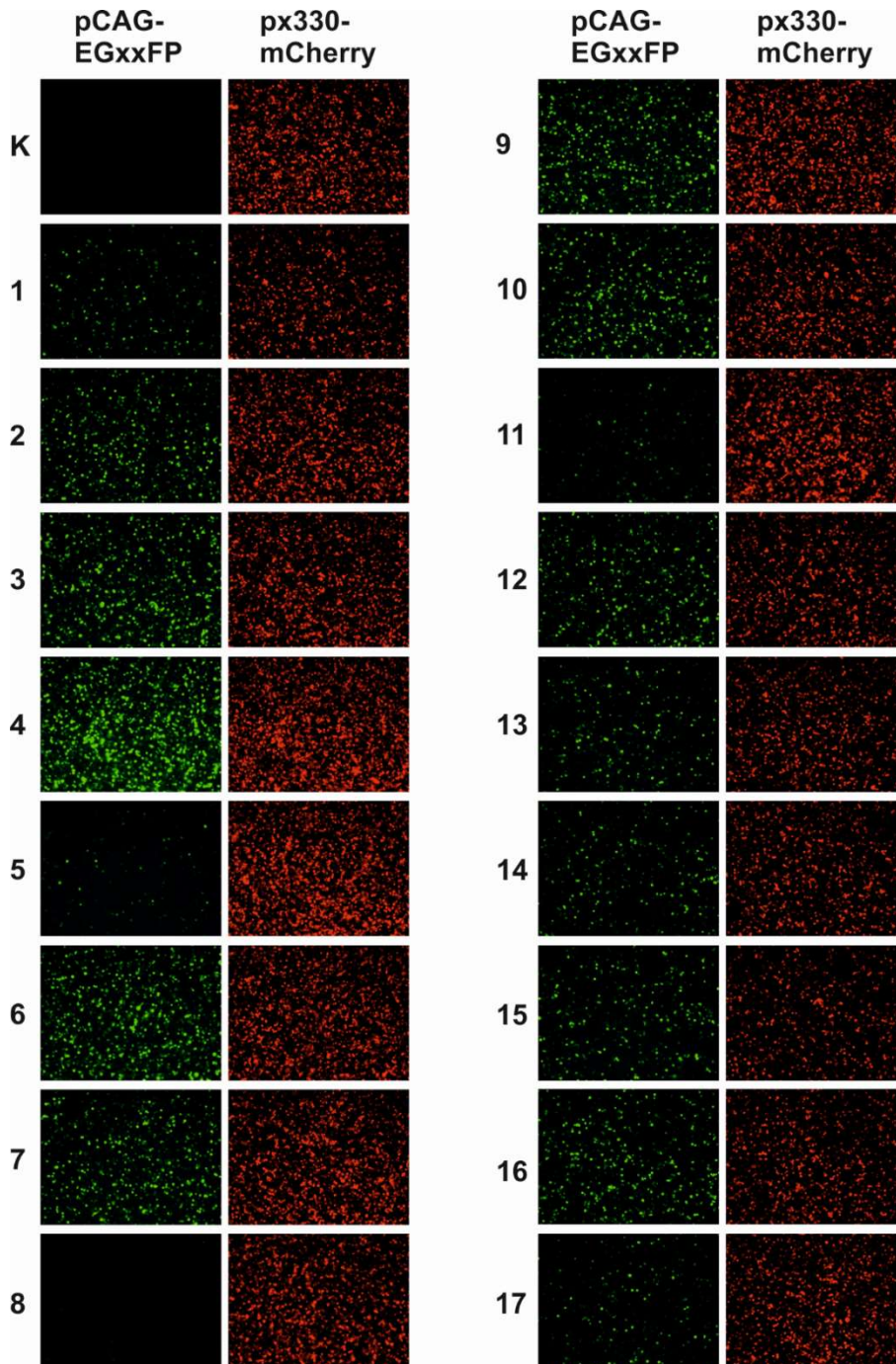


Abbildung 8: Mikroskopische Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Transfektionsansätze auf 96-Well-Platten 72 h nach der Transfektion in die HEK293T-Zellen (eigene Abbildung)

Dargestellt sind die Fluoreszenzaufnahmen der Negativkontrolle „K“ und der bioinformatisch ermittelten guideRNAs in einer Graphik mit je zwei Spalten. Die jeweils erste Spalte zeigt Aufnahmen der grünen Fluoreszenz, die jeweils zweite Spalte die rote Fluoreszenz. Mit Hilfe des Nikon-Mikroskops wurden Aufnahmen in einer 10x Vergrößerung erstellt.

Es konnte kein grünes Fluoreszenzsignal in der Negativkontrolle K und der guideRNA 8 detektiert werden. Die restlichen guideRNAs zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Spezifität gegenüber der korrespondierenden Zielsequenz.

Ergebnisse

Ein positives Fluoreszenzsignal des mCherry-Proteins konnte in allen Transfektionsansätzen nachgewiesen werden.

Im direkten Anschluss an die qualitativen Messungen wurden quantitative Daten der in-vitro-Tests mit dem Plattenreader Tecan Spark® erhoben. Da jedes Vektorensystem mindestens drei Mal biologisch repliziert und qualitativ ausgewertet wurde, folgt auch die quantitative Analyse diesem Schema. Die Daten wurden wie unter dem Abschnitt *4.3.2.1 Auswertung der quantifizierten Daten der Kalziumphosphat-Transfektion* beschrieben, auf die Hintergrundfluoreszenzen, Zellzahl und Transfektionseffizienz normalisiert. Das Ziel dieser Analyse lag darin, die getesteten Vektorensysteme miteinander in Bezug zu setzen und eine Auswahl von geeigneten guideRNAs für den weiteren Prozess zu treffen. Nachstehende **Abbildung 9** zeigt graphisch die Resultate in einem Balkendiagramm.

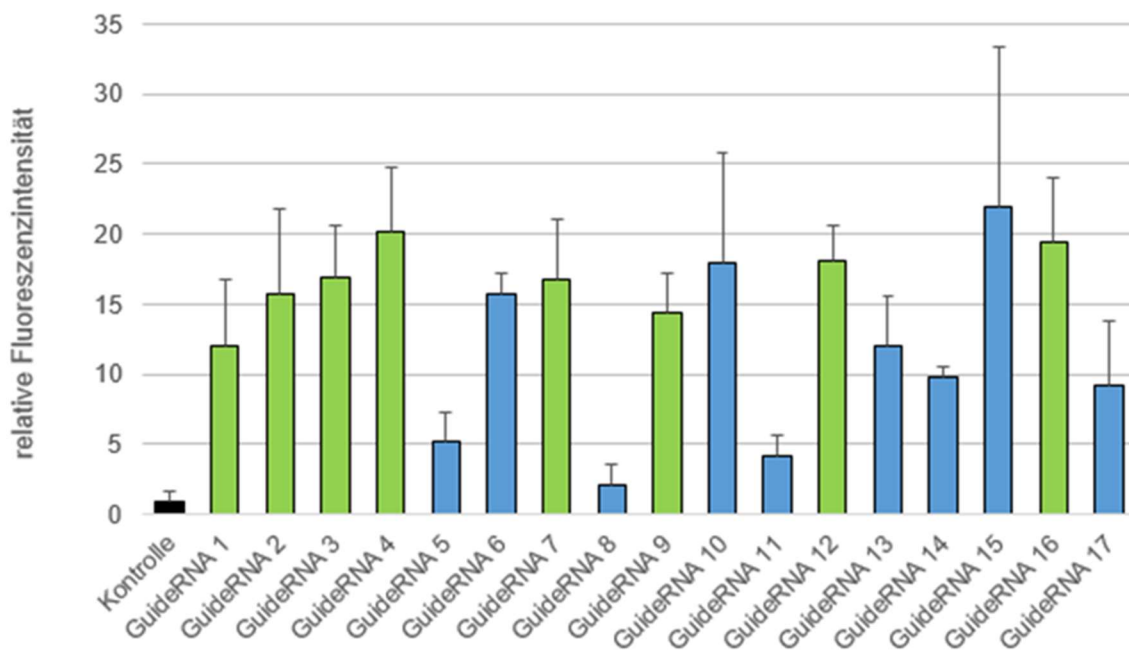


Abbildung 9: Ergebnisse der Quantifizierung der Immunfluoreszenz am Tecan Spark® Plattenreader (eigene Abbildung)

Messungen im Anschluss an die qualitativen Immunfluoreszenzaufnahmen 72 h nach der Transfektion in HEK293T-Zellen. Die Werte wurden normalisiert auf die Zellzahl, Hintergrundfluoreszenzen und Transfektionseffizienz. Gezeigt sind relative Fluoreszenzintensitäten der Transfektionsansätze „Kontrolle“ und den 17 guideRNAs mit Darstellung der mittleren Standardabweichungen. Eine grüne Markierung des Balkens bedeutet, dass diejenige guideRNA für den weiteren Prozess ausgewählt wurde. Blau gekennzeichnete guideRNAs wurden nicht weitergeführt

Abbildung 9 präsentiert die relativen Fluoreszenzintensitäten der Vektorensysteme „Kontrolle“ sowie der 17 untersuchten guideRNAs. Die Kontrolle wurde normalisiert

Ergebnisse

auf eine relative Fluoreszenz von 1. Im Vergleich zu dieser wurde in allen guideRNA-Vektorensystemen 1 - 17 mindestens eine 2,1-fache relative Fluoreszenz gemessen. Den höchsten Wert zeigt das Vektorensystem mit der Expressionskassette der guideRNA 15 (relative Fluoreszenzintensität: 22,0; SD: 11,3).

Der Selektionsprozess erfolgte nach den folgenden Kriterien: Die Promotersequenz sollte homogen abgedeckt werden, mit einer Akzentsetzung im Bereich nahe des Startcodons. Die relative Fluoreszenzintensität sollte mindestens 10 betragen, während die Standardabweichung möglichst gering sein sollte. In **Abbildung 9** ist die Auswahl der guideRNAs mit Hilfe zweier Farben kenntlich gemacht. Die grüne Kennzeichnung bedeutet, dass die guideRNA für das weitere Vorgehen ausgewählt wurde. Die blau markierten guideRNAs wurden ausgeschlossen.

So konnten acht der siebzehn ursprünglichen guideRNAs bestimmt werden, deren Spezifität, Lokalisation und Standardabweichung für die weiteren Analysen geeignet erscheint.

5.3 Ergebnisse der in vitro-Experimente zur Expression des ABCA4 Transkripts

Im Folgenden werden die Resultate der in-vitro Experimente zur Expression der 8 voridentifizierten guideRNAs beschrieben, um eine verstärkte Expression des ABCA4 Transkripts nachzuweisen zu können.

5.3.1 Vektorensystem zur Potenzierung des ABCA4 Transkripts

Die untenstehende **Abbildung 10** zeigt, analog zu **Abbildung 7**, die Schemata der verwendeten Vektorensysteme. Ziel des wiederum aus zwei Vektoren bestehenden Systems ist die Aktivierung der Genexpression des ABCA4 Transkripts.

Ergebnisse

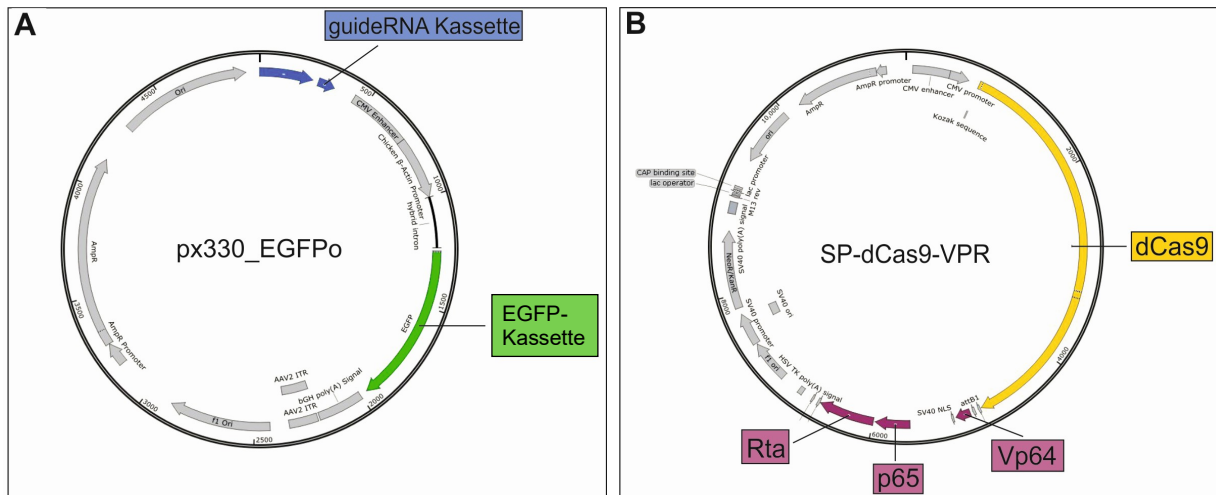


Abbildung 10: Schema der verwendeten Vektoren zur Aktivierung des *ABCA4*-Transkripts (modifiziert nach SnapGene® Software von Insightful Science)

(A) Dargestellt ist der px330_EGFPo Vektor mit der guideRNA- und EGFP-Expressionskassette (B) Die Abbildung zeigt den SP-dCas9-VPR mit der Expressionskassette für die Endnuklease dCas9 und für die Aktivatoren Rta, p65 und Vp64.

Entsprechend zum px330_mCherry-Vektor, wird hier der px330_EGFPo-Vektor verwendet (**Abbildung 10A**). Entstehende Fluoreszenzsignale des EGFP-Proteins lassen eine Einschätzung der Transfektionseffizienz zu. Gemeinsam mit dem dargestellten SP-dCas9-VPR-Vektor der **Abbildung 10B** wurde der px330_mCherry-Vektor in HEK293T-Zellen transfiziert. Eine koordinierte Expression der guideRNA, der dCas9 und der Transkriptionsfaktoren führt zu einer Verstärkung des *ABCA4* Transkripts.

5.3.2 Nachweis der verstärkten Expression des *ABCA4*-Transkripts

48 h nach der Transfektion wurde mit Hilfe des Nikon-Mikroskops die Transfektionseffizienz mikroskopisch beurteilt. **Abbildung 11** zeigt exemplarisch die Messungen der einzelnen Transfektionsansätze. Analog zu den vorhergegangenen Experimenten wurde zur besseren Vergleichbarkeit eine Kontrollprobe mit einem px330_EGFP-Vektor ohne guideRNA-Expressionskassette transfiziert.

Ergebnisse

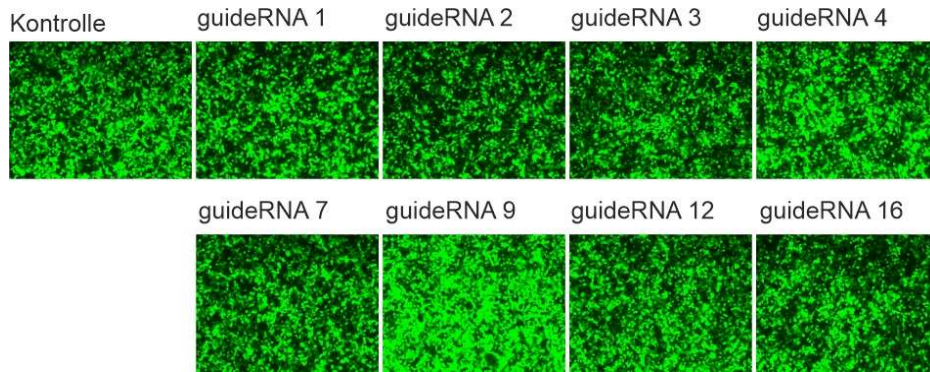


Abbildung 11: Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen 48 h nach Transfektion der HEK293T-Zellen (eigene Abbildung)

Darstellung der Transfektionsansätze „Kontrolle“ und der guideRNAs mit der Nummerierung 1, 2, 3, 4, 7, 9, 12 und 16. Die detektierte, grüne Fluoreszenz bestätigt eine erfolgreiche Transfektion in allen Transfektionsansätzen. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des Nikon-Mikroskops in einer 10x Vergrößerung erstellt.

Zusammenfassend lässt sich aus **Abbildung 10** feststellen, dass für alle Ansätze die Transfektion erfolgreich war. Eine ausreichende Transfektionseffizienz wurde als Grundvoraussetzung für das weitere Vorgehen festgelegt. Nach der oben beschriebenen Prüfung konnte die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die semiquantitative RT-PCR Messung durchgeführt werden.

Die folgende **Abbildung 12** zeigt die Resultate der RT-PCR Messungen. Analog zu den Beschriftungen der **Abbildung 11** sind hier die einzelnen Transfektionsansätze inklusive der Kontrolle gelistet. Zusätzlich ist das Ergebnis der Negativkontrollen „Untransfiziert“ abgebildet. Dieser Transfektionsansatz wurde in Bezug auf die Methodik identisch zu den übrigen Ansätzen geführt. Jedoch wurde kein kloniertes Vektorensystem in die Zellen eingebracht. Die fehlende Expression in der Agarosegel-Aufnahme der untransfizierten Proben belegt, dass die gewünschte Verstärkung des *ABCA4*-Transkripts nur mithilfe des beschriebene Vektorensystems generiert werden kann und nicht aufgrund eines möglichen PCR-Artefaktes. Des Weiteren wurde die Positivkontrolle „Humane Retina“ zur Standardisierung der Ergebnisse hinzugefügt und die dargestellte Wasserprobe „H₂O“ dient dem möglichen Nachweis von Verunreinigungen. Zur Bestätigung der Resultate wurde das Experiment unter gleichen Bedingungen drei Mal in Form technischer Replikate wiederholt.

Ergebnisse

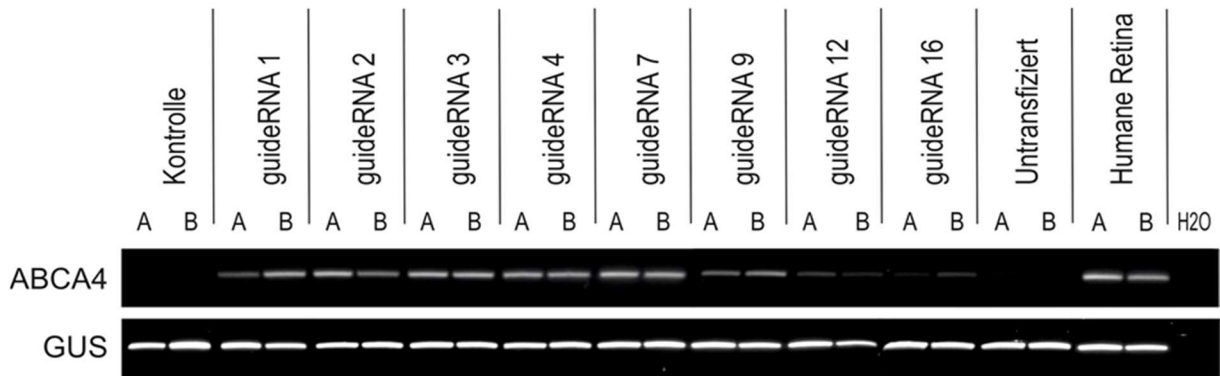


Abbildung 12: Nachweis des verstärkten Transkriptionsproduktes von *ABCA4* mit Negativkontrollen (eigene Abbildung)

RNA-Expressionsprofil der HEK293T-Zelllinien. Gesamt-RNA wurde aus den Transfektionsansätzen „Kontrolle, guideRNA 1, 2, 3, 4, 7, 9, 12 und 16, Untransfiziert, Humane Retina und H2O“ isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Messungen der semiquantitative RT-PCR wurden mit den genspezifischen Primern (*ABCA4_Ex38_F* und *ABCA4_Ex40_R*) durchgeführt und via Agarose-Gel-Elektrophorese analysiert. Die Abbildung zeigt je 2 biologischer Replikate A und B. Das Housekeeping-Gen GUS wurde konstitutiv exprimiert mit Ausnahme des H2O-Transfektionsansatzes.

ABCA4 wurde in dem Vektorsystemen der guideRNAs 1 bis 16 nachgewiesen. Die Negativkontrollen zeigen keine Expression, die Postivkontrolle „Humane Retina“ bildet eine deutliche Expression ab. Die guideRNAs 1, 2, 3, 4, 7 und 9 erzielten im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöhte Expressionen im RNA-Expressionsprofil, die guideRNAs 12 und 16 zeigten eine verminderte Intensität. Die Intensitätsabschwächung korreliert mit der Lokalisation der Zielsequenzen der einzelnen guideRNAs in Bezug zum Startcodon. So zeigt guideRNA 16 die geringste Expression und ist auf der Promotersequenz 995 bp upstream des Startcodons definiert.

5.3.3 Verschiedene Kombinationen

Zur weiteren Analyse wurden jeweils drei erfolgreich klonierte px330_EGFPo-Vektorkonstrukte zu einer Kombination zusammengefasst. Die Zusammenstellung der insgesamt 5 Kombinationen, die in der **Tabelle 32** gelistet sind, erfolgte einerseits mit px330_EGFPo-Vektorkonstrukten, dessen Zielsequenzen der guideRNAs in relativer Nachbarschaft zueinander auf der Promotersequenz definiert sind (Kombination 1, 2 und 3). Andererseits wurden Vektorkonstrukte kombiniert, deren Zielsequenzen auf der Promotersequenz verteilt waren (Kombination 4 und 5). Unter dem Aspekt einer möglichen Verbesserung der RT-PCR-Resultate wurden die

Ergebnisse

Transfektionsansätze der generierten Kombinationen neben einzelnen, klonierten px330_EGFPo-Vektorkonstrukte geführt (**Abbildung 13**).

Jeweils gemeinsam mit dem SP-dCas9-VPR-Vektor wurden die 5 Kombinationen und die einzelnen px330-EGFPo-Vektorkonstrukte der guideRNAs 1, 7, 9 und 12 in die HEK293T-Zellen transfiziert. Die Transfektionseffizienzen des EGFP-Proteins wurden 48 h nach der Transfektion mikroskopisch gemessen und konnten in allen Fällen detektiert werden.

Nach erfolgreicher Prüfung der Transfektionseffizienzen wurde wiederum mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR die Zielsequenz *ABCA4* nachgewiesen. Die nachfolgende **Abbildung 13** zeigt in der Agarosegel-Aufnahme die Expressionen der Zielsequenz *ABCA4* der einzelnen Transfektionsansätze.

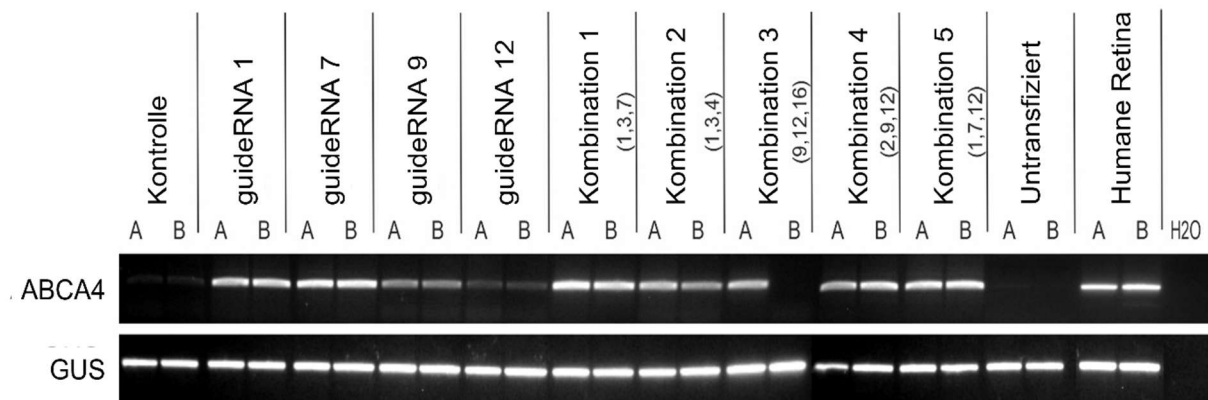


Abbildung 13: Nachweis des *ABCA4* von einzelnen guideRNAs und Kombinationen (eigene Abbildung)

Nach der RNA-Isolation und cDNA-Synthese, erfolgte die RT-PCR-Messung mit den genspezifischen Primern (*ABCA4_Ex38_F* und *ABCA4_Ex40_R*). Darstellung der Expressionen der Negativkontrollen „H₂O, Untransfiziert und Kontrolle“ und des Referenzwertes „Humane Retina“, sowie des Housekeepers „GUS“. Ebenso sind die guideRNAs 1, 7, 9 und 12, sowie die Kombinationen 1 bis 5 gezeigt. In Klammern unter der jeweiligen Kombination sind die Nummerierungen der enthaltenen guideRNA-Vektorkonstrukte beschrieben. Jeweils abgebildet sind zwei biologische Replikate A und B. „GUS“ wurde konstitutiv exprimiert. Die Negativkontrollen zeigen keine Expression im Gegensatz zur Positivkontrolle „Humane Retina“.

Die Agarosegel-Aufnahme des Housekeeper-Gens GUS zeigt eine relativ konstitutive Expression in allen Transfektionsansätzen. Analog zu **Abbildung 12**, zeigen die guideRNAs 1 und 7 eine deutliche, die guideRNAs 9 und 12 eine reduzierte Expression. Mit Ausnahme der Kombination 3 (B) wurde die Verstärkung der Zielsequenz in allen Kombinationen erfolgreich nachgewiesen.

5.3.4 Zeitreihe

Bei den bisherigen Ergebnissen der HEK293T-Zell-Transfektionen betrug die Inkubationszeit vor der mikroskopischen Messung und der semiquantitativen RT-PCR-Analyse 48 h. Zur detaillierten Analyse und einer möglichen Verkürzung der Inkubationszeit wurde eine Zeitreihe erstellt. Nach 12, 24, 36, 48 und 72 h wurden die Zellen unter ausschließlicher Verwendung der Kombination 1 weiter prozessiert. Analog zu **Abbildung 11** wurde die Immunfluoreszenzen der Transfektionsansätze mikroskopisch aufgenommen.

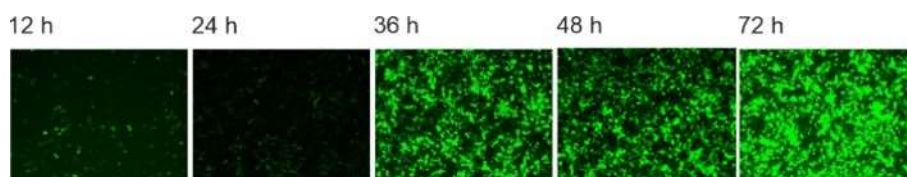


Abbildung 14: Immunfluoreszenzaufnahmen der Transfektionsansätze nach unterschiedlichen Inkubationszeiten

Dargestellt sind die mikroskopischen Aufnahmen nach der Transfektion der HEK293T-Zellen mit der Kombination 1. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe des Nikon-Mikroskops in einer 10x Vergrößerung erstellt. Die Messung der Immunfluoreszenzen des EGFP-Proteins erfolgt nach einer Inkubationszeit von 12, 24, 36, 48 und 72 h bei 37 °C im Brutschrank.

Nach 12 h und 24 h wurde nur eine geringe Intensität der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Ab 36 h war eine intensivere Fluoreszenz detektierbar. Die Fluoreszenzmessung nach 48 h war leicht schwächer, im Gegensatz zur Messung nach 72 h, die die höchste Intensität der vorliegenden Zeitreihe aufweist.

Im Anschluss wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die semiquantitative RT-PCR Messung durchgeführt. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigt **Abbildung 15**, die gemäß der RNA-Expressionsprofile in **Abbildung 12** aufgebaut ist mit Ausnahme des untransfizierten Transfektionsansatzes.

Ergebnisse

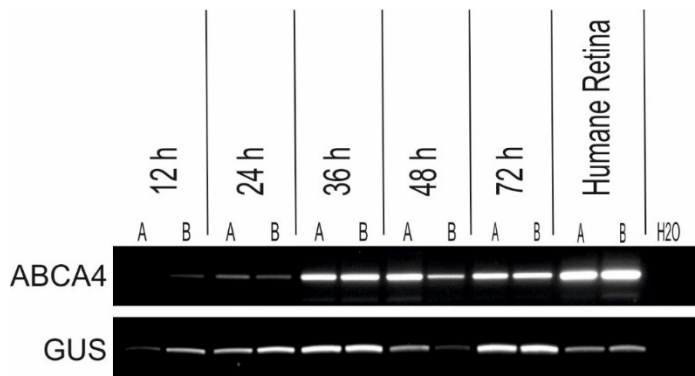


Abbildung 15: Nachweis von *ABCA4* unter Verwendung von Kombination 1 nach unterschiedlichen Inkubationszeiten

Die HEK293-T Zellen wurden mit der Kombination 1 transfiziert. Nach der RNA-Isolation und der cDNA-Synthese erfolgte eine RT-PCR-Messung mit Hilfe der genspezifischen Primer (*ABCA4_Ex38_F* und *ABCA4_Ex40_R*). A und B stellen biologische Replikate dar. „H₂O“ ist als Negativkontrolle gezeigt und die „Humane Retina“ als Positivkontrolle. „GUS“ wurde als Housekeeper-Gen verwendet. GUS wurde mit der Ausnahme von den Ansätzen 12 h (A), 48 h (B) und H₂O relativ konstitutiv exprimiert. *ABCA4* konnte in den Transfektionsansätzen 12 h (B) und 24 h mit schwacher Expressionsintensität nachgewiesen werden. In den Ansätzen 36 h, 48 h, 72 h und humane Retina zeigt sich eine deutliche Expression.

Das Housekeeper-Gen „GUS“ weist eine abgeschwächte Intensität der Expression in dem biologischen Replikat A mit der Inkubationszeit von 12 h auf. Ebenso in B mit einer Inkubationszeit von 48 h und in der Humanen Retina. Eine Expression der Zielsequenz *ABCA4* war schon nach 12 h in dem biologischen Replikat B detektierbar. Ab 36 h zeigte sich eine deutlich intensivere Expression. Die Intensität der Expression sank nach 48 h. Dies korrelierte mit der ebenfalls sinkenden Intensität des Housekeeper-Gens GUS. Insgesamt wurde gezeigt, dass ein weiteres Vorgehen mit den Transfektionsansätzen nach 36 h Inkubationszeit möglich wäre.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es die Genexpression von *ABCA4* in HEK293-T-Zellen zu aktivieren. Dies kann ein initialer Schritt sein, um die Untersuchung des Transkripts des *ABCA4*-Gens insbesondere auf intronische und regulatorisch wirkende Mutationen in Zellen zu ermöglichen, die das Netzhaut-spezifische Gen prinzipiell nicht exprimieren. Dazu wurden in dieser Doktorarbeit siebzehn bioinformatisch vorhergesagte guideRNAs mit Hilfe der CRISPR-Cas9-Technologie auf ihre Spezifität gegenüber der Zielsequenzen im *ABCA4*-Gen getestet. Basierend auf den experimentellen Daten erfolgte eine Auswahl von acht geeigneten guideRNAs. Mit Hilfe der ausgewählten guideRNAs und unter dem Einsatz des CRISPR-dCas9-VPR-Systems wurde die Transkription der Zielsequenz erfolgreich initiiert. Zur weiteren Analyse und unter dem Aspekt einer möglichen Verbesserung der Expressionsergebnisse wurden fünf Kombinationen bestehend aus jeweils drei spezifischen guideRNAs untersucht. Ebenso wurde eine Zeitreihe mit Blick auf eine Verkürzung der erforderlichen Inkubationszeit erstellt.

Nach der bioinformatischen Auswahl der guideRNAs wurde deren Spezifität für die jeweils korrespondierende Zielsequenz experimentell überprüft. Hierbei zeigten alle guideRNA-Vektoren in den Transfektionsergebnissen eine erhöhte relative Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle. Schlussfolgernd waren die definierten Auswahlkriterien sowie das Softwareprogramm *Optimized CRISPR Design Tool* für das initiale Design der guideRNAs geeignet. Die einzelnen guideRNAs variieren jedoch untereinander in ihren Spezifitäten. Solche Variabilitäten waren teilweise nicht aus den bioinformatischen Angaben abzuleiten. Beispielsweise erzielte guideRNA 4 mit dem niedrigsten berechneten *on-target-Score* (65/100) im Vergleich zur Kontrolle eine 20,2-fach erhöhte relative Fluoreszenz. Außerdem zeigten sich bei guideRNA 5 und guideRNA 6 unterschiedliche Resultate in der relativen Fluoreszenz, obwohl der *on-target-Score* mit 71 (71/100) identisch war. Daher scheinen weitere Faktoren für eine genaue Vorhersage der Spezifität von Bedeutung zu sein, die von der Software nicht erfasst wurden. Sledzinski und Kollegen beschreiben ebenso die geringe Verlässlichkeit der Spezifität von bioinformatisch erstellten guideRNAs in Bezug auf die berechneten Ergebnisse der Algorithmen verschiedener Softwareprogramme (Sledzinski et al. 2020). Eine eigene, experimentelle Überprüfung der entworfenen,

Diskussion

auf die Zielsequenz abgestimmten guideRNAs ist somit essenziell, um nicht vorhersehbare Interferenzen zu minimieren.

Zusammen mit dem dCas9-VPR-System erzielten die ausgewählten guideRNAs eine Aktivierung und Verstärkung des *ABCA4* Transkripts in HEK293T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Auch hier zeigten sich Unterschiede bei den jeweiligen *ABCA4*-Expressionen. Sie scheinen jedoch mit der Lokalisation der Zielsequenzen auf dem abgesteckten Promotorbereich zu korrelieren. Die Vektorensysteme derjenigen guideRNA-Zielsequenzen, die sich in einem Sequenzfenster von 0 bis 350 bp stromaufwärts des Transkriptionstarts befanden, zeigten intensitätsstärkere RNA-Expressionsprofile von *ABCA4* im Vergleich zu Vektorsystemen mit Zielsequenzen außerhalb dieses Fensters. Vergleichbare Studien beobachteten ebenfalls, dass der Abstand zwischen der Zielsequenz der guideRNA und des Transkriptionsstarts ein guter Prädiktor für die Aktivierung und Verstärkung des Zielgens ist (Deaner and Alper, 2017). Das Softwareprogramm *Optimized CRISPR Design Tool* berücksichtigt nicht die Lokalisation der Zielsequenzen in Bezug auf den Transkriptionsstart bei dem Design von guideRNAs. Somit können die Intensitätsunterschiede der *ABCA4*-Expression nicht im Vergleich zu den Vorhersagen des Softwareprogramms gesehen werden. Dies zeigt wiederholt, dass keine genaue Vorhersage aufgrund rein bioinformatischer Algorithmen getroffen werden kann.

Nach der erfolgreichen Aktivierung und Verstärkung der Genexpression des *ABCA4*-Gens in HEK293-T-Zellen wurden zur weiteren Analyse fünf Kombinationen bestehend aus jeweils drei spezifischen guideRNAs gebildet und die jeweiligen Expressionsprofile im Vergleich zu den singulären guideRNA-Vektorensysteme untersucht. Dieser direkte Vergleich sollte die Analyse einer möglichen Intensitätssteigerung durch das gleichzeitige Ansprechen mehrerer Zielsequenzen von *ABCA4* ermöglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Intensitätssteigerung der Genexpression von *ABCA4* durch die Kombinationen im Vergleich zu singulären guideRNA-Vektorkonstrukten nicht erzielt werden konnte. Beispielsweise weist Kombination 4 mit den guideRNA-Vektorsystemen 2, 9 und 12 insgesamt ein vergleichbares RNA-Expressionsprofil wie der singuläre guideRNA-Vektor 2 auf. Während in vergleichbaren Studien ebenfalls die höchste Genexpression mit einer singulären guideRNA erzielt wurde (Moses et al., 2019; Qi et al., 2013), zeigten andere Arbeitsgruppen, dass die Verwendung von Kombinationen aus drei bis vier

Diskussion

guideRNAs vorzuziehen ist (Maeder et al., 2013; Wiegand et al., 2015). Der Vorteil der singulären Verwendung im Vergleich zur Bildung von Kombinationen könnte darin liegen, dass ein einzelnes guideRNA-Vektorsystem zu einer geringeren Anzahl von off-target Bindungsstellen in den Zielzellen führt (Wu et al., 2015). Weiterhin wurde bereits bei Anwendungen verschiedener transkriptioneller Aktivierungs- und Repressionssystemen darüber spekuliert, ob die hemmenden Effekte einer sterischen Hinderung mit einer einzelnen guideRNA reduziert werden könnten (Hilton et al., 2015; Qi et al., 2013). Unter dem Aspekt der zukünftigen Entwicklung eines diagnostischen Protokolls zur Auffindung neuer pathologischer Varianten auf Transkriptebene aus PBMCs, ist die vereinfachte Anwendung von nur einem guideRNA-Vektorsystem und damit einer Minimierung des Risikos für Interferenzen von Vorteil.

Die hier vorliegende Doktorarbeit stellt einen initialen Schritt zur Entwicklung einer diagnostischen Methode zur Untersuchung des Transkripts von *ABCA4* auf pathogene Varianten dar. Zur Verkürzung der Inkubationszeit im Rahmen einer Vereinfachung des künftigen Verfahrens wurde eine Zeitreihe für die erforderlichen Transfektionsdauern erstellt. Nach 12, 24, 36, 48 und 72 h wurden die Zellen unter ausschließlicher Verwendung der Kombination 1 weiter prozessiert. Eine leichte Expression der Zielsequenz von *ABCA4* war schon nach 12 h Inkubationszeit in einem von insgesamt zwei biologischen Replikaten detektierbar. Aber erst nach 36 h zeigte sich ein intensives RT-PCR-Resultat in beiden biologischen Replikaten. Eine weitere Steigerung der Expressionsintensität nach 48 h oder 72 h war nicht zu erkennen. Vergleichbare Studien belegen ebenfalls eine optimale Inkubationszeit von 36 – 48 h (Koner mann et al., 2015; Wiegand et al., 2015). Standardisierte Inkubationszeiten über 48 h würden einen Wechsel des Zellmediums erfordern und damit das Kontaminationsrisiko der Zellen erhöhen. Schlussfolgernd sollte daher in diesem Verfahren eine minimale Inkubationszeit von 36 h und eine maximale Inkubationszeit von 48 h gewählt werden.

Das Ziel dieser Doktorarbeit, die Genexpression von *ABCA4* mit Hilfe der CRISPR-Cas9-Technologie gezielt zu aktivieren wurde in HEK293T-Zellen durchgeführt. Bekanntlich hat sich diese humane Zelllinie als geeignetes Testsystem erwiesen, um zelluläre Zusammenhänge zu analysieren und Auswirkungen neuer Methoden nachzuvollziehen (Soto-Velasquez et al., 2018). Für das diagnostische Protokoll zur

Diskussion

Analyse des Transkripts von *ABCA4* werden jedoch Zellen benötigt, die risikoarm, und vielfach erprobt vom Patienten entnommen und kultiviert werden können. Somit erscheint der nächste Schritt in Fortsetzung dieser Arbeit als sinnvoll, nun die geeigneten Vektorkonstrukte an PBMCs zu erproben. Es gilt zu zeigen, dass eine Übertragung des Systems möglich ist, ohne dass sich maßgebliche Unterschiede im Verhalten der Zellpopulationen ergeben. Eine mögliche Komplikation könnte die bestehende, zellspezifische Zugänglichkeit der Zielsequenzen für die guideRNAs sein. Im Gegensatz zum Genom von Bakterien, in denen CRISPR-Systeme erstmals nachgewiesen wurden, wird die DNA in Eukaryoten weitgehend von Histonen geschützt. Histone bilden Nukleosomen, wodurch eukaryotische DNA dichter verpackt werden kann und infolgedessen die Zugänglichkeit des Zielgens und die Bindung von CRISPR/Cas9-Komplexen beeinflusst wird (Bergsma et al., 2018). Mithilfe eines Hypersensitivitäts-Assays könnten offene DNA-Regionen ausfindig gemacht werden, da DNA hier zugänglich für den Verdau durch DNase I ist.

Morbus Stargardt ist eine autosomal-rezessive Erkrankung, das bedeutet Betroffene tragen auf beiden Allelen des *ABCA4*-Gens eine pathogene Mutation (Allikmets et al., 1997). Nach einer vollständigen Sequenzierung der kodierenden Bereiche des *ABCA4*-Gens können bei maximal 70 % der Patienten mit einer klinischen Stargardt Diagnose beide Mutationen identifiziert werden. Bei 17 – 30 % der Patienten wird jedoch nur eine krankheits-auslösende Variante gefunden (Schulz et al., 2017). Ist die Etablierung der CRISPR-dCas9-VPR-Technologie in PBMCs aus Patientenblut erfolgreich, kann mittels einer RNA-Isolation, einer cDNA-Synthese und einer darauffolgenden PCR das Transkript von *ABCA4* detektiert werden. Mit Hilfe eines solchen Transkripts eines Patienten wäre darauffolgend eine Bewertung bisher nicht identifizierter, pathogener Varianten in Bezug auf ihre funktionellen Auswirkungen auf Transkriptebene möglich. Erste Hinweise kann die Gelelektrophorese des Transkripts eines Patienten liefern. Werden zwei Fragmente unterschiedlicher Länge detektiert, lässt das auf eine allelische Heterogenität von *ABCA4*-Transkripten schließen. Zur genaueren Charakterisierung würde im Anschluss eine Sequenzierung des veränderten Transkripts und ein Vergleich mit der *ABCA4*-Wildtyp-mRNA erfolgen.

Verschiedene Mutationen resultieren in einer Veränderung des RT-PCR-Resultats des Patienten. Beispielsweise würde eine Variante, die eine Insertion oder eine

Diskussion

readthrough-Mutation zur Folge hat, ein RT-PCR-Fragment verlängern. Eine Deletion würde zu einer Verkürzung führen. Weiterhin sind Mutationen von Bedeutung, die das korrekte Spleißen der mRNA beeinflussen. Spleißmutation treten in Exons und Introns auf und können eine bestehende Spleißstelle stören, eine neue generieren oder eine kryptische Spleißstelle aktivieren (Abramowicz et al. 2018). Die pathogenen Varianten können auch die komplementäre Bindung von Splicing-*Enhancer* oder *Silencer* beeinflussen. Solche Mutationen würden während des Prä-mRNA-Spleißens zum Überspringen von Exonen oder Exon-Fragmenten führen und in der Gelelektrophorese durch ein verkürztes Amplifikat erkennbar sein (Bergsma et al., 2018; Read und Donnai, 2008).

Größtenteils liegen die Mutationen als Missense-Varianten vor, welche zu einer relevanten Veränderung von regulatorischen Elementen führen können, die wiederum einen Einfluss auf die korrekte Prozessierung der prä-mRNA haben (Garces et al., 2018). Intronische Segmente können hierbei fälschlicherweise als kodierende Sequenzen erkannt und in der reifen mRNA beibehalten werden. Dadurch entstehen sogenannte Pseudoexons (Albert et al., 2018; Braun et al., 2013). Diese pathogenen Varianten stellen einen möglichen therapeutischen Ansatz für die Verwendung von Antisense-Oligonukleotiden (AON) dar. AONs sind kurzkettige Nukleinsäuren, die komplementär an die Ziel-prä-mRNA binden und ein Überspringen von Pseudoexons ermöglichen (Arechavala-Gomez et al., 2014; Hammond and Wood, 2011). Die Wirksamkeit von Antisense-Oligonukleotiden wurden bereits erfolgreich *in vitro* bei STGD getestet und haben sich als vielversprechender therapeutische Ansatz bestätigt (Albert et al., 2018; Sangermano et al., 2019). Insgesamt ist eine genaue Definition der Mutationen und deren funktionellen Auswirkungen auf das Transkript nicht nur für eine mögliche Therapie von maßgeblicher Bedeutung, sondern auch für die Prognose und die Aufklärung über eine mögliche Vererbbarkeit.

Eine Komplikation der die CRISPR-dCas9-VPR-Technologie in PBMCs in Bezug auf die Detektion von alternativen Spleißvarianten ist eine mögliche Spezifität von Regulationsmechanismen in Photorezeptoren. Morphologisch zählen Photorezeptorzellen zu Nervenzellen, jedoch mit zum Teil spezifische Spleißfaktoren und Spleißvarianten (Murphy et al., 2016; Parfitt et al., 2016). Ist die Etablierung der Methodik in PBMCs erfolgreich, lässt die Interpretation der Ergebnisse daher keine

Diskussion

direkten Rückschlüsse auf die funktionellen Auswirkungen der Mutationen in Photorezeptoren zu. Dennoch bietet die Methodik eine gute Option, um die funktionellen Auswirkungen pathogener Varianten auf das Transkript einschätzen zu können. Dies liegt darin begründet das *ABCA4* ausschließlich in Photorezeptoren exprimiert wird und daher eine direkte Untersuchung des Gewebes von Betroffenen nicht verfügbar ist (Illing and Molday, 1997). Ein Vergleich mit Ergebnissen, die unter Verwendung unterschiedlicher Zelllinien generiert wurden, könnte eine genauere Bewertung ermöglichen. Besonders die Verwendung von Photorezeptoren, die von induziert pluripotenten Stammzellen abstammen, dienen als mögliche Interpretationsgrundlage.

Zusammenfassend ist für die Bewertung der Pathogenität einer genetischen Varianten eine funktionelle Analyse des Transkripts von weitreichender Bedeutung. Mit Hilfe einer etablierten Methode zur Bewertung des *ABCA4*-Transkripts von Patienten, könnte die diagnostische Erfolgsrate im Hinblick auf die hohe Anzahl an nicht identifizierten pathogenen Varianten im *ABCA4*-Gen substanziell erhöht werden und den betroffenen Patienten in Zukunft eine Teilnahme an einer zielgerichteten Therapie ermöglichen.

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit, die Genexpression von *ABCA4* mit Hilfe der CRISPR-Cas9-Technologie gezielt in HEK293-T-Zellen zu aktivieren, wurde erreicht. Dies stellt den initialen ersten Schritt für eine zukünftige Bewertung der Funktionsfähigkeit eines *ABCA4*-Transkripts von Patienten dar.

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme	23
Tabelle 2: Verwendete Zelllinien	23
Tabelle 3: Verwendete Vektoren	23
Tabelle 4: Zur Klonierung der guideRNAs verwendete Oligonukleotide	24
Tabelle 5: Für PCR und Sequenzierung verwendete Oligonukleotide.	25
Tabelle 6: Durch Klonierung hergestellte Vektorkonstrukte	26
Tabelle 7: Verwendete Enzyme	27
Tabelle 8: Verwendete Reaktionssysteme	27
Tabelle 9: Verwendeter Molekularmassenstandard	28
Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Reagenzien	28
Tabelle 11: Verwendete Puffer und Medien	29
Tabelle 12: Verwendete Geräte	31
Tabelle 13: Verwendete Software	32
Tabelle 14: PCR-Ansatz	34
Tabelle 15: Schritte des PCR-Programms	34
Tabelle 16: Herstellung eines 1 %-Agarosegels	35
Tabelle 17: Ligationsansatz für den pGem®-T-Vektor	36
Tabelle 18: Kolonie-PCR-Ansatz	37
Tabelle 19: Ansatz des pGem®-T-Vektor - Kontroll-Verdau	38
Tabelle 20: Sequenzierungsansatz	39
Tabelle 21: Sequenzierereinstellung des Thermocyclers	39
Tabelle 22: Ansatz für pGem®-T-Restriktionsverdau	40
Tabelle 23: Ansatz für Restriktionsverdau	40
Tabelle 24: Ligationsansatz für Zielsequenz in Zielvektor	41
Tabelle 25: Verdau des px330_mCherry-Vektors	42
Tabelle 26: Phosphorylierung and Annealing der Oligonukleotidpaare	42
Tabelle 27: RAMP-Programm	42
Tabelle 28: Ligation von guideRNA und px330_mCherry-Vektor	43
Tabelle 29: Bearbeitung der Ligation zur Entfernung von Rekombinationsprodukten	43
Tabelle 30: Transfektionsansatz der Kalziumphosphat-Methode	45
Tabelle 31: Ansatz für die TransIT®-2020 Transfektion	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 32: Zusammenstellung der Kombinationen für die TransIT®-2020 Transfektion	48
Tabelle 33: Ansatz für die cDNA-Synthese mit Hilfe der Reversen Transkriptase	50
Tabelle 34: Einstellungen des Thermocycler für die cDNA-Synthese	50
Tabelle 35: Übersicht der ausgewählten 17 guideRNAs und Darstellung ausgewählter Merkmale als Ergebnisse der bioinformatischen Analyse	54

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fundusfotografie und FAF eines STGD-Patienten (modifiziert nach Tanna et al., 2017)	10
Abbildung 2: Lokalisation von <i>ABCA4</i> (modifiziert nach University-of-Santa-Cruz (UCSC) Genome Browser)	12
Abbildung 3: Sekundärstruktur des <i>ABCA4</i> (modifiziert nach Sullivan, 2009)	13
Abbildung 4: Bildung von toxischen A2E (modifiziert nach Tsybovsky et al., 2010)	14
Abbildung 5: Das CRISPR-Cas9-System und das CRISPR-dCas9-VPR-System (modifiziert nach Mohamed Saleem, 2014)	21
Abbildung 6: Schematische Darstellung der guideRNA – Auswahl (modifiziert nach SnapGene® Software von Insightful Science)	55
Abbildung 7: Schema der verwendeten Vektoren zur Testung der guideRNAs (modifiziert nach der SnapGene® Software von Insightful Science)	56
Abbildung 8: Mikroskopische Immunfluoreszenz-Aufnahmen der Transfektionsansätze auf 96-Well-Platten 72 h nach der Transfektion in die HEK293T-Zellen (eigene Abbildung)	58
Abbildung 9: Ergebnisse der Quantifizierung der Immunfluoreszenz am Tecan Spark® Plattenreader (eigene Abbildung)	59
Abbildung 10: Schema der verwendeten Vektoren zur Aktivierung des <i>ABCA4</i> -Transkripts (modifiziert nach SnapGene® Software von Insightful Science)	61
Abbildung 11: Mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen 48 h nach Transfektion der HEK293T-Zellen (eigene Abbildung)	62
Abbildung 12: Nachweis des verstärkten Transkriptionsproduktes von <i>ABCA4</i> mit Negativkontrollen (eigene Abbildung)	63
Abbildung 13: Nachweis des <i>ABCA4</i> von einzelnen guideRNAs und Kombinationen (eigene Abbildung)	64
Abbildung 14: Immunfluoreszenzaufnahmen der Transfektionsansätze nach unterschiedlichen Inkubationszeiten	65
Abbildung 15: Nachweis von <i>ABCA4</i> unter Verwendung von Kombination 1 nach unterschiedlichen Inkubationszeiten	66

9 Abkürzungsverzeichnis

A.d.	<i>Aqua destillata</i>
A2E	<i>N-retinylidene-N-retinyl-ethanolamine</i>
A2PE	<i>N-retinylidene-N-retinyl-phosphatidyl-ethanolamine</i>
ABCA4	<i>ATP-binding-cassette-A-member-4-Gen</i>
ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>
AON	<i>Antisense-Oligonukleotide</i>
ATP	<i>Adenosintri-phosphat</i>
bp	<i>Basenpaar</i>
Cas	<i>CRISPR-assoziierte Proteine</i>
dCas9	<i>deaktivierte CRISPR-assoziierte Endonuklease 9</i>
ECD	<i>Extrazelluläre Domäne</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
ELOVL4	<i>Elongation-of-very-long-chain-fatty-acids-protein-4-Gen</i>
FAF	<i>Fundusautofluoreszenz-Aufnahme</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
G-ERG	<i>Ganzfeld-Elektroretinogramm</i>
guideRNA	<i>guide-Ribonukleinsäure</i>
h	<i>Stunde(n)</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
kb	<i>Kilobasenpaar</i>
kDa	<i>Kilodalton</i>
mg	<i>Milligramm</i>
min	<i>Minuten, Minuten</i>
ml	<i>Milliliter</i>
N-Retinyl-PE	<i>N-Retinylidene-Phosphatidylethanolamin</i>
OCT	<i>Optische Kohärenztomographie</i>
PAM	<i>Protospacer-adjactant-motif</i>
PBMC	<i>Pluripotente, mononukleäre Zellen des Blutes</i>
PCR	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion</i>
PE	<i>Phosphatidylethanolamin</i>
Pen/Strep	<i>Penicillin/Streptomycin</i>
PNK	<i>Polynukleotid-Kinase</i>

pre-crRNA	<i>Vorläufer CRISPR RNA</i>
<i>PRPH2</i>	<i>Peripherin-2-Gen</i>
px330_mCherry	<i>pU6-(BbsI)_CBh-Cas9-T2A-mCherry</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
RPE	<i>Retinales Pigmentepithel</i>
s	<i>Sekunden</i>
SNP	<i>Single-Nukleotid-Polymorphismus</i>
STGD	<i>Morbus Stargardt</i>
tracrRNA	<i>Transactivating-crRNA</i>
UCSC	<i>University-of-Santa-Cruz</i>
V	<i>Volt</i>

10 Literaturverzeichnis

- Abramowicz, A., Gos, M., 2018. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J Appl Genet* 59, 253–268. <https://doi.org/10.1007/s13353-018-0444-7>
- Agbaga, M.P., Brush, R.S., Mandal, M.N.A., Henry, K., Elliott, M.H., Anderson, R.E., 2008. Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12843–12848. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802607105>
- Albert, S., Garanto, A., Sangermano, R., Khan, M., Bax, N.M., Hoyng, C.B., Zernant, J., Lee, W., Allikmets, R., Collin, R.W.J., Cremers, F.P.M., 2018. Identification and Rescue of Splice Defects Caused by Two Neighboring Deep-Intronic ABCA4 Mutations Underlying Stargardt Disease. *The American Journal of Human Genetics* 102, 517–527. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.02.008>
- Allikmets, R., 2000. Further evidence for an association of ABCR alleles with age-related macular degeneration. The International ABCR Screening Consortium. *Am J Hum Genet* 67, 487–491.
- Allikmets, R., 2000. Simple and complex ABCR: Genetic predisposition to retinal disease. *Am J Hum Genet* 67, 793–799. <https://doi.org/10.1086/303100>
- Allikmets, R., Singh, N., Sun, H., Shroyer, N., Hutchinson, A., Chidambaram, A., Gerrard, B., Anderson, K., Baird, L., Stauffer, D., Peiffer, A., Rattner, A., Smallwood, P., Li, Y., Anderson, K., Lewis, R., Nathans, J., Leppert, M., Dean, M., Lupski, J., 1997. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 15, 236–246. <https://doi.org/10.1038/ng0397-236>
- Arechavala-Gomez, V., Khoo, B., Aartsma-Rus, A., 2014. Splicing modulation therapy in the treatment of genetic diseases. *Application of Clinical Genetics* 7, 245–252. <https://doi.org/10.2147/TACG.S71506>
- Bergsma, A.J., van der Wal, E., Broeders, M., van der Ploeg, A.T., Pim Pijnappel, W.W.M., 2018. Alternative Splicing in Genetic Diseases: Improved Diagnosis and Novel Treatment Options, 1st ed, *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.07.008>

Literaturverzeichnis

- Bernstein, P.S., Tammur, J., Singh, N., Hutchinson, A., Dixon, M., Pappas, C.M., Zabriskie, N.A., Zhang, K., Petrukhin, K., Leppert, M., Allikmets, R., 2001. Diverse macular dystrophy phenotype caused by a novel complex mutation in the ELOVL4 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 3331–3336.
- Braun, T., Mullins, R., Wagner, A., Andorf, J., Johnston, R., Bakall, B., Deluca, A., Fishman, G., Lam, B., Weleber, R., Cideciyan, A., Jacobson, S., Sheffield, V., Tucker, B., Stone, E., 2013. Non-exonic and synonymous variants in ABCA4 are an important cause of Stargardt disease. *Hum Mol Genet* 22, 5136–5145. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt367>
- Briggs, C.E., Rucinski, D., Rosenfeld, P.J., Hirose, T., Berson, E.L., Dryja, T.P., 2001. Mutations in ABCR (ABCA4) in patients with Stargardt macular degeneration or cone-rod degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 2229–2236.
- Carvalho, L.S., Vandenberghe, L.H., 2015. Promising and delivering gene therapies for vision loss. *Vision Res* 111, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2014.07.013>
- Cremers, F., van de Pol, D., van Driel, M., den Hollander, A., van Haren, F., Knoers, N., Tijmes, N., Bergen, A., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Pinckers, A., Deutman, A., Hoyng, C., 1998. Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum Mol Genet* 7, 355–362. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.3.355>
- da Palma, M., Martin, D., Salles, M., Teixeira Motta, F., Abujamra, S., Sallum, J., 2019. Retinal dystrophies and variants in PRPH2. *Arq Bras Oftalmol*. <https://doi.org/10.5935/0004-2749.20190033>
- Deaner, M., Alper, H.S., 2017. Systematic testing of enzyme perturbation sensitivities via graded dCas9 modulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng* 40, 14–22. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.01.012>
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602–607. <https://doi.org/10.1038/nature09886>.CRISPR

Literaturverzeichnis

- Downes, S., Packham, E., Cranston, T., Clouston, P., Seller, A., Nemeth, A., 2012. Detection Rate of Pathogenic Mutations in ABCA4 Using Direct Sequencing: Clinical and Research Implications. *Archives of Ophthalmology* 130, 1486–1489.
- Farjo, R., Skaggs, J., Quiambao, A.B., Cooper, M.J., Naash, M.I., 2006. Efficient non-viral ocular gene transfer with compacted DNA nanoparticles. *PLoS One* 1, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000038>
- Finnemann, S.C., Leung, L.W., Rodriguez-Boulan, E., 2002. The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3842–3847. <https://doi.org/10.1073/pnas.052025899>
- Fishman, G.A., Stone, E.M., Grover, S., Derlacki, D.J., Haines, H.L., Hockey, R.R., 1999. Variation of Clinical Expression in Patients With Stargardt Dystrophy and Sequence Variations in the ABCR Gene. *Archives of Ophthalmology* 117, 504.
- Franceschetti, A., 1965. A special form of tapetoretinal degeneration: undus flavimaculatus. *Trans Am Acad* 69, 1048–1053.
- Fujinami, K., Sergouniotis, P.I., Davidson, A.E., Mackay, D.S., Tsunoda, K., Tsubota, K., Robson, A.G., Holder, G.E., Moore, A.T., Michaelides, M., Webster, A.R., 2013. The clinical effect of homozygous ABCA4 Alleles in 18 patients. *Ophthalmology* 120, 2324–2331. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2013.04.016>
- Garces, F., Jiang, K., Molday, L.L., Stöhr, H., Weber, B.H., Lyons, C.J., Maberley, D., Molday, R.S., 2018. Correlating the expression and functional activity of ABCA4 disease variants with the phenotype of patients with stargardt disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 59, 2305–2315. <https://doi.org/10.1167/iovs.17-23364>
- Garcia-Bloj, B., Moses, C., Sgro, A., Plani-lam, J., Arooj, M., Duffy, C., Thiruvengadam, S., Sorolla, A., Corvalan, A.H., Blancafort, P., 2016. Waking up dormant tumor suppressor genes with zinc fingers , TALEs and the CRISPR / dCas9 system. *Oncotarget* 7.
- Gelissen, O., de Laey, J.J., 1985. A clinical review of Stargardt's disease and/or Fundus Flavimaculatus with follow-up. *Int Ophthalmol* 8, 225–235. <https://doi.org/10.1007/BF00137651>

Literaturverzeichnis

- Gilbert, L., Larson, M., Morsut, L., Liu, Z., Gloria, A., Torres, S., Stern-Ginossar, N., Brandman, O., Whitehead, H., Doudna, J., Lim, W., Jonathan, S., 2013. CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes. *Cell* 154, 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>.CRISPR-Mediated
- Gill, J.S., Georgiou, M., Kalitzeos, A., Moore, A.T., Michaelides, M., 2019. Progressive cone and cone-rod dystrophies: clinical features, molecular genetics and prospects for therapy. *British Journal of Ophthalmology* 103, 711–720. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2018-313278>
- Hammond, S.M., Wood, M.J.A., 2011. Genetic therapies for RNA mis-splicing diseases 27. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.02.004>
- Hilton, I., Vockley, C., Pratiksha, I., Crawford, G., Reddy, T., Gersbach, C., 2015. Epigenome editing by a CRISPR/Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol* 33, 510–517. <https://doi.org/10.1038/nbt.3199>.Epigenome
- Holland, B., Susan, C., Karl, K., Christopher, H., 2003. ABC Proteins: From Bacteria to Man.
- Holz, F.G., Schiitt, F., Kopitz, J., Eldred, G.E., Kruse, F.E., Volcker, H.E., Cantz, M., 1999. Inhibition of Lysosomal Degradative Functions in RPE Cells by a Retinoid Component of Lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 737–743.
- Hsu, P., Lander, E.S., Zhang, F., 2014. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157, 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>.
- Huang, X., Huang, F., Wu, K., Wu, J., Chen, J., Pang, C.-P., Lu, F., Qu, J., Jin, Z.-B., 2015. Open Genotype – phenotype correlation and mutation spectrum in a large cohort of patients with inherited retinal dystrophy revealed by next-generation sequencing. *Genetics in Medicine* 17, 271–278. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.138>
- Illing, M.E., Molday, R.S., 1997. The 220 kDa RIM protein of OD outer segments is a novel member of the ABC transporter superfamily. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 10303–10310.

Literaturverzeichnis

- 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. *J Bacteriol* 169, 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jiang, F., Pan, Z., Xu, K., Tian, L., Xie, Y., Zhang, X., Chen, J., Dong, B., Li, Y., 2016. Screening of ABCA4 gene in a chinese cohort with stargardt disease or cone-rod dystrophy with a report on 85 novel mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57, 145–152. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-18190>
- 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* (1979) 337, 816–822. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kaminski, W.E., Piehler, A., Wenzel, J.J., 2006. ABC A-subfamily transporters: Structure, function and disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1762, 510–524. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.01.011>
- Kellner, U., Wachtlin, J., 2008. *Retina - Diagnostik und Therapie der Erkrankungen des hinteren Augenabschnitts*, 1st ed.
- Klevering, B.J., Yzer, S., Rohrschneider, K., Zonneveld, M., Allikmets, R., van den Born, L.I., Maugeri, A., Hoyng, C.B., Cremers, F.P.M., 2004. Microarray-based mutation analysis of the ABCA4 (ABCR) gene in autosomal recessive cone-rod dystrophy and retinitis pigmentosa. *European Journal of Human Genetics* 12, 1024–1032. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201258>
- Klevering, J., Deutmann, A., Maugeri, A., Cremers, F., Hoyng, C., 2005. The spectrum of retinal phenotypes caused by mutations in the ABCA4 gene. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 243, 90–100. <https://doi.org/10.1007/s00417-004-1079-4>
- Konermann, S., Brigham, M.D., Trevino, A.E., Joung, J., Abudayyeh, O.O., Barcena, C., Hsu, P.D., Habib, N., Gootenberg, J.S., Nishimasu, H., Nureki, O., Zhang, F., 2015. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 517, 583–8. <https://doi.org/10.1038/nature14136>. Genome-scale

- Kong, J., Kim, S., Binley, K., Pata, I., Doi, K., Mannik, J., Zernant-Rajang, J., Kan, O., Iqball, S., Naylor, S., Sparrow, JR., Gouras, P., Allikmets, R., 2008. Correction of the disease phenotype in the mouse model of Stargardt disease by lentiviral gene therapy. *Gene Ther.* 15, 1311–1320.
- Lambertus, S., van Huet, R.A.C., Bax, N.M., Hoefsloot, L.H., Cremers, F.P.M., Boon, C.J.F., Klevering, B.J., Hoyng, C.B., 2015. Early-onset stargardt disease: Phenotypic and genotypic characteristics. *Ophthalmology* 122, 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2014.08.032>
- Lewis, R., Shroyer, N., Singh, N., Allikmets, R., Hutchinson, A., Li, Y., Lupski, J., Leppert, M., Dean, M., 1999. Genotype/phenotype analysis of a photoreceptor-specific ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, in Stargardt disease. *Am J Hum Genet* 64, 422–434. <https://doi.org/10.1086/302251>
- Lin, S., Ewen-Campen, B., Ni, X., Housden, B.E., Perrimon, N., 2015. In Vivo Transcriptional Activation Using CRISPR / Cas9 in *Drosophila*. *Genetics* 201, 433–442. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.181065>
- Ma, Y., Zhang, L., Huang, X., 2014. Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS Journal* 281, 5186–5193. <https://doi.org/10.1111/febs.13110>
- Maeder, M., Linder, S., Cascio, V., Fu, Y., Ho, Q., Joung, K., 2014. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods.* 10, 977–979. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2598>
- Maeder, M.L., Linder, S.J., Cascio, V.M., Fu, Y., Ho, Q.H., Joung, J.K., 2013. CRISPR RNA – guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods.* <https://doi.org/10.1038/NMETH.2598>
- Makarova, K., Koonin, E., 2015. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods Mol Biol.* 47–57. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9_4
- Mali, P., Aach, J., Stranges, B., Esvelt, K., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, L., Church, G., 2014. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat Biotechnol.* 31, 833–838. <https://doi.org/10.1038/nbt.2675>

- Mata, N.L., Weng, J., Travis, G.H., 2000. Biosynthesis of a major lipofuscin fluorophore in mice and humans with ABCR-mediated retinal and macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7154–7159. <https://doi.org/10.1073/pnas.130110497>
- Maugeri, A., Klevering, J., Rohrschneider, K., Blankenagel, A., Brunner, H., Deutman, A., Hoyng, C., Frans, C., 2000. Mutations in the ABCA4 (ABCR) Gene Are the Major Cause of Autosomal Recessive Cone-Rod Dystrophy. *Am J Hum Genet* 67, 960–966. <https://doi.org/10.1086/303079>
- Mohamed Saleem, N.H., 2014. The CRISPR-Cas9 System: A New Dawn in Gene Editing. *OMICS J Radiol* 06, 45–48. <https://doi.org/10.4172/1948-593x.1000109>
- Mojica, F., Diez-Villasenor, C., Soria, E., Juez, G., 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 36, 244–246.
- Molday, L.L., Rabin, A.R., Molday, R.S., 2000. ABCR expression in foveal cone photoreceptors and its role in Stargardt macular dystrophy. *Nat Genet* 25, 257–258. <https://doi.org/10.1038/77004>
- Molday, R.S., Zhong, M., Quazi, F., Robert S. Molday, M.Z., 2010. The role of the photoreceptor ABC transporter ABCA4 in lipid transport and Stargardt macular degeneration. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 1791, 573–583. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.02.004>
- Moses, C., Nugent, F., Waryah, C.B., Garcia-bloj, B., Harvey, A.R., Blancafort, P., 2019. Activating PTEN Tumor Suppressor Expression with the CRISPR / dCas9 System. *Molecular Therapy: Nucleic Acid* 14, 287–300. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.12.003>
- Mullins, R.F., Kuehn, M.H., Radu, R.A., Enriquez, G.S., East, J.S., Schindler, E.I., Travis, G.H., Stone, E.M., 2012. Autosomal Recessive Retinitis Pigmentosa Due To ABCA4 Mutations: Clinical , Pathologic , and Molecular Characterization. *Retinal Cell Biology* 53. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9477>
- Murphy, D., Cieply, B., Carstens, R., Ramamurthy, V., Stoilov, P., 2016. The Musashi 1 Controls the Splicing of Photoreceptor-Specific Exons in the Vertebrate Retina. *PLoS Genet* 12, 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006256>

Literaturverzeichnis

- Nassisi, M., Mohand-Saïd, S., Dhaenens, C.M., Boyard, F., Démontant, V., Andrieu, C., Antonio, A., Condroyer, C., Foussard, M., Méjécase, C., Eandi, C.M., Sahel, J.A., Zeitz, C., Audo, I., 2018. Expanding the mutation spectrum in ABCA4: Sixty novel disease causing variants and their associated phenotype in a large french stargardt cohort. *Int J Mol Sci* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19082196>
- Oh et al., 2004. Electroretinographic Findings in patients with Stargardt disease and fundus flavimaculatus. *Retina* 24 (6), 920–8.
- Papermaster, D.S., Reilly, P., Haven, W., Haven, N., 1982. Cone lamellae and red and green rod outer segment disks contain a large intrinsic membrane protein on their margins: An ultrastructural immunocytochemical study of frog retinas. *Vision Res* 22, 1417–1428.
- Parfitt, D.A., Lane, A., Ramsden, C.M., Hardcastle, A.J., Coffey, P.J., Cheetham, M.E., Parfitt, D.A., Lane, A., Ramsden, C.M., Carr, A.F., Munro, P.M., Jovanovic, K., 2016. Identification and Correction of Mechanisms Underlying Inherited Blindness in Human iPSC- Identification and Correction of Mechanisms Underlying Inherited Blindness in Human iPSC-Derived Optic Cups. *Stem Cell* 18, 769–781. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.03.021>
- Perez-Pinera, P., Kocak, D.D., Vockley, C.M., Adler, A.F., Kabadi, A.M., Polstein, L.R., Thakore, P.I., Glass, K.A., Ousterout, D.G., Leong, K.W., Guilak, F., Crawford, G.E., Reddy, T.E., Gersbach, C.A., Kabadi, M., Polstein, L.R., Thakore, P.I., Glass, K.A., David, G., Leong, K.W., Guilak, F., Crawford, G.E., Timothy, E., Gersbach, C.A., 2013. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods* 10, 973–976. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2600>
- Piotter, E., McClements, M.E., Maclaren, R.E., 2021. Therapy approaches for stargardt disease. *Biomolecules* 11, 1–28. <https://doi.org/10.3390/biom11081179>
- Poliakov, E., Strunnikova, N. v., Jiang, J. kang, Martinez, B., Parikh, T., Lakkaraju, A., Thomas, C., Brooks, B.P., Redmond, T.M., 2014. Multiple A2E treatments lead to melanization of rod outer segment-challenged ARPE-19 cells. *Mol Vis* 20, 285–300.

- Qi, L.S., Larson, M.H., Gilbert, L.A., Doudna, J.A., Weissman, J.S., Arkin, A.P., Lim, W.A., 2013. Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression. *Cell* 152, 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>. Repurposing
- Read, A., Donnai, D., 2008. Angewandte Humangenetik, in: *New Clinical Genetics*. pp. 136–164.
- Riveiro-Alvarez, R., Aguirre-Lamban, J., Angel Lopez-Martinez, M., Jose Trujillo-Tiebas, M., Cantalapiedra, D., Vallespin, E., Avila-Fernandez, A., Ramos, C., Ayuso, C., 2009. Frequency of ABCA4 mutations in 278 Spanish controls: An insight into the prevalence of autosomal recessive Stargardt disease. *British Journal of Ophthalmology* 93, 1359–1364. <https://doi.org/10.1136/bjo.2008.148155>
- Rotenstreich, Y., Fishman, G., Anderson, R., 2003. Visual acuity loss and clinical observations in a large series of patients with Stargardt disease. *Ophthalmology* 110, 1151–1158.
- Rozet, J.-M., Gerber, S., Souied, E., Perrault, I., Chatelin, S., Ghazi, I., Leowski, C., Dufier, J., Munnich, A., Kaplan, J., 1998. Spectrum of ABCR gene mutations in autosomal recessive macular dystrophies. *European Journal of Human Genetics* 291–295.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A., 1977. DNA sequencing with chain-terminating. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463–5467.
- Sangermano, R., Garanto, A., Khan, Mubeen, Runhart, E., Bauwens, M., Bax, N., van den Born, I., Khan, Muhammad, Cornelis, S., Verheij, J., Pott, J.-W., Thiadens, A., Klaver, C., Puech, B., Meunier, I., Dhaenens, C., Stöhr, H., Grassmann, F., Weber, B., Hoyng, C., de Baere, E., Albert, S., Collin, R., Cremers, F., 2019. Deep-intronic ABCA4 variants explain missing heritability in Stargardt disease and allow correction of splice defects by antisense oligonucleotides. *Genetics in Med* 21, 1751–1760. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0414-9>
- Schulz, H.L., Grassmann, F., Kellner, U., Spital, G., Rütther, K., Jäggle, H., Hufendiek, K., Rating, P., Huchzermeyer, C., Baier, M.J., Weber, B.H.F., Stöhr, H., 2017.

Literaturverzeichnis

- Mutation spectrum of the ABCA4 gene in 335 stargardt disease patients from a multicenter German cohort—impact of selected deep intronic variants and common SNPs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 58, 394–403. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19936>
- Schwartz, S.D., Regillo, C.D., Lam, B.L., Elliott, D., Rosenfeld, P.J., Gregori, N.Z., Hubschman, J.P., Davis, J.L., Heilwell, G., Spirn, M., Maguire, J., Gay, R., Bateman, J., Ostrick, R.M., Morris, D., Vincent, M., Anglade, E., del Priore, L., Lanza, R., 2015. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt’s macular dystrophy: Follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *The Lancet* 385, 509–516. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61376-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61376-3)
- Shah, S., Erdmann, S., Mojica, F., Garrett, R., 2013. Protospacer recognition motifs. *RNA Biol* 10, 891–899. <https://doi.org/10.4161/rna.23764>
- Shroyer, N.F., Lewis, R.A., Allikmets, R., Singh, N., Dean, M., Leppert, M., Lupski, J.R., 1999. The rod photoreceptor ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, and retinal disease: From monogenic to multifactorial. *Vision Res.* [https://doi.org/10.1016/S0042-6989\(99\)00037-1](https://doi.org/10.1016/S0042-6989(99)00037-1)
- Sledzinski, P., Nowaczyk, M., Olejniczak, M., 2020. Computational Tools and Resources Supporting CRISPR-Cas Experiments. *Cells* 9. <https://doi.org/10.3390/cells9051288>
- Smith, J., Ward, D., Michaelides, M., Moore, A., Simpson, S., 2015. New and emerging technologies for the treatment of inherited retinal diseases: A horizon scanning review. *Eye* 29, 1131–1140. <https://doi.org/10.1038/eye.2015.115>
- Smith, R.T., Gomes, N.L., Barile, G., Busuioc, M., Lee, N., Laine, A., 2009. Lipofuscin & Autofluorescence Metrics in progressive STGD. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 50, 3907–3914. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2448>
- Solberg, Y., Dysli, C., Escher, P., Berger, L., Wolf, S., Zinkernagel, M.S., 2019. Retinal Flecks in Stargardt Disease reveal characteristic Fluorescence Lifetime Transition over time. *RETINA* 39, 879–888.

- Soto-Velasquez, M., Hayes, M.P., Alpsy, A., Dykhuizen, E.C., Watts, V.J., 2018. A novel CRISPR/Cas9-based cellular model to explore adenylyl cyclase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol* 94, 963–972. <https://doi.org/10.1124/mol.118.111849>
- Sparrow, J.R., Fishkin, N., Zhou, J., Cai, B., Jang, Y.P., Krane, S., Itagaki, Y., Nakanishi, K., 2003. A2E, a byproduct of the visual cycle. *Vision Res* 43, 2983–2990. [https://doi.org/10.1016/S0042-6989\(03\)00475-9](https://doi.org/10.1016/S0042-6989(03)00475-9)
- Sparrow, J.R., Nakanishi, K., Parish, C.A., 2000. The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1981–1989.
- Stargardt, K., 1909. Familiäre, progressive Degeneration in der Makulagege des Auges. *Albrecht Von Graefes Arch Ophthalmol* 71, 534–550.
- Stephen, J.R., 2013. *Retina*, Edition 5. ed, Elsevier Saunders.
- Sullivan, J.M., 2009. Focus on Molecules: ABCA4 (ABCR) - An Import-Directed Photoreceptor Retinoid Flipase. *Exp Eye Res* 89, 602–603. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2009.03.005>
- Tanna, P., Strauss, R., Fujinami, K., Michaelides, M., 2017. Stargardt disease: Clinical features, molecular genetics, animal models and therapeutic options. *British Journal of Ophthalmology* 101, 25–30. <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2016-308823>
- Terns, M.P., Terns, R.M., 2012. CRISPR-Based Adaptive Immune Systems. *Curr Opin Microbiol.* 14, 321–327. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.03.005>. CRISPR-Based
- Tsybovsky, Y., Molday, R.S., Palczewski, K., Krzystof, P., 2010. The ATP-binding cassette transporter ABCA4: Structural and functional properties and role in retinal disease. *Adv Exp Med Biol* 703, 105–125. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5635-4_8
- Vives-Bauza, C., Anand, M., Shirazi, A.K., Magrane, J., Gao, J., Vollmer-Snarr, H.R., Manfredi, G., Finnemann, S.C., 2008. The age lipid A2E and mitochondrial dysfunction synergistically impair phagocytosis by retinal pigment epithelial cells.

Literaturverzeichnis

- Journal of Biological Chemistry 283, 24770–24780.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M800706200>
- Westeneng-Van Haaften, S.C., Boon, C.J.F., Cremers, F.P.M., Hoefsloot, L.H., den Hollander, A.I., Hoyng, C.B., 2012. Clinical and genetic characteristics of late-onset Stargardt's disease. *Ophthalmology* 119, 1199–1120.
<https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.01.005>
- Wiegand, D.J., Ter-ovanesyanyan, D., Braff, J.L., Davidsohn, N., 2015. Highly-efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods*. 12, 326–328.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3312>. Highly-efficient
- Wirtitsch, M.G., Ergun, E., Hermann, B., Unterhuber, A., Stur, M., Scholda, C., Sattmann, H., Ko, T.H., Fujimoto, J.G., Drexler, W., 2005. Ultrahigh resolution optical coherence tomography in macular dystrophy. *Am J Ophthalmol* 140, 976–983.e2. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2005.06.029>
- Wu, X., Scott, D.A., Kriz, A.J., Chiu, A.C., Hsu, P.D., Dadon, D.B., Cheng, A.W., Trevino, A.E., Konermann, S., Chen, S., Jaenisch, R., Zhang, F., Sharp, P.A., 2015. Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat Biotechnol*. 32, 670–676. <https://doi.org/10.1038/nbt.2889>
- Yi, J., Li, S., Jia, X., Xiao, X., Wang, P., Guo, X., Zhang, Q., 2012. Evaluation of the ELOVL4, PRPH2 and ABCA4 genes in patients with Stargardt macular degeneration. *Mol Med Rep* 6, 1045–1049.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2012.1063>
- Zaneveld, J., Siddiqui, S., Li, H.H., Wang, X., Wang, H., Li, H.H., Ren, H., Lopez, I., Dorfman, A., Khan, A., Salvo, J., Gelowani, V., Li, Y., Sui, R., Koenekoop, R., 2016. Comprehensive analysis of Stargardt macular dystrophy patients reveals new genotype-phenotype correlations and unexpected diagnostic revisions. *Genetic medicine* 17, 262–270. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.174>
- Zernant, J., Lee, W., Collison, F.T., Fishman, G.A., Sergeev, Y. v, Schuerch, K., Sparrow, J.R., Tsang, S.H., Allikmets, R., 2017. Frequent hypomorphic alleles account for a significant fraction of ABCA4 disease and distinguish it from age-related macular degeneration. *J Med Genet* 54, 404–412.
<https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104540>

Literaturverzeichnis

- Zernant, J., Schubert, C., Im, K.M., Burke, T., Brown, C.M., Fishman, G.A., Tsang, S.H., Gouras, P., Dean, M., Allikmets, R., 2011. Analysis of the ABCA4 gene by next-generation sequencing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 8479–8487. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8182>
- Zernant, J., Xie, Y.A., ngela, Ayuso, C., Riveiro-Alvarez, R., Lopez-Martinez, M.A., Simonelli, F., Testa, F., Gorin, M.B., Strom, S.P., Bertelsen, M., Rosenberg, T., Boone, P.M., Yuan, B., Ayyagari, R., Nagy, P.L., Tsang, S.H., Gouras, P., Collison, F.T., Lupski, J.R., Fishman, G.A., Allikmets, R., 2014. Analysis of the ABCA4 genomic locus in Stargardt disease. *Hum Mol Genet* 23, 6797–6806. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu396>
- Zongchao Han, Shannon M. Conley, M.I.N., 2014. Gene Therapy for Stargardt Disease associated with ABCA4 Gene, in: *Retinal Degenerative Diseases*. pp. 719–724. <https://doi.org/10.1080/09553008314551361>

11 Danksagung

Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen und Institutionen hätte die vorliegende Dissertation in dieser Form nicht realisiert werden können. An dieser Stelle möchte ich mich für die vielseitig erfahrene Hilfe aufrichtig bedanken.

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Weber für die Möglichkeit an einem experimentellen Forschungsprojekt arbeiten zu dürfen und in diesem Bereich zu promovieren. Zudem bedanke ich mich für die vielfältigen Weiterbildungsmöglichkeiten durch die Teilnahme an diversen Labmeetings, Journal-Clubs und dem Forschungs-Retreat.

Für die engmaschige Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bin ich besonders Tobias Strunz vom humangenetischen Institut Regensburg verbunden, der meine Arbeit über den ganzen Zeitraum betreute. Die fachlichen Hinweise im Labor, die Klärung diverser Fragen, die mehrfache Durchsicht dieser Abhandlung sowie seine differenzierten Anmerkungen und die Weiterbetreuung haben wesentlich zur Anfertigung und erfolgreichen Vollendung dieser Arbeit beigetragen.

Ich möchte außerdem PD Dr. Caroline Brandl für die freundliche Übernahme der Funktion des Zweitgutachters danken.

Des Weiteren möchte ich den Kollegen des humangenetischen Instituts für ihre mit wertvoller Hilfestellung und ihre Gestaltung einer angenehmen Zeit herzlich danken.

Mein tiefverbundener Dank gilt Mirjam Zwick für ihre unglaubliche Unterstützung. Die freundschaftliche Verbindung und ihr einfühlsames Verständnis bei der Anfertigung dieser Arbeit gab mir die Kraft zu einem erfolgreichen Abschluss. Zudem danke ich Kilian McVey für sein Talent mich in schwierigen Zeiten auf andere Gedanken zu bringen.

Zuletzt möchte ich meinen Großvater Ferdinand Koschany danken, der mir mein bisheriges Studium ermöglichte und dem ich diese Arbeit widme.

12 Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Doktorarbeit ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen wörtlich oder inhaltlich übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats kenntlich gemacht.

Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form weder im In- noch im Ausland keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Regensburg, den

Anna Sophie Koschany