

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HUMANGENETIK
Prof. Dr. Bernhard Weber

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CRISPR-AAV-Vektoren
mit optimierter Cas9-Nuklease-Aktivität
zur Haplotyp-spezifischen Deletion des Genortes für Morbus Best

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Vorgelegt von
Lorenz Happel

2024

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR HUMANGENETIK
Prof. Dr. Bernhard Weber

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

CRISPR-AAV-Vektoren
mit optimierter Cas9-Nuklease-Aktivität
zur Haplotyp-spezifischen Deletion des Genortes für Morbus Best

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Vorgelegt von
Lorenz Happel

2024

Dekan:

Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Bernhard Weber

2. Berichterstatterin:

Prof. Dr. Caroline Brandl

Tag der mündlichen Prüfung:

23.10.2024

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	4
2.1	Das retinale Pigmentepithel (RPE)	4
2.2	Bestrophinopathien.....	4
2.2.1	Bestrophin 1 (BEST1)	4
2.2.2	Best'sche vitelliforme Makuladegeneration (BVMD).....	5
2.2.3	Therapieansätze hereditärer Retinopathien mit dominantem Phänotyp	9
2.3	Die iPSC-Technologie	10
2.4	Das CRISPR/Cas9-System.....	11
2.4.1	Grundlagen	11
2.4.2	Therapie dominanter Erbkrankheiten: Allel-spezifische CRISPR/Cas9-Editierung	12
2.4.3	Optimierung des CRISPR/Cas9-Systems	15
2.5	Der AAV-Vektor als Gen-Fähre	16
2.6	Zielsetzung der Arbeit	17
3	Material	20
3.1	Bakterienstämme	20
3.2	Zell-Linie	20
3.3	Vektor-Plasmide	20
3.4	Oligonukleotide	21
3.4.1	Oligonukleotide für die PCR und Sanger Sequenzierung	21
3.4.2	Oligonukleotide für die Mutagenese-PCR	22
3.4.3	Oligonukleotide für die Guide-RNAs	22
3.5	Erzeugte Vektorkonstrukte	23
3.6	Reaktionssysteme.....	24
3.7	Enzyme	24
3.8	Antikörper	25
3.9	Molekularmassenstandards	25
3.10	Chemikalien	25
3.11	Zellkulturbestandteile	26
3.12	Puffer und Lösungen	27
3.13	Geräte.....	28
3.14	Software	30
4	Methoden.....	31
4.1	Klonierung von Vektor-Konstrukten.....	31
4.1.1	GoTaq-PCR: Amplifizierung der Klonierungssequenz.....	31

4.1.2	Agarosegelelektrophorese: Größenspezifische DNA-Auftrennung.....	32
4.1.3	Aufreinigen von DNA aus einem Agarosegel.....	33
4.1.4	Ligation des PCR-Produkts in einen pGem-T-Vektor	33
4.1.5	Hitzeschocktransformation und Kultivierung von DNA in E. coli-Bakterien	33
4.1.6	Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli Bakterien in einer MiniPräp.....	34
4.1.7	Sanger-Sequenzierung.....	34
4.1.8	Mutagenese-PCR	35
4.1.9	Erwerb von Positiv-Kontrollen zu den Cas9-Varianten	37
4.1.10	Restriktionsverdau von Cas9-Fragmenten	37
4.1.11	Bildung und Phosphorylierung der sgRNA-Dimere	39
4.1.12	Ligation in die Expressionsvektoren	39
4.1.13	Exonuklease-Verdau von Ligationsprodukten.....	40
4.1.14	Colony-PCR	41
4.1.15	Herstellung und Sicherung hochkonzentrierter Plasmid-DNA	41
4.2	Kultivierung der Zelllinien.....	42
4.2.1	Kultivierung von HEK293T-Zellen	42
4.2.2	Kultivierung von Fibroblasten	43
4.2.3	Kultivierung von hiPSC-entstammenden RPE-Zellen.....	43
4.3	Zell-Assays	43
4.3.1	Transfektion von Zellen	43
4.3.2	Transduktion von Zellen	46
4.4	Target Sequenzierung: Evaluation der CRISPR-Effizienz	47
4.4.1	Präparation von Plasmid-DNA aus HEK293T-Zellen	47
4.4.2	Go-Taq-PCR und Klonierung in E. coli-Bakterien.....	47
4.4.3	Colony-PCR von 47 Klonen	47
4.4.4	Exonuklease I (Exo) und alkalische antarktische Phosphatase (AAP)-Verdau.....	47
4.4.5	Sanger-Sequenzierung.....	48
4.5	Western Blot.....	48
5	Vorarbeiten	51
5.1	Bioinformatische Vorarbeit: SNP-Analyse	51
5.2	Experimentelle Vorarbeit: Evaluation der Guide-Funktion	53
5.3	Experimentelle Vorarbeit: Optimierung des AAV-Vektors.....	55
6	Ergebnisse.....	56
6.1	Mutagenese der Cas9-Sequenz	56
6.2	Klonierung der CRISPR-miniAAV-Vektoren	58
6.3	HEK293T-EGFP-Assays: Testen der Cas9-Varianten in HEK293T-Zellen.....	59

6.3.1	Testen der Cas9-Konstrukte mit der sgRNA 749_A_20mer	61
6.3.2	Testen der Cas9-Konstrukte mit der sgRNA 756_C1_20mer	63
6.3.3	Testen der Cas9-Konstrukte mit der sgRNA 759B_C_20mer	64
6.3.4	Testen der Cas9-Konstrukte mit der Positiv-Kontrolle EMX1	65
6.4	Bestimmung der Proteinexpression der Cas9-Varianten	66
6.5	EGFP-Vergleich der px- und miniAAV-Vektoren.....	68
6.6	Target Sequenzierung: Vergleich der Vektorsysteme	69
6.7	Target Sequenzierung: Transfektion des dualen Vektorsystems	72
6.8	Testen der Transduktionskompetenz des AAV-Vektors.....	73
6.8.1	Transduktion von HEK293T-, Fibroblasten- und hiPSC-RPE-Zellen	73
6.8.2	Vergleich zweier AAV-Serotypen.....	74
6.9	Transduktion des dualen pAAV-Vektor-Systems.....	75
7	Diskussion.....	77
7.1	Evaluation der optimierten Cas9-Konstrukte im miniAAV-Vektor	78
7.2	Evaluation verschiedener CRISPR-AAV-Vektoren am genomischen Target.....	85
7.3	Evaluation der viralen Transduktionskompetenz von CRISPR-AAV-Vektoren	86
7.4	Ausblick und weiterführende Aspekte	88
7.4.1	Das SNP-spezifische CRISPR/Cas9-System und alternative Gentherapie-Strategien....	89
7.4.2	Das AAV-Transportsystem und alternative Transportsysteme	93
7.4.3	Analyse von OFF-Target-Effekten.....	96
	Literaturverzeichnis	98
	Abkürzungsverzeichnis	109
	Abbildungsverzeichnis.....	111
	Tabellenverzeichnis	112
	Danksagung	114
	Eidesstattliche Erklärung.....	115

1 Zusammenfassung

Das Bestrophin (BEST1) ist ein integrales Membranprotein, das okulär exklusiv in der basolateralen Zellmembran des retinalen Pigmentepithels (RPE) des Menschen zu finden ist und dort als Kalzium-aktivierter Chlorid-Kanal fungiert. Dieser Ionenkanal besitzt eine homopentamere Struktur aus fünf identischen Untereinheiten des Bestrophin. Für das *BEST1*-Gen sind bisher über 250 Mutationen bekannt, die zu verschiedenen seltenen hereditären Netzhauterkrankungen, den sogenannten Bestrophinopathien, führen. Unter diesen stellt die autosomal dominant vererbte Best'sche vitelliforme Makuladegeneration (BVMD) das häufigste Krankheitsbild dar, in dessen Verlauf sich progredient Lipofuszinakkumulationen im RPE bilden und über mehrere pathologischen Stadien zu einem schleichenden Sehverlust bis hin zur Erblindung führen können. Obwohl der zugrunde liegende Pathomechanismus bereits in ersten Ansätzen aufgeklärt ist, gibt es für die BVMD noch keine effektiven Therapien. Heterozygote autosomal-dominate *BEST1*-Mutationen lassen auf einen dominant-negativen Effekt schließen, da bereits die Integration einer, von dem mutierten Allel exprimierten, fehlerhaften Untereinheit in die Quartärstruktur wahrscheinlich die gesamte Kanalfunktion kompromittiert. Als Therapieansatz erscheint es deshalb sinnvoll, das mutierte Allel gezielt auszuschalten, sodass die *BEST1*-Expression allein über das wildtypische Allel erfolgt und somit ausschließlich funktionstüchtige Untereinheiten zur Verfügung stellt. Somit sollten die gebildeten BEST1-Kanäle wieder ihre physiologische Funktion im RPE besitzen. Für eine solche Genmodifikation empfiehlt sich als Methode der Wahl das CRISPR/Cas9-System. Hier wird eine Cas9-Endonuklease von einer programmierbaren sgRNA sequenzspezifisch zu deren Zielsequenz geführt und induziert hier einen Doppelstrangbruch. In den postmitotischen RPE-Zellen wird durch die Reparatur-mechanismen ein *Frame-shift* und ein frühzeitiges Stopp-Codon provoziert, das als Nonsense-Mutation die weitere Expression des (mutierten) Allels unterdrückt.

In dieser Arbeit sollte das CRISPR/Cas9-vermittelte Stilllegen des mutierten *BEST1*-Allels Mutations-unabhängig über eine Stilllegung des gesamten *BEST1*-Haplotyps durch die Adressierung definierter Nukleotidpolymorphismen (SNP) erfolgen. In Vorarbeiten waren hierzu 22 targetierbare und in der Population häufig vorkommende SNPs identifiziert worden, von denen bereits für einen Teil eine Testung der Effizienz und Spezifität der SNP-spezifischen sgRNAs erfolgte.

Trotz aufwendiger Optimierungsversuche dieser Guides über gezielte Sequenzmodifikationen konnte in früheren Vorversuchen nicht für alle untersuchten sgRNAs eine ausreichend hohe Spezifitäten oder Effizienz erreicht werden. Aus diesem Grund sollte nun in dieser Arbeit eine Optimierung mittels Sequenzmodifikationen der Cas9-Nuklease erfolgen, mit dem Ziel eine Verbesserung der Effizienz und vor allem eine hohe Spezifität zu erreichen. Dafür wurden vier Varianten der SpCas9 generiert, wobei durch die Modifikationen kritischer Aminosäuren in der Polypeptidstruktur eine Schwächung der DNA-Bindung erreicht wurde, um eine höhere Gewichtung der spezifischen Bindung der sgRNA an ihre ON-Target-Sequenz zu erreichen. Die Funktion dieser Varianten wurden anschließend in einem EGFP-Transfektions-Assay mit HEK293T-Zellen an drei kritischen sgRNAs in einem modifizierten miniAAV-Vektor mit verkürzten Promotor-Sequenzen getestet. In der Gesamtheit zeigten die modifizierten Cas9-Konstrukte in den Versuchen eine eher geringe Effizienz und ihre Funktionstüchtigkeit wirkte stark beeinträchtigt, sowie in hohem Maße sgRNA-abhängig. Als unerwarteter Befund wies die wildtypische Cas9-Nuklease allein im miniAAV-Vektor eine Verbesserung der Spezifität auf, ausgelöst durch die verkürzten Promotoren und eine reduzierte Expression, was die OFF-Target-Aktivität maßgeblich verringerte. Bei Versuchen am genomischen *BEST1*-Lokus unterschiedlicher Zielzellen verlor der miniAAV-Vektor allerdings deutlich an Effizienz, weshalb für die viralen Transduktionen von HEK293T, Fibroblasten und hiPSC-RPE Zellen auf eine alternative Transportmethode mit dualen AAV-Vektoren zurückgegriffen wurde. Bei der abschließenden Testung dieser dualen CRISPR-AAV-Vektoren in viral transduzierten HEK293T-Zellen wurde sgRNA-abhängig eine sehr unterschiedliche Effizienz der CRISPR/Cas9-Aktivitäten festgestellt. Die Transduktion von hiPSC-RPE-Zellen stellte sich als ineffizient dar. Die modifizierten Cas9-Varianten erwiesen sich für die in dieser Arbeit getesteten sgRNAs als ineffizient, was bei diesem Therapieansatz mit einer begrenzten Auswahl an SNP-spezifischen Guides sehr ungünstig ist. Grundsätzlich könnte die Anwendung in Einzelfällen jedoch erfolgsversprechend sein. Der miniAAV-Vektor verlor bereits bei Transfektionsversuchen auf genomischer Ebene seine Effizienz und empfiehlt sich somit nicht für eine virale Transduktion in RPE-Zellen, weshalb er durch die alternative Transportmethode der dualen AAV-Vektoren abgelöst wurde. In Zukunft wird anhand dieses Transportsystems eine umfassende Testung aller SNP-spezifischen sgRNAs und deren optimierter Varianten, mit dem SpCas9-Enzym und dessen Varianten erforderlich sein, um evidenzbasiert für jeden targetierbaren SNP die optimale Kombination des CRISPR/Cas9-Systems zu ermitteln. Die entsprechenden CRISPR-

AAV-Vektoren werden sich schließlich in Versuchen an hiPSC-abgeleiteten RPE-Zellen von BVMD-Patienten beweisen müssen. Bevor ein praktischer Einsatz erwogen werden kann, ist außerdem eine umfassende Analyse auf OFF-Target-Effekte notwendig, zum Ausschluss ungewollter genomweiter Nebenwirkungen. Ausschlaggebend für einen Erfolg des Verfahrens wird sein, ob sich tatsächlich ein Knock-Out des mutierten Allels und eine Verbesserung des pathologischen Phänotyps erreichen lässt.

2 Einleitung

2.1 Das retinale Pigmentepithel (RPE)

Die hexagonalen Zellen des RPE im Auge sitzen basal auf der bindegewebigen Bruch'schen Membran und formen als polares Monolayer eine Barriere zwischen den apikalen retinalen Fotorezeptorzellen und den basalen Kapillaren der Choroidea. Neben der Absorption von einfallendem Licht ist das RPE auch zuständig für die Nährstoffversorgung der neurosensorischen Retina und über die Phagozytose der Fotorezeptoraußensegmente (*photoreceptor outer segments*; POS), sowie des Metabolismus des Sehpigments entscheidend am Sehprozess beteiligt (J.R. Sparrow 2010; Lakkaraju et al. 2020).

Die Bedeutung des RPE für die Funktion der Retina wird insbesondere deutlich im Falle seiner Insuffizienz durch eine Erkrankung. Entsprechende RPE-assoziierte Retinopathien sind hinlänglich beschrieben und reichen von Erkrankungen mit komplexer Ätiologie wie der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) (J.R. Sparrow 2010), bis hin zu monogenetischen Erkrankungen wie der Best'schen vitelliformen Makuladegeneration (BVMD).

2.2 Bestrophinopathien

2.2.1 Bestrophin 1 (BEST1)

Bestrophinopathien haben ihren Ursprung im Bestrophin-1 Gen (*BEST1*), einem Genomabschnitt auf dem langen Arm des Chromosoms 11 (11q13), mit einer genomischen Ausdehnung von etwa 15 Kilobasen (kb) über 11 Exone (Petrukhin et al. 1998; Marquardt et al. 1998). Das humane *BEST1* ist Bestandteil der artübergreifend hoch konservierten



Abbildung 1: Schematische Darstellung des Bestrophin1-Proteins als Homopentamer

BEST1 ist ein Oligomer aus fünf identischen Einheiten (unterschiedlich gefärbt) und bildet einen Anionenkanal in der basolateralen Membran von RPE-Zellen. Abbildung entnommen aus Yang et al. 2014

Bestrophin-Familie aus vier paralogen Genen (*BEST1-4*) (Stöhr et al. 2002) und wird hauptsächlich im RPE exprimiert (Marquardt et al. 1998; Petrukhin et al. 1998; Marmorstein et al. 2000).

Das humane Bestrophin1-Polypeptid ist ein 585 Aminosäuren (AS) großes integrales Membranprotein, das sich, gut beschrieben mittels Röntgenstrukturanalyse und Kryoelektronenmikroskopie, aus Bestrophin-1-Untereinheiten zu einer homopentameren Struktur zusammensetzt (Kane Dickson et al. 2014; Yang et al. 2014; Miller et al. 2019; Owji et al. 2022) und in der basolateralen Zellmembran des RPE verortet ist (Marmorstein et al. 2000). Hier fungiert es insbesondere als Kalzium (Ca^{2+})-aktivierter-Chlorid (Cl^-)-Kanal (Sun et al. 2002; Ji et al. 2019; Miller et al. 2019), wobei es auch Permeabilität für weitere Anionen aufweist (Sun et al. 2002; Hartzell et al. 2008; Kane Dickson et al. 2014; Yang et al. 2014; Miller et al. 2019; Cordes et al. 2020). Es hat Einfluss auf die intrazelluläre Kalzium-Homöostase (Marmorstein et al. 2015) mit Einbindung in Kalzium Signalwege, womit eine regulatorische Funktion gegenüber anderen Ionenkanälen vermutet wird (Cordes et al. 2020). Es wird als entscheidender Faktor bei der Volumenregulation der RPE-Zellen gesehen (Milenkovic et al. 2015). Das BEST1 als multifunktionales Protein scheint damit in ein komplexes Interaktionsnetz eingebunden zu sein (Johnson et al. 2017), welches bei einer Störung der Proteinfunktion vielfältige Beeinträchtigungen nach sich ziehen kann.

2.2.2 Best'sche vitelliforme Makuladegeneration (BVMD)

Gegenwärtig sind über 250 pathogene Mutationen im *BEST1*-Gen beschrieben (*Human Gene Mutation Database*, Oktober 2021), die ursächlich für die verschiedenen Formen der Bestrophinopathien sind. Dazu zählen die BVMD (Marquardt et al. 1998; Petrukhin et al. 1998), die adulte vitelliforme Makuladegeneration (AVMD) (Krämer et al. 2000), die autosomal dominante Vitreoretinopathia (ADVIRC) (Yardley et al. 2004) und die autosomal rezessive Bestrophinopathie (ARB) (Burgess et al. 2008). Weiter wird eine Beteiligung am Krankheitsbild der Retinitis pigmentosa (RP) diskutiert (Davidson et al. 2009).

Die BVMD ist eine progredient autosomal dominant vererbte Retinopathie (BMD, OMIM 153700) und weist unter den bekannten Bestrophinopathien mit geschätzt 1:50.000 die höchste Prävalenz auf (Bitner et al. 2012), ein Wert, der jedoch abhängig von der Population stark schwanken kann (Bitner et al. 2012; Nordström und Thorburn 1980). Die Namensgebung der auch als Morbus Best (M. Best, *Best disease*, BD) bekannten Erkrankung geht auf seinen

Erstbeschreiber, den deutschen Ophthalmologen Friedrich Best zurück (Best 1905). Der Phänotyp manifestiert sich dabei meist relativ früh (Mohler und Fine 1981), ist insgesamt jedoch genau wie die Expressivität sehr variabel (Lacassagne et al. 2011) und kann zwischen der ersten und sechsten Lebensdekade auftreten (Mohler und Fine 1981; Renner und Kellner 2016).

M. Best ist eine generalisierte Erkrankung des RPE. Der Phänotyp zeigt sich dabei insbesondere durch eine pathologisch zunehmende intrazelluläre Akkumulation von Lipofuszingranula, die im weiteren Verlauf typische vitelliforme Läsionen am hinteren Augenpol im Bereich der Makula bilden (Weingeist et al. 1982; BOON et al. 2009). Als diagnostische Mittel dienen die Funduskopie, die Elektrookulografie (EOG) und die Erhebung der Familienanamnese (Marmorstein et al. 2009). In der Funduskopie lässt sich die Progredienz der Erkrankung anhand der vitelliformen Läsionen in fünf Stadien nach Mohler & Fine einteilen (**Abbildung 2**). Dem prävitelliruptivem Stadium 0 ohne Fundusbefund bei bereits auffälligem EOG folgt das prävitelliforme Stadium I mit schwachen Pigmentveränderungen, das über längere Zeit, z.T. auch bis an das Lebensende arretieren kann. Das Stadium II unterteilt sich in IIa und IIb und markiert den Beginn eines rapiden Krankheitsprogresses, wobei trotz ausgeprägter Läsionen weiterhin ein suffizientes Sehvermögen möglich sein kann. Das „Eidotter“-Stadium IIa zeigt eine typisch erhabene vitelliforme Zyste, die im Übergang zum „Rührei“-Stadium IIb resorptiv

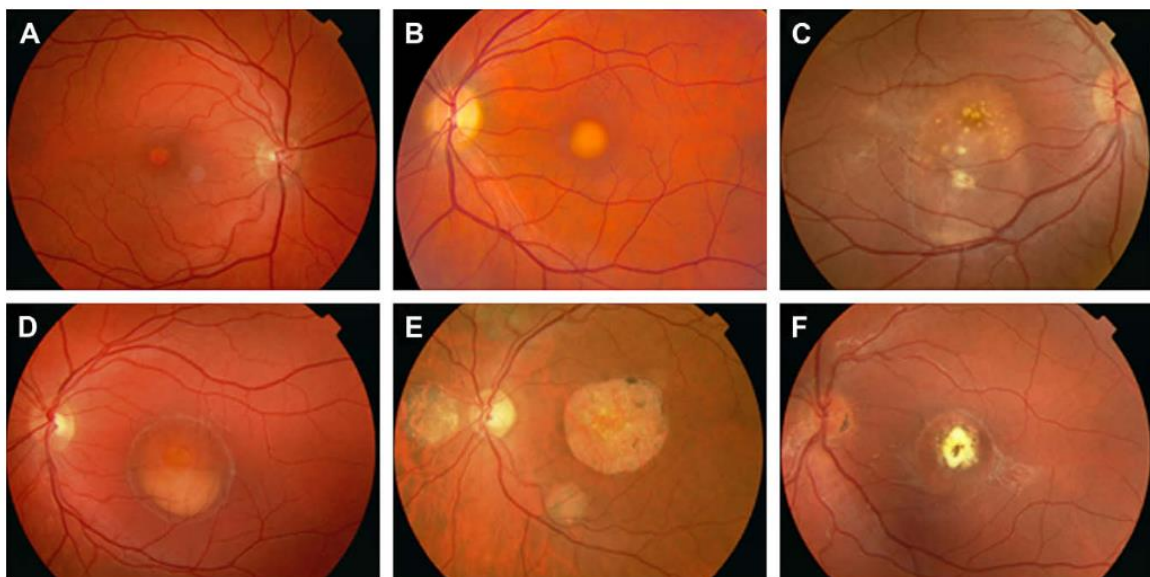


Abbildung 2: Stadien der BVMD in der Funduskopie

(A) Stadium I: prävitelliforme schwache Pigmentveränderungen, (B) Stadium IIa: vitelliforme Zyste („Eidotter“) aus akkumuliertem Lipofuszin, (C) Stadium IIb: Aufbrechen und Resorption der Lipofuszinzyste, (D) Stadium III: pseudohypopyone Läsion, basales vitelliformes Material überlagert von klarer Flüssigkeit (E) Stadium IVa: atrophe Macula mit beginnender Fibrosierung, (F) Stadium IVc: vaskularisierte fibrotische Narbe; Abbildung entnommen aus Boon et al. 2009

aufbricht. Dem pseudohypopyonen Stadium III folgt das vitelliruptive Stadium IV, welches mit einem deutlichen Visusverlust einhergeht. Hierbei entwickelt sich die Läsion über das Stadium IVa zu einer atrophen Makula, die in IVb eine fibrotische Narbe, sowie schließlich in IVc eine vaskularisierte fibrotische Narbe bildet (Mohler und Fine 1981; Marmorstein et al. 2009; BOON et al. 2009). Der beschriebene Verlauf muss dabei nicht immer konsekutiv oder vollständig sein.

Diagnostisches Leitsymptom der Bestrophinopathien ist ein verminderter Hellanstieg im EOG (Cross und Bard 1974). Das Verfahren gilt als verlässlicher Gradmesser für die Bestrophinfunktion, da eine erhöhte Cl⁻-Leitfähigkeit an der basolateralen RPE-Membran für den Hellanstieg als essentiell angenommen wird (Gallemore et al. 1997). BEST1 formt einen Ca²⁺-abhängigen Cl⁻-Kanal und ist typischerweise an dieser Membran lokalisiert (Marmorstein et al. 2000). Die Mehrzahl der autosomal-dominanten Mutationen als Ursache für die BMVD hemmen dominant-negativ den Anionenfluss durch den Kanal (Sun et al. 2002). Die Beeinträchtigung des BEST1-Proteins führt demnach zu einer messbaren Beeinträchtigung der Signaltransduktion im Sehprozess.

Allgemein stellt sich der klinische Befund der BVMD als sehr variabel dar, insbesondere was die Ausprägung der vitelliformen Läsionen und den Visusverlust in Zusammenhang mit dem EOG-Befund angeht. Eine Reduktion des Hellanstiegs und Visus kann beispielsweise erst moderat ausfallen, obwohl bereits ein fortgeschrittenes Stadium nach Mohler & Fine vorliegt. Korrelationen zwischen diesen Faktoren sind sehr lose (Marmorstein et al. 2009). Ebenso ist der Verlauf individuell schwer vorhersagbar, da sich der Phänotyp selbst innerhalb einer Familie und bei derselben Mutation stark unterscheiden kann (Lacassagne et al. 2011). Absolute Gewissheit über das Vorliegen einer hereditären Bestrophin1-assoziierten Erkrankung liefert somit nur eine Genanalyse (Renner und Kellner 2016).

Es ist bekannt, dass BVMD-assoziierte Genveränderungen überwiegend Missense-Mutationen entsprechen, seltener Nonsense- oder Deletions-Mutationen (Krämer et al. 2003). Pathophysiologisch existieren allerdings gleich mehrere Theorien zum genauen Krankheitshergang. Dies ergibt sich mitunter aus der Erkenntnis, dass unterschiedliche Mutationen zu unterschiedlichen Effekten hinsichtlich Lokalisierung, Oligomerisierung und Funktion des BEST1-Proteins führen (Johnson et al. 2013; Johnson et al. 2014). Ursächlich kann demnach ein gestörter Transport zur Zellmembran mit folgender BEST1-Mislokation sein

(Davidson et al. 2009; Milenkovic et al. 2015; Nachtigal et al. 2020), in anderen Fällen eine Störung der Anionen-Kanalfunktion (Hartzell et al. 2008; Xiao et al. 2010; Marmorstein et al. 2015; Nachtigal et al. 2020). Ob Faktoren wie die Beeinträchtigung des Kalzium-Haushalts oder des Membranpotenzials (Marmorstein et al. 2015) letztendlich ausschlaggebend für den Ausbruch der Erkrankung sind, bleibt weiter ungewiss.

Neuste Erkenntnisse konnten Unterschiede in der Degradation mutierter BEST1-Varianten der verschiedenen Bestrophinopathien festmachen (Nachtigal et al. 2020). Während Varianten der autosomal rezessiven Bestrophinopathie (ARB) schnell und effektiv bereits über Qualitätssicherungsmechanismen im endoplasmatischen Retikulum (ER) aussortiert und proteasomal abgebaut werden, entziehen sich andere BEST1-Mutanten einer solchen frühen Kontrolle und werden erst verzögert im Golgi-Apparat oder an der Plasmamembran herausgefiltert und über das endolysosomale System neutralisiert, was bei heterozygoten Mutationsträgern letztendlich zu einem Krankheitsbild autosomal dominanter Bestrophinopathien führt (Milenkovic et al. 2018; Nachtigal et al. 2020).

Es konnte gezeigt werden, dass diese autosomal-dominanten Missense-Mutationen infolgedessen einen dominant-negativen Effekt auf das Protein ausüben, was sich in einer Hemmung des Anionenflusses äußert (Sun et al. 2002; Ji et al. 2019). Dies lässt sich durch die homopentamere Struktur des BEST1 verstehen. Bei heterozygoten BVMD-Patienten erfolgt eine in gleichem Maße ausgeprägten Expression von wildtypischem und mutiertem Allel, was eine kombinatorisch vielfältige Oligomerisierung von wildtypischen und mutierten Protomeren nach sich zieht. Im resultierenden BEST1-Kanal führt jedoch bereits der Einbau einer fehlerhaften BEST1-Untereinheit zu einer Beeinträchtigung des gesamten Kanals. Dieses Phänomen einer funktionierenden Oligomerisierung bei Co-Expression eines wildtypischen und mutierten Allels, mit folgender Dysfunktion des BEST1-Kanals ist mehrfach beschrieben (Sun et al. 2002; Krämer et al. 2003; Johnson et al. 2014; Marchant et al. 2007; Milenkovic et al. 2015; Ji et al. 2019; Nachtigal et al. 2020). Das Problem liegt somit in der kontinuierlichen Expression des mutierten Allels und einer verzögerten Qualitätskontrolle mit unvollständiger Beseitigung fehlerhafter Polypeptid-Varianten, was letztendlich zu einer Beeinträchtigung der gesamten Kanalfunktion in der RPE-Zelle führt.

2.2.3 Therapieansätze hereditärer Retinopathien mit dominantem Phänotyp

Der bisher in Ansätzen geklärte Pathomechanismus hat bisher keine effektive pharmakologische Therapie der BVMD zugelassen (Johnson et al. 2017). Hinsichtlich hereditärer Retinopathien liegt der Fokus seit einigen Jahren deshalb vermehrt auf der Erforschung gentherapeutischer Verfahren, auch weil das Auge durch verschiedene einzigartige Charakteristika ein ideales Zielorgan für einen solchen Ansatz bildet. Zum einen besitzt es eine gute Zugänglichkeit und vereinfacht so die invasive Applikation eines Therapeutikums, während es durch die Transparenz seiner organischen Strukturen visuelle und messbare Kontrollen des Therapieerfolgs und der Funktion erlaubt. Die bilaterale Anlage erlaubt dazu einen einfachen Vergleich zwischen behandeltem Test- und unbehandeltem Kontroll-Auge. Zum anderen ist es durch die Blut-Retina-Schranke systemisch vom restlichen Körper abgegrenzt und bildet einen immunprivilegierten Raum (Smith et al. 2009; Boye et al. 2013). Bisherige Studien mit viral-applikativen Verfahren haben gezeigt, dass mögliche lokale oder systemische Immunreaktionen auf einen injizierten AAV-Vektor moderat bis kaum ausfallen (Hollander et al. 2008; Ruan et al. 2017;).

Dem Phänotyp autosomal dominanter Erbkrankheiten können verschiedene genetische Ursachen zugrunde liegen: (I) *loss-of-function*-Mutationen, die eine Haploinsuffizienz und einen damit einhergehenden pathologischen Funktionsverlust nach sich ziehen (Huang et al. 2010), (II) die Mutation eines Allels, die über einen dominant-negativen Effekt die Wirkung des wildtypischen Allels unterdrückt und zu einer Dysfunktion führt (Veitia 2007) und (III) *gain-of-function*-Mutationen mit einem pathologischen Funktionszugewinn (Wu et al. 2020).

Erkrankungen mit Haploinsuffizienz lassen sich mittlerweile durch das gut erforschte Verfahren der Gensatztherapie behandeln. Ein Erfolgsbeispiel ist die Leber'sche kongenitale Amaurose (LCA), eine schwere frühkindliche Form der retinalen Dystrophie, bedingt durch eine Mutation beispielsweise im *RPE65*-Gen. Die heterozygoten Patienten erleben bereits eine erhebliche Einschränkung der Sehkraft im ersten Lebensjahr und erblinden im frühen Erwachsenenalter (Hollander et al. 2008). Studien haben gezeigt, dass durch die Injektion rekombinanter cDNA, kloniert in einen Adeno-assoziierten Virus (AAV)-Vektor, in das Auge von Patienten eine signifikante Verbesserung der Sehkraft erreicht werden kann (Bainbridge et al. 2008; Cideciyan et al. 2008).

Für autosomal dominante Retinopathien aus Szenario zwei und drei stellt dies allerdings nur bedingt eine Lösung dar, da hier kein Funktionsausfall kompensiert, sondern eine unerwünschte Wirkung ausgeschaltet werden muss. Ein Ansatz bei solchen dominanten Erkrankungen wäre also eine Allel-spezifische Inaktivierung (Miller et al. 2003) der mutierten Genvariante, sodass die physiologische Funktion durch die ausschließliche Expression des wildtypischen Allels wiederhergestellt werden kann (Long et al. 2016).

Zum einen weckt diese Problematik den Bedarf an einem praktikablen Modellsystem, das den Phänotyp einer Erkrankung realistisch abbildet und ein vereinfachtes Testen und Kontrollieren von entsprechenden Interventionen erlaubt. Zum anderen ist für einen solchen Eingriff in das Genom ein ausreichend spezifisches und effizientes Verfahren notwendig, das sich in CRISPR/Cas-System finden könnte (Liu et al. 2016).

2.3 Die iPSC-Technologie

Ein praktikables Zell-Modell bieten induzierte pluripotente Stammzellen (iPSC). Hierbei lassen sich ausdifferenzierte Fibroblastenzellen mittels der Expression von vier definierten Transkriptionsfaktoren in pluripotenten Stammzellen reprogrammieren (Takahashi und Yamanaka 2006; Takahashi et al. 2007). Der pluripotente Charakter dieser iPS-Zellen ermöglicht anschließend eine Ausdifferenzierung in gewebespezifische Zelltypen und somit auch in die Zellen des RPE (Buchholz et al. 2013; Maruotti et al. 2013). Diesen aus iPSC-abgeleiteten RPE-Zellen (hiPSC-RPE) konnten morphologisch und funktionell charakteristische Eigenschaften des natürlichen retinalen Pigmentepithels nachgewiesen werden, was sie als geeignetes *in vitro* Modell für diesen Zelltyp qualifiziert (Buchholz et al. 2013; Singh et al. 2013; Brandl et al. 2014; Krohne et al. 2012; Kamao et al. 2014; Nachtigal et al. 2020). In der Erforschung der Retinopathien bietet das die Möglichkeit der Patienten-spezifischen *in vitro* Simulation eines Krankheitsphänotyps. Das trägt beispielsweise zu einem besseren Verständnis von Pathomechanismen bei (Du et al. 2011; Singh et al. 2013), da sich gezielt Manipulationen vornehmen und die Folgen beobachten lassen (Smith et al. 2015; Bassuk et al. 2016), und ermöglicht die Kultivierung und Transplantation von körpereigenem Gewebe (Mandai et al. 2017; Du et al. 2011). Dieses Modell eröffnet hereditären Retinopathien mit *gain-of-function*-Mutationen oder Mutationen mit einem dominant-negativen Effekt das Erforschen neuer Therapieoptionen.

2.4 Das CRISPR/Cas9-System

2.4.1 Grundlagen

Ein geeignetes Verfahren zur präzisen Editierung des Genoms stellt das CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats*) /Cas (*CRISPR-associated*) -System dar. Seitdem sein Nutzen und Potenzial als Werkzeug zur Genmanipulation erkannt wurde (Le Cong et al. 2013), ermöglicht es der Forschung durch seine einfache Handhabung eine vielseitige Anwendung in den unterschiedlichsten Bereichen wie Biotechnologie, Medizin oder Landwirtschaft (Hsu et al. 2014).

Ursprünglich handelt es sich um ein in Prokaryonten wie Bakterien und Archaeen entdecktes (Ishino et al. 1987), adaptives Immunsystem gegen fremde DNA (Barrangou et al. 2007; Mojica et al. 2009). Das Genom dieser Organismen birgt als genetische Region den CRISPR-Lokus aus repetitiven Sequenzen, die regelhaft durch kurze Sequenzen, sogenannte *Spacer* intermittiert werden (Mojica et al. 2000; Jansen et al. 2002; Barrangou et al. 2007; Horvath und Barrangou 2010). Der CRISPR-Lokus wird dabei von mehreren Cas-Genen flankiert, die für Endonukleasen codieren (Wiedenheft et al. 2012). Zur Funktion als Abwehrsystem gehört eine initiale adaptive Phase, in welcher bei Kontakt mit Fremd-DNA, vermittelt durch die Cas-Endonuklease, spezifisch Sequenzfragmente, sogenannte *Protospacer*, entnommen und als *Spacer* in das Eigengenom integriert werden (Barrangou et al. 2007; Wiedenheft et al. 2012). Bei erneuter Infektion erfolgt in der Expressionsphase die Transkription des entsprechenden *Repeat-Spacer*-Fragments in eine pre-crRNA (*precursor CRISPR RNA*), die mit Hilfe einer tracrRNA (*trans activating CRISPR RNA*) zur reifen crRNA (*CRISPR RNA*) modifiziert wird, woraufhin sich ein crRNA:tracrRNA Duplex bildet. Dieser fügt sich tracrRNA-vermittelt mit der Cas9-Endonuklease zu einem chimären Komplex zusammen und navigiert crRNA-vermittelt zur komplementären Region, dem ursprünglichen Protospacer, auf der Fremd-DNA (Deltcheva et al. 2011). Voraussetzung zur Interaktion in der nun folgenden Interferenzphase sind zwei Erkennungssequenzen: (I) eine kurze PAM (*Protospacer Adjacent Motif*)-Sequenz direkt vor dem 3'-Ende des *Protospacers*, die der initialen Bindung des Cas-Proteins (Jinek et al. 2012; Jiang et al. 2013) dient und je nach Cas-Typ variiert (Makarova et al. 2011; Mojica et al. 2009) und (II) die an die PAM angrenzende *Seed*-Sequenz, die etwa 10-13 Basen zu Beginn des *Protospacers* am 3'-Ende umfasst und innerhalb derer die Bindung zur crRNA absolut komplementär sein muss (Jinek et al. 2012; Jiang et al. 2013). Distal davon werden bis zu sechs

Basenpaarabweichungen toleriert (Jinek et al. 2012; Jiang et al. 2013; Le Cong et al. 2013). Die Cas-Endonuklease induziert schließlich einen Doppelstrangbruch (*double-strand break*, DSB) drei Basenpaare stromabwärts der PAM. Dies erfolgt mittels zweier Domänen (Wang et al. 2011), der HNH-Domäne, welche den Komplementärstrang schneidet und der RuvC-Domäne, welche den Nicht-Komplementärstrang schneidet (Jinek et al. 2012; Jiang et al. 2013).

Die Erkenntnis, dieses Prinzip der RNA-gesteuerten Navigation einer DNA-Endonuklease zu beliebigen Stellen des Genoms für die praktische Forschung nutzbar zu machen, war eine wissenschaftliche Revolution und wird seitdem zur gezielten Genmanipulation *in vitro* und *in vivo* herangezogen (Le Cong et al. 2013; Mali et al. 2013). Der Erfolg von CRISPR/Cas9 begründet sich dabei durch seine Variabilität und simplen Handhabung. Der Duplex aus crRNA:tracrRNA lässt sich zu einer einzelnen sgRNA (*single guide RNA*) fusionieren (Jinek et al. 2012) und entsprechend der zu adressierenden Zielsequenz designen (Liu et al. 2016; Hsu et al. 2013). Dies macht das CRISPR/Cas-System zu einem variablen, aber spezifischen Genomeditierungsverfahren, das zwischen Sequenzen mit nur einem Basenpaar Unterschied diskriminieren kann (Wu et al. 2020), mit der meist einzigen Voraussetzung einer nahegelegenen Cas9-spezifischen PAM-Sequenz (Mojica et al. 2009; Ran et al. 2013).

Innerhalb des CRISPR/Cas-Systems unterscheidet man entsprechend der Funktionsweise drei Typen (Makarova et al. 2015), wobei im praktischen Gebrauch der Typ II und die Cas9 des *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) am häufigsten eingesetzt wird (Jinek et al. 2012; Chylinski et al. 2014; Long et al. 2016; Wang et al. 2011). Die SpCas9 war das erste und ist bisher das am besten erforschte Cas9-Enzym (Jinek et al. 2012) und bindet an die spezifische PAM-Sequenz ,NGG‘ (Jiang et al. 2013). Das Spektrum der praktikablen CRISPR-Systeme erweitert sich jedoch stetig, zum einen durch die Erforschung orthologer Cas9-Varianten verschiedener Organismen (Esvelt et al. 2013; Ran et al. 2015) mit jeweils eigenen PAM-Sequenzen (Mojica et al. 2009; Makarova et al. 2011) und zum anderen durch die Modifizierung von Cas9-Proteinen und deren Eigenschaften (Zetsche et al. 2015; Kleinstiver et al. 2016a).

2.4.2 Therapie dominanter Erbkrankheiten: Allel-spezifische CRISPR/Cas9-Editierung

In der angewandten Forschung wird die Funktion des CRISPR/Cas-Systems genutzt, um gezielt Doppelstrangbrüche (DSB) in eine DNA-Sequenz zu induzieren (Wang et al. 2011). Eukaryontische Zellen reagieren auf solche DSB mit einem eigenen DNA-Reparatursystem, das grundsätzlich über zwei Mechanismen verfügt (Heyer et al. 2010). Die homologe

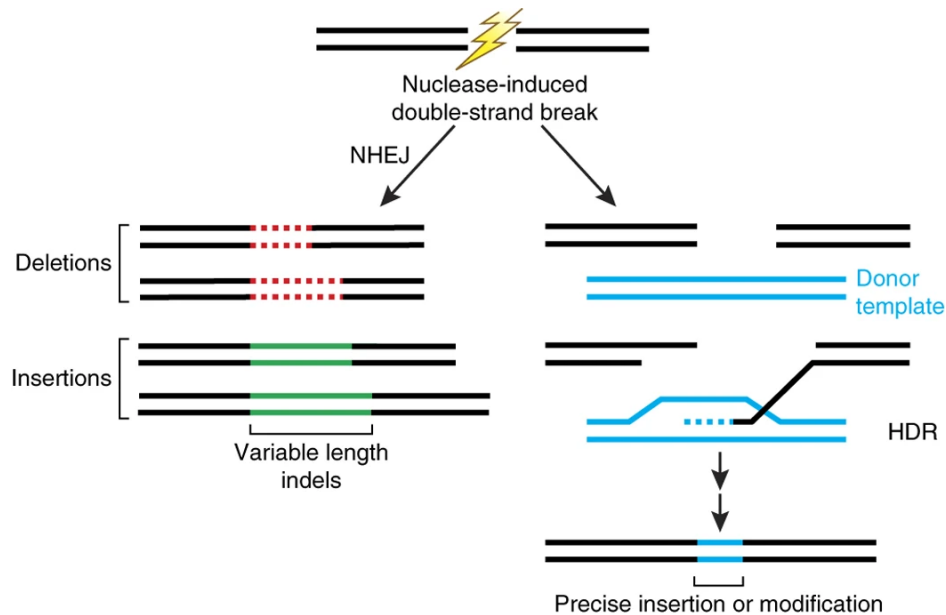


Abbildung 3: Schematische Darstellung der zellulären DNA-Reparaturmechanismen

Infolge eines DSB der DNA kann die Reparatur über das NHEJ erfolgen, wobei *Indels* von variabler Länge integriert werden, die das Risiko eines *Frame-shifts* und damit einhergehender *Nonsense*-Mutation bergen. Der Mechanismus des HDR dagegen beruht auf der präzisen Rekonstruktion der ursprünglichen Sequenz mittels einer DNA-Schablone. Abbildung entnommen aus Sander und Joung 2014

Rekombination, oder *homology-directed repair* (HDR) ist sehr spezifisch und insbesondere in mitotisch aktiven Zellen in der G1- und S-Phase des Zellzyklus aktiv. Hier wird anhand einer DNA-Schablone (*Template*) die ursprüngliche Sequenz exakt wiederhergestellt (Heyer et al. 2010). Dagegen findet das *nonhomologous end joining* (NHEJ) in der G1-, S- und G2-Phase und somit auch bei postmitotischen Zellen statt (Heyer et al. 2010) und ist deutlich unspezifischer, da der DSB durch das Einfügen von *Indels*, also DNA-Fragmenten variabler Länge, geschlossen wird (Lieber 2008). Das Verfahren läuft schneller ab als die HDR, ist durch die variablen *Indels* jedoch intrinsisch mutagen und kann eine Verschiebung des Leserasters (*Frame-shift*) und damit Nonsense-Mutationen provozieren (Mao et al. 2008). **Abbildung 3** veranschaulicht die beiden DNA-Reparaturmechanismen.

Im Falle hereditärer Dystrophien wie der BVMD erfordert die Therapie das Stilllegen des mutierten Allels, welches durch einen dominant-negativen Effekt die Wirkung des wildtypischen Allels beeinflusst. Für diesen Allel-Knockout kann man sich das Prinzip des *nonsense-mediated decay* (NMD) zunutze machen (Chang et al. 2007). Das Verfahren beruht auf dem initialen CRISPR-vermittelten Induzieren eines Doppelstrangbruchs (DSB), der anschließend durch den unspezifischen zellulären Reparaturmechanismus des NHEJ einen *Frame-shift* herbeiführt und eine Nonsense-Mutation mit einem verfrühten Stopp-Codon

provoziert (Burnight et al. 2017). Das NHEJ eignet sich aufgrund der fehlerbehafteten Reparatur wesentlich besser für einen NMD als das HDR (Zhang et al. 2017). Das CRISPR-Ereignis sollte dabei in einer exonischen Region des mutierten Allels und ausreichend stromaufwärts erfolgen, sodass ein suffizienter Schaden in der späteren Polypeptidstruktur entsteht, um von zellulären Kontrollsystemen ausgeschaltet zu werden. Dieser Ansatz eines CRISPR-vermittelten NMD konnte bereits am Beispiel der Duchenne Muskeldystrophie (DMD) in Maus-Modellen erfolgreich durchgeführt werden. Hierbei wurde durch das gezielte Ausschalten von mutierten Exonen des Dystrophin-Gens anhand einer CRISPR/Cas9- und NHEJ-vermittelte Genomeditierung eine Verbesserung der Muskelfunktion erreicht (Long et al. 2016; Koo et al. 2018).

Ein wichtiger Faktor des Allel-spezifischen Knockouts ist die Diskriminierung zwischen dem mutierten und wildtypischen Allel. Gesucht sind also heterozygot auftretende Sequenz-Unterschiede, die idealerweise zwei Kriterien erfüllen. Zum einen sollten sie innerhalb einer Population in einer möglichst hohen Frequenz vertreten sein, sodass ein Vorteil hinsichtlich der Vereinheitlichung des späteren Therapiesystems besteht. Zum anderen erfordert der Einsatz des CRISPR/Cas9-Systems ein in der Zielsequenz enthaltenes PAM-Motiv, wobei zwei Modelle möglich sind, wie der Sequenzunterschied, beziehungsweise (bzw.) die Mutation damit assoziiert sein kann (Wu et al. 2020). (I) Beim „*In-PAM-Model*“ kreiert die Mutation eine neue PAM-Sequenz, die somit nur auf dem mutierten Allel vorliegt. Die sgRNA wird entsprechend der davon stromabwärts liegenden Sequenz designt (Wu et al. 2020). (II) Das „*Near-PAM-Model*“ erfordert die Lokalisation der Mutation nahe einer bestehenden PAM-Sequenz, optimalerweise in der *Seed*-Sequenz der entsprechenden sgRNA (Wu et al. 2020).

Primär können diese Kriterien von der krankheitsverursachenden Mutation selbst erfüllt werden. Ein erfolgreiches Editieren des Genoms über diesen Ansatz gelang bereits sowohl *in vitro*, anhand von iPS-Zellen mit Alpha1-Antitrypsin (AAT) assoziierten Punktmutationen (Smith et al. 2015), als auch in einem *in vivo*-Mausmodell mit einer humanen Form von genetisch bedingter Taubheit (Gao et al. 2018). Der Ansatz ist allerdings limitiert durch zu hohe Variabilität bei Erkrankungen mit vielen verschiedenen ursächlichen Mutationen, sowie der Abhängigkeit von einer benachbarten PAM-Sequenz.

Sequenz-Unterschiede finden sich neben der eigentlichen Mutation auch in sogenannten SNPs (*single nucleotide polymorphism*). Diese Polymorphismen einzelner Nukleotide erzeugen

im menschlichen Genom an der entsprechenden Position eine zweite Basenvariante im Vergleich zum korrespondierenden Allel. Hintergrund sind spontan auftretende Punktmutationen, die über Generationen unkorrigiert weitervererbt werden und so konservierte Basenpolymorphismen bilden, die eine signifikante Frequenz in der Bevölkerung erreichen können. Identifiziert wurden diese Genvarianten im Rahmen der detaillierten Genomanalyse des 1000-Genom-Projekts, anhand dessen eine detaillierte Datenbank der über 84,7 Millionen SNPs angelegt werden konnten (Auton et al. 2015). Ihre Variabilität und Frequenz in der Bevölkerung sind entscheidende Vorteile für die Allel-spezifische Genomeditierung (Wu et al. 2020), um ganze Patientenkohorten gesammelt abzudecken und die Zahl der zu designenden sgRNAs zu vermindern. Dieser Haplotyp-spezifische Ansatz konnte bereits am Beispiel der Chorea Huntington erfolgreich angewandt werden (Carroll et al. 2011), einer neurodegenerative Erkrankung mit dominantem Erbgang und pathologischen *gain-of-function*-Mutationen. Durch die Adressierung von PAM-verändernden SNPs mittels des CRISPR/Cas-Systems gelang eine Allel-spezifische Inaktivierung des mutierten Gens und eine damit einhergehende reduzierte Expression (Shin et al. 2016; Monteys et al. 2017; Shin et al. 2022).

2.4.3 Optimierung des CRISPR/Cas9-Systems

Beim therapeutischen Ansatz einer CRISPR/Cas9-vermittelten Allel-Inaktivierung *in vivo* liegt ein besonderer Fokus auf der Sicherheit des Systems und der Frage, ob die Cas9 auch abseits des gewünschten ON-Targets an Sequenz-ähnlichen OFF-Targets aktiv ist. Entsprechende OFF-Target-Effekte konnten für eine Vielzahl von sgRNAs beobachtet werden (Fu et al. 2013; Hsu et al. 2013; Lin et al. 2014). Allein dieser Problematik der OFF-Target-Identifizierung ist die Entwicklung neuer Methoden wie des GUIDE-Seq- (*genome-wide unbiased identification of DSBs enabled by sequencing*) -Verfahrens gewidmet, das für sgRNAs bekannter Gene bereits die Dokumentation möglicher Editierungsstellen abseits des ON-Targets in Form eines OFF-Target-Registers ermöglicht hat (Tsai et al. 2015).

Da bei einer finalen Anwendung im Patienten solche Ereignisse unbedingt vermieden werden sollten, besteht der Bedarf an einer Optimierung des CRISPR/Cas9-Systems hinsichtlich seiner Spezifität. Das Ziel dabei ist, eine Balance zu finden zwischen einer verbesserten Spezifität mit verringerter OFF-Target-Aktivität und der Aufrechterhaltung der Effizienz mit suffizienter ON-Target-Aktivität (Wu et al. 2020). Das grundlegende Prinzip beruht dabei auf der

Destabilisierung unspezifischer, ergänzender Wechselwirkungen zwischen Cas9-sgRNA-Komplex und DNA-Strang, damit die Erkennung der ON-Target-Sequenz hauptsächlich über die spezifische *Seed*-Sequenz der Guide-RNA erfolgt (Kleinstiver et al. 2016a; Slaymaker et al. 2016).

Eine Stellschraube der Optimierung bildet die Guide-RNA selbst. Hier konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine Verkürzung (Trunkierung) am PAM-fernen 5'-Ende von 20nt auf bis zu 17nt eine Verminderung der OFF-Target-Frequenz erreicht werden kann (Fu et al. 2014a). Dieser Effekt ist jedoch sehr variabel und sgRNA-spezifisch (Christie et al. 2017), sodass die Balance zwischen Spezifität und Effizienz oftmals nicht gehalten werden kann. Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass man sich zusätzlich eingebaute *Mismatches* zwischen sgRNA und der Zielsequenz hinsichtlich einer verbesserten Spezifität zunutze machen kann (Smith et al. 2015).

Ein weiteres Feld befasst sich deshalb mit der Modifizierung der Cas9-Nuklease und deren Bindungsverhalten zum DNA-Strang. Kleinstiver et al. identifizierten beispielsweise eine Region der SpCas9, die über vier Wasserstoffbrückenbindungen mit der DNA interagiert. Sie schlussfolgerten, dass durch einen Austausch der entsprechenden polaren Aminosäuren mit der unpolaren Aminosäure Alanin die Bindung des sgRNA-Cas9-Komplexes an OFF-Target-Regionen energetisch weniger begünstigt werden könnte (Kleinstiver et al. 2016a). Im Falle der Arbeit von Slaymaker et al. lag der Fokus auf der Schwächung der SpCas9-Helikase-Aktivität, wobei eine positiv geladene Domäne zur Stabilisierung des nicht-komplementären Strangs auf dieselbe Weise durch einen Aminosäure-Austausch neutralisiert werden sollte (Slaymaker et al. 2016). Die so konstruierten SpCas9-Varianten wurden anschließend mit Guide-RNAs bekannter Gene hinsichtlich ihres Editierungsverhaltens untersucht. In einigen Fällen konnte dabei eine Verbesserung der Spezifität bei erhaltener Effizienz festgestellt werden (Kleinstiver et al. 2016a; Slaymaker et al. 2016).

2.5 Der AAV-Vektor als Gen-Fähre

Ein wichtiger Faktor der Gentherapie ist das Einbringen des genetischen Materials in das Zielgewebe. Im Falle des CRISPR/Cas9-Systems umfasst dies die Sequenz der Cas9-Nuklease und der Guide-RNA mit den entsprechenden für die Transkription nötigen Sequenzelementen. Das führende Transportsystem für einen solchen Gentransfer *in vivo* und *in vitro* stellt das Adeno-assoziierte Virus (AAV) dar (Wang et al. 2019), das bereits für die Gentherapie erblicher

retinaler Erkrankungen eingesetzt wurde (Buch et al. 2008). Das AA-Virus gehört der Familie der Parvoviren an und findet sich natürlicherweise im Menschen, ohne ursächlich eine Erkrankung auszulösen (Wang et al. 2019). Der genomische Vektor liegt als einzelsträngige DNA vor und hat eine Größe von ungefähr 5 kb (Dong et al. 1996). Die Umformung des AAV-Vektors zu einer effektiven Gen-Fähre erfolgte mittels der Modifizierung der wildtypischen Vektor-Sequenz. Hierbei wurden wichtige codierende Sequenzen für virale Proteine entfernt und durch Transgen-spezifische Expressionskassetten für den therapeutischen Einsatz ersetzt (Wang et al. 2019), woraus sich zahlreiche Vorteile ergeben. Zum einen hat es zur Folge, dass entsprechende Transgene lediglich episomal exprimiert und nicht in das Genom integriert werden (Wang et al. 2019) und sich Immunogenität und Zytotoxizität verringern (Bennett 2003). Zum anderen vergrößert sich die Transportkapazität auf ungefähr 4,7 kb (Wang et al. 2019). Das Einbringen des viralen Vektors in die Zelle erfolgt schließlich über Transduktion. Hier profitiert man von den verschiedenen Serotypen des AAV, die verschiedene Gewebe spezifisch adressieren (Wu et al. 2006; Asokan et al. 2012; Srivastava 2016) und so eine gleichermaßen effektive wie gezielte Gentherapie ermöglichen.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Als monogene Retinopathie liegen der autosomal dominant vererbten BVMD Missense-Mutationen in einem der Allele des *BEST1*-Gens zugrunde, die wahrscheinlich aufgrund des homopentameren Aufbaus des Bestrophin-Kanals einen dominant-negativen Effekt auf dessen Kanalfunktion ausüben. Das Problem liegt somit in der Expression eines mutierten Allels und des Einbaus der mutierten Untereinheit in den Kanal, wodurch überwiegend dysfunktionale Kanalmoleküle entstehen. Ein möglicher therapeutischer Ansatz wäre es somit eine CRISPR/Cas9-vermittelte Allel-spezifische Genomeditierung des mutierten Allels *in vivo*, um über den unspezifischen DNA-Reparaturmechanismus des NHEJ eine Nonsense-Mutation und eine damit einhergehende Nonsense-vermittelte Stilllegung (NMD) des mutierten Allels zu erreichen. Schließlich sollte durch die ausschließliche Expression des wildtypischen Allels die physiologische Funktion wiederhergestellt werden.

Im Verlauf dieses Vorgehens sind jedoch einige Aspekte zu klären. Grundsätzlich besteht die Gefahr der Haploinsuffizienz, da sich die Frage stellt, ob ein funktionierendes wildtypisches Allel überhaupt ausreicht, um die natürliche Kanalfunktion aufrecht zu erhalten. Hoffnung gibt das Krankheitsbild der ARB, die rezessive Form der Bestrophinopathien, bei der heterozygote

Mutationsträger keinen Phänotyp zeigen (Burgess et al. 2008). Somit liegt die Vermutung nahe, dass eine Kopie des wildtypischen Allels zur Aufrechterhaltung der Kanalfunktion genügen sollte. Für den Therapieerfolg einer allel-spezifischen Genomeditierung wird allerdings entscheidend sein, ob eine klinische Besserung des BVMD Phänotyps erreicht werden kann, was über eine Verbesserung eines reduzierten EOG-Signals zu beurteilen sein wird.

Die Diskriminierung zwischen der mutierten und wildtypischer Genvariante kann über die Adressierung von heterozygot vorliegenden SNPs erfolgen, die im Gegensatz zum Mutations-spezifischen Ansatz mehrere Vorteile aufweist. Durch die große Auswahl und genaue Dokumentation lassen sich aus einer Vielzahl an Möglichkeiten passende SNPs herausfiltern, die Kriterien wie eine ausreichend hohe Frequenz in der Bevölkerung, die Nähe zu einer PAM-Sequenz und die Lokalisation in einem exonischen Bereich erfüllen. Für diese Varianten lohnt sich anschließend das Designen einer Guide-RNA. Der Transfer der erforderlichen CRISPR-Komponenten in das RPE als Zielgewebe ließe sich mit einem AAV-Vektor bewältigen, als Träger der codierenden Sequenzen der Cas9-Nuklease und der sgRNA unter der Kontrolle von passenden Promotoren. Bezogen auf die Transduktion wäre ein Ansatz mit nur einem *All-in-one*-AAV-Vektor mit beiden Komponenten effizienter, als zwei separate AAV-Vektoren zu verwenden. Ein Problem, das es zu lösen gilt, ist dabei die begrenzte Vektorkapazität von 4,7 kb, von der die Cas9 bereits 4,2 kb beansprucht und nur 0,5 kb für regulatorische Komponenten verbleiben. Der eigentliche Eingriff erfolgt schließlich *in vivo* und erfordert deshalb ein hohes Maß an Präzision und Sicherheit. Der Anspruch eines CRISPR/Cas9-Ansatzes muss es sein, einzig und allein das ON-Target der anvisierten SNP-Variante auf dem mutierten Allel zu erkennen, ohne OFF-Targets an anderen Stellen des Genoms zu editieren. Diese unspezifische Aktivität ist ein vielbeobachtetes Phänomen und erfordert eine Optimierung der CRISPR/Cas-Komponenten. Hierbei ist es wichtig eine Balance zu finden, zwischen einer verbesserten Spezifität durch verringerte OFF-Target-Aktivität und einer ausreichenden Effizienz mit erhaltener ON-Target-Aktivität.

Als finales Therapeutikum wird ein *All-in-one*-CRISPR-miniAAV-Vektor angestrebt, der optimierte Varianten der Cas9-Nuklease und der SNP-spezifischen sgRNA unter der Kontrolle eines effizienten Promotors trägt. Entscheidende Faktoren sind die Fähigkeit des Vektors zur Bildung Transduktions-kompetenter Viruspartikel, die Spezifität der designten Guide-RNA für

den adressierten SNP und die Spezifität und Effektivität, mit der die Cas9-Nuklease die DNA am ON-Target editiert. Dahingehend geleistete Vorarbeiten am Institut für Humangenetik Regensburg bezogen sich auf die Analyse passender SNPs und das Designen der entsprechenden sgRNAs. Es erfolgten zusätzliche Optimierungsversuche der Guides, die jedoch nicht für alle SNPs wirkungsvoll waren. Bezogen auf die Transportkapazität wurden die Promotoren der CRISPR-Komponenten um redundante Regionen verkürzt und die Klonierung von Cas9-Sequenzen und Guide-RNA in einem einzigen Vektorkonstrukt ermöglicht.

Die primäre Aufgabe dieser Arbeit soll es sein, die Befunde von Kleinstiver et al. (2016) und Slaymaker et al. (2016) zu reproduzieren und die beschriebenen SpCas9-Varianten durch Mutagenese zu optimieren. Diese sollen anschließend in dem modifizierten *All-in-one*-miniAAV-Vektor mit bisher Optimierungs-resistenten Guides in einem Transfektionsassay *in vitro* anhand HEK293T- und iPSC-entstammenden RPE-Zellen getestet und hinsichtlich ihrer Spezifität und Effizienz untersucht werden. Das Ziel ist es, für möglichst viele SNPs eine passende Kombination aus optimierter sgRNA und Cas9-Nuklease zu finden, die ein spezifisches und effizientes Editierungsverhalten zeigt. Idealerweise lässt sich die Funktion dieser identifizierten CRISPR-miniAAV-Vektoren schließlich auch im Rahmen einer Transduktion der HEK293T- und RPE-Zellen mit Viruspartikeln nachweisen.

3 Material

3.1 Bakterienstämme

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme und deren Herkunft

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

3.2 Zell-Linie

Tabelle 2: Verwendete Zelllinien und deren Herkunft

Zelllinie	Organismus	Ursprungsgewebe	Referenz
Fibroblasten	Homo sapiens	Primäre Zelllinie aus Hautstanze	MHW
HEK293T	Homo sapiens	embryonale Nierenzelle	ATCC; LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
AAVpro 293T	Homo sapiens	embryonale Nierenzelle	Takara Bio Inc., Saint-Germain-en-Laye, France
RPE	Homo sapiens	hiPSC-Zellen aus Hautstanze	AP, CH, MHW

3.3 Vektor-Plasmide

Tabelle 3: Verwendete Vektoren, deren Verwendung und deren Herkunft

Bezeichnung	Verwendung	Referenz
AAV-GFP	AAV-Vektor mit grün fluoreszierendem Protein; Potential zur Viruspartikelbildung; für die Transduktion der HEK293T, Fibroblasten und RPE	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK; #49055
eSpCas9(1.1)	Träger der originalen eCas-1.1 aus der Literatur zur Positivkontrolle bei Transfektionen	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK; #71814
pAAV2/2	AAV-Helferplasmid zur Viruspartikelbildung des Serotyps 2; für die Transduktion der HEK293T, Fibroblasten und RPE	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK; #104963
pAAV-RSV-SpCas9	Träger der Cas9-Endonuklease mit RSV-Promotor, für das Duale System	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK; #85450
pAAV-U6-sgRNA-CMV-GFP	AAV-Vektor mit grün fluoreszierendem Protein und sgRNA-Klonierungskassette; Potential zur Viruspartikelbildung; für das Duale System	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK; #85451
pAdDeltaF6	AAV-Helfer Plasmid zur Viruspartikelbildung des Serotyps 2; für die Transduktion der HEK293T, Fibroblasten und RPE	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK; #112867
pDGM6	AAV-Helferplasmid zur Viruspartikelbildung des Serotyps 6; für die Transduktion der HEK293T, Fibroblasten und RPE	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK; #110660

pCAG-EGxxFP	Träger der SNP-spezifischen Zielsequenz zwischen EGxxFP Kasette; Leervektor zur Negativkontrolle bei Transfektionen	Addgene, LGC Standards, Teddington, UK
pGem [®] -T	PCR-Vektor	Promega Corporation, Madison, WI, USA
pmaxGFP	Träger eines stark grün fluoreszierenden Proteins für das Sorten transfizierter Zellen	BIOZ, State Street 316, Los Altos, CA

3.4 Oligonukleotide

3.4.1 Oligonukleotide für die PCR und Sanger Sequenzierung

Tabelle 4: Verwendete PCR- und Sequenzierprimer, ihre Sequenz und ihre Verwendung

Guide-Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Verwendung
Cas9_ApaI-F	GGGCCctctggccaggggaa	PCR-Primer eines Cas9-Abschnitts zur Klonierung in einen pGem-T-Vektor für die anschließende Mutagenese
Cas9_SpHI-R	GCATGctcagcactttccgcac	
Cas9-Opt-F1	ggcgtggaagatcggttcaa	Sequenzierung des Cas9-Inserts im pGem-T-Vektor zur Überprüfung der Mutagenese-PCR
Cas9-Opt-F2	catccagaaagcccaggtgt	
Cas9-Opt-F3	ggaccaggaactggacatca	
Cas9-Opt-F4	gctggtgtccgatttccgga	
M13-F	cgccagggttttccagtcacgac	
M13-R	agcggataacaatttcacacagga	
hU6-F	gagggcctatttcccatgatt	Sequenzierung der Guide-Kassette im AAV-Vektor zur Überprüfung der Guide-Klonierung
PCR-EMX1-F-EcoRI	GAATTCaggaacaggaaaaccacct	PCR einer genomischen Sequenz im EMX1-Gen zur anschließenden Klonierung in den pCAG-EGxxFP-Vektor
PCR-EMX1-R-BamHI	GGATCcggttgcccaccctagtcattg	
756_759_F_EcoRI	GAATTCcctcagccccactcccatg	PCR und Sequenzierung der Zielsequenz der CRISPR-AAV-Vektoren im Genom
756_759_R_BamHI	GGATTCcagacctgtttccaaggcc	
EMX1-OT1-F	tcctgaagacctgtaatctgact	
EMX1-OT1-R	ccgcttggtccatgtctagga	
VMD2_ex3-F (Best Exon3_534)	cagtctcagccatctcctcg	
VMD2_ex3-R (Best Exon3_534)	ggaggatcacgaggagctg	

Großbuchstaben in der Sequenz zeigen die Schnittstelle des Restriktionsenzym

3.4.2 Oligonukleotide für die Mutagenese-PCR

Tabelle 5: Verwendete Mutagenese-Primer, ihre Sequenz und ihre Verwendung

Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Mittlere Annealing-Temperatur	Verwendung
HiFi-Cas9_N497A-F	gcggatgaccgccttcgataagaacctg	64°C	PCR-Primer des Q5-Mutagenese-Kits zur Rekonstruktion der optimierten Cas9-Konstrukte aus der Literatur
HiFi-Cas9_N497A-R	tcgatgaagctctgggcg		
HiFi-Cas9_R661A-F	cggctggggcgcgctgagccgg	67°C	
HiFi-Cas9_R661A-R	gtgtatctccgccgcttc		
HiFi-Cas9_Q695A-F	aaacttcatggcgtgatccacgacgacag	66°C	
HiFi-Cas9_Q695A-R	ctgttggcgaagccgtcg		
HiFi-Cas9_Q926A-F	ggaaacccggcgatcacaaaag	57°C	
HiFi-Cas9_Q926A-R	accagctgtctcttgatg		
eCas9-1.0_K810A_F	gcagaacgagcgctgtacctgtac	63°C	
eCas9-1.0_K810A_R	agctgggtgtttccacg		
eCas9-1.1_K848A_F	gagctttctggcgacgactccatc	62°C	
eCas9-1.1_K848A_R	tgaggcacgatatggtcc		
eCas9_K1003A_F	aaagtaccctgcgctggaaagcgagttc	65°C	
eCas9_K1003A_R	ttgatcagggcggttccc		
eCas9_R1060A_F	gatccggaagcgccctctgatcgagacaaacg	69°C	
eCas9_R1060A_R	tcgccgttggccagggta		
Spmut-Cas9_K855A_F	catcgacaacgcggtgctgacc	59°C	
Spmut-Cas9_K855A_R	gagtcgtccttcagaaag		

Rot markierte Buchstaben: Im Rahmen der Mutagenese eingefügte Basen-Mutationen. Ermittelt über *NEBaseChanger™*

3.4.3 Oligonukleotide für die Guide-RNAs

Tabelle 6: Verwendete sgRNA-Primer, ihre Sequenz und ihre Verwendung

Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Verwendung
sgRNA_534_C_18mer_F	CACCGaaggaaatggggatgagc	Klonierung in die BbsI-Schnittstelle der CRISPR-AAV-Vektoren
sgRNA_534_C_18mer_R	AAACgctcatccccatttccttC	
sgRNA_749_A_20mer_F	CACCGtggggctgaggggtgtctgt	
sgRNA_749_A_20mer_R	AAACacagacaccctcagccccaC	
sgRNA_756_C1_20mer_F	CACCGgaattgctctcagagagcga	
sgRNA_756_C1_20mer_R	AAACtcgctctctgagagcaattcC	
sgRNA_759B_C_20mer_F	CACCGtcaagtgaggaggaaaacCg	
sgRNA_759B_C_20mer_R	AAACcGgttttctcctcacttgaC	
sgRNA_EMX1_20mer_F	CAACggagtccgagcagaagaagaa	
sgRNA_EMX1_20mer_R	AAACttcttctctgctcgactcc	

Großbuchstaben: Basen der Restriktionsschnittstelle zur Ligation in den Expressionsvektor; Kleinbuchstaben: Basen der sgRNA, ermittelt über das *Optimised CRISPR-Design-Tool* im Rahmen der Vorarbeit

3.5 Erzeugte Vektorkonstrukte

Tabelle 7: Durch Klonierung hergestellte Vektorkonstrukte und ihre Verwendung

Bezeichnung	Verwendung
In pGem-T-Vektor klonierter Cas9-Abschnitt	Mutagenesen
pGem-WT-Cas9	
Cas9-sgRNA-miniAAV-Vektoren	Klonierung von Guides
AAV-miniCMV-WT-Cas-U6short-sgRNA	
AAV-miniCMV-HiFi-Cas-U6short-sgRNA	
AAV-miniCMV-Spmut-Cas-U6short-sgRNA	
AAV-miniCMV-e1.0-Cas-U6short-sgRNA	
AAV-miniCMV-e1.1-Cas-U6short-sgRNA	
AAV-miniCMV-Ae1.1-Cas-U6short-sgRNA	
CRISPR-miniAAV-Vektoren mit Cas9-Variante und SNP-sgRNA	HEK293T-EGFP-Assays
WT-Cas	
AAV-miniCMV-WT-Cas-U6short-749_A_20mer	
AAV-miniCMV-WT-Cas-U6short-756_C1_20mer	
AAV-miniCMV-WT-Cas-U6short-759B_C_20mer	
AAV-miniCMV-WT-Cas-U6short-EMX1	
HiFi-Cas	
AAV-miniCMV-HiFi-Cas-U6short-749_A_20mer	
AAV-miniCMV-HiFi-Cas-U6short-756_C1_20mer	
AAV-miniCMV-HiFi-Cas-U6short-759B_C_20mer	
AAV-miniCMV-HiFi-Cas-U6short-EMX1	
Spmut-Cas	
AAV-miniCMV-Spmut-Cas-U6short-749_A_20mer	
AAV-miniCMV-Spmut-Cas-U6short-756_C1_20mer	
AAV-miniCMV-Spmut-Cas-U6short-759B_C_20mer	
AAV-miniCMV-Spmut-Cas-U6short-EMX1	
e1.0-Cas	
AAV-miniCMV-e1.0-Cas-U6short-749_A_20mer	
AAV-miniCMV-e1.0-Cas-U6short-756_C1_20mer	
AAV-miniCMV-e1.0-Cas-U6short-759B_C_20mer	
AAV-miniCMV-e1.0-Cas-U6short-EMX1	
e1.1-Cas	
AAV-miniCMV-e1.1-Cas-U6short-749_A_20mer	
AAV-miniCMV-e1.1-Cas-U6short-756_C1_20mer	
AAV-miniCMV-e1.1-Cas-U6short-759B_C_20mer	
AAV-miniCMV-e1.1-Cas-U6short-EMX1	
AAV-Addgene-e1.1-Cas	
AAV-miniCMV-Ae1.1-Cas-U6short-749_A_20mer	
AAV-miniCMV-Ae1.1-Cas-U6short-756_C1_20mer	
AAV-miniCMV-Ae1.1-Cas-U6short-759B_C_20mer	
AAV-miniCMV-Ae1.1-Cas-U6short-EMX1	

px-Addgene-e1.1-Cas

px-CMV-Ae1.1-Cas-U6-749_A_20mer

px-CMV-Ae1.1-Cas-U6-756_C1_20mer

px-CMV-Ae1.1-Cas-U6-759B_C_20mer

px-CMV-Ae1.1-Cas-U6-EMX1

Zielvektoren für CRISPR-Vektoren mit in EGFP-Kassette klonierte SNP-spezifischer Sequenzen

pCAG-EGxxFP-EMX1

HEK293T-EGFP-Assays

pCAG-EGxxFP-VEGFA

Guide-pAAV-Vektoren für das Duale System

pAAV-U6-759B_C_20mer-CMV-GFP

Duales System

pAAV-U6-534_C_18mer-CMV-GFP

AAV = Adeno assoziierter Virus; CMV = Zytomegalievirus; WT = wildtypisch; HiFi = High fidelity; Spmut = *Streptococcus pyogenes* mutiert; VEGFA = vascular endothelial growth factor; EGFP = enhanced green fluorescent protein

3.6 Reaktionssysteme

Tabelle 8: Verwendete Reaktionssysteme und ihr Hersteller

Bezeichnung	Referenz
10x KLD Enzyme Mix	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
BigDye Terminator v1.1, v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
GoTaq® Long Expand PCR Master Mix	Promega Corporation, Madison, WI, USA
NucleoBond® XtraMidi	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, GE
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, GE
NucleoSpin® Plasmid	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, GE
Nucleospin® Tissue	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Duren, GE
pGEM®-T Vector System	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4 DNA Ligase Kit	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

3.7 Enzyme

Tabelle 9: Verwendete Enzyme und deren Hersteller

Bezeichnung	Referenz
Agel-HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Apal-HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Arktisch alkalische Phosphatase (AAP)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
BamHI-HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
EcoRI-HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
EcoRI-HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Exonuklease I (Exo I)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Exonuklease V (Exo V)	Affymetrix, USB Products, Santa Clara, CA, USA
FastDigest Bpil (BbsI)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gibco™ TrypLE™ Express Enzyme	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

GoTaq® DNA-Polymerase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
pGem Ligase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Quick CIP (calf intestinal alkaline phosphatase)	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Quick Ligase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
SpHI-HF	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4 PNK	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Trypsin	GE Healthcare, Galfont St Giles, GB

3.8 Antikörper

Tabelle 10: Verwendete primäre Antikörper

Primärantikörper	Typ	Spezies	Verdünnung	Anwendung	Referenz
Cas9	mAK	Maus	1:2500/1:250	WB/ICF	Cell Signaling Technology Europe B.V., Frankfurt am Main, DE
β-Aktin	mAK	Maus	1:10.000	WB	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, DE

mAK: monoklonale Antikörper; WB: Western Blot; ICC: Immunocytochemie

Tabelle 11: Verwendete Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Spezies	Verdünnung	Anwendung	Referenz
Goat anti-Rat IgG, Alexa Fluor® 594 conjugated	Ziege	1:500	ICC	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, NE, USA
IRDye® 680CW anti-Mouse IgG (H+L)	Donkey Ziege	1:2500	WB	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

WB: Western Blot; ICC: Immunocytochemie

3.9 Molekularmassenstandards

Tabelle 12: Verwendete Molekularmassenstandards, ihre Verwendung und ihre Hersteller

Bezeichnung	Verwendung	Referenz
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fragmentgrößenreferenz Gelelektrophorese	in Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fragmentgrößenreferenz Western Blot	in Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

3.10 Chemikalien

Tabelle 13: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller

Bezeichnung	Referenz
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Agarose	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Ampicillin Natriumsalz	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Bromphenolblau Natriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Chloroquin Phosphat (CQ)	Biomol, Hamburg, DE
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent, Santa Clara, CA, USA
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP; 100 mM)	Genaxxon Bioscience, Ulm, DE
Dulbecco's PBS (DPBS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Ethanol ≥99,8 p. a	Chemikalienlager Universität Regensburg, DE
Ethidiumbromid	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Glycerol 87%	Chemikalienlager Universität Regensburg, DE
Goat-Serum	Abcam, Cambridge, UK
HiDi™ Formamid	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Hoechst	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol ≥99,8 p. a	Chemikalienlager Universität Regensburg, DE
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Kalziumchlorid	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Methanol	Chemikalienlager Universität Regensburg, DE
Milchpulver	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumacetat	Chemikalienlager Universität Regensburg, DE
Natriumazid	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Odyssey® Blocking Buffer (TBS)	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Paraformaldehyd (PFA)	BIOTREND Chemikalien GmbH, Miramar Beach, FL, USA
Polyacrylamid	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, DE
SDS (Sodium dodecyl sulfate) ≥99%, C12H25NaO4S	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Triton® X-100	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)	VWR International GmbH, Darmstadt, DE

3.11 Zellkulturbestandteile

Tabelle 14: Verwendete Zusätze in der Zellkultur und ihre Hersteller

Bezeichnung	Referenz
DMEM High Glucose Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
DPBS, no calcium, no magnesium, 10 x 500 mL	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fetal calf Serum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Fibronectin (5µl/ml PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Penicillin (10.000 Units)/Streptomycin (10 mg/ml), (Pen/Strep)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Polybrene Infection/Transfection Reagent	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Poly-L-Lysin Hydrobromid (0,1mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 15: Erstellte Medien für die Zellkultur, ihre Bestandteile und deren Mengenzusatz

Bezeichnung	Komponenten	Menge
EDTA-Lösung	0,5M EDTA	0,2 % (v/v)
	DPBS	
HEK293T-Medium	FCS	10% (v/v)
	P/S	1% (v/v)
	DMEM	
KØ - Medium 5%	Gentamicin solution (50 mg/ml)	5 µg/ml
	Gibco™ KnockOut™ Serum Replacement (KOSR)	5 % (v/v)
	Gibco™ L-Glutamine 200 mM (100x)	2 mM
	Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	0.1 mM
	Nicotinamide	10 mM
	β-Mercaptoethanol	0.1 mM
	DMEM	
Polylysine-Lösung	Poly-L-Lysin Hydrobromid (0,1mg/ml)	1 % (v/v)
	Penicillin (10.000 Units)/Streptomycin (10 mg/ml), (Pen/Strep)	1 % (v/v)
	DPBS	

3.12 Puffer und Lösungen

Tabelle 16: Verwendete Puffer und Lösungen mit ihrer jeweiligen Zusammensetzung

Bezeichnung	Komponenten	Menge
2x HBSS	HEPES	50 mM
	KCl	10 mM
	Na ₂ HPO ₄	1.5 mM
	NaCl	280 mM
	H ₂ O dest.	
5x Lämmli Puffer	Bromphenolblau	0,01 % (v/v)
	Glycerin	10 % (v/v)
	SDS	2 % (w/v)
	Tris-HCl, pH 6,8	60 mM
	β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)
ATP (5mCi/ml)	H ₂ O dest.	
	ATP	300 mM
Bromphenolblau (DNA-Ladepuffer)	H ₂ O dest.	
	Glycerin	40 % (v/v)
	Bromphenolblau	0,01 % (w/v)
LB-Medium	H ₂ O dest.	
	Trypton	1% (w/v)
	NaCl	1% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)

LB-Platten	Bacto-Agar	15% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	1% (w/v)
	Trypton	1% (w/v)
	H ₂ O dest.	
PFA-Lösung	PFA	4 % (w/v)
	PBS	
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), pH 7,4	KCl	0,27 mM
	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	NaCl	137 mM
	H ₂ O dest.	
SDS-Laufpuffer, pH 8,6	Glycin	0,2 M
	SDS	1 % (w/v)
	Tris-HCl	0,25 mM
	H ₂ O dest.	
Soc-Medium	Glukose	20 mM
	Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
	KCl	2,5 mM
	NaCl	10 mM
	Trypton	2 % (w/v)
	H ₂ O dest.	
Towbinpuffer, pH 8,7	Glycin	190 mM
	Methanol	20 % (v/v)
	Tris	0,25 mM
	H ₂ O dest.	
Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE), pH 8,0	Borsäure	100 mM
	EDTA	1 mM
	Tris-HCl, pH 8,0	100 mM
	H ₂ O dest.	
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS), pH 7,5	NaCl	150 mM
	Tris	50 mM
	H ₂ O dest.	
Xylencyanol-Puffer (DNA-Ladepuffer)	Glycerin 87 %	40 % (w/v)
	Xylencyanol	0,1 % (w/v)

3.13 Geräte

Tabelle 17: Verwendete Geräte und deren Hersteller

Bezeichnung	Referenz
Abi3130X1 Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Accu-jet Pipet Kontroller	Brand, Wertheim, DE
Autoklav V-150	Systec GmbH, Wettenberg, DE
Biometra® Thermocycler Tadvanced	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Brutschrank für Bakterien 37°C	Memmert GmbH, Schwabach, DE
Bunsenbrenner Gasprofi1	WLD Tec, Göttingen, DE
BINDER CO2-Inkubator	Kendro Lab Products, Langenselbold, DE

CyFlow Space FACS	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, DE
Durchlichtmikroskop Axioskop 2	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
E1-ClipTip™ Equalizer Mehrkanalpipette	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Eismaschine AF 100	Scotsman, Vernon Hills, IL, USA
Feinwaage Explorer	OHAUS, Nänikon, CH
Gelelektrophoreseapparatur Mini PROTEAN 3	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Gelkammer Blue Marine200	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Invertiertes Routine-Mikroskop ECLIPSE Ts2	Nikon Corporation, Minato, Präfektur Tokyo, JP
Laminar-Flow-Einheit	BDK Luft und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl, DE
Leica DM IL Inverted Phase Contrast Microscope 090-135.001	Leica Camera AG, Wetzlar, DE
Mikro-Fuge	Heathrow Scientific, Vernon Hills, IL, USA
Mikrowelle KOR-6D07	Daewoo, Seoul, KR
Milli-Q-Synthesis Reinstwasseranlage	Merck Chemicals GmbH, Schwalbach, DE
Mini-Zentrifuge	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, DE
Multipette plus	Eppendorf AG, Hamburg, DE
NanoDrop® ND1000 Spektrophotometer	NanoDrop, Wilmington, DE, USA
Netzgerät Blue Power 500	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
Odyssey® FC-Scanner	LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA
Rollenmischer	premiere
Schüttelinkubator Ceromat R	B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, DE
Sicherheitswerkbank BDK-SK1800	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, DE
Spark® Multimode Microplate Reader	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Thermocycler T1	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Thermocycler T3	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Tischzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
Transferpipette® 10 µl	Brand, Wertheim, DE
Transferpipette® 100 µl	Brand, Wertheim, DE
Transferpipette® 1000 µl	Brand, Wertheim, DE
Ultraschallgerät Vibra Cell VCX400	Sonics & Materials, Newtown, CT, USA
UVP Gelstudio PLUS	Analytik Jena AG, Jena, DE
Vakuumpumpe MZ 2 C	Vacuubrand GmbH, Wertheim, DE
Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage	SCALTEC Instruments GmbH, Heiligenstadt, DE
Wasserbad W12	Labortechnik Medingen, Arnsdorf, DE
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE

3.14 Software

Tabelle 18: Verwendete Software und deren Hersteller

Bezeichnung	Referenz
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, DE
Chromas	Technelysium Pty Ltd, South Brisbane, AU
CorelDRAW® X8	Corel Corporation, Ottawa, ON, CA
Image Studio Version 4.0	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, NE, USA
Microsoft Office 2019	Microsoft Cooperation, Redmond, WA, USA
NEBaseChanger	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
NIS-Elements BR 3.0	Nikon Corporation, Minato, Präfektur Tokio, JP
SigmaPlot Version 14.0	Systat Software, San Jose, CA, USA
SnapGene® Version 2.8.2	GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA
Spark® Control Method Editor	Tecan Trading AG, Männedorf, CH
VisionWorks	Analytik Jena AG, Jena, DE
NCBI Nucleotide BLAST	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, Bethesda MD, USA
UCSC Genome Browser	UC Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
Primer 3	Prof. Mado Remm, University of Tartu, Tartu, EE

4 Methoden

4.1 Klonierung von Vektor-Konstrukten

Zu Beginn erfolgte die Generierung der CRISPR-miniAAV-Vektoren und der EGxxFP-Ziel-Vektoren. Dieser Prozess beinhaltete unterschiedliche Versuchsreihen mit jeweils ähnlichen Klonierungsschritten.

Im Falle der CRISPR-miniAAV-Vektoren wurde in einer ersten Versuchsreihe ein DNA-Fragment aus der Cas9-Nuklease-Sequenz amplifiziert und in den PCR Vektor pGem-T kloniert. Hier konnten die Mutagenese-Schritte der einzelnen DNA-Codons erfolgen, die als Ergebnis die vier beschriebenen, optimierten SpCas9-Varianten (Opt-Cas9) hervorbrachten. Die generierten Opt-Cas9-Fragmente, sowie die über die Firma *Addgene* verfügbare Positivkontrolle, wurden mittels Restriktionsverdau zurück in eine wildtypische SpCas9-Sequenz in einen miniAAV-Vektor kloniert. Zuletzt erfolgte die Klonierung der sgRNA-Sequenz in die entsprechende Expressionskassette des Vektors.

Im Rahmen des HEK293T-EGFP-Assays musste zudem der EGxxFP-Ziel-Vektor für die EMX1-Positivkontrolle neu generiert werden. Hierzu wurde zunächst die entsprechende SNP-haltige Zielsequenz aus einem humanen Genom herausamplifiziert und in einen PCR Vektor kloniert, bevor sie in den EGxxFP-Vektor ligiert und das Produkt in Bakterien transformiert wurde.

Alle beschriebenen Versuchsansätze wurden unter ständiger Kühlung auf Eis durchgeführt.

4.1.1 GoTaq-PCR: Amplifizierung der Klonierungssequenz

Im Mittelpunkt der Klonierung steht ein DNA-Fragment, welches aus einer Ausgangs-Sequenz herausamplifiziert und in einen Zielvektor eingefügt werden soll. Für den ersten Schritt der Amplifikation wurde die Go-Taq-Polymerase (*Thermus aquaticus* Polymerase) im *GoTaq® Long Expand PCR Master Mix* verwendet, mit der Kompetenz zur Bildung von Adenosin-Überhängen. Im Falle der CRISPR-miniAAV-Klonierung diente ein AAV-RSV-WT-Cas-Vektor als DNA-Vorlage mit den Primern Cas9_ApaI-F und Cas9_SpHI-R, für den EMX1-EGxxFP-Vektor wurde die Probe einer humanen genomischen DNA verwendet mit den Primern EMX1-F-EcoRI und EMX1-R-BamHI. Aus dem Standardansatz von 25 µl (**Tabelle 19**) wurde ein Mastermix für 2,5 Reaktionen erstellt (Reaktion, Leerkontrolle und Pipettierfehler).

Tabelle 19: Komponenten und deren Menge für einen Standardansatz der Go-Taq-PCR

Komponenten	Menge
DNA-Vorlage (~25 ng)	2 µl
H ₂ O dest.	13,9 µl
5x Reaktionspuffer	5 µl
dNTPs (5 mM)	2 µl
Primer F (10 µM)	1 µl
Primer R (10 µM)	1 µl
Go-Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl

Für die PCR wurde am Thermocycler das in **Tabelle 20** angegebene Programm gewählt.

Tabelle 20: Verwendetes PCR-Programm zur Amplifikation des SpCas9-Fragments

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	35x
Primer-Annealing	58°C	30 sec	
Elongation	72°C	1 min*	
Finale Elongation	72°C	4 min	
Pause	10°C	∞	

*Elongationsdauer variiert je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments (30 sec/kb)

4.1.2 Agarosegelelektrophorese: Größenspezifische DNA-Auftrennung

Dieser Schritt diente zur Kontrolle des PCR-Erfolges und Isolation des PCR-Produkts. Ein 1 % Ansatz (w/v) aus Agarose und 1x TBE-Puffer (**Tabelle 21**) wurde 4 Minuten (min) in einer Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose über die Schlierenbildung hinaus gelöst war und anschließend in einem Eisbad auf <50 °C abgekühlt. Das Gemisch wurde mit einem Tropfen Ethidiumbromid versetzt und zum Aushärten auf einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Nach ca. 15 min konnte das fertige Gel in einer mit 1x TBE gefüllten Elektrophoresekammer platziert werden.

Tabelle 21: Zusammensetzung eines 1%igen Agarosegels

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

Der PCR-Ansatz wurde zum Beschweren und Anfärben der DNA standardmäßig mit 10 µl Bromphenolblau versetzt und vollständig auf das Gel aufgetragen, zusammen mit 10 µl *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* als Referenz. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 Volt (V) über

30 min und der Nachweis der DNA unter einem Darkhood-UV-Strahler. Das PCR-Produkt zeigte sich als eine differenzierte Bande bei 2 kb, ablesbar auf der daneben aufgetragenen DNA-Leiter.

4.1.3 Aufreinigen von DNA aus einem Agarosegel

Die PCR-Bande wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kits* nach Herstellerangaben in 20 µl destilliertem Wasser (*aqua destillata*, A.D.) eluiert. Eine Lagerung der Probe erfolgte bei -20 °C.

4.1.4 Ligation des PCR-Produkts in einen pGem-T-Vektor

Zum Einfügen des amplifizierten und aufgereinigten DNA-Fragments der Cas9-Nuklease in einen offenen pGem-T-Vektor wurde das *pGEM®-T Vector-Kit* herangezogen und ein entsprechender Ligationsansatz (**Tabelle 22**) über Nacht bei 14 °C inkubiert. Die Ligation erfolgte hierbei zwischen den durch die Go-Tag synthetisierten Adenosin-Überhängen des PCR-Produkts und den Thymin-haltigen Enden des pGem-T-Vektors.

Tabelle 22: Ligationsansatz zum Einbringen des eluierten PCR-Produkts in einen pGem-T-Vektor

Komponenten	Menge
PCR-Produkt	3,5 µl*
pGEM®-T Vector	0,5 µl
2x Ligationspuffer	5 µl
pGem-Ligase	1 µl

*Für diese Ligation wurde Konzentrationsunabhängig immer 3,5 µl des PCR-Produkts eingesetzt.

4.1.5 Hitzeschocktransformation und Kultivierung von DNA in E. coli-Bakterien

Zur Reproduktion wurde der ligierte pGem-T-Vektor mittels der Hitzeschock-Methode in E. coli-Bakterien des DH5α-Stamms transformiert. Die bei -80 °C kryokonservierten Aliquots wurden auf Eis aufgetaut und anschließend mit dem vollständigen Ligationsansatz aus **4.1.4** versetzt. Es folgte eine Inkubation für 45 sec bei 42 °C in einem Heizblock und sofortige Lagerung für weitere 5-10 min auf Eis. Zur Vermehrung der Bakterienzellzahl wurde unter einer Sicherheitswerkbank 900 µl glukosereiches Soc-Medium hinzugegeben und die Probe für 1-2 Stunden (h) bei 37 °C in einem Schüttelinkubator belassen. 200 µl dieser Bakteriensuspension konnten schließlich auf einer Ampicillin (Amp)-positiven LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C in einem Bakterienbrutschrank inkubiert werden. In diesem Fall erfolgte zusätzlich eine Blau-Weiß-Selektion.

4.1.5.1 Blau-Weiß-Selektion von transformierten Bakterien

Diese Methode dient dem Nachweis der erfolgreichen Ligation und Transformation eines Klonierungsvektors und der Identifizierung entsprechend exprimierender Bakterien. Die Selektion erfolgt durch Aussäen auf einer Agarplatte. Der Transformationsnachweis wird erbracht, indem auf dem Amp-positiven Agar nur transformierte Klone mit dem Amp-Resistenzgen tragenden pGem-T-Vektor anwachsen. Der Nachweis der Ligation erfolgt über einen Farbstoffnachweis. Blaue Kolonien mit unligiertem pGem-T-Vektor besitzen ein intaktes lacZ-Gen für die β -Galaktosidase mit der Kompetenz zur Umwandlung des Galactosids X-Gal in einen blauen Farbstoff. Im Gegensatz dazu unterbricht bei weißen Kolonien das ligierte PCR-Produkt die *multiple cloning site* (MCS) innerhalb des lacZ-Gens und inaktiviert so das Gen und eine Farbstoffentwicklung.

Eine LB-Amp-Platte wurde hierfür mit 20 μ l IPTG und 100 μ l X-Gal beschichtet und für 20 min bei 37 °C belassen. Anschließend erfolgte das Ausstreichen von 200 μ l der DH5 α -Suspension mit einem vorher mittels Bunsenbrenner abgeflammt Spatel und eine Inkubation über Nacht in einem Bakterienbrutschrank bei 37 °C. Am Folgetag wurden angewachsene weiße Klone von der Platte gepickt und in 5 ml Ansätzen LB-Medium mit 0,1 % Ampicillin über Nacht bei 37 °C im Bakterienbrutschrank inkubiert. Zur Sicherung der kultivierten Proben wurden am Folgetag vor einer Weiterverarbeitung stets 500 μ l-Ansätze entnommen und bei 4 °C gesichert.

4.1.6 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli Bakterien in einer MiniPräp

Zellpellets aus einer 5 ml-Übernacht-Kultur wurden mit dem *NucleoSpin® Plasmid*-Kit gemäß der Herstelleranweisung behandelt und die aufgereinigte DNA in 30 μ l A.D. eluiert. Es folgte eine Bestimmung der Konzentrationen mittels des *NanoDrop® Spektrophotometers*. Sie lagen meist zwischen 200-400 ng/ μ l und wurden für die anstehende Sequenzierung auf 25 ng/ μ l verdünnt. Die Probe wurde bis zur weiteren Verwendung auf -20 °C gelagert.

4.1.7 Sanger-Sequenzierung

Dieser Schritt diente in allen Klonierungen als finale Kontrolle des Klonierungsvektors auf das eingefügte DNA-Fragment und Synthesierungsfehler der DNA-Polymerase in der PCR und erfolgte mittels des *BigDye Terminator v1.1, v3.1 Cycle Sequencing Kits*. Für den Klonierungsloкус des pGem-T-Vektors wurden hierbei standardmäßig die Primer M13-F und

M13-R in zwei separaten Ansätzen verwendet. Die Zusammensetzung des Standard-Sequenzierungsansatzes von 10 µl ist in **Tabelle 23** dargestellt.

Tabelle 23: Zusammensetzung eines Standard-Sequenzierungsansatzes

Komponenten	Menge
H ₂ O dest.	4,5 µl
5x BigDye Terminator Puffer	2 µl
BigDye Terminator Reaktionsmix	0,5 µl
Primer (10 µM)	1 µl
Plasmid-DNA (25ng)	2 µl

Das Cycle-Sequencing im Thermocycler erfolgte standardgemäß mit folgendem Programm:

Tabelle 24: Programmeinstellung am Thermocycler für ein Cycle Sequencing

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	
Denaturierung	95 °C	30 sec	26x
Primer-Annealing	58 °C	30 sec	
Elongation	60 °C	3 min	
Finale Elongation	60 °C	5 min	
Pause	10 °C	∞	

Das weitere Verfahren beinhaltete die Fällung der DNA. Initial wurden die Proben versetzt mit 2 µl einer 3 molaren (M) Natriumacetat-Lösung und 25 µl 100%igem Ethanol. Nach kurzem Vortexen und einer Inkubationszeit von rund 10 min bei Raumtemperatur (RT) wurde der Ansatz 45 min bei 4000 rpm. und 4 °C in einer *Megafuge* pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Ein zweiter Waschschrift erfolgte mit 100 µl 70%igem Ethanol und Zentrifugation über 30 min bei 4000 rpm. und 15 °C. Das Pellet wurde zum Trocknen für 10 min offenstehend belassen und final in 15 µl HiDi-Formamid resuspendiert. Die eigentliche Sequenzierung lief anschließend über einen *Abi3130x1 Genetic Analyser* ab. Zur Auswertung wurden die Programme *Chromas* und *SnapGene* herangezogen.

4.1.8 Mutagenese-PCR

Für die Mutagenese-PCR wurde das *Q5 Hot Start High-Fidelity*-Kit verwendet. Hierzu war das Designen von speziellen Mutagenese-Primern erforderlich: ein bis zu 30 bp langer F (*forward*)-Primer, der zentral die zwei gewünschten Mutations-Basen enthielt und ein kürzerer R (*reverse*)-Primer, der am Komplementärstrang End-zu-End zum F-Primer entgegengesetzt ausgerichtet war. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (**Tabelle 25**) und der

Programmablauf des Thermocyclers (**Tabelle 26**) erfolgten gemäß den Herstelleranweisungen.

Tabelle 25: Zusammensetzung des Q5-Mutagenese-Ansatzes

Komponenten	Menge
H ₂ O dest.	9 µl
F-Mut-Primer (10 µM)	1,25 µl
R-Mut-Primer (10 µM)	1,25 µl
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	12,5 µl
Plasmid-DNA (25 ng)	1 µl

Tabelle 26: Verwendetes Mutagenese-Programm des Thermocyclers.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec	25x
Denaturierung	98 °C	10 sec	
Primer-Annealing	57-69 °C*	30 sec	
Elongation	72 °C	3 min**	
Finale Elongation	72 °C	2 min	
Pause	4 °C	∞	

*variable und Primer-spezifische Annealingtemperaturen; **variable Dauer je nach Länge des Amplikons (30 sec/kb)

Das Produkt der Mutagenese-PCR war eine lineare unligierte Form des pGem-T-Vektors. Zur Überprüfung des PCR-Erfolges diente eine Agarosegelelektrophorese mit einem 1%igen Agarosegel und 5 µl des PCR-Produkts, sowie 0,5 µl der ursprünglich eingesetzten Plasmid-DNA als Referenz mit 10 µl Bromphenolblau und 10 µl DNA-Leiter.

Zur Rekonstruktion und Aufreinigung des amplifizierten pGem-T-Vektors wurde der PCR-Ansatz anschließend mit einem dem Mutagenese-Kit beiliegende *10x KLD Enzyme Mix* behandelt. Die freien Enden des zunächst linearen PCR-Produkts wurden mittels einer Kinase phosphoryliert und durch eine Ligase zu einem Ring ligiert. Das Restriktionsenzym DpnI diente dem Abbau des methylierten, bakteriellen Ausgangsplasmids. Der in **Tabelle 27** gezeigte Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf Eis gelagert.

Tabelle 27: Ansatz des KLD-Verdaus

Komponenten	Menge
H ₂ O dest.	3 µl
10x KLD Enzym Mix	1 µl
2x KLD Reaktions-Puffer 4	5 µl
PCR-Produkt	25 µl

Die so generierten pGem-Opt-Cas9-Vektoren wurden erneut transformiert, kultiviert, aufgereinigt und die Inserts mittels Sanger-Sequenzierung kontrolliert.

4.1.9 Erwerb von Positiv-Kontrollen zu den Cas9-Varianten

In der öffentlichen Plasmid-Datenbank *Addgene* konnte ein Plasmid ausfindig gemacht und bestellt werden, welches das Konstrukt der e1.1-Cas9 enthielt. Dieses sollte als Positiv-Kontrolle zu den eigenen erzeugten Konstrukten dienen und wird im Folgenden als Ae1.1-Cas9 bezeichnet.

4.1.10 Restriktionsverdau von Cas9-Fragmenten

Die Konstruktion der CRISPR-miniAAV-Vektoren erforderte das Klonieren der Opt-Cas9-Fragmente aus dem pGem-T- in einen miniAAV-Vektor mit wildtypischer Cas9-Sequenz. Im ersten Schritt galt es hierfür die Ausgangs- und Empfängervektoren mittels Restriktionsenzymen (RE) zu schneiden

4.1.10.1 Restriktionsverdau zur Klonierung der pGem-T-Opt-Cas9 in CRISPR-miniAAV-Vektoren

Der Verdau der vier pGem-T-Opt-Cas9-Ausgangs- und des miniAAV-WT-Cas9-Empfängervektors erfolgte mit den Restriktionsenzymen Apal und SpHI innerhalb der Cas9-Sequenz. Die Zusammensetzung der insgesamt fünf Ansätze ist in **Tabelle 28** gegeben. Vom Ansatz des miniAAVs wurde lediglich 1 µl eingesetzt und mit 5 µl A.D. auf 6 µl aufgefüllt.

Tabelle 28: Ansatz des Doppelverdaus der miniAAV-WT-Cas- und der pGem-Opt-Cas-Vektoren

Komponenten	Menge
Plasmid-DNA	6 µl
H ₂ O dest.	20 µl
10x CutSmart Puffer	3 µl
Apal	0,5 µl
SpHI	0,5 µl

4.1.10.2 Restriktionsverdau zur Klonierung der Ae1.1-Cas9 in CRISPR-miniAAV-Vektoren

Der Verdau des Addgene-Ae1.1-Cas9-Ausgangs- und des miniAAV-WT-Cas9-Empfängervektors erfolgte mit den Restriktionsenzymen AgeI und EcoRI außerhalb der Cas9-Sequenz. Die Vektoren wurden in zwei separaten Ansätzen verdaut, da unterschiedliche Massen und ein drittes Restriktionsenzym zur Fragmentierung des nicht benötigten Vektorteils erforderlich waren. Die Zusammensetzung beider Verdaue zeigt **Tabelle 29**.

Tabelle 29: Verdau des Addgene-Vektors zur Exzision der Cas9-Sequenz

Verdau <i>Addgene-</i> Vektor	Komponenten	Menge	Verdau <i>miniAAV-</i> Vektor	Komponenten	Menge
	Addgene-Vektor (3µg)	3,4 µl		miniAAV-Vektor (500ng)	0,6 µl
	H ₂ O dest.	20,6 µl		H ₂ O dest.	23,4 µl
	10x CutSmart Puffer	3 µl		10x CutSmart Puffer	3 µl
	AgeI	1,5 µl		AgeI	1 µl
	EcoRI	1,5 µl		EcoRI	1 µl
	SacII*	1,5 µl		Apal**	1 µl

*RE zur Fragmentierung des Vektorgerüsts; **RE zur Fragmentierung der Cas9-DNA-Sequenz

Die Ansätze wurden für 5 h bei 37 °C inkubiert und anschließend auf ein Agarosegel aufgetragen. Es folgte die Elution der gewünschten Fragmente mittels des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kits*.

4.1.10.3 Restriktionsverdau zur Klonierung der Guides in CRISPR-miniAAV-Vektoren

Die Ligation der sgRNA-Dimere in den miniAAV-Vektor wurde über Schnittstellen des Restriktionsenzym *BbsI* vermittelt. Ein 20 µl Ansatz wurde 45 min bei 37 °C inkubiert. Die genaue Zusammensetzung zeigt **Tabelle 30**.

Tabelle 30: Komponenten und Mengen im *BbsI*-Verdau

Komponenten	Menge
Plasmid-DNA	1 µg
H ₂ O dest.	14-16 µl
10x CutSmart Puffer	2 µl
Quick CIP (Alkalische Phosphatase)	1 µl
<i>BbsI</i>	1 µl

Die Proben wurden auf ein 0,7%iges Gel aufgetragen und die DNA-Banden aufgereinigt.

4.1.10.4 Restriktionsverdau zur Klonierung des EMX1-Fragments in den EGxxFP-Vektor

Die Ligation in den EGxxFP-Vektor erfolgte mittels der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *BamHI*. Das EMX1-Fragment wurde in einem entsprechenden Doppelverdau über Nacht bei 37 °C aus dem pGem-T-Vektor herausgeschnitten (**Tabelle 31**).

Tabelle 31: Komponenten des Restriktionsverdaus des pGem-T-Vektors mit *EcoRI* und *BamHI*

Komponenten	Menge
pGem-T-Vektor (2-3 µg)	7 µl
H ₂ O dest.	18 µl
10x CutSmart Puffer	3 µl
<i>EcoRI</i>	1 µl
<i>BamHI</i>	1 µl

Es erfolgte eine Auftrennung des 400 bp großen Restriktionsprodukts in einem 1%igen Agarosegel und eine Aufreinigung des gewünschten Fragments.

4.1.10.5 Restriktionsverdau zur Klonierung von sgRNAs in den Guide-pAAV-Vektor

Die Klonierungskassette des Vektors pAAV-U6-sgRNA-CMV-GFP wurde mit dem Enzym SAPI zur Klonierung der beiden sgRNAs 759B_C_20mer und 534_C_18mer entsprechend des oben geschilderten Prozederes verdaut.

4.1.11 Bildung und Phosphorylierung der sgRNA-Dimere

Die Klonierung der Guides erforderte die Bildung und Aktivierung von sgRNA-Dimeren mit BbsI-kompatiblen Überhängen aus entsprechenden Primerpaaren. Die Proben wurden entsprechend **Tabelle 32** angesetzt und in einem Thermocycler dem RAMP-Programm unterzogen. Der Ansatz wurde dabei zunächst 30 min bei 38 °C inkubiert, anschließend auf 95 °C erhitzt und nun sukzessiv die Temperatur alle 5 min um 5 °C reduziert wurde, bis eine Temperatur von 25 °C erreicht war. Die fertigen Proben wurden 1:200 in 199 µl A.D. verdünnt.

Tabelle 32: Zusammensetzung des Phosphorylierungsansatzes

Komponenten	Menge
F-Primer	1 µg
R-Primer	1 µl
H ₂ O dest.	6,5 µl
10x T4 PNK Ligase Puffer	1 µl
T4 PNK	0,5 µl

4.1.12 Ligation in die Expressionsvektoren

4.1.12.1 Ligation der Cas9-Fragmente in den CRISPR-miniAAV-Vektor

In zwei separaten Ansätzen wurden die Opt-Cas9-Fragmente und das Ae1.1-Cas9-Fragment in die geschnittenen miniAAV-WT-Cas9-Gerüste ligiert. Die Reaktion wurde durch die T4 Ligase vermittelt und entsprechend **Tabelle 33** angesetzt. Die Inkubation erfolgte über 24 h bei 14 °C.

Tabelle 33: Ligation der verschiedenen Cas9-Fragmente in einen mit RE-geschnittenen miniAAV-Vektor

Komponenten	Menge	Komponenten	Menge
Opt-Cas-Fragmente	8 µl	Ae1.1-Cas-Fragment	8 µl
5,6 kb miniAAV-Vektor	4 µl	3,4 kb miniAAV-Vektor	5,5 µl
H ₂ O dest.	5 µl	H ₂ O dest.	3,5 µl
10x T4 Puffer	2 µl	10x T4 Puffer	2 µl
T4 Ligase	1 µl	T4 Ligase	1 µl

4.1.12.2 Ligation der sgRNA-Dimere in den CRISPR-miniAAV-Vektor

Die Ligation erfolgte zwischen den phosphorylierten sgRNA-Dimeren in Form der 1:200 Verdünnung und den mit BbsI geschnittenen CRISPR-miniAAV-Vektoren, von denen etwa 50 ng eingesetzt werden sollte, was bei den gemessenen Konzentrationen etwa 3 µl entsprach. Der 10 µl Ansatz (**Tabelle 34**) wurde über Nacht bei Raumtemperatur belassen.

Tabelle 34: Komponenten des Ligationsansatzes zwischen sgRNA und miniAAV-Vektor

Komponenten	Menge
geschnittener CRISPR-miniAAV-Vektor	3 µl
1:200 sgRNA-Verdünnung	1 µl
2x Quickligations Puffer	5 µl
Quick Ligase	1 µl

4.1.12.3 Ligation des EMX1-Fragments in den EGxxFP-Vektor

Das Fragment konnte mit dem *T4 DNA Ligase Kit* über Nacht bei 14 °C in einen mit RE geschnittenen EGxxFP-Vektor ligiert werden.

Tabelle 35: Ligationsansatz des EMX1-Fragments in einen mit RE-geschnittenen EGxxFP-Vektor

Komponenten	Menge
EMX1-Fragment	8 µl
H ₂ O dest.	7 µl
10x T4 Ligase Puffer	2 µl
T4 Ligase	1 µl
EGxxFP-Vektor (25 ng/µl)	2 µl

4.1.13 Exonuklease-Verdau von Ligationsprodukten

Zum Abbau nicht ligierter linearer Sequenzen und zur Vermeidung ungewünschter Rekombinationsprodukte erfolgte nach Ligationen in einen miniAAV-Vektor ein Verdau mit der Exonuklease V (Exo V). Dem Ligationsansatz wurden die in **Tabelle 36** genannten Komponenten hinzugefügt und 30 min bei 37 °C inkubiert, anschließend analog zu **4.1.5** in *E. coli*-Bakterien des Stbl3-Stamms transformiert und auf LB-Platten ausgesät.

Tabelle 36: Ansatz zum Exonuklease-Verdau von Ligationsprodukten

Komponenten	Menge
Ligationsansatz	20 µl
H ₂ O dest.	3 µl
10x CutSmart Puffer	3 µl
ATP (5 mCi/ml)	3 µl
Exo V	1 µl

4.1.14 Colony-PCR

Im Rahmen der Klonierung der Opt-Cas9-Fragmente wurde der Erfolg von Ligation und Transformation mittels Colony-PCR überprüft. Von den über Nacht kultivierten LB-Platten wurden pro Probe acht Klone gepickt und in LB-Amp-Medium über 2 h bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurde stets eine Leerprobe verwendet. Für die darauffolgende PCR wurde das *GoTaq® Long Expand PCR*-Kit verwendet und die Reaktion entsprechend **Tabelle 37** angesetzt.

Tabelle 37: Zusammensetzung des Go-Taq Ansatzes für eine Colony-PCR

Komponenten	Menge
E. coli Kultur	2 µl
H ₂ O dest.	15,9 µl
5x Go-Taq-Reaktionspuffer	5 µl
dNTPs (5 mM)	0,5 µl
Primer F (10 µM)	0,75 µl
Primer R (10 µM)	0,75 µl
Go-Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl

Tabelle 38: PCR-Programm im Thermocycler für eine Colony-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	4 min	
Denaturierung	95 °C	30 sec	32x
Primer-Annealing	58 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	30 sec*	
Finale Elongation	72 °C	4 min	
Pause	10 °C	∞	

*Elongationsdauer variiert je nach Größe des zu amplifizierenden Fragments (30 sec/kb)

Der Nachweis des PCR-Produkts in der folgenden Elektrophorese eines 1,5%igen Gels bestätigte den Erfolg der Ligation und Transformation. Pro Konstrukt wurden anschließend zwei positive Klone in einer Übernachtskultur kultiviert. Analog zu **4.1.7** erfolgte nach jeder Klonierung eine abschließende Kontrolle via Sanger Sequenzierung.

4.1.15 Herstellung und Sicherung hochkonzentrierter Plasmid-DNA

Nach der Identifikation von Klonen mit fehlerfreien und korrekt ligierten CRISPR-miniAAV-Vektoren durch Sequenzierung erfolgte die Gewinnung hochkonzentrierter reiner Plasmid-DNA. Dafür wurden die entsprechenden Stbl3-Bakterienproben schrittweise in zwei Übernachtskulturen, ausgehend von einem 500 µl Aliquot, über eine 5 ml Kultur und eine anschließende 200 ml Kultur reproduziert.

4.1.15.1 Herstellung eines Glyzerin-Stocks

Zur Langzeitsicherung von Plasmid-DNA-tragenden Bakterienklonen wurden entsprechende Proben in einem Glyzerin-Stock bei -80 °C gelagert. Hierfür wurden 870 µl einer 200 ml LB-Amp-Übernachtskultur mit 170 µl 83%igem Glyzerin versetzt, welches die Zellen vor Gefrierschäden schützen sollte. Die genaue Position dieser Stocks wurde in der zugehörigen Datenbank vermerkt.

4.1.15.2 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli-Bakterien in einer MaxiPräp

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus einer 200 ml Kultur erfolgte mittels des *NucleoBond® XtraMidi-Kits* nach Herstelleranweisung. Hierbei wurden die zunächst pelletierten Stbl3-Zellen sukzessiv lysiert, aufgereinigt, eluiert und gefällt. Das resultierende DNA-Pellet ließ sich in 200 µl A.D. lösen, wurde per *NanoDrop® Spektrophotometer* vermessen und auf eine Konzentration von rund 1000 ng/µl verdünnt. Die Proben konnten bis zur weiteren Verwertung bei -20 °C gelagert werden. Das Produkt der Cas9- und Guide-Klonierung waren fertige CRISPR-miniAAV-Vektoren. Eine vollständige Liste zeigt **Tabelle 7**.

4.2 Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in einem *Binder CO₂ Inkubator* bei konstanten 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 %. Alle Zellen wurden mit Kompletmedium behandelt, das bei 4 °C gelagert und vor Anwendung in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt wurde. Vor Versuchen oder Passagieren der Zellen erfolgte stets eine Kontrolle der Zellkonfluenz unter dem Lichtmikroskop.

4.2.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen

Für den Großteil der Versuche wurden eukaryontische HEK293T-Zellen herangezogen. Die Zellen wurden standardmäßig in DMEM-Medium in 10 cm Schalen gehalten und je nach Wachstumsverhalten und Konfluenz wöchentlich mehrmals gesplittet. Hierbei wurde der Zellrasen mit dem bestehenden Medium abgespült und in einer Standzentrifuge pelletiert, wobei das überstehende Medium verworfen wurde. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und mit 12 ml Gesamtvolumen auf eine variierende Anzahl Platten ausgesät, je nach Art des Versuchs. 24 h vor jeder Transfektion erfolgte eigens eine Passagierung auf eine zuvor mit Polylysin beschichtete Platte, um am Folgetag eine optimale Konfluenz von 70-80 % zu erreichen. Eine Polylysinbeschichtung erforderte die Inkubation der Schale mit Polylysin-Lösung über mindestens 2 h und anschließendes Waschen mit DPBS-Puffer. Zur Ernte von

beschichteten Platten bedurfte es später eines sukzessiven Andauens der Zellen mit EDTA- und Trypsin-Lösung über jeweils 7 min bei 37 °C.

4.2.2 Kultivierung von Fibroblasten

Für ausgewählte Versuche wurde eine Fibroblasten-Zelllinie eines BVMD-Patienten in Kultur gehalten. Ihre Kultivierung erfolgte analog zu den HEK293T-Zellen mit der Ausnahme, dass die Fibroblastenzellen auch ohne Polylysin-Beschichtung einer Trypsin-Behandlung bedurften, bevor sich der Zellrasen von der Platte lösen ließ.

4.2.3 Kultivierung von hiPSC-entstammenden RPE-Zellen

Die Kultivierung von Zelllinien dreier BVMD-Patienten erfolgte in speziellem Krowne-Ohne-Medium (KØ) mit erhöhter Vorsicht bei der Handhabung. Sie wurden vor Versuchen auf Fibronectin-beschichteten Platten ausgesät und von diesen durch das Andauen mit *Gibco™ TrypLE™ Express Enzyme* über 7 min bei 37 °C wieder gelöst.

4.3 Zell-Assays

4.3.1 Transfektion von Zellen

Zur Transfektion von eukaryontischen Zellen wurde die chemische Kalzium-Phosphat-Methode herangezogen. Hierbei lagert sich ein zuvor gebildetes Präzipitat aus Calcium-Phosphat-Kristallen und DNA an die Zelloberfläche an und wird anschließend internalisiert. Zuvor induzierter Zellstress erhöht dabei die Effizienz (Robert E. Kingston, Claudia A. Chen, John K. Rose). Der Standard-Transfektionsansatz setzte sich wie folgt zusammen (**Tabelle 39**):

Tabelle 39 Zusammensetzung eines 500 µl Standard-Transfektionsansatzes einer 6-Well-Schale

Komponenten	Menge
Plasmid-DNA	2-4 µg
Calciumchlorid (2 M)	31 µl
2x HBSS	250 µl
H ₂ O dest.	

4.3.1.1 Transfektion für den HEK293T-EGFP-Assay

HEK293T-Zellen wurden am Vortag auf mit Polylysin beschichtete 6-Well-Platten ausgesät, damit sie eine Konfluenz von 70-80 % zum Transfektionszeitpunkt erreichten. Im ersten Schritt erfolgte ein Stressen der Zellen, indem die Zellen mit einem Ansatz aus HEK293T-Medium und 0,1 M Chloroquin versetzt und über 90 min bei 37 °C inkubiert wurden. Es folgte die

Zusammenstellung des Transfektionsansatzes (**Tabelle 40**), der entsprechend der Art des Assays und der Plattengröße variieren konnte.

Tabelle 40: Zusammensetzung des Transfektionsansatzes für einen HEK293T-EGFP-Assay

Komponenten	Menge
EGxxFP-Vektor (1,5 µg)	1-3 µl
CRISPR-Vektor (miniAAV/px) (1,5 µg)	1-3 µl
H ₂ O dest.	215 µl
Calciumchlorid (2 M)	31 µl
2x HBSS	250 µl

Zuletzt erfolgte die Zugabe der 2x HBSS-Lösung, die schließlich zur Bildung von transfektionsfähigen DNA-Phosphat-Komplexen führte. Dies wurde so abgestimmt, dass die erforderliche Inkubationszeit von 25 min auf das Ende der 90minütigen Chloroquin-Inkubation fiel. Den Zellen wurde der Chloroquin-Ansatz entnommen und frisches Medium zugeführt, ehe der Transfektionsansatz den Zellen langsam zugetropft werden konnte. Es folgte eine Inkubation über 24 h und ein anschließender Mediumwechsel.

Zum Messen wurden die Zellen nach 48 h auf Polylysin-beschichtete schwarze 96-Well-Platten umgesiedelt. Der Zellrasen wurde hierzu zunächst mit DPBS-Lösung gewaschen und sukzessive mit EDTA und 1x Trypsin jeweils 7 min bei 37 °C angedaut. Im Anschluss waren ein Ernten und erneutes Aussäen der Zellen möglich. Der Erfolg einer Transfektion und der CRISPR-Vektor-Funktion wurde nach 72 h mit mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen festgestellt und dokumentiert. Eine anschließende Quantifikation der Signale erfolgte über einen *Spark® Multimode Microplate Reader*. Zur Normalisierung des Signals auf die Zellzahl wurden die Zellkerne zuvor mittels Hoechst-Färbung markiert. Die Zellen wurden einem entsprechenden 0,05 M Ansatz aus Medium und Hoechst über 7 min bei 37 °C ausgesetzt. Das Ergebnis der Quantifikation war ein Datensatz der Fluoreszenzintensität aus drei Messzyklen, der anschließend auf das Hoechst-Signal normalisiert und pro Probe gemittelt werden konnte. Die so ermittelten Signalwerte wurden anschließend relativ zur Messung einer unbehandelten Zellprobe (Leer-Probe) als Referenz betrachtet.

4.3.1.2 Transfektion für die Target Sequenzierung

Für die Guides 759B_C_20mer und 534_C_18mer sollte die CRISPR-Aktivität am genomischen ON-Target untersucht werden. Der initiale Ablauf war dabei analog zu dem der HEK293T-EGFP-Assays. Für die Transfektionen mit den Vektoren miniAAV und px wurden HEK293T-

Zellen in einem 1:6 Verhältnis mit 3 µg Plasmid-DNA transfiziert, davon 0,5 µg eines pmaxGFP-Vektors und jeweils 2,5 µg des entsprechenden CRISPR-Vektors in einem Transfektionsansatz von insgesamt 500 µl pro 6-Well-Schale. Für Transfektionen mit dem dualen CRISPR-pAAV-Vektorsystem wurden jeweils 1,5 µg des pAAV-RSV-SpCas9-Vektors und des pAAV-U6-sgRNA-CMV-GFP-Vektors eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 72 h erfolgte die Ernte der Zellen mittels EDTA und Trypsin. Das Zellpellet wurde nun mit 1x PBS gewaschen und in ein FACS-Röhrchen gefiltert, um anschließend in einem *CyFlow Space* FACS-Gerät entsprechend der GFP-Fluoreszenz gesortet zu werden. Die Anzahl der gewonnenen Zellen variierte zwischen 300.000 und 1×10^6 .

4.3.1.3 Transfektion zur Viruspartikelbildung

Dieser Assay galt der Produktion von Viruspartikeln in speziellen HEK293T-AAV-Zellen zur anschließenden Transduktion. HEK293T-AAV-Zellen wurden dabei anfänglich mit insgesamt 6 - 9 mol Plasmid-DNA transfiziert. Diese bestand zum einen aus einem Effektor-Plasmid, hier ein AAV-GFP-Vektor zur fluoreszenzgestützten Transduktionskontrolle. Zum anderen waren ein oder zwei Helfer-Plasmide (pDGM6; pAdDelta+pAAV2/2) nötig zur Formung der Viruspartikel. Die Transfektion der Zellen erfolgte in einer 10 cm Schale mit einem 1 ml Ansatz (**Tabelle 41**).

Tabelle 41: Zusammensetzung eines Transfektionsansatzes für einen Transduktions-Assay

Komponenten	Menge
AAV-GFP-Vektor (3 mol, 10 µg)	9-12 µl
Helferplasmid(e) (3 mol)	10-37 µl
Calciumchlorid (2 M)	62 µl
2x HBSS	500 µl
H ₂ O dest.	

Das Medium wurde anschließend täglich gewechselt und die Zellen nach 72 h geerntet, pelletiert und in frischem Medium resuspendiert. Die anschließende Isolation der Viruspartikel aus den Zellen geschah über sukzessives Gefrieren bei -20 °C, Auftauen bei 37 °C und Vortexen der Zellprobe in drei Zyklen mit je 20 min, was dem Aufbrechen der Zellen diente. Die Zellreste wurden pelletiert und der Überstand mit den freien Viren abgenommen und zu einer fertigen Probe steril-filtriert.

4.3.2 Transduktion von Zellen

Mittels des AAV-GFP-Vektors sollte fluoreszenzgestützt die generelle Transduktions- und Expressionseffizienz der zuvor generierten AA-Viren in HEK293T und hiPSC-RPE bzw. Fibroblasten-Zellen untersucht werden. Transduziert wurde ein 3 ml Ansatz (**Tabelle 42**) pro 6-Well-Schale. Die Proben wurden daraufhin über Nacht inkubiert, wobei das ergänzte Polybrene durch die Neutralisation negativer Ladungen zwischen Virus und Zellmembran das Andocken der Partikel erleichtern sollte. Das Medium wurde anschließend täglich gewechselt und die Zellen abhängig von ihrer Konfluenz nach einer variablen Anzahl von Tagen gesplittet.

Tabelle 42: Zusammensetzung eines Transduktionsansatzes

Komponenten	Menge
Virus-Lösung	1 ml
Polybrene Transfection Reagent (0,8 µl/ml)	2,4 µl
Penicillin/Streptomycin	30 µl
Medium (HEK293T/ KØ)	2 ml

Im Rahmen des Fluoreszenz-Assays erfolgte eine erste Transduktion in HEK293T-, hiPSC-RPE- und Fibroblasten-Zellen mit den Helferplasmiden pAdDelta und pAAV2/2. Hierbei wurde täglich das GFP-Signal unter dem *Invertierten Routine-Mikroskop ECLIPSE Ts2* beurteilt. Die Zellen wurden nach 5 Tagen ein zweites Mal transduziert, nach 9 Tagen gesplittet und insgesamt über 18 Tage beobachtet.

In einem zweiten Versuch wurde anstatt der Helferplasmide pAdDelta und pAAV2/2 das pDGM6-Helferplasmid verwendet, dessen Funktion mit den beiden vorherigen Helferplasmiden in HEK293T- und hiPSC-RPE-Zellen verglichen wurde. Die Inkubationszeit betrug hier 7 Tage.

4.3.2.1 Duale Transduktion

Das duale Vektorsystem mit separierten CRISPR/Cas9-Komponenten wurde für die 759- und 534-Guides zusätzlich in einem Transduktions-Assay an HEK293T-Zellen getestet. Die Viruspartikelbildung erfolgte mit Hilfe des Helferplasmids pDGM6 in 4x 10 cm Schalen, zwei Schalen mit dem pAAV-RSV-SpCas9- und jeweils eine Schale mit einem pAAV-U6-sgRNA-CMV-GFP-Vektor mit anschließender Aufreinigung zu vier Viruslösungen. Die Ziel-HEK293T-Zellen im 6-Well-Format wurden mit jeweils 1 ml Viruslösung des pAAV-SpCas9- und pAAV-sgRNA-Vektors versetzt und die Transduktion mittels Spinfektion gefördert. Hierbei wurden die 6-Well-Platten für 90 min bei 21.000 rpm. und Raumtemperatur zentrifugiert und der

Transduktionsansatz anschließend durch Medium ersetzt, welches nun täglich gewechselt wurde. Nach 72 h Inkubation erfolgte ein FACS nach dem GFP-Signal und eine Target Sequenzierung des ON-Targets.

4.4 Target Sequenzierung: Evaluation der CRISPR-Effizienz

Zur Beurteilung der Effizienz der CRISPR-Vektoren miniAAV, px und des dualen Systems war schließlich eine gezielte Sequenzierung von SNP-assoziierten ON-Targets im *BEST1*-Lokus der transfizierten oder transduzierten HEK293T-Zellen notwendig.

4.4.1 Präparation von Plasmid-DNA aus HEK293T-Zellen

Mit CRISPR-Vektoren transfizierte HEK293T-Zellen aus dem Versuch **4.3.1.2** wurden mit dem *Nucleospin® Tissue*-Kit entsprechend der Betriebsanleitung behandelt und so die zelluläre genomische DNA isoliert und aufgereinigt.

4.4.2 Go-Taq-PCR und Klonierung in E. coli-Bakterien

Zur selektiven Amplifizierung von kurzen DNA-Fragmenten um einen CRISPR-Lokus herum wurden entsprechende Primer-Paare verwendet, die in **Tabelle 4** gelistet sind. Die PCR-Reaktion wurde analog zu **4.1.1** durchgeführt, das PCR-Produkt in einem Gel aufgetrennt und die entsprechende Bande aufgereinigt. Es folgte die Ligation des Fragments in einen pGem-T-Vektor entsprechend zu **4.1.4** und die Transformation in DH5 α -Zellen. Diese wurden in einer Blau-Weiß-Selektion auf LB-Amp-Platten ausgestrichen.

4.4.3 Colony-PCR von 47 Klonen

Zur quantitativen Bestimmung der CRISPR-Effizienz wurden pro Probe 47 Klone von der LB-Amp-Platte gepickt und das pGem-T-Fragment in einer Colony-PCR nach dem Schema **4.1.14** amplifiziert. Es folgte eine PCR-Kontrolle in einem Agarosegel.

4.4.4 Exonuklease I (Exo) und alkalische antarktische Phosphatase (AAP)-Verdau

Bevor die amplifizierten Fragmente in den PCR-Ansätzen sequenziert werden konnten, mussten zunächst die PCR-Primer neutralisiert werden. Es wurden jeweils 4 μ l des in **Tabelle 43** gezeigten Reaktionsansatzes hinzugegeben und die Proben in einem Thermocycler jeweils 15 min zunächst bei 37 °C und anschließend 80 °C inkubiert.

Tabelle 43: Reaktionsansatz des Exo-AAP-Verdaus für eine Probe

Komponenten	Menge
H ₂ O dest.	3,65 µl
Exo I	0,1 µl
AAP	0,25 µl

4.4.5 Sanger-Sequenzierung

Die Sequenzierung der 47 Klone lief analog zu **4.1.7** ab. Als Sequenzierungs-Primer diente der jeweilige F-Primer aus der vorherigen Colony-PCR. Die so generierten Sequenzen wurden in *SnapGene* auf CRISPR-Ereignisse untersucht.

4.5 Western Blot

Mittels der Western Blot-Methode sollte die Expressionsrate der verschiedenen Cas9-Nuklease-Konstrukte in transfizierten HEK293T-Zellen untersucht werden. Zur Probengewinnung wurden transfizierte HEK293T-Zellen nach 72 h geerntet und pelletiert, um anschließend in 400 µl einer 1x Lämmli-Pufferlösung resuspendiert und lysiert zu werden. Eine Lagerung erfolgte bei -20 °C. Vor erstmaliger Benutzung wurden die Proben in einem *Ultraschallgerät Vibra Cell VCX400* sonifiziert, ein notwendiger Schritt zum Aufbrechen der DNA und Reduzieren der Proteine, worauf eine kurze Phase der Erhitzung über eine Minute in einem Heizblock mit 94 °C folgte, unmittelbar vor dem Laden in die Geltaschen.

Als Trägermatrix für die Protein-Elektrophorese dienten SDS-Gele, die sukzessiv aus einem Trenngel und einem Sammelgel gegossen wurden. Das Trenngel hatte, angepasst auf die Größe der Cas9-Nuklease, eine Konzentration von 8 % und pro Gel ein Volumen von 10 ml, wovon 7 ml als Gel gegossen wurden. Die Komponenten sind in **Tabelle 44** aufgelistet.

Tabelle 44: Komponenten eines 8%igen SDS-Gels

Komponenten	Menge
H ₂ O dest.	4,2 ml
1M Tris pH 8,8	3,8 ml
Acrylamid-Lösung 40 %	2,0 ml
20 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl
Temed	20 µl

Nach Aushärten des Trenngels wurde es mit dem Sammelgel (Konzentration 3 %, Volumen 5 ml, **Tabelle 45**) überschichtet, welches die Taschen zum Platzieren der Trennlösung enthielt.

Tabelle 45: Komponenten eines 3%igen SDS-Gels

Komponenten	Menge
H ₂ O dest.	1,7 ml
1M Tris ph 6,8	2,8 ml
Acrylamid-Lösung 40 %	0,6 ml
20 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
Temed	10 µl

Das fertige Gel wurde in eine Western Blot-Kammer eingespannt und mit 1x SDS-Puffer umspült. Beim Laden wurde jedes Gel stets mit 3 µl eines Proteinstandards versehen. Dieser schlossen sich sukzessive die verschiedenen und kurz zuvor erhitzten Proben an, von denen jeweils 30 µl in die Taschen geladen wurden. Vollständig aufgefüllte Gelkammern wurden an ein Netzgerät angeschlossen und initial 50 min lang bei 50 V belassen, was dem Übertritt der Proben vom Sammelgel in das Trenngel diente. Die eigentliche Auftrennung der Proteinspezies erfolgte bei 150 V über 50 min. Es folgte das Übertragen der aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Trägermembran mittels *Blotting*. Hierzu wurden entsprechend auf die Gele zugeschnittene Nylonmembranen zunächst kurz in 100 % Methanol aktiviert und anschließend in gekühltem *Towbin*-Puffer eingelegt, zusammen mit den ebenfalls erforderlichen *Whatman*-Papieren und den ausgespannten SDS-Gelen. Alle drei Komponenten wurden luftblasenfrei in einen *Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell* geschichtet mit einem *Whatman*-Papier als Unterlage, der Trägermembran, dem Gel und abschließend einem *Whatman*-Papier. An einem Netzgerät wurde für den Transfer der Proteine auf die Trägermembran eine Spannung von 24 V über 40 min angelegt.

Die Detektion der Proteinspezies auf der Trägermembran erfolgte mittels Immunofärbung. Zum Blocken freier Bindungsstellen wurden geblottete Membranen zunächst über 30-60 min mit einer 5 % 1x TBS-Milchpulver-Suspension auf einem Rollenmischer inkubiert und danach mit 1x TBS-Puffer gewaschen. Die Markierung der Proteinbande erfolgte mittels eines Primär-Antikörpers, dessen Lösung entsprechend **Tabelle 46** angesetzt wurde.

Tabelle 46: 5ml Ansatz des Primärantikörpers gegen die Cas9-Nuklease nach Western Blot

Komponenten	Menge
Odyssey® Blocking Buffer (TBS)	250 µl
1x TBS	4,75 ml
Antikörper: α-Cas9 (mouse) (1:2500)	2 µl
Natriumazid (2%)	50 µl

Trägermembranen wurden mit mindestens 2 ml dieser Lösung versetzt und bei 4 °C über Nacht auf einem Rollenmischer belassen. Durch das Beimengen des bakteriziden Natriumazids konnte die Antikörper-Lösung am Folgetag entnommen und weiter bei 4°C aufgehoben werden, während die Membranen einem Waschschrift mit 1x TBS unterzogen wurden. Nach demselben Schema wurde neben der Cas9-Nuklease ebenfalls das *Housekeeper*-Protein β -Tubulin als Referenz angefärbt. Dessen Primär-Antikörperansatz zeigt **Tabelle 47**.

Tabelle 47: 5ml Ansatz des Primärantikörpers gegen das β -Tubulin nach Western Blot

Komponenten	Menge
Odyssey® Blocking Buffer (TBS)	250 μ l
1x TBS	4,75 ml
Antikörper: β -Tubulin (mouse) (1:10.000)	0,5 μ l
Natriumazid	50 μ l

Abschließend erfolgte die Markierung der maustypischen Primärantikörper mit einem Spezies-gerichteten sekundären Antikörper mit detektierbarer Fluoreszenzeigenschaft. Die Membran wurde hierfür erneut gewaschen, mit einem entsprechenden Ansatz (**Tabelle 48**) versetzt und über Nacht inkubiert.

Tabelle 48: 10 ml Ansatz des 2°AK gegen maus-typischen 1°AK nach Western Blot

Komponenten	Menge
Odyssey® Blocking Buffer (TBS)	500 μ l
1x TBS	9,5 ml
Antikörper: α - Maus (rot) (1:2500)	4 μ l

Am Folgetag konnte die Membran nach obligatorischem Waschen für 2 h zwischen *Whatman*-Papier getrocknet und anschließend ausgewertet werden. In einem *Odyssey® FC-Scanner* wurde die rote Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 770 nm der Sekundärantikörper erfasst und mittels *Image Studio* ein Bandenmuster der mit dem Primärantikörper versehenen Proteinbanden erstellt. Die Intensität der Banden wurde anschließend über *Image Studio* quantifiziert und relativ zu einer Referenzprobe betrachtet.

5 Vorarbeiten

Ein mögliches Therapiekonzept für die BVMD basiert auf dem selektiven Ausschalten des mutierten *BEST1*-Allels, wobei eine Differenzierung zwischen mutiertem und wildtypischem Allel durch heterozygot auftretende SNPs im *BEST1*-Haplotyp erfolgen soll. Dies erforderte die Identifikation von Polymorphismen, die mittels dem CRISPR/Cas9-System adressiert werden können und die experimentelle *in vitro*-Testung entsprechend generierter sgRNAs. Darüber hinaus soll der anschließende Gen-Transport der CRISPR-Bestandteile in die jeweilige Zielzelle über einen AAV-Vektor erfolgen. Dessen Transportkapazität muss allerdings optimiert werden, wenn ein einziger Vektor die Sequenzen beider CRISPR/Cas-Komponenten, der Cas9-Nuklease und der Guide-RNA, beinhalten soll.

In diesen Bereichen wurden am Institut für Humangenetik Regensburg bereits grundlegende Vorarbeiten geleistet, welche im Folgenden erläutert werden sollen.

5.1 Bioinformatische Vorarbeit: SNP-Analyse

Die SNP-Analyse wurde auf Grundlage der Daten aus dem 1.000 Genom Projekt durchgeführt, in der die Genomsequenzen von über 2500 Individuen aus 26 Populationen hinterlegt wurden. Dies führte zur Identifikation von über 84,7 Millionen Polymorphismen und der Möglichkeit Haplotypinformationen zu erhalten. Im Speziellen finden sich 1.191 SNPs im *BEST1*-Genort. Aus diesem Pool wurden anhand verschiedener Kriterien SNPs herausgefiltert, welche als Ziel (Targets) für einen CRISPR/Cas9-vermittelten Therapieansatz infrage kommen könnten.

Kriterien für die Eignung eines SNPs zur CRISPR/Cas Editierung am *BEST1*-Genort ist zunächst eine Frequenz in der Bevölkerung von über 5 %, um eine gewisse Vereinheitlichung der Therapie zu gewährleisten, um so möglichst viele Patienten mit möglichst wenigen sgRNAs behandeln zu können. Dieser Schritt reduzierte das Spektrum auf 69 SNPs.

Das nun folgende Design entsprechender sgRNAs für diese SNPs musste weiteren Bedingungen genügen:

- Ein SNP durfte nicht in repetitiven Sequenzen (*repeats*) liegen.
- Ein SNP sollte in der *Seed*-Sequenz und damit nicht mehr als 10 Basenpaare distal der PAM-Sequenz liegen, da diese Region essenziell für die Stabilität und Spezifität der Bindung der sgRNA ist (Sander und Joung 2014).

- Ein SNP durfte nicht auf die Position der variablen *N*-Base der NGG-PAM-Sequenz fallen. Diese Stelle ist unspezifisch durch jede der 4 Basen besetzbar und würde den Differenzierungscharakter des Polymorphismus aufheben.
- Die Effizienz und Spezifität korrespondierender sgRNAs von 20 bp Länge wurden mittels des *Optimized CRISPR Design-Tools* simuliert. Der *ON-target-score* (Effizienz) einer Guide-RNA sollte >50 % betragen und einen möglichst niedrigen *OFF-target-score* (Spezifität) aufweisen.

Am Ende dieses Filterprozesses erfüllten 22 SNPs die geforderten Bedingungen und qualifizierten sich für das Designen entsprechender Guide-RNAs (**Abbildung 4**). Diese SNPs lagen sowohl intronisch als auch exonisch und zunächst war eine Testung von Guides für jeden dieser SNPs vorgesehen, da in einem ersten Ansatz der Allel-spezifische Knock-down durch die Exzidierung eines ganzen Genfragments erfolgen sollte. Dabei könnte man die intronischen SNPs hinzuziehen und aus dem gesamten Pool der 22 SNPs schöpfen, es wären jedoch gleich zwei sgRNAs mit ähnlich guter Effizienz erforderlich und eine vorgestellte Analyse des SNP-spezifischen Haplotyps jedes Patienten. In dieser Arbeit wurde der Fokus allein auf exonische SNPs gelegt, da hier bereits der Einsatz einer einzigen spezifischen sgRNA zur Induktion CRISPR-vermittelter *Indels* und einer Leserasterverschiebung ausreichen würde. SNP-Analyse und SNP-Auswahl wurden dadurch vereinfacht.

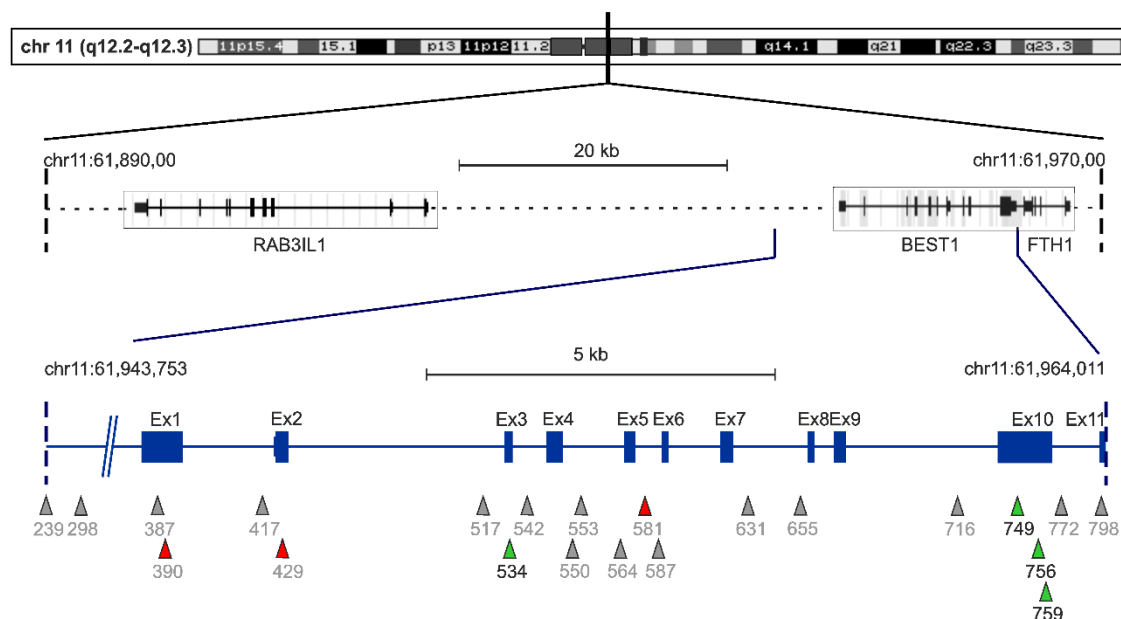


Abbildung 4: Ausschnitt des *BEST-1* Lokus mit den 22 SNPs aus der Analyse

Oberer Graph: Schema des Chromosom 11; Lokalisation des *BEST1*-Gens auf dem langen Arm des Chromosoms; Mittlerer Graph: Lokalisation des *BEST1*-Gens relativ zu den benachbarten Genen; Unterer Graph: Ausschnitt der *BEST1*-Genregion mit Exons und Introns. Rote Dreiecke: In Vorarbeit getestete SNPs; Grüne Dreiecke: In dieser Arbeit adressierte SNPs; Chromosom 11; Gene: *RAB31L1*, *BEST1*, *FTH1*; Ex: Exon 1-11

5.2 Experimentelle Vorarbeit: Evaluation der Guide-Funktion

Die Effizienz der Guides sollte zunächst in einem Transfektions-Assay in HEK293T-Zellen getestet werden (HEK293T-EGFP-Assay). Hierzu wurde die sgRNA in einen px-mCherry-Vektor kloniert, der zusätzlich die Sequenzen für die wildtypische (WT) SpCas9 und das Reportergen mCherry enthält. Ein zweiter Vektor enthielt die Zielsequenz, die als unterbrechende Komponente inmitten der Sequenzkassette des EGFP-Proteins gelegen war. Durch Co-Transfektion in HEK293T-Zellen und Expression des CRISPR/Cas9-Systems, sollte die Zielsequenz im EGxxFP-Vektor editiert, die EGFP-Kassette durch homologe Reparatur rekombiniert und das EGFP-Protein in den Zellen exprimiert werden. Die Fluoreszenzintensität der Proben gibt somit quantitativ die Expressionsrate und Effizienz der CRISPR-Funktion wieder. Für beide Varianten eines SNPs wurde jeweils ein EGxxFP-Zielvektor erstellt und in zwei separaten Proben mit der sgRNA für eine der Varianten co-transfiziert. Die Effizienz, bzw. ON-Target-Aktivität ergab sich aus den Proben, in denen die SNP-Varianten der sgRNA mit der Zielsequenz des EGxxFP-Vektors kompatibel waren. Die Spezifität, bzw. *OFF-target*-Aktivität wurde in Proben erhoben mit dem EGxxFP-Vektor für die zweite nicht kompatible SNP-Variante.

Von den 22 geeigneten SNPs wurden für die SNPs 390, 429, 534, 581, 749, 756, 759 zunächst Guides mit der Standardlänge von 20 bp generiert und für beide Allel-Varianten getestet. Im nächsten Schritt erfolgten Versuchsreihen mit modifizierten sgRNAs, mit dem Ziel insbesondere die Spezifität des CRISPR/Cas9-Systems zu verbessern, wobei zwei Ansätze verfolgt wurden.

- Trunkierung: Die SNP-spezifischen Guides wurden am PAM-fernen 5'-Ende schrittweise bis auf eine Länge von 17 bp verkürzt, womit Basen-*Mismatches* stärker ins Gewicht fallen und fehlerhafte Bindungen reduziert werden (Fu et al. 2014b).
- Basenveränderung: Es wurden gezielt Punktmutationen in der sgRNA vorgenommen, sodass eine Bindung an die Zielsequenz weiter möglich, aber eine fehlerhafte Bindung an eine Nichtzielsequenz durch ein bereits vorhandenes *Mismatch* erschwert war.

In diesen HEK293T-EGFP-Assays konnten anhand der jeweiligen Fluoreszenzintensität die Effizienz und Spezifität der Guides und deren Modifikationen grob bewertet und die Guides untereinander verglichen werden. Für die Guides 749_A_20mer, 756_C_20mer und

759_C_20mer ergaben sich dabei verglichen mit der ON-Target-Aktivität jeweils auch hohe Aktivitäten für das korrespondierende OFF-Target-Allel und damit eine schlechte Spezifität (**Abbildung 5**). Bei dem SNP 756 lag der OFF-Target-Aktivität sogar über der des ON-Targets. Dies macht die Guides zu geeigneten Kandidaten für den in dieser Arbeit angedachten alternativen Ansatz zur Optimierung des CRISPR/Cas9-Systems. Ziel war es im Vergleich zu diesen Ausgangsdaten eine Verbesserung der Spezifität bei gleichzeitigem Erhalt der Effizienz mittels Sequenzmodifikationen der Cas9 Nuklease zu erreichen.

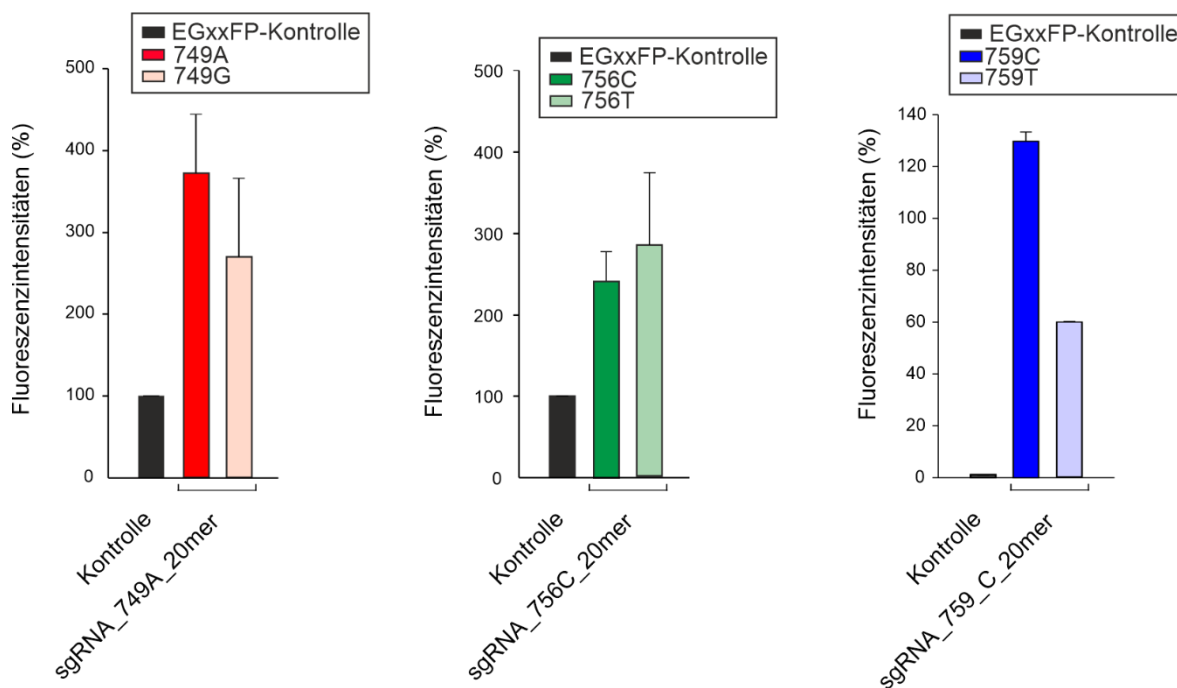


Abbildung 5: HEK293T-EGFP-Assays der Guides für SNP 749, 756 und 759

In Vorarbeit wurden bereits HEK293T-EGFP-Assays für die Guides der SNPs 749, 756 und 759 vollzogen. Diese Guides hatten dabei noch die Standardlänge von 20 bp und wurden zusammen mit der wildtypischen SpCas9-Nuklease in einem px-Vektor getestet. Der Assay fand in HEK293T-Zellen statt. Anhand der ON-Target- (dunkler Farbton) und Off-Target- (heller Farbton) Aktivität sind Effizienz und Spezifität abzulesen. Die hohe Off-Target-Aktivität der 3 dargestellten Guides zeugt von einer schlechten Spezifität und soll in dieser Arbeit verbessert werden.

Im Rahmen früherer Arbeiten erfolgten schließlich Tests vielversprechender Guide-RNAs in primären Fibroblasten-Zelllinien von BVMD-Patienten. Diese wurden mit dem CRISPR-Vektor transfiziert, 72 Stunden inkubiert und mehrere Klone am entsprechend adressierten SNP im *BEST1*-Lokus sequenziert. Gemessen an editierten und nicht-editierten Zellen konnte so eine Effizienz-Ratio erstellt werden.

Die Fibroblasten-Zellen wurden aus Hautstanzen von BVMD-Patienten gewonnen. Die Zellen wurden für die geplanten Experimente nach einem etablierten Protokoll in induzierte pluripotente Stammzellen umgewandelt und in retinale Pigmentepithelzellen differenziert.

5.3 Experimentelle Vorarbeit: Optimierung des AAV-Vektors

In den Vorexperimenten war das CRISPR/Cas9-System stets in px-Vektoren getestet worden. Diese nicht-virale Vektoren wurden als *All-in-one*-Vektoren mit starken Promotoren für die beiden benötigten CRISPR-Komponenten verwendet. Für die therapeutische Intervention ist allerdings die Verwendung von AAV-Vektoren vorgesehen, die den aktuellen Standard für eine Gentherapie in eukaryontische Zellen darstellen (Wang et al. 2019). Die Transportkapazität ist dabei auf rund 4,7 kb limitiert und musste daher für die geplanten Insertgrößen optimiert werden, um die Sequenzen der 4,2 kb großen Cas9-Nuklease und der 2,8 kb großen sgRNA-Expressionskassette gleichzeitig tragen zu können. Dies wurde durch die Verkürzung der Expressions-Promotoren beider CRISPR-Bestandteile erreicht, in Form eines 159 bp miniCMV-Promotors für die Cas9 und eines 99 bp shortU6-Promotors für die sgRNA (**Abbildung 6**). Entsprechende Modifikationen und deren Wirkung waren in der Literatur bereits beschrieben (Senís et al. 2014) und konnten in internen Versuchen reproduziert werden. In vergleichenden Experimenten zwischen diesem *All-in-one*-miniAAV-Vektor und einem dualen AAV-Transfektionssystem mit den Originalpromotoren wurde ein Erhalt der CRISPR-Funktion nachgewiesen.

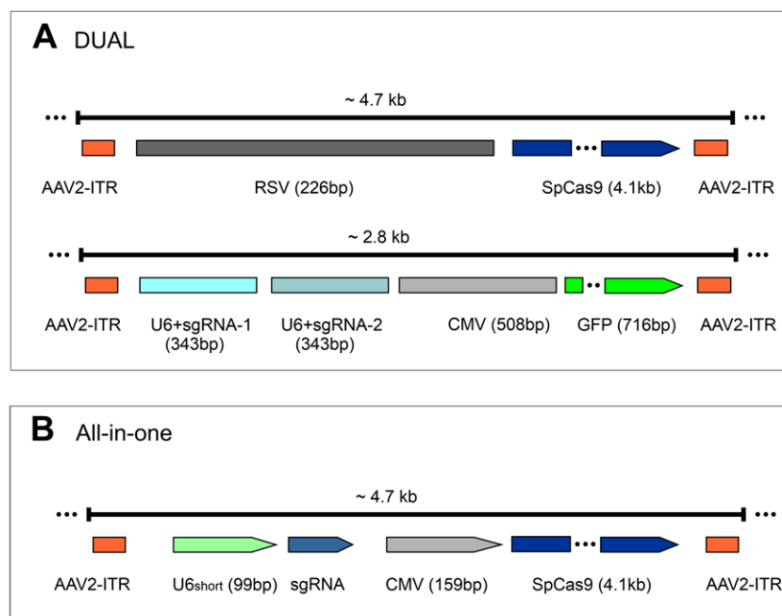


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Konstruktion des *All-in-one*-miniAAV-Vektors

A: Duales Transfektionsschema mit zwei AAV-Vektoren, jeweils einer für die Cas9-Nuklease-Sequenz und die sgRNA und deren Promotoren in Originalform.

B: *All-in-one*-miniAAV-Vektor mit beiden CRISPR-Komponenten, sgRNA und Cas9-Nuklease-Sequenz mit den verkürzten Promotoren.

6 Ergebnisse

6.1 Mutagenese der Cas9-Sequenz

Zu Beginn dieser Doktorarbeit erfolgte die Optimierung der SpCas9 und die Generierung der verschiedenen Varianten des Enzyms in Anlehnung an die Publikationen von Kleinstiver et al. (2016) und Slaymaker et al. (2016), über den spezifischen Austausch einzelner Aminosäuren (AS) jeweils durch die Aminosäure Alanin. Hierbei wurden mittels Mutagenese und ausgehend von der Sequenz der wildtypischen Cas9-Sequenz (WT-Cas) die ersten beiden Basen der entsprechenden Codons durch die Basenfolge GC substituiert (**Abbildung 7**).

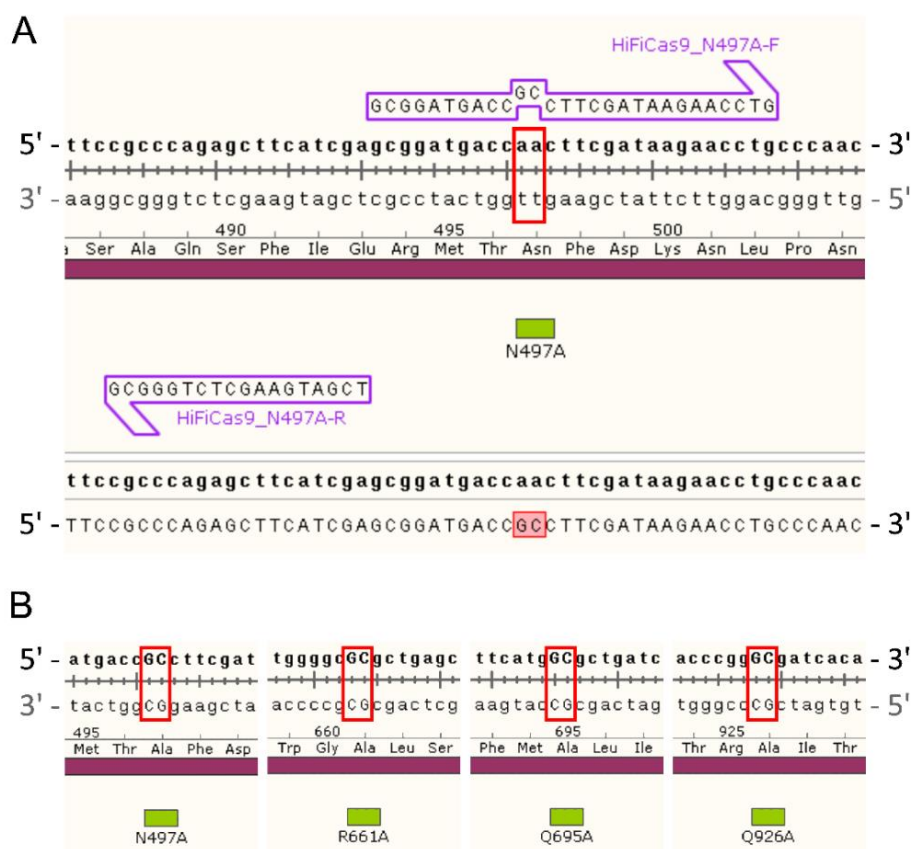


Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung der Mutagenesen für das Konstrukt der HiFi-Cas. Roter Rahmen in A und B: Markierung der ersten beiden Basen des Codons der zu substituierender Aminosäure.

- A:** Wildtypische Cas9-Sequenz mit Mutagenese-Primern und vergleichend angelegte Mutagenese-Sequenz. Die Mutagenese-Primer bestanden aus einem langen F-Primer, der die gewünschte Basensubstitution zentral als *Mismatch* trug und einem kürzeren R-Primer. Beiden waren End-zu-End angelegt und generierten ein lineares PCR-Produkt. Dieses wurde sequenziert und vergleichend an die Original-Sequenz angelegt, sodass sich bei erfolgreicher Mutagenese der entsprechende Basenaustausch in *SnapGene* als *Mismatch* zeigte.
- B:** Darstellung aller sukzessiv eingefügter Mutationen für die HiFi-Cas9 Variante. Zur Generierung der HiFi-Cas9 mussten vier Aminosäure-Substitutionen vorgenommen werden. Die entsprechenden Mutagenesen wurden ausgehend von der wildtypischen Cas9-Sequenz sukzessiv eingefügt. Eine Kontrolle mittels Sequenzierung erfolgte dabei nach jedem einzelnen Mutagenese-Schritt.

Die Mutagenese wurde wie zuvor beschrieben mit speziellen Primern des *Q5 Hot Start High-Fidelity-Kits* durchgeführt. Diese bestanden aus einem langen F-Primer mit den zentral gelegenen Substitutions-Basen und einem kurzen R-Primer, der End-zu-End gelegen war. Das Resultat war ein lineares PCR-Produkt mit der durch den F-Primer eingefügten Mutation. Die Kontrolle der Mutationsstellen erfolgte mittels Sanger Sequenzierung und dem Abgleich mit der Original-Cas9-Sequenz in *SnapGene*, wobei die Basensubstitutionen als *Mismatch* erkennbar waren.

Durch diesen Mutagenese-Prozess wurden vier in PCR-Vektoren klonierte Opt-Cas9-Vektoren generiert. **Tabelle 49** zeigt die genaue Konstrukt-Bezeichnung und die eingefügten Mutationen.

Tabelle 49: Liste der optimierten Cas9-Konstrukte (pGem-Opt-Cas)

Bezeichnung	Mutationen
High-Fidelity-Cas9 (HiFi-Cas) (Kleinstiver et al. 2016a)	N497A, R661A, Q695A, Q926A
SpCas9-mutiert (Spmut-Cas) (Slaymaker et al. 2016)	K855A
eSpCas9-1.0 (e1.0-Cas) (Slaymaker et al. 2016)	K1003A, R1060A, K810A
eSpCas9-1.1 (e1.1-Cas) (Slaymaker et al. 2016)	K1003A, R1060A, K848A

Mutationscodierung: N – 497 – A → ursprüngliche AS – Position in Proteinsequenz – mutierte AS

Darüber hinaus wurde eine Positiv-Kontrolle für die Opt-Cas9-Variante e1.1-Cas9 über *Addgene* bezogen, die in **Tabelle 50** dargestellt ist. Diese lag in einem px-Vektor vor.

Tabelle 50: Über *Addgene* erworbenes Plasmid als Positiv-Kontrolle

Bezeichnung	Cas9-Konstrukt	Bemerkung
eSpCas9(1.1)	e1.1-Cas	Im Folgenden als Ae1.1-Cas9 angegeben; der px-Vektor enthält zusätzlich die Klonierungskassette für die sgRNA

In der Positivkontrolle der kommerziell erworbenen Cas9-Varianten lag für zwei Codons eine abweichende Basensequenz vor. Damit bleibt die AS-Sequenz zwar erhalten, Unterschiede in der Expression des Enzyms können allerdings nicht ausgeschlossen werden. In der *Addgene*-Version der e1.1-Cas-Variante liegt an der Mutation K848A das Codon *GCC* vor, in unserer Version das Codon *GCG*. Das Codon an Stelle 239 für die Aminosäure Glycin unterscheidet sich ebenfalls an der dritten Base zwischen der gekauften (*GGA*) und eigens generierten (*GGC*) Variante.

6.2 Klonierung der CRISPR-miniAAV-Vektoren

Aus der Klonierung sollten CRISPR-miniAAV-Vektoren hervorgehen, die mit den Sequenzen einer sgRNA und der Cas9-Variante zusammen in einem einzigen *All-in-one*-Vektor ausgestattet sind. Das Ausgangsprodukt war ein modifizierter miniAAV-Vektor, der verkürzte Promotoren für die beiden CRISPR-Bestandteile und eine Klonierungskassette für die Guide-RNAs, sowie die Sequenz einer WT-Cas9-Nuklease enthielt. Die sgRNA wurde in die vorgesehene Kassette zwischen einem *short-U6-Promotor* und ihrem ergänzenden Gerüst (*gRNA-scaffold*) kloniert, während die modifizierten pGem-T-Opt-Cas-Fragmente in den entsprechenden Teil der WT-Cas9 eingefügt wurden und schließlich als vollständige *All-in-one*-Opt-Cas-Varianten vorlagen.

Die Positiv-Kontrolle der Ae1.1-Cas9 wurde zum einen im ursprünglichen px-Vektor der Firma *Addgene* belassen und die sgRNAs in die dort enthaltene Klonierungs-Kassette eingefügt. Zum anderen wurde die Cas9-Sequenz als Ganzes ebenfalls in einen *All-in-one*-CRISPR-miniAAV-Vektor kloniert und in diesem getestet. Die genaue Zusammensetzung aller Testvektoren ist in **Tabelle 51** zusammengestellt.

Tabelle 51: Zusammensetzung der CRISPR-miniAAV-Vektoren

Nr.	Vektor	Cas9-Promotor	Cas9-Variante	Mutationen	Guide-Promotor	Guide Varianten	Bemerkung
1	miniAAV	mini-159bp-CMV	WT	-	U6-short		Referenz: Original-Cas9
2	miniAAV	mini-159bp-CMV	HiFi	N497A R661A Q695A Q926A	U6-short	749_A_20mer	Testobjekte: Modifizierte Cas9-Varianten
3	miniAAV	mini-159bp-CMV	Spmut	K855A	U6-short	756_C1_20mer	
4	miniAAV	mini-159bp-CMV	e1.0	K1003A R1060A K810A	U6-short	759B_C_20mer	
5	miniAAV	mini-159bp-CMV	e1.1	K1003A R1060A K848A	U6-short	EMX1	
6	miniAAV	mini-159bp-CMV	Ae1.1	K1003A R1060A K848A	U6-short		Positiv-Kontrollen: <i>Addgene</i> -Konstrukte
7	px	CMV Enhancer + chicken β -Aktin Promotor	Ae1.1	K1003A R1060A K848A	U6		

6.3 HEK293T-EGFP-Assays: Testen der Cas9-Varianten in HEK293T-Zellen

Die beschriebenen Cas9-Varianten wurden anschließend für drei SNP-spezifische Guide-RNAs und der Guide-RNA für das *EMX1*-Gen als Positivkontrolle in HEK293T-Zellen exprimiert und auf ihre Effizienz und Spezifität getestet.

In diesen HEK293T-EGFP-Assays wurde das Editierungsverhalten der verschiedenen sgRNA-Cas9-Kombinationen anhand der Intensität eines Fluoreszenzsignals des EGFP (*enhanced green fluorescence protein*) in HEK293T-Zellen beurteilt. Diese Assays waren prinzipiell ähnlich zu den Transfektionsversuchen der sgRNA-Testung in den Vorarbeiten. HEK293T-Zellen wurden in separaten Proben jeweils mit zwei verschiedenen Expressionsvektoren transfiziert, einem CRISPR-miniAAV-Vektor aus **Tabelle 51** und einem pCAG-EGxxFP-Vektor mit einer Gen-Kassette für das EGFP (**Abbildung 8**). Diese ist unterbrochen von einem kurzen ~ 500 bp langen genomischen DNA-Fragment, das den sgRNA-spezifischen SNP enthält und als Zielsequenz für das CRISPR/Cas9-System dienen sollte. Als Negativkontrolle wurden die Guides zusätzlich mit der zweiten SNP-Variante als Nicht-Zielsequenz getestet. Bei erfolgreichem Adressieren des korrekten SNP auf der Zielsequenz durch die sgRNA und anschließendem Editieren durch die Cas9-Nuklease, sollte die funktionsfähige EGFP-Kassette durch homologe Rekombination wiederhergestellt werden. Die entsprechenden Zellen sollten nun das fluoreszierende EGFP exprimieren können. Die CRISPR-Aktivität der miniAAV-Vektoren ließ sich anschließend über die Intensität des grünen Fluoreszenzsignals quantifizieren und vergleichen.

Ein HEK293T-EGFP-Assay bestand aus 15 Proben von HEK293T-Zellen, davon eine Leer-Probe, die allein mit dem nativen pCAG-EGxxFP zur Bestimmung der Grundfluoreszenz transfiziert wurde. Die weiteren Proben bestanden jeweils aus den Co-Transfektionen der sieben in **Tabelle 51** aufgeführten CRISPR-miniAAV-Vektoren mit den EGxxFP-Vektoren für den Ziel-SNP und den Nicht-Ziel-SNP. Nach einer Inkubationszeit von 72 h wurden mikroskopisch Bilder der Fluoreszenz aufgenommen und die Signalintensität quantitativ am Plattenreader gemessen, welche sich anschließend in einem Balkendiagramm bildlich darstellen ließ.

Die Cas9-Varianten wurden insgesamt mit vier sgRNAs getestet, drei Guides für SNPs im *BEST1*-Gen (749_A_20mer, 756_C1_20mer, 759B_C_20mer) und einer Guide-RNA als

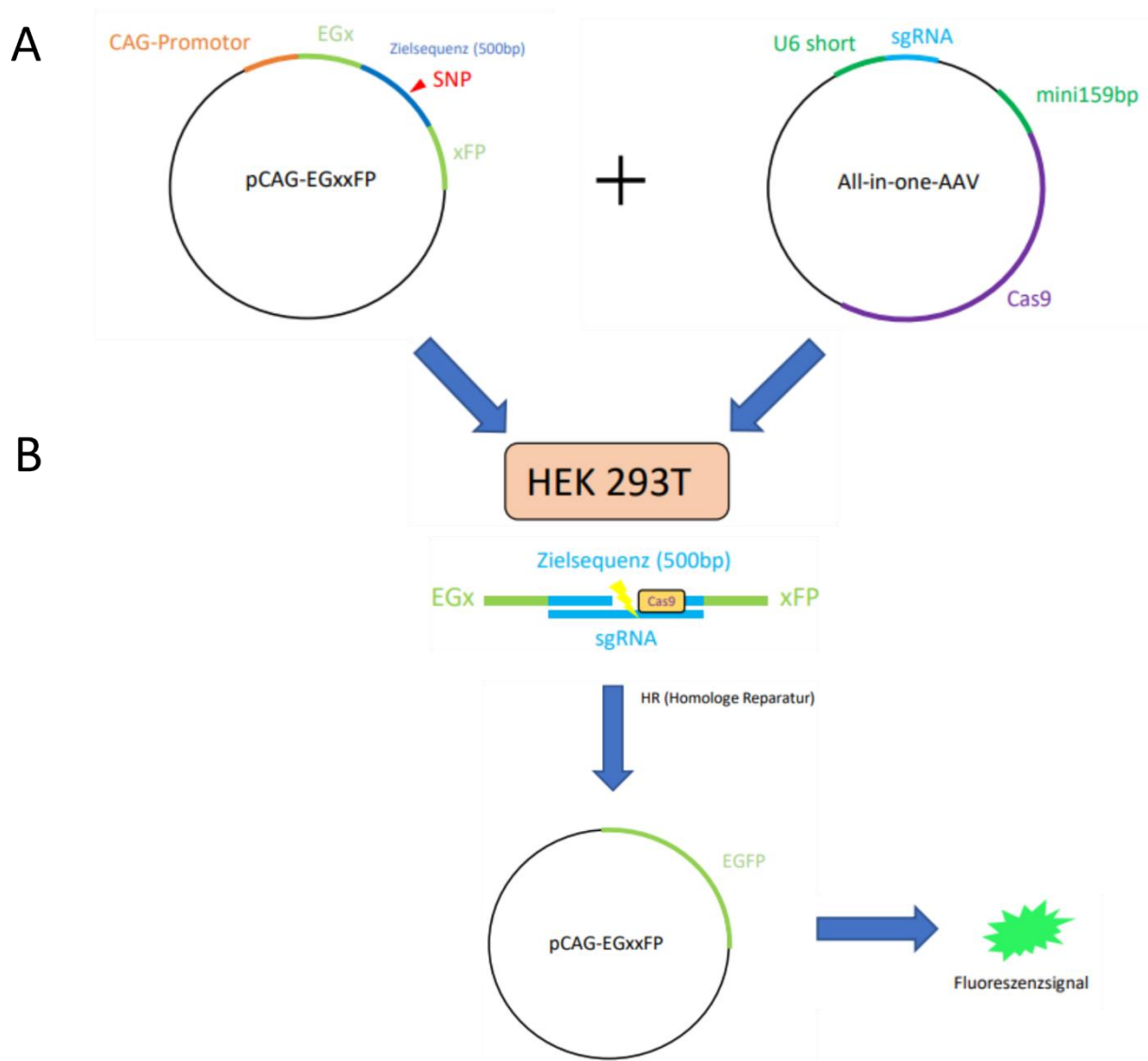


Abbildung 8: Transfektionsschema des HEK293T-EGFP-Assays

- A:** Ein pCAG-EGFP-Vektor enthielt die Gen-Kassette für das EGFP, in welche über eine intrinsische multiple cloning site (MCS) die Zielsequenz mit einer Größe von ca. 500 bp für die Guide des CRISPR-miniAAV-Vektors, jeweils in beiden SNP-Ausführungen, kloniert war. Der CRISPR-miniAAV-Vektor war ausgestattet mit den Sequenzen der sgRNA und Cas9-Nuklease, unter Kontrolle verkürzter Promotoren.
- B:** Co-transfizierte HEK293T-Zellen exprimieren das CRISPR/Cas9-System, welches die Ziel-Sequenz im EGFP-Vektor editieren. Über homologe Rekombination wird die EGFP-Sequenz wieder zusammengeführt und das fluoreszierende EGFP exprimiert. Die Aktivität des CRISPR/Cas9-Systems spiegelt sich dabei wider in der Intensität des Fluoreszenzsignals und somit der Expressionsrate des EGFP.

Positivkontrolle am *EMX1*-Lokus. Die SNPs wurden ausgewählt, da sie im Exon 10 des *BEST1*-Gens liegen und sich damit jeweils einzeln bereits für die Geneditierung eignen. Außerdem waren die sgRNAs für die SNPs 749 und 756 bereits in Vorarbeiten in px-Vektoren getestet worden und hatten dort keine überzeugenden Ergebnisse hinsichtlich Effektivität und Spezifität geliefert, sodass nun zunächst ein Vergleich mit den entsprechenden *All-in-one*-miniAAV-Vektoren von Interesse war. Die Guide für den Lokus des *EMX1*-Gens wurde als

Positiv-Kontrolle ausgewählt, da sie in der Literatur bereits eingehend beschrieben ist (Tsai et al. 2015; Kleinstiver et al. 2016a; Slaymaker et al. 2016).

6.3.1 Testen der Cas9-Konstrukte mit der sgRNA 749_A_20mer

In dieser Versuchsreihe wurden die verschiedenen Cas9-Konstrukte zusammen mit der sgRNA 749_A_20mer im CRISPR-miniAAV-Vektor getestet. **Abbildung 9** zeigt die Ergebnisse der Transfektion der Cas9-Konstrukte mit der sgRNA 749_A_20mer, wobei in **Abbildung 9A** die mikroskopischen Bilder der Zellfluoreszenz zu sehen sind. Die erste Probe enthält HEK293T-Zellen, die allein mit dem pCAG-EGxxFP-Vektor transfiziert wurden. Es folgen die Proben der sieben CRISPR-miniAAV-Vektoren, beginnend mit dem Konstrukt, das die wildtypische Cas9-

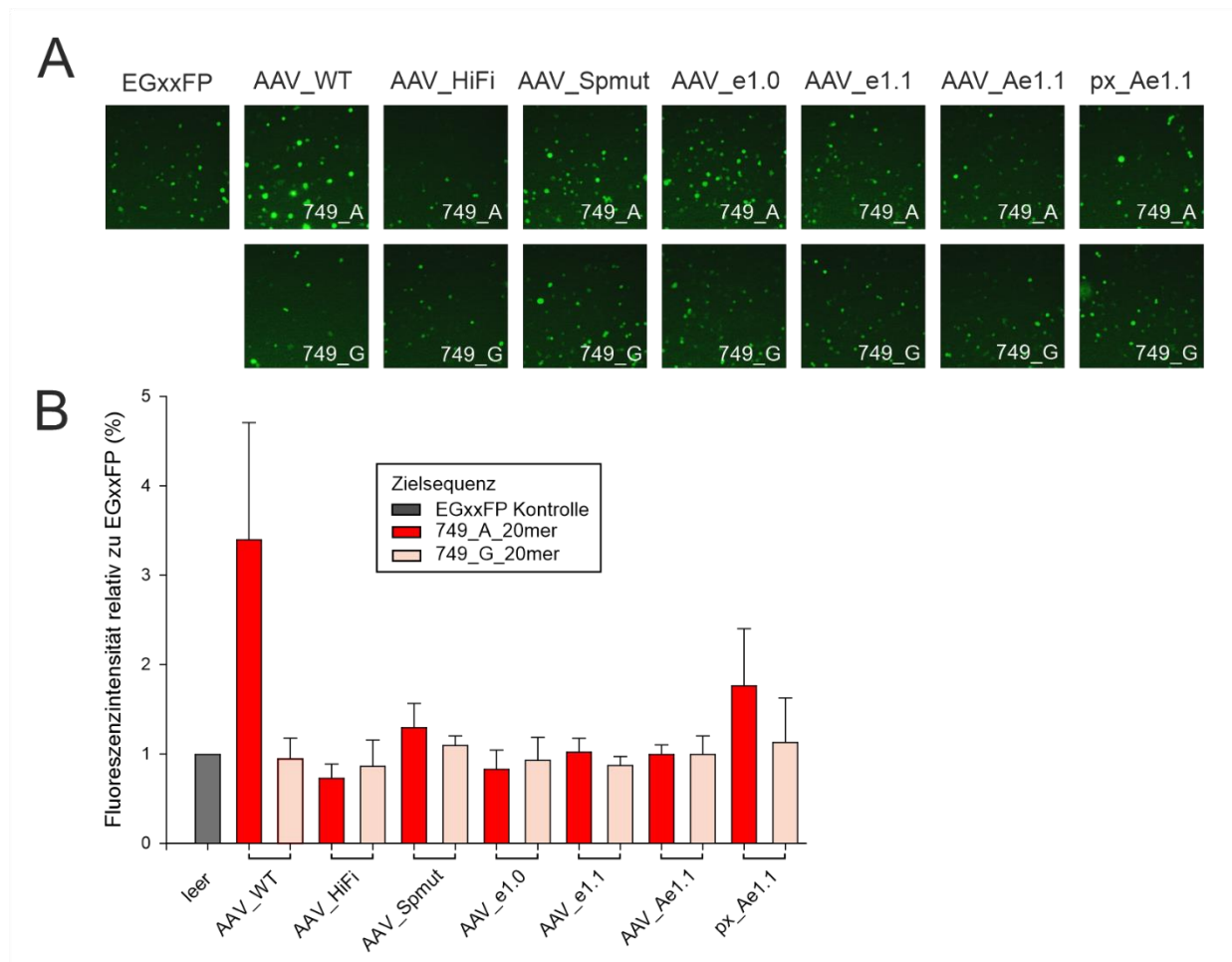


Abbildung 9: Ergebnisse des HEK293T-EGFP-Assays für die Guide 749_A_20mer; n≥3

Die CRISPR-Vektoren mit den verschiedenen Cas9-Varianten wurden mit der sgRNA 749_A_20mer versehen und zusammen mit einem pCAG-EGxxFP-Vektor co-transfiziert, der entweder den Ziel-SNP 749-A (ON-Target) oder den Nicht-Ziel-SNP 749-G (OFF-Target) enthielt.

A: Mikroskopische Aufnahmen der Zellfluoreszenz 72 h nach Transfektion. Standard: Leerprobe mit pCAG-EGxxFP-Vektor; Oben: EGxxFP-Vektor mit dem Ziel-SNP 749-A (ON-Target); Unten: EGxxFP-Vektoren mit dem Nicht-Ziel-SNP 749-G (OFF-Target)

B: Quantifizierung der Zellfluoreszenz 72 h nach Transfektion. Grau: Leerprobe mit pCAG-EGxxFP-Vektor; Dunkles Rot: EGxxFP-Vektor mit dem Ziel-SNP 749-A (ON-Target); Helles Rot: EGxxFP-Vektor mit Nicht-Ziel-SNP 749-G (OFF-Target)

Nuklease exprimiert. Daran schließen sich die vier durch Mutagenese veränderten Cas9-Varianten der HiFi-, Spmut-, e1.0- und e1.1-Cas9, sowie die Positivkontrolle der Ae1.1-Cas9 der Firma *Addgene*, jeweils im miniAAV- und im ursprünglichen px-Vektor an. In der oberen Reihe sind die Proben der Cas9-Konstrukte angesiedelt, die mit pCAG-EGxxFP-Vektoren des Ziel-SNP 749-A (ON-Target) co-transfiziert wurden, die untere Reihe in **Abbildung 9A** repräsentiert Proben der Co-Transfektion von EGxxFP-Vektoren mit dem Nicht-Ziel-SNP 749-G (OFF-Target).

Die EGxxFP-Leerprobe zeigt erwartungsgemäß kein starkes Signal, sondern nur ein leichtes Grundschiimmern, das als Referenz für die Co-Transfektionen dient. Generell fallen Leuchtsignale in den Proben sehr dezent aus. Bei der Unterscheidung zwischen ON- (oben) und OFF-Target-Proben (unten) der CRISPR-miniAAV-Vektoren kann man festhalten, dass ausschließlich in Proben des ON-Targets grüne Fluoreszenzen erkennbar sind und die untere Reihe der OFF-Target-Transfektionen durchgehend dunkel verbleibt. Das Konstrukt der WT-Cas9 zeigt das stärkste Leuchtsignal. Leichte Fluoreszenzen sind daneben in den Proben der Spmut-Cas9 und erwartungsgemäß auch der Ae1.1-Positivkontrolle im px-Vektor zu erkennen, da letzterer starke Promotoren in Originalgrößen aufweist. Alle weiteren Zellansätze der Konstrukte HiFi, e1.0, e1.1 und Ae1.1 zeigen keine Leuchtaktivität im ON-Target-Ansatz.

Die Signale wurden jeweils für $n \geq 3$ Messungen pro Ansatz in **Abbildung 9B** in einem Balkendiagramm quantifiziert. Auf der x-Achse sind die Probenbezeichnungen angegeben, auf der y-Achse ist die Fluoreszenzintensität relativ zur EGxxFP-Leerprobe in Prozent („leer“) aufgetragen. Es folgen die sieben Cas9-Konstrukte, wobei die Proben der ON-Targets in dunklem rot und die der OFF-Targets in einem helleren Rotton jeweils vergleichend nebeneinanderstehen. Hier zeigen sich nun deutlich die oben bereits beschriebenen Ergebnisse der Leuchtintensitäten. Die WT-Cas9 verzeichnet beim ON-Target die stärkste Fluoreszenz mit einer 3,4-fachen Erhöhung der Fluoreszenzintensität, während sie beim OFF-Target auf dem Grundniveau verbleibt. Weitere leichte Ausschläge über dem Wert der Referenzfluoreszenz sind bei den ON-Targets der Ae1.1-Cas9 im px-Vektor (1,8-fach) und der Spmut-Cas9 (1,3-fach) zu erkennen. Die restlichen Konstrukte bewegen sich kaum über den Werten des Leervektors. Die Werte aller OFF-Target-Proben liegen ebenfalls im Bereich des Basiswertes.

6.3.2 Testen der Cas9-Konstrukte mit der sgRNA 756_C1_20mer

Die CRISPR-miniAAV-Vektoren der Cas9-Varianten exprimierten in diesem Versuch die sgRNA 756_C1_20mer und wurden co-transfiziert mit EGxxFP-Vektoren der SNP-Varianten 756-C (ON-Target) und 756-T (OFF-Target). In **Abbildung 10** sind die mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen und die quantifizierten Signalintensitäten nach demselben Schema wie in **6.3.1.** aufgeführt. Es ist erneut auffällig, dass die wildtypische Cas9-Nuklease im miniAAV-Vektor mit einer 8,2-fach höheren Fluoreszenzintensität mit Abstand die beste Effizienz aufweist bei trotzdem sehr niedriger OFF-Target Aktivität nahe dem Referenz-Niveau. Die optimierten Cas9-Konstrukte und deren Positivkontrolle zeigen nicht die erhoffte

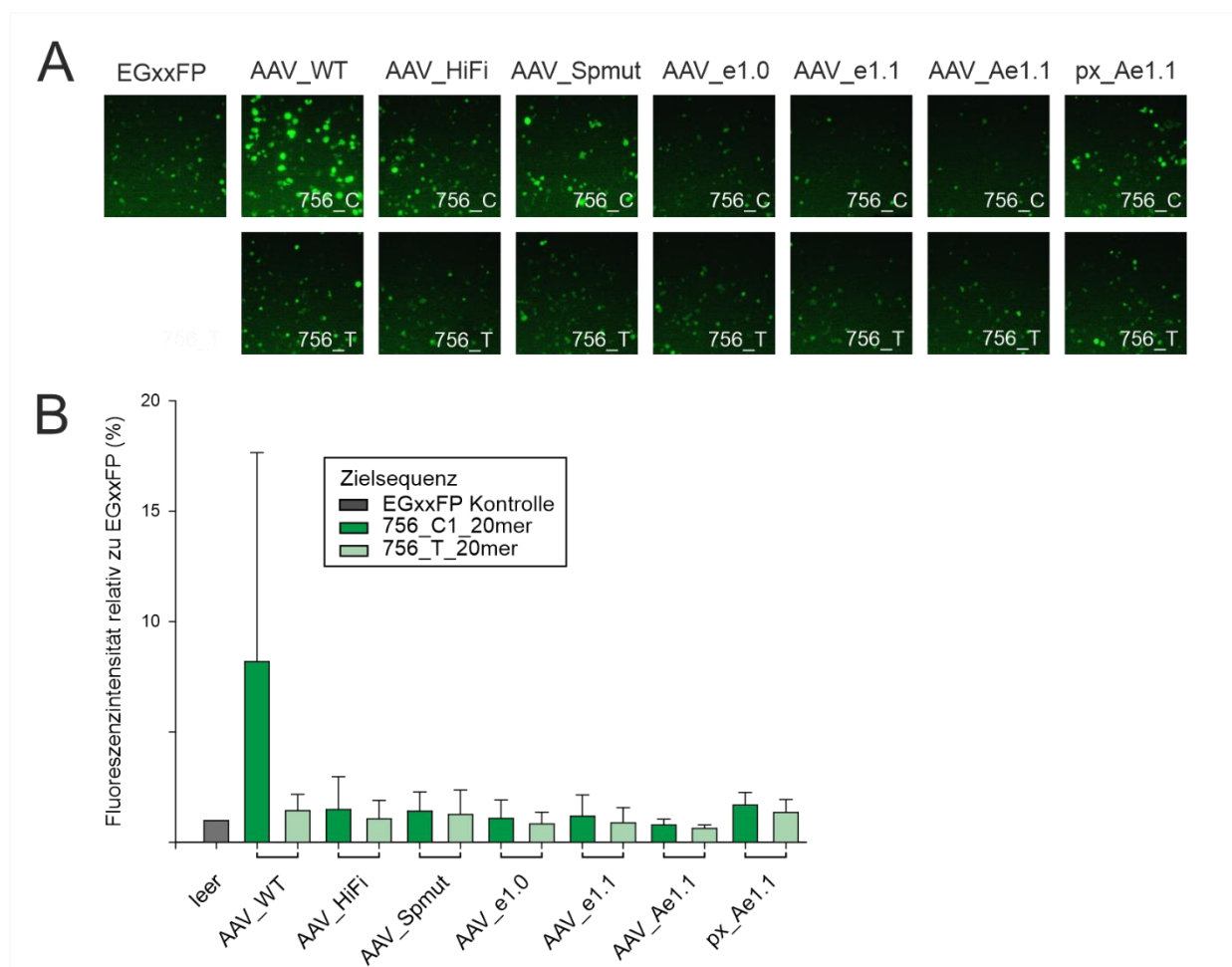


Abbildung 10: Ergebnisse des HEK293T-EGFP-Assays für die Guide 756_C1_20mer; n≥4

Die CRISPR-Vektoren mit den verschiedenen Cas9-Varianten wurden mit der sgRNA 756_C1_20mer versehen und zusammen mit einem pCAG-EGxxFP-Vektor co-transfiziert, der entweder den Ziel-SNP 756-C (ON-Target) oder den Nicht-Ziel-SNP 756-T (OFF-Target) enthielt.

- A:** Mikroskopische Aufnahmen der Zellfluoreszenz 72 h nach Transfektion. Standard: Leerprobe mit pCAG-EGxxFP-Vektor; Oben: EGxxFP-Vektor mit dem Ziel-SNP 756-C (ON-Target); Unten: EGxxFP-Vektoren mit dem Nicht-Ziel-SNP 756-T (OFF-Target)
- B:** Quantifizierung der Zellfluoreszenz 72 h nach Transfektion. Grau: Leerprobe mit pCAG-EGxxFP-Vektor; Dunkles Grün: EGxxFP-Vektor mit dem Ziel-SNP 756-C (ON-Target); Helles Grün: EGxxFP-Vektor mit Nicht-Ziel-SNP 756-T (OFF-Target)

Steigerung der Effizienz und liegen nur marginal über der Grundaktivität der Referenzprobe. Expression und Editierungsaktivität sind demnach vorhanden, jedoch in sehr niedrigem Maß. Eine Auffälligkeit zeigt sich darüber hinaus bei dem gekauften px-Konstrukt. Die Signalintensität ist hier erneut niedrig, es lässt sich allerdings eine gewisse Unspezifität beim OFF-Target erkennen, obwohl ein optimiertes Cas9-Konstrukt vorliegt.

6.3.3 Testen der Cas9-Konstrukte mit der sgRNA 759B_C_20mer

In dieser Versuchsreihe wurde die sgRNA 759B_C_20mer getestet und auf ihre Spezifität und Effizienz in Kombination mit den verschiedenen Cas9-Varianten überprüft (**Abbildung 11**). Wie

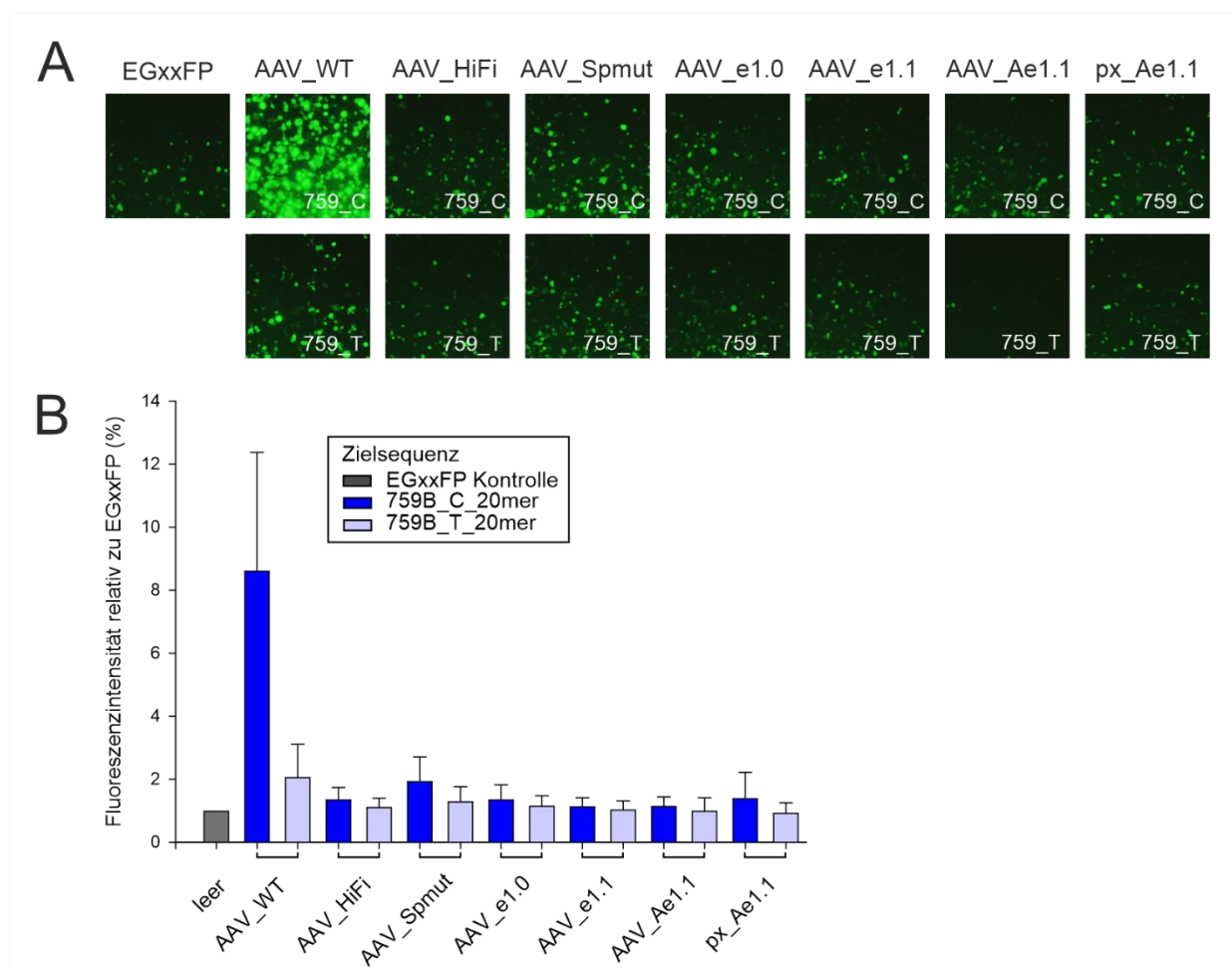


Abbildung 11: Ergebnisse des HEK293T-EGFP-Assays für die Guide 759B_C_20mer; n≥5

Die CRISPR-Vektoren mit den verschiedenen Cas9-Varianten wurden mit der sgRNA 759B_C_20mer versehen und zusammen mit einem pCAG-EGxxFP-Vektor Co-Transfiziert, der entweder den Ziel-SNP 759-C (ON-Target) oder den Nicht-Ziel-SNP 759-T (OFF-Target) enthielt.

- A:** Mikroskopische Aufnahmen der Zellfluoreszenz 72 h nach Transfektion. Standard: Leerprobe allein mit pCAG-EGxxFP-Vektor; Oben: EGxxFP-Vektor mit dem Ziel-SNP 759-C (ON-Target); Unten: EGxxFP-Vektoren mit dem Nicht-Ziel-SNP 759-T (OFF-Target)
- B:** Quantifizierung der Zellfluoreszenz 72 h nach Transfektion. Grau: Leerprobe allein mit pCAG-EGxxFP-Vektor; Dunkelblau: EGxxFP-Vektor mit dem Ziel-SNP 759-C (ON-Target); Hellblau: EGxxFP-Vektor mit Nicht-Ziel-SNP 759-T (OFF-Target)

man in **Abbildung 11B** sehen kann, ergibt sich ein ähnliches Schema der Fluoreszenzaktivitäten und somit Cas9-Funktionen wie in den Versuchen mit den beiden vorherigen Guides. Im miniAAV-Vektor ist die Funktion der WT-Cas9 geprägt von einer relativ hohen Effizienz (ON-Target-Aktivität) mit einem 8,6-fachen Wert im Vergleich zur Grundaktivität, sowie einer guten Spezifität. Hier liegt die OFF-Target-Aktivität nur bei knapp 2 %. Die optimierten Cas9-Konstrukte weisen deutlich niedrigere Effizienzen auf, wenngleich die OFF-Target-Aktivität ebenfalls niedrig verbleibt. Die Spmut-Cas9 liegt hier mit einer 1,9-fach höheren Fluoreszenzintensität noch an der Spitze der vier generierten Varianten.

6.3.4 Testen der Cas9-Konstrukte mit der Positiv-Kontrolle EMX1

In den vorherigen Versuchen wurden die Cas9-Varianten mit Guides spezifisch für SNPs im *BEST1*-Gen getestet. Eine Verbesserung der Effizienzen im Vergleich zur wildtypischen Cas9-

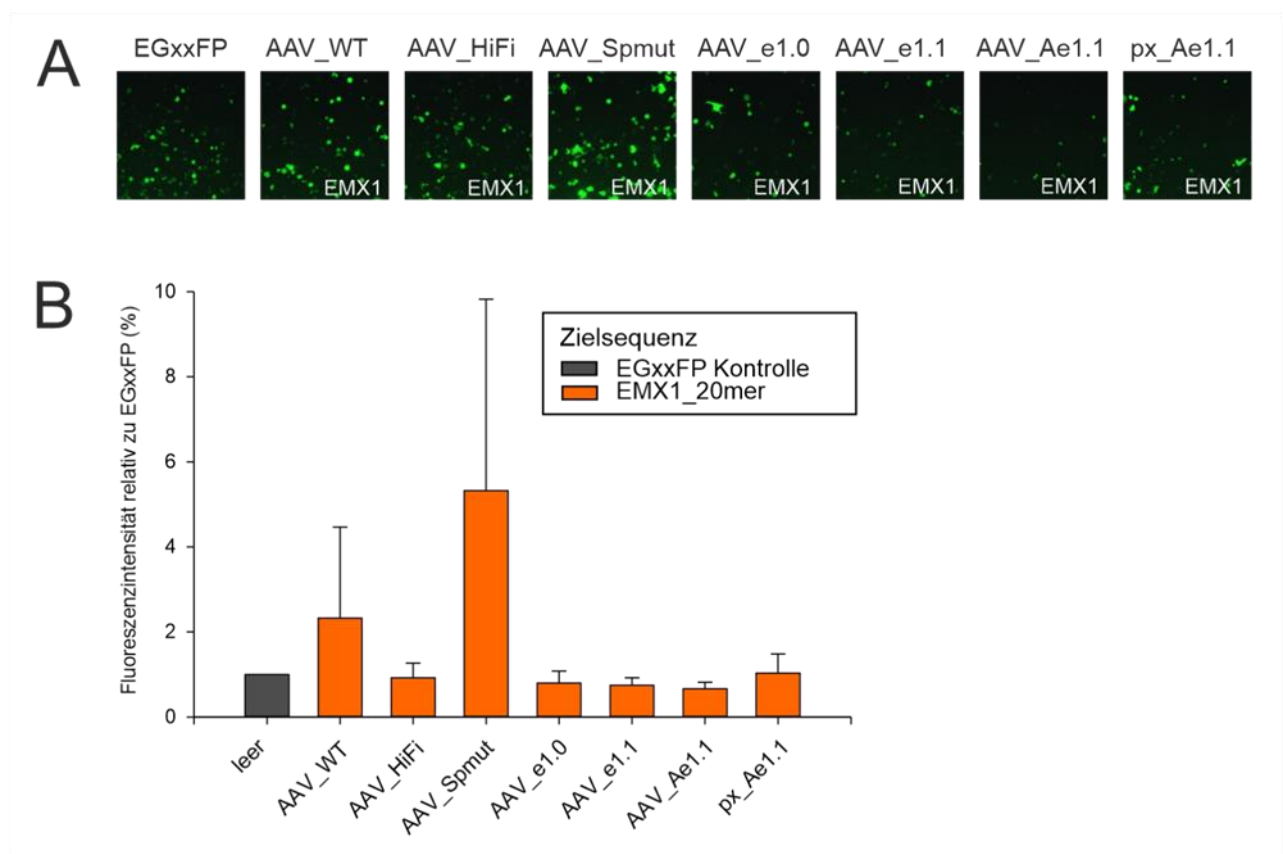


Abbildung 12: Ergebnisse des HEK293T-EGFP-Assays für die Guide des *EMX1*-Lokus; n≥3

Die CRISPR-Vektoren mit den verschiedenen Cas9-Varianten wurden mit der sgRNA für den *EMX1*-Lokus versehen und zusammen mit einem pCAG-EGxxFP-Vektor co-Transfiziert, der den Ziel-SNP EMX1 (ON-Target) enthielt.

A: Mikroskopische Aufnahmen der Zellfluoreszenz 72 h nach Transfektion. Leerprobe mit pCAG-EGxxFP-Vektor und Cas9-Konstrukte mit ON-Target-EGxxFP

B: Quantifizierung der Zellfluoreszenz 72 h nach Transfektion. Schwarz: Leerprobe allein mit pCAG-EGxxFP-Vektor; Orange: Cas9-Konstrukte mit ON-Target-EGxxFP

Nuklease war jedoch nicht zu sehen, im Gegenteil, die Varianten wiesen eine deutlich niedrigere CRISPR-Aktivität auf. Aus diesem Grund wurde ein Locus im *EMX1*-Gen als eine aus der Literatur bekannte Positivkontrolle herangezogen (Kleinstiver et al. 2016a; Slaymaker et al. 2016). In die CRISPR-Vektoren wurde die entsprechende sgRNA kloniert und analog zu den vorherigen Versuchen im HEK293T-EGFP-Assay mit einem pCAG-EGxxFP-Vektor mit entsprechender Ziel-Sequenz (ON-Target) co-transfiziert.

Abbildung 12A zeigt die mikroskopischen Fluoreszenzbilder des Assays, links beginnend mit der EGxxFP-Leer-Kontrolle und den darauffolgenden Cas9-Varianten im CRISPR-Vektor in Co-Transfektion mit dem EGxxFP-Vektor und der EMX1-Zielsequenz. In **Abbildung 12B** lässt sich quantitativ ein Trend ablesen, der bereits in den Fluoreszenzbildern optisch zu erkennen ist. Die EMX1-Guide zeigt für die Variante Spmut-Cas9 die höchste Effizienz, mit einem ca. 5,3-fachen Wert über dem Basiswert. Damit liegt bei der CRISPR-Aktivität zum ersten Mal ein optimiertes Cas9-Konstrukt über der wildtypischen Cas9-Nuklease, die hier nur einen 2,3-fachen Wert erreicht. Die Signale der weiteren Konstrukte verhalten sich dabei weiter sehr schwach.

6.4 Bestimmung der Proteinexpression der Cas9-Varianten

Auf der Suche nach Erklärungen für das CRISPR-Verhalten der verschiedenen Cas9-Varianten in den HEK293T-EGFP-Assays wurde ein Unterschied in der Expression der Cas9-Nuklease in Betracht gezogen, was nun mittels Western Blot-Untersuchungen kontrolliert werden sollte. Mit CRISPR-miniAAV-Vektoren transfizierte HEK293T-Zellen wurden nach 72 h geerntet, aufgereinigt und der entsprechende Ansatz in einem Western Blot aufgetrennt. Auf eine Trägermembran geblottete Proteine wurden mit Antikörpern gegen die Cas9-Nuklease behandelt und mittels Immunofluoreszenz markiert. Die resultierenden Ergebnisse sind in **Abbildung 13** dargestellt.

Abbildung 13A zeigt eine Cas9-Antikörperfärbung. Ganz links wurde als Referenz eine wildtypische Cas9 in einem AAV-Vektor unter der Kontrolle eines RSV-Promotors eingesetzt. Es folgen die Cas9-Konstrukte in bekannter Reihenfolge. In **Abbildung 13B** wurden die Immunofluoreszenz-Signale der Cas9-Proteinspezies in einem Balkendiagramm quantifiziert und relativ zum Signal des AAV-RSV-Cas9-Konstrukts betrachtet. In der Western Blot-Analyse zeigt die Positivkontrolle im px-Vektor, dessen Cas9 unter der Kontrolle des sehr starken CMV-Promoters liegt, die höchste Expressivität und ist ca. 5,3-mal so hoch wie die der RSV-Cas9-

Referenz. Am zweithöchsten fällt das Konstrukt der HiFi-Cas9 mit einer ca. 2,4-mal so hohen Expression auf, relativ zur Referenz. Die Werte von zuvor im HEK293T-EGFP-Assay auffälligen Konstrukten wie der WT- und Spmut-Cas9 verbleiben deutlich niedriger. Insgesamt zeigt dieses Ergebnis jedoch, dass die niedrigen CRISPR-Effizienzen der modifizierten Cas9-Konstrukte aus den Versuchen **6.3.1** bis **6.3.4** nicht auf eine zu niedrige Cas9 Expression der *All-in-one*-miniAAV-Vektoren mit auf 159 bp verkürztem CMV-Promoter zurückzuführen ist. Alle AAV-Konstrukte zeigen eine zum RSV-Promoter vergleichbar gute Cas9 Expression.

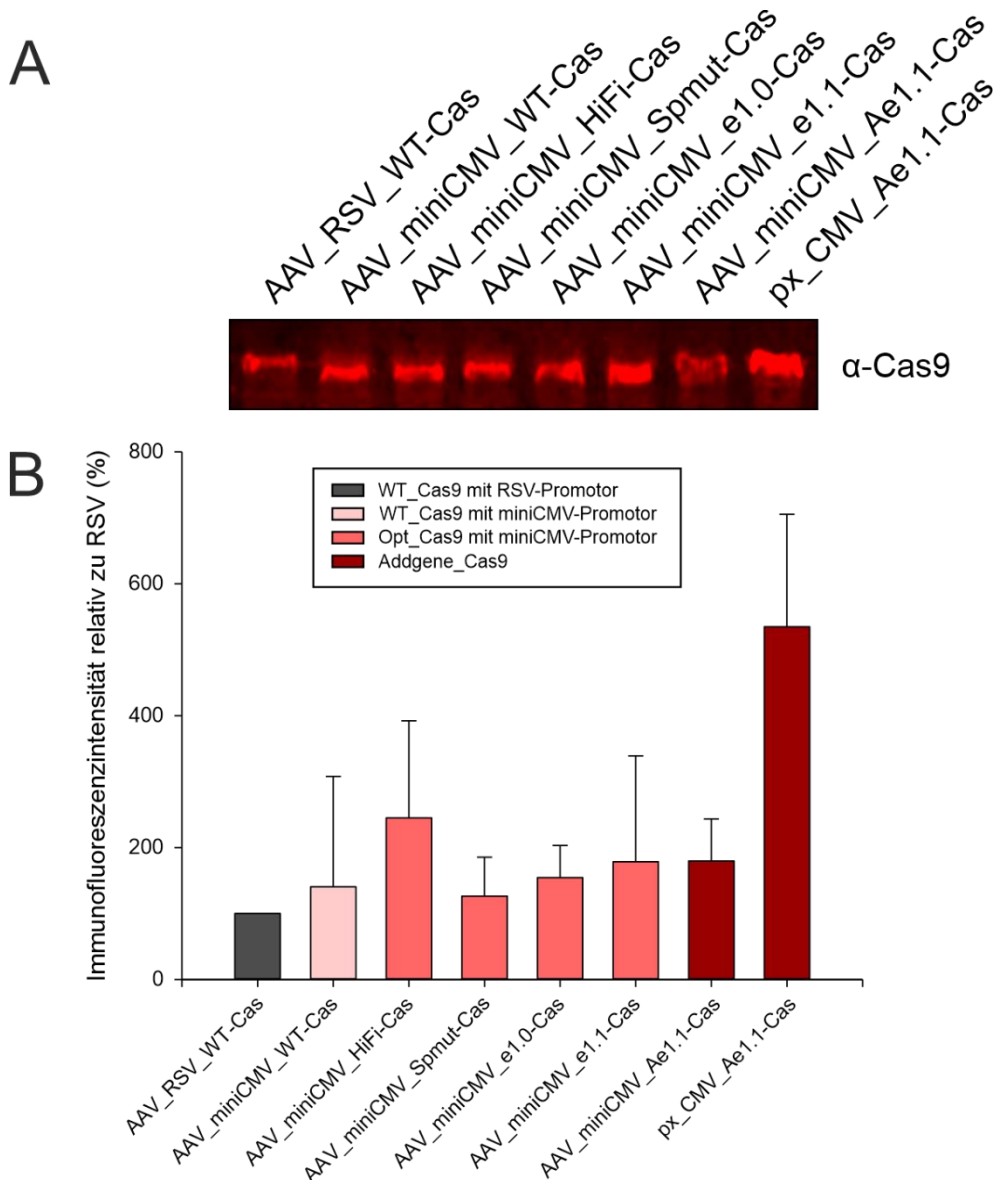


Abbildung 13: Ergebnisse der Western Blot-Analyse in HEK293T-Zellen; n=10

- A:** Mittels Immunofluoreszenz sichtbar gemachte Banden der Cas9-Nuklease. Als Referenz dient die Expression der wildtypischen Cas9-Nuklease in einem AAV-Vektor unter der Kontrolle eines RSV-Promotors (links). Es folgen die Banden der verschiedenen Cas9-Varianten nach bekannter Reihenfolge.
- B:** Quantifiziertes Immunofluoreszenzsignal aller Cas9-Konstrukte. Schwarz: Referenz der WT-Cas9 unter Kontrolle des RSV-Promotors; Helles Rot: wildtypische Cas9; Mittleres Rot: optimierte Cas9-Konstrukte; Dunkles Rot: Positivkontrolle im miniAAV bzw px-Vektor

6.5 EGFP-Vergleich der px- und miniAAV-Vektoren

In den Vorarbeiten am Institut waren Cas9-sgRNA-Kombinationen stets in px-Vektoren getestet worden, in dieser Arbeit erfolgten die Versuche der verschiedenen Cas9-Varianten in miniAAV-Vektoren. Um den Einfluss des verwendeten Expressionsvektors auf die CRISPR-

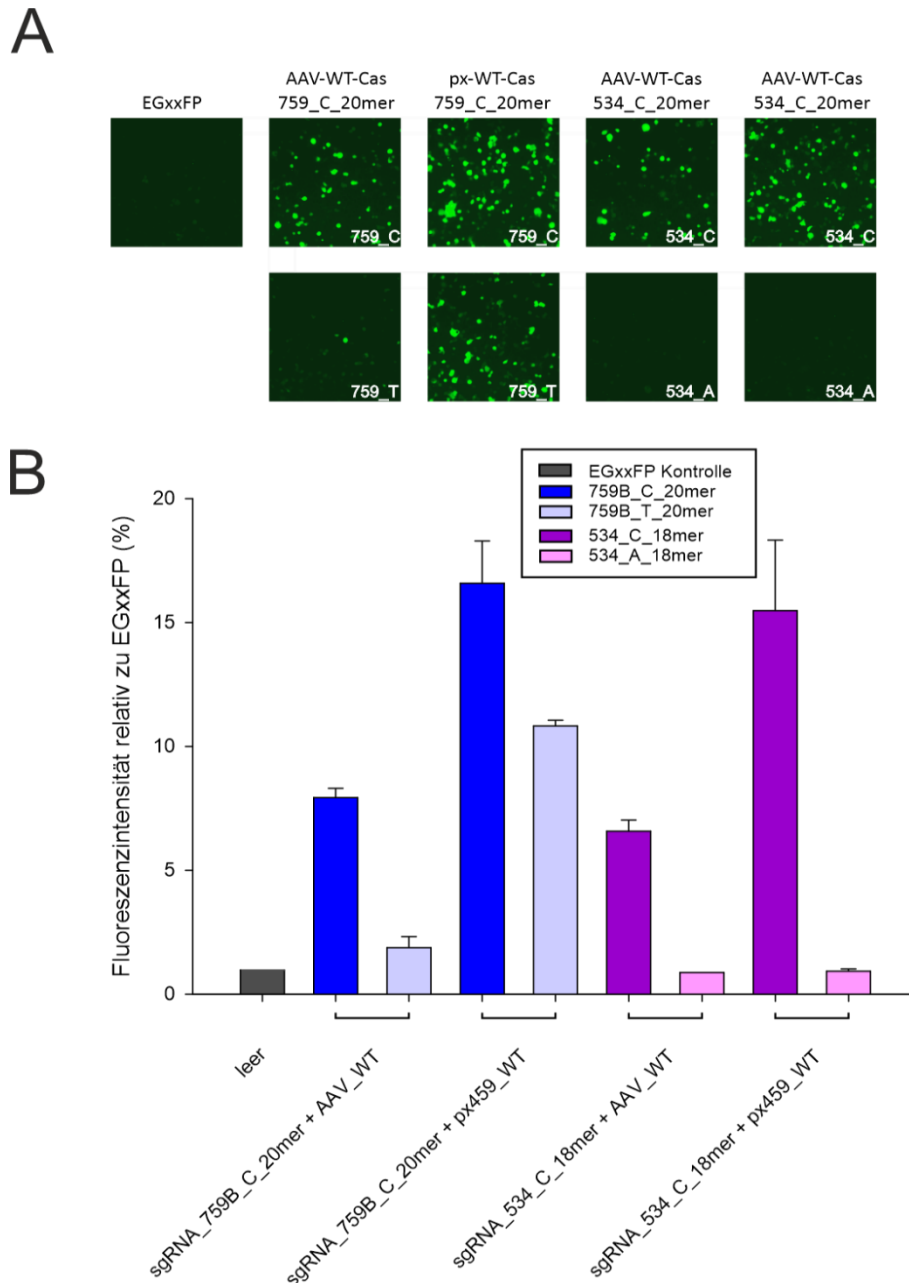


Abbildung 14: Ergebnisse des HEK293T-EGFP-Assays der Guides 759 und 534 im miniAAV- und px-Vektor; n=2

Es erfolgte ein Vergleich der miniAAV- und px-Vektoren für die WT-Cas9 mit den Guides 759B_C_20mer und 534_C_18mer in einem HEK293T-EGFP-Assay. HEK293T-Zellen wurden co-transfiziert und nach 72h analysiert.

- A:** Mikroskopische Aufnahmen der Zellfluoreszenz 72 h nach Transfektion
 Von Links: Leerprobe mit pCAG-EGxxFP-Vektor; 759-Guide im miniAAV- und px-Vektor; 534-Guide im miniAAV- und px-Vektor; Oben: EGxxFP-Vektor mit dem Ziel-SNP (ON-Target); Unten: EGxxFP-Vektor mit dem Nicht-Ziel-SNP (OFF-Target)
- B:** Quantifizierung der Zellfluoreszenz 72 h nach Transfektion
 Schwarz: Leerprobe allein mit pCAG-EGxxFP-Vektor; Blau: 759-Guide im miniAAV- und px-Vektor jeweils mit ON- und OFF-Target; Lila: 534-Guide im miniAAV- und px-Vektor jeweils mit ON- und OFF-Target

Funktion zu ermitteln, sollte nun im HEK293T-EGFP-Assay ein direkter Vergleich eines CRISPR/Cas9-Systems im px- und miniAAV-Vektor erfolgen. Hierzu wurde die wildtypische SpCas9-Nuklease herangezogen, zum einen, da diese Form der Cas9 in den HEK293T-EGFP-Assays mit den miniAAV-Vektoren die besten Ergebnisse geliefert hatte und zum anderen, da sie auch in den HEK293T-EGFP-Assays der Vorarbeiten verwendet worden war. Als Guides wurde die in dieser Arbeit im miniAAV-Vektor getestete und vielversprechende 759B_C_20mer verwendet, sowie die bereits in Vorarbeiten im px-Vektor getestete und sehr spezifische 534_C_18mer, die einen SNP im Exon 3 adressiert. Jeder CRISPR-Vektor wurde erneut mit beiden SNP-Varianten, ON- und OFF-Target, im EGxxFP-Vektor getestet.

Die nach 72 h aufgenommenen Fluoreszenzbilder sind in **Abbildung 14A** dargestellt, wobei von links auf die EGxxFP-Leerkontrolle zunächst die 759-Guide im miniAAV- und im px-Vektor und schließlich die 534-Guide im miniAAV- und px-Vektor folgt. Die obere Reihe zeigt die Co-Transfektion mit dem ON-, die untere Reihe mit dem OFF-Target. **Abbildung 14B** quantifiziert die Signalintensitäten in einem Balkendiagramm, die Reihenfolge der Proben entspricht der obigen Beschreibung, wobei die Signale aus den ON- (dunkler Farbton) und OFF-Target-Proben (heller Farbton) für jedes Vektorkonstrukt nebeneinander angeordnet sind.

Vergleicht man die Effizienz (ON-Target-Aktivität) beider Vektortypen, erkennt man für den px-Vektor bei beiden Guides eine ungefähr doppelt so hohe Signalintensität und demnach CRISPR-Aktivität als für den miniAAV-Vektor. Betrachtet man die Spezifität, zeigt sich vor allem im Falle der Guide 759B_C_20mer, dass der miniAAV-Vektor eine deutlich niedrigere OFF-Target-Aktivität aufweist. Allgemein kann man festhalten, dass es sich in beiden Systemen um sehr starke Guides handelt, da selbst im miniAAV-Vektor die Fluoreszenzintensität für 759-sgRNA und 534-sgRNA 7,7-fach bzw. 6,2-fach über dem Basisniveau liegt.

6.6 Target Sequenzierung: Vergleich der Vektorsysteme

Bisher erfolgte die Testung der CRISPR-miniAAV-Konstrukte in HEK293T-EGFP-Assays mit dem EGxxFP-Vektor als Träger der ca. 500 bp langen genomischen ON-Target-Sequenz und der EGFP-Fluoreszenzentwicklung als Indikator für die CRISPR-Aktivität. Im nächsten Schritt sollten nun direkte Versuche am genomischen ON-Target im nativen Zellsystem vorgenommen werden, wobei die CRISPR-Aktivität anhand der Anzahl von durch CRISPR-Ereignisse eingefügte *Indels* am Zielort gemessen werden sollte. Für die Konstrukte wurde die wildtypische Cas9-Nuklease (WT-Cas) ausgewählt und mit den beiden Effizienz-starken

sgRNAs 759B_C_20mer und 534_C_18mer im miniAAV- und px-Vektor kombiniert. HEK293T-Zellen, die jeweils homozygot am Locus 759 und 534 waren, wurden in vier separaten Proben mit den vier Vektor-Konstrukten und einem pmax-GFP-Vektor als Transfektionsmarker co-transfiziert. Zellen mit grüner Fluoreszenz wurden mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*) isoliert, der SNP-Lokus mit spezifischen Primern aus der genomischen DNA PCR-amplifiziert, in einen PCR-Vektor kloniert, und anschließend in DH5α-Zellen transformiert. Mehrere solcher Klone wurden schließlich von einer Agar-Platte selektioniert, der SNP-Lokus im entsprechenden PCR-Vektor sequenziert und auf CRISPR-Ereignisse untersucht. **Abbildung 15** zeigt am Beispiel der Guide 534_C_18mer im px-Vektor das Ergebnis der Sequenzierung des 534-Lokus mehrerer Klone. Die Auswertung erfolgte im Programm *SnapGene*, wobei die generierten Sequenzen mit dem Originalloкус am *BEST1*-Genort abgeglichen und auf Veränderungen untersucht wurden. Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt und die Daten anschließend zusammengefasst.

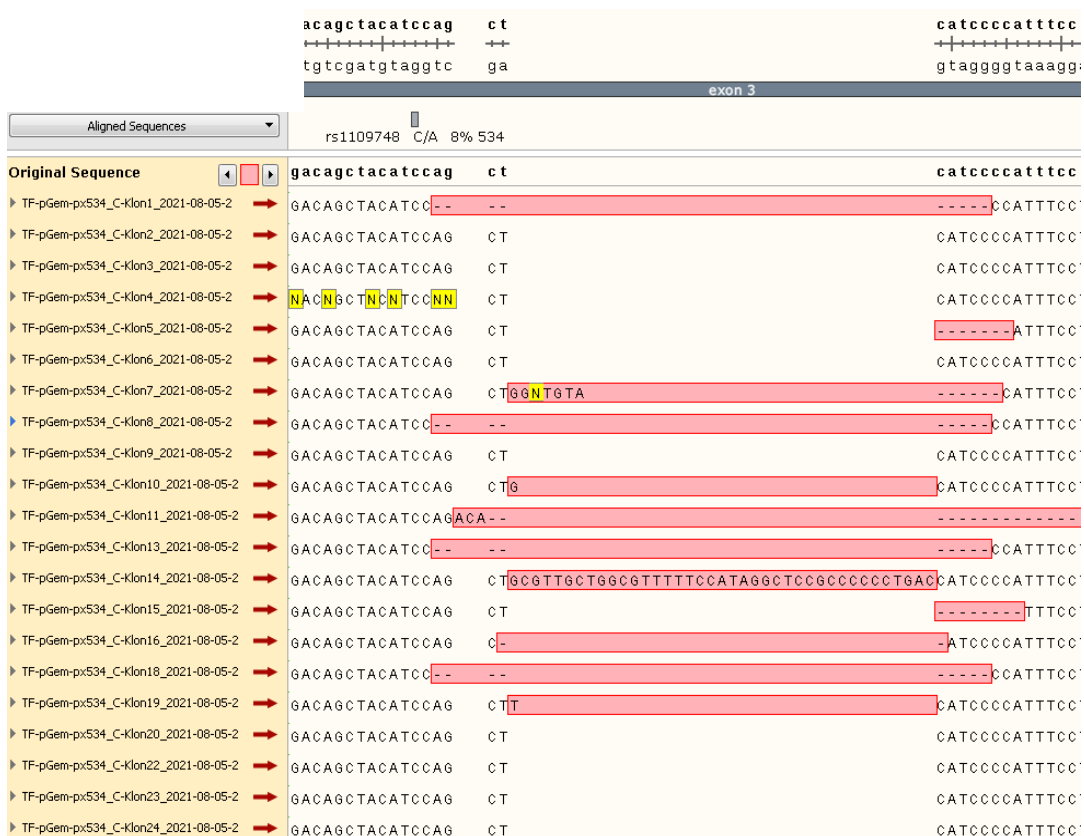


Abbildung 15: Beispielhafte Sequenzierung mehrerer Bakterienklone für den SNP 534 in *SnapGene*

Der Locus des SNPs 534 wurde aus dem pGem-T-Vektor mehrerer Bakterienklone heraus sequenziert und die resultierenden Sequenzen im Programm *SnapGene* mit dem Original-Lokus im *BEST1*-Genort abgeglichen. Rot markierte Bereiche kennzeichnen nicht übereinstimmende Abschnitte, die als durch das CRISPR/Cas9-System induzierte Mutationen gewertet wurden.

Abweichungen in der Basenabfolge zwischen Sequenzierungsprodukt und *BEST1*-Lokus am oder kurz hinter dem SNP sind rot gekennzeichnet und wurden als durch das CRISPR/Cas9-System induzierte Mutationen gewertet. Als Mutationen traten insbesondere Deletionen und Insertionen auf. Im Rahmen der Auswertung wurde für jedes Vektorkonstrukt die Anzahl der Klone mit einem solchen CRISPR-Ereignis und deren Prozentsatz an der Gesamtklonzahl bestimmt. Das Ergebnis ist in **Tabelle 52** zu sehen.

Insgesamt wurden vier CRISPR-Konstrukte auf ihre Effizienz getestet, wobei die wildtypische Cas9-Nuklease mit den beiden gezeigten Guides jeweils in den beiden Vektoren px und miniAAV kombiniert wurde. Für jedes Konstrukt ist die Anzahl der insgesamt sequenzierten Klone angegeben, sowie die Anzahl der Klone mit einem erfolgreich editierten und mit unverändertem SNP-Lokus. Zuletzt wurde die CRISPR-Effizienz bestimmt als Anteil der Klone mit CRISPR-Ereignis an der Gesamtklonzahl.

Tabelle 52: Target Sequenzierung für die Transfektion mit CRISPR-miniAAV- und px-Vektoren; n=2

Cas9-Variante	sgRNA	Vektor	Klonzahl gesamt	CRISPR- Ereignisse	Unverändert	CRISPR-Effizienz
WT-Cas	759B_C_20mer	miniAAV	81	10	71	12,3 %
		px	68	37	31	54,4 %
	534_C_18mer	miniAAV	92	8	84	8,7 %
		px	83	39	44	46,9 %

Für beide Guides gilt, dass analog zu den Versuchen im HEK293T-EGFP-Assay die Effizienz im px-Vektor deutlich besser ist als im miniAAV-Vektor. Im Falle der 534-Guide ist die Effizienz im px-Vektor knapp sechs Mal so hoch wie im miniAAV-Vektor, für die 759-Guide beträgt der Unterschied das 4-fache bis 5-fache. Vergleicht man die sgRNAs untereinander, stellt sich die 759-Guide als die effizientere von beiden heraus, sowohl im px-Vektor mit 54,4 % (759) zu 46,9 % (534), als auch im mini AAV-Vektor mit 12,3 % (759) zu 8,7 % (534). Prinzipiell kann man jedoch festhalten, dass die Transfektion eines kompletten CRISPR/Cas9-Systems, bestehend aus der wildtypischen Cas9-Nuklease und einer sgRNA, in einem einzelnen px- oder miniAAV-Vektors in HEK293T-Zellen erfolgreich zur Editierung des adressierten Genortes geführt hat. Unterschiede der Effizienz sind abhängig von der Art des Vektors und der verwendeten sgRNA.

Die vier Konstrukte sind damit sowohl in einem artifiziellen HEK293T-EGFP-Assay als auch direkt am genomischen ON-Target im nativen Zellsystem auf ihre CRISPR-Effizienz untersucht worden. Im Vergleich der beiden Guides stellt sich die 759-Guide als etwas effizienter heraus. Der Vergleich der Expressionsvektoren zeigt den px- als prinzipiell deutlich effektiver als den miniAAV-Vektor. Was das genaue Verhältnis der Aktivität angeht, tun sich zwischen den beiden Versuchen jedoch deutliche Unterschiede auf. Im HEK293T-EGFP-Assay ist die Effizienz des miniAAV-Vektors um den Faktor zwei bis drei niedriger als die des px-Vektors. Im genomischen Kontext verringert sich die Effizienz des miniAAV-Vektors drastisch und liegt um den Faktor vier bis sechs unter der des px-Vektors. Der miniAAV-Vektor als Träger des CRISPR/Cas9-Systems funktioniert im Falle eines genomischen Ziels im nativen Zellsystem also wesentlich schlechter als im HEK293T-EGFP-Assay.

6.7 Target Sequenzierung: Transfektion des dualen Vektorsystems

Eine Alternative zum miniAAV-Vektor, der beide CRISPR/Cas9-Komponenten in einem Vektorkonstrukt trägt, ist die Verwendung eines dualen Vektorsystems, wobei sgRNA und Cas9-Nuklease in separate pAAV-Vektoren kloniert und anschließend co-transfiziert bzw. co-transduziert werden. Aufgrund der stark reduzierten CRISPR-Aktivität des miniAAV am genomischen ON-Target, erfolgte ein Versuch mit dem alternativen Ansatz. Die beiden Guides 759B_C_20mer und 534_C_18mer wurden hierzu jeweils in einen pAAV-U6-sgRNA-CMV-GFP-Vektor kloniert und mit dem pAAV-RSV-SpCas9-Vektor in HEK293T-Zellen co-transfiziert. Im Unterschied zu den zuvor verwendeten miniAAV-Vektoren, beinhalten diese Vektoren ungekürzte U6- bzw. CMV-Promotoren. An den über das GFP-Signal sortierten Zellen wurde danach eine Target Sequenzierung durchgeführt, das Ergebnis zeigt **Tabelle 53**.

Tabelle 53: Target Sequenzierung für die Transfektion mit einem dualen pAAV-Vektorsystem; n=1

Cas9-Variante	sgRNA	Vektor	Klonzahl gesamt	CRISPR- Ereignisse	Unverändert	CRISPR-Effizienz
WT-Cas	759B_C_20mer	Dual pAAV	45	29	16	64,4 %
	534_C_18mer	Dual pAAV	43	22	21	51,2 %

Für beide Guides wurden die Genome von über 40 transfizierten Zellen am ON-Target auf CRISPR-Ereignisse untersucht. Für die 759-Guide ergibt sich dabei eine Effizienz von etwa 64 % und diese ist damit etwas stärker als die 534-Guide mit 51 %. Ein ähnliches Effizienzverhältnis hatte sich bereits im Versuch zuvor gezeigt (**Tabelle 52**). Im dualen System mit zwei pAAV-

Vektoren liegt die CRISPR-Effizienz beider Guides zudem etwa um den Faktor 5 über der des miniAAV-Vektors und übertrifft sogar knapp die Effizienz des px-Vektors. Mit dem dualen Transfektionsansatz für das CRISPR/Cas9-System konnte also die bisher beste CRISPR-Effizienz am ON-Target erreicht werden. Laut den Werten wird jedoch weiterhin lediglich etwas mehr als jede zweite transfizierte Zelle editiert. Hierbei gilt es allerdings auch zu beachten, dass beim FACS nur nach Zellen mit GFP-gekoppelter sgRNA sortiert wird und nicht jede Zelle, die mit sgRNA transduziert wurde, auch eine Cas9-Sequenz erhalten hat. Außerdem wurde der Versuch nur einmalig durchgeführt, wodurch es sich auch um zufällige Werte handeln kann.

6.8 Testen der Transduktionskompetenz des AAV-Vektors

Bisher wurde der AAV-Vektor als Gen-Fähre für das CRISPR/Cas9-System mittels Transfektion in Zellen integriert. Die zukünftige Behandlung soll allerdings über Transduktion erfolgen, wobei der AAV-Vektor zuvor *in vitro* Viruspartikel bilden soll, die schließlich in das Zielorgan injiziert werden und dort das Vektorpaket in das RPE einbringen. Zu diesem Zweck sollte die Kompetenz des AAV-Vektors zur Viruspartikelbildung, sowie deren allgemeine Transduktionseffizienz zunächst CRISPR-unabhängig überprüft werden. In einem entsprechenden Versuch wurde in den miniAAV-Vektor anstelle der Cas9-Sequenz die Sequenz für das GFP kloniert, dessen Fluoreszenzsignal nach erfolgreicher Transduktion als Marker für deren Effizienz dient. Die Bildung der Viruspartikel erfolgte dabei in speziellen HEK293T-AAV-Zellen, die neben dem AAV-GFP- auch mit Helfer-Plasmiden zur Expression der Hüllproteine transfiziert wurden. Die Viruspartikel wurden nach 72 h aus den Zellen isoliert und in einem Medium als fertiger Transduktionsansatz gelöst.

6.8.1 Transduktion von HEK293T-, Fibroblasten- und hiPSC-RPE-Zellen

Es wurde ein erster Transduktionsansatz mit den Helferplasmiden pAdDeltaF6 und pAAV2/2 erstellt. Diese sind spezifisch für die Produktion von Viruspartikeln des Serotyps 2, der sich für die Transduktion von Strukturen des Auges eignet (Srivastava 2016). Die Transduktionseffizienz der so generierten Viruspartikel sollte anschließend in drei verschiedenen Zelltypen getestet werden, die sich zusammensetzten aus HEK293T-Zellen, einer Zelllinie von M. Best-Patienten entnommenen primären Fibroblasten und einer daraus über iPS-Zellen differenzierten RPE-Zelllinie. In drei Proben wurde der jeweilige Zellrasen entsprechend des Transduktionsprotokolls mit dem Virusansatz versetzt und über mehrere Tage unter regelmäßigem Mediumwechsel inkubiert. Nach vier Tagen erfolgte außerdem eine

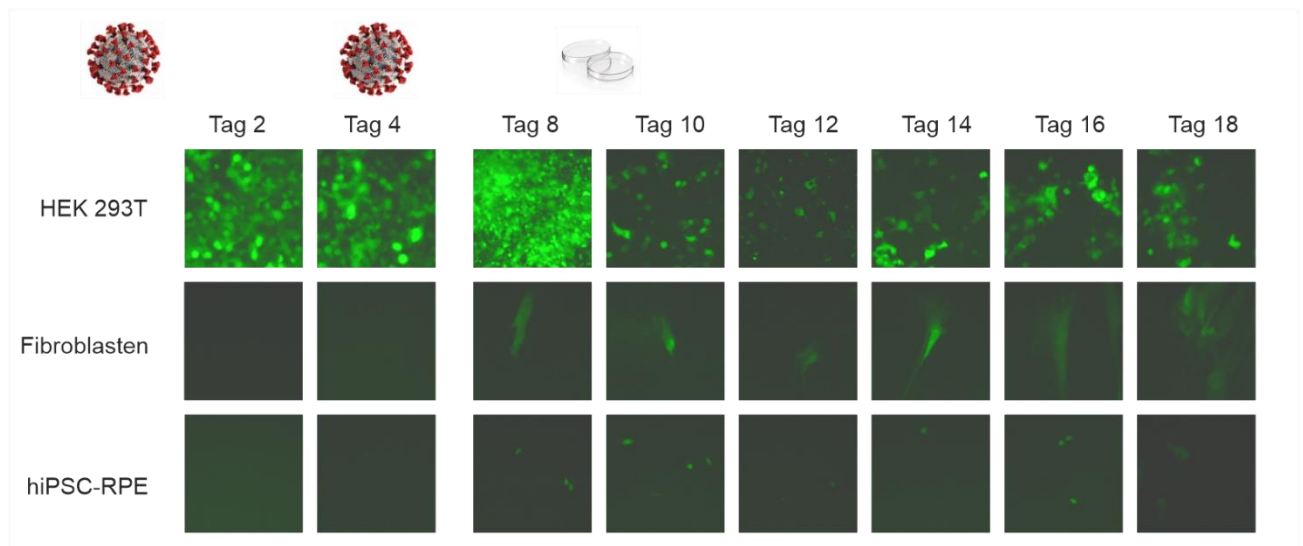


Abbildung 16: Zelluläre Fluoreszenzentwicklung nach Transduktion mit einem AAV-GFP-Vektor; n=1

HEK 293T- (oben), Fibroblasten- (Mitte) und hiPSC-RPE-Zellen (unten) wurden an Tag 0 mit dem AAV-GFP-Vektor transduziert und über 18 Tage fluoreszenzmikroskopisch auf die Entwicklung des grünen Leuchtsignals überprüft. An Tag 4 erfolgte eine zweite Transduktion und an Tag 9 ein Splitten der Zellen.

zusätzliche zweite Transduktion der Zellproben und ein Splitten der Zellen nach neun Tagen.

Die Kontrolle auf eine GFP-vermittelte grüne Fluoreszenz erfolgte mikroskopisch in regelmäßigen Abständen und die Entwicklung der Signalintensität wurde mittels Bildaufnahmen dokumentiert. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 16** dargestellt.

Infolge der ersten Transduktion entwickelten lediglich die HEK293T-Zellen ein deutliches Fluoreszenzsignal, während bei den Fibroblasten und hiPSC-RPE-Zellen keine Zelle mit entsprechend suffizienter GFP-Expression detektiert werden konnte. Aus diesem Grund erfolgte an Tag 4 die zweite Transduktion und nach vier Tagen eine erneute Kontrolle der Zellreaktion. Für die HEK293T-Zellen wurde daraufhin ein weiterhin sehr intensives Signal dokumentiert, im Falle der beiden anderen Zelllinien konnten ab diesem Zeitpunkt zumindest einzelne fluoreszierende Zellen ausgemacht werden. Dieses Muster setzte sich auch nach dem Splitten fort. Prinzipiell ließen sich die HEK293T-Zellen wesentlich besser transduzieren als die beiden Spender-Zelllinien, eine nachweisbare Transduktion fand jedoch bei allen drei Zelltypen statt, was für die grundsätzliche Kompetenz des miniAAV-Vektors spricht, funktionierende Virus-Partikel zu generieren.

6.8.2 Vergleich zweier AAV-Serotypen

Für den in **6.8.1** beschriebenen Versuch wurden zur Virusproduktion des Serotyps 2 (AAV2) die Helferplasmide pAdDeltaF6 und pAAV2/2 eingesetzt. Eine weitere Option stellt das Plasmid pDGM6 für den Serotyp 6 (AAV6) dar, dem in früheren Arbeiten ebenfalls eine

Kompetenz zur Transduktion von RPE-Zellen nachgewiesen werden konnte (Song et al. 2018). Die Transduktionseffizienz der durch diese beiden Systeme generierten Viren sollte nun verglichen werden, indem zum einen HEK293T-, zum anderen hiPSC-RPE-Zellen mit dem AAV-GFP-Vektor transduziert, über sieben Tage inkubiert und die GFP-vermittelte Fluoreszenz mikroskopisch dokumentiert wurde. Die jeweiligen Aufnahmen sind in **Abbildung 17** gegenübergestellt.

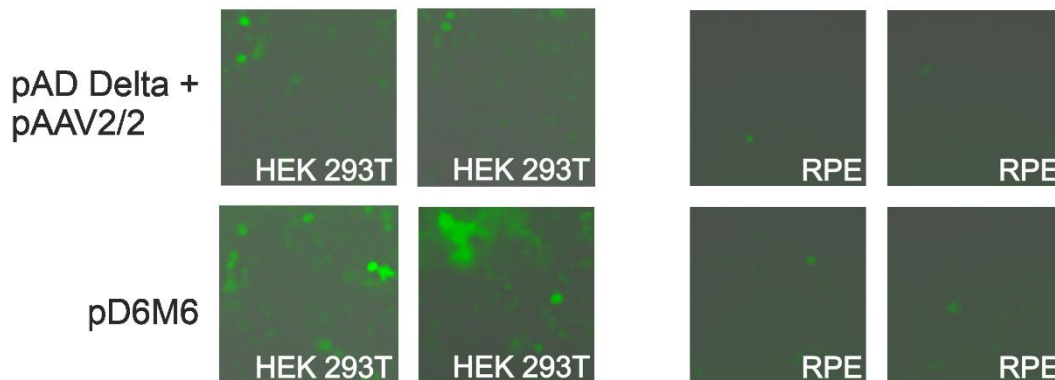


Abbildung 17: Zelluläre Fluoreszenzentwicklung nach Transduktion verschiedener AAV-Serotypen; n=1

Für den AAV-GFP-Vektor wurden mittels zweier verschiedener Helferplasmid-Systeme zwei separate Transduktionsansätze mit Viruspartikeln generiert. Für eine Probe wurden die beiden Helferplasmide pAdDeltaF6 und pAAV2/2 verwendet, für die zweite Probe das Plasmid pDGM6. HEK293T- und hiPSC-RPE-Zellen wurden separat mit den Virusüberständen transduziert, über sieben Tage inkubiert und schließlich mikroskopische Bilder der zellulären Fluoreszenz aufgenommen.

Zunächst lässt sich festhalten, dass sich auch in diesem Versuch die HEK293T-Zellen deutlich besser transduzieren ließen als die hiPSC-RPE-Zellen, die nur sehr vereinzelt das GFP in erkennbarer Menge exprimieren. Beim Vergleich der Helferplasmide fällt auf, dass insbesondere im Falle der HEK293T-Zellen die Proben nach Behandlung mit pDGM6-gebildeten Viren eine etwas deutlichere Fluoreszenz aufweisen als solche nach Transduktion mit den Helferplasmiden pAdDeltaF6 und pAAV2/2. In den hiPSC-RPE-Zellen ist dieser Unterschied marginal, aber vorhanden. Allgemein zeigen die mit pDGM6-Viren transduzierten Proben eine höhere Signalintensität, was auf eine bessere Transduktionseffizienz der erzeugten Viruspartikel schließen lässt.

6.9 Transduktion des dualen pAAV-Vektor-Systems

Nach den Tests zur Editierungseffizienz der CRISPR/Cas9-Komponenten und der Transduktionseffizienz von Viruspartikeln des AAV-Vektors sollten nun beide Eigenschaften kombiniert und in einem dualen Transduktionsversuch mit anschließender Bestimmung der CRISPR-Effizienz am genomischen ON-Target im Zellsystem untersucht werden. In separaten Proben wurden für die Vektoren der Cas9-Nuklease (pAAV-RSV-SpCas9) und der beiden

Guides 759 und 534 (pAAV-U6-sgRNA-CMV-GFP) mithilfe des pDGM6-Helferplasmids Viruspartikel-Ansätze generiert und die Ziel-HEK293T-Zellen mit jeweils 1 ml Cas9-Virus und Guide-Virusüberstand transduziert. Das Ergebnis der abschließenden Target Sequenzierung ist in **Tabelle 54** zu sehen.

Tabelle 54: Ergebnis der Target Sequenzierung für die duale Transduktion von HEK293T-Zellen; n=1

Cas9-Variante	sgRNA	Vektor	Klonzahl gesamt	CRISPR- Ereignisse	Unverändert	CRISPR-Effizienz
WT-Cas	759B_C_20mer	Dual pAAV	48	25	23	52,1 %
	534_C_18mer	Dual pAAV	44	7	37	15,9 %

Für beide Guides wurden zwischen 40 und 50 transduzierte Zellen auf CRISPR-Ereignisse untersucht, wobei für beide Guides erfolgreich CRISPR-Ereignisse nachgewiesen werden konnten. Die Guide 759B_C_20mer hat dabei etwa jede zweite Zelle editiert, die Guide 534_C_18mer nur etwa jede sechste. Interessant ist nun der Vergleich zwischen dualer pAAV-Transduktion und dualer pAAV-Transfektion der CRISPR/Cas9-Komponenten. Für die 759-Guide bedeutet die Transduktion einen Verlust der CRISPR-Effizienz um 12 %-Punkte, liegt damit allerdings noch etwas über 50 %. Bei der 534-Guide dagegen war ein stärkerer Effizienz-Verlust zu beobachten von etwa 50 % zuvor auf nun 16 %. Da es sich hier jedoch nur um einen einmaligen Versuch handelt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um zufällig entstandene Werte handelt.

Die duale Transduktion der CRISPR-Komponenten führt im Falle der sgRNA_759B_C_20mer zu einer soliden CRISPR-Effizienz von rund 50 % und liegt damit sogar über der des einzelnen px-Vektors. Für die 759-Guide kann dieser Ansatz also durchaus erfolgsversprechend sein. Bei der sgRNA_534_C_20mer dagegen resultierte ein deutlicher Effizienz-Verlust durch die Transduktion auf ein Niveau, welches sich weniger für einen praktischen Ansatz anbietet.

7 Diskussion

M. Best als hereditärer Retinopathie liegt als Pathomechanismus ein dominant-negativer Effekt eines mutierten Allels des *BEST1*-Gens zugrunde, welcher sich möglicherweise gentherapeutisch *in vivo* über eine CRISPR/Cas9-vermittelte Allel-spezifische Editierung des entsprechend mutierten *BEST1*-Allels adressieren lässt, wobei heterozygot vorliegende Mutationen oder SNPs zur Allel-Diskriminierung genutzt werden können. Als praktischer Therapieansatz wurde ein modifizierter, *All-in-one*-CRISPR-miniAAV-Vektor mit verkürzten Promotoren erwogen. Er sollte als Vehikel für die Sequenzen einer SNP-spezifischen sgRNA und SpCas9-Nuklease dienen, die über virale Transduktion in das Zielgewebe des RPE eingebracht werden. In Vorarbeiten wurden bereits Analysen hinsichtlich geeigneter SNPs durchgeführt und mit der Optimierung entsprechender sgRNAs in px-Vektoren experimentiert. Diese Arbeit beschäftigte sich nun mit *in vitro* Testungen von CRISPR-miniAAV-Vektoren, wobei die CRISPR-Funktion mit optimierten Varianten der SpCas9-Nuklease evaluiert werden sollte, die an funktionellen Stellen zur DNA-Bindung modifiziert worden waren. Diese Varianten sollten anhand drei hinsichtlich ihrer Spezifität problematischer SNP-spezifischer sgRNAs geprüft werden, mit dem Ziel, eine Verbesserung der Effizienz und Spezifität des CRISPR/Cas9-Systems zu erreichen. Letztendlich sollten vielversprechende Kombinationen aus Guide, Cas9-Variante und Transportmethode ermittelt werden, die sich für eine virale Transduktion in Zielzellen eignen.

Ausgehend von den Ergebnissen der HEK293T-EGFP-Assays zeigte sich allerdings, dass die angestrebte Optimierung des CRISPR/Cas9-Systems über modifizierte Varianten der SpCas9-Nuklease für drei, das *BEST1*-Gen targetierende sgRNAs nicht erfolgreich war. Die mittels Mutagenese generierten Cas9-Konstrukte zeigten für die verwendeten SNP-spezifischen sgRNAs eine konstant niedrige bis keine Aktivität. Eine generelle Funktionstüchtigkeit konnte lediglich für eines der Konstrukte (Spmut-Cas9) anhand einer Positivkontrolle für die sgRNA eines Protospacers im *EMX1*-Gen festgestellt werden. Überraschenderweise zeigte sich allerdings bei der wildtypischen Cas9-Nuklease im miniAAV-Vektor für alle getesteten SNP-Guides eine konsequente Verbesserung der Spezifität im Vergleich zum herkömmlichen px-Vektor. Diese Optimierung ging allerdings auf Kosten der Effizienz, welche insbesondere bei darauffolgenden Versuchen am genomischen Locus im Zellsystem relativ zur Aktivität im px-Vektor stark abnahm. Überzeugende Ergebnisse einer verbesserten CRISPR-Effizienz konnten

hier mit der Alternative eines dualen pAAV-Transportsystem erreicht werden. Zuletzt erfolgte die Anwendung dieser CRISPR-pAAV-Vektoren in einem Transduktionsversuch mit viralen Partikeln, wobei sich suffiziente CRISPR-Effizienzen nur teilweise einstellten.

Eine Optimierung des CRISPR/Cas9-Systems hinsichtlich der Spezifität im HEK293T-EGFP-Assay wurde überraschenderweise nicht durch die Modifikation der Cas9-Nuklease, sondern durch die Kombination der wildtypischen Cas9 mit einem modifizierten miniAAV-Vektor erreicht. Jedoch ist aufgrund der mangelnden Aktivität insbesondere am genomischen ON-Target am *BEST1*-Lokus die Verwendung eines *All-in-one*-CRISPR-miniAAV-Vektors im Allgemeinen als therapeutische Option ineffizient und muss überdacht werden. Ein Ansatz mit einem dualen pAAV-Vektorsystem könnte hier eine vielversprechende Alternative sein. Eine Optimierung des CRISPR/Cas9-Systems über die Modifikation von sgRNA oder SpCas9-Nuklease kann dabei weiterhin hilfreich sein, es sind allerdings zusätzliche Versuche notwendig, um im Einzelnen die besten Kombinationen aus Vektor, Guide und Cas9 zu ermitteln. Die Strategie, dabei lediglich auf exonische SNPs zu setzen, reduziert dabei möglicherweise den Aufwand. Weiterführende Arbeiten werden insbesondere die Testung des CRISPR-AAV-Systems in hiPSC-RPE-Zellen von BVMD-Patienten beinhalten, welche das eigentliche Zielgewebe darstellen. Dabei wird neben dem Nachweis einer stabilen Effizienz am ON-Target vor allem eine Analyse der genomweiten OFF-Target-Aktivität eine zentrale Rolle einnehmen. Zuletzt muss außerdem eine immunologische Reaktion der Zellen auf das virale Material ausgeschlossen werden.

7.1 Evaluation der optimierten Cas9-Konstrukte im miniAAV-Vektor

Die modifizierten SpCas9-Varianten haben in den HEK293T-EGFP-Assays für die drei getesteten SNP-spezifischen Guides keine Optimierung der CRISPR-Spezifität gezeigt (**Abbildung 9-11**). Diese Entwicklung steht in Kontrast zu den aus der Literatur bekannten Erkenntnissen, wobei mit den Opt-Cas9-Varianten für viele getestet sgRNAs eine deutliche Verbesserung der Spezifität unter Erhalt der Effizienz erreicht werden konnte, verglichen mit der wildtypischen Cas9 (Kleinstiver et al. 2016b; Slaymaker et al. 2016). Die Optimierungs-Strategie beruhte hier auf der Schwächung initialer zwischenmolekularer Bindungen der SpCas9-Nuklease mit dem DNA-Strang, um so die spezifische Bindung der sgRNA an die Protospacer-Sequenz mehr zu gewichten. In der praktischen Umsetzung wurden die für die Cas9-Bindung verantwortlichen polaren Aminosäuren in der Polypeptidstruktur ausfindig

gemacht und an diesen Positionen durch die unpolare Aminosäure Alanin ersetzt. Nach Experimenten mit unterschiedlicher Anzahl und Position dieser AS-Austausche wurden die effizientesten SpCas9-Varianten identifiziert, die zu Beginn dieser Arbeit auch erfolgreich reproduziert werden konnten. In vorherigen Arbeiten waren bereits sgRNAs für einige der 22 adressierbaren SNPs im *BEST1*-Gen hinsichtlich ihrer CRISPR-Aktivität in HEK293T-EGFP-Assays und ihrem Optimierungspotenzial getestet worden. Dabei hatten sich die beiden exonischen Guides 749_A_20mer und 756_C1_20mer als insuffizient und optimierungsresistent herausgestellt. Anhand dieser Problemkandidaten sollte nun ein Optimierungsversuch mit den optimierten Cas9-Varianten unternommen werden. Zusätzlich wurde die sgRNA_759B_C_20mer hinzugezogen, die in den bisherigen Vorarbeiten noch nicht untersucht worden war. Für die HEK293T-EGFP-Assays wurde von den Opt-Cas9-Konstrukten eine stabile ON-Target-Aktivität auf ähnlichem Niveau erwartet wie die der WT-Cas9, bei einer gleichzeitig verminderten OFF-Target Aktivität, die bestenfalls im Bereich der Leerkontrolle liegen sollte.

Im Vergleich zur EGxxFP-Leerkontrolle zeigten die Konstrukte jedoch kaum bis keine CRISPR-Aktivität am ON-Target und somit eine schlechte Effizienz. Die OFF-Target-Aktivität verblieb ebenfalls auf dem Kontrollniveau. Zwischen ON- und OFF-Targets ergaben sich demnach keine klar abgrenzbaren Unterschiede oder Tendenzen, weshalb auch keine Aussage über die Spezifität getroffen werden kann. Es stellte sich eher die Frage, ob die Konstrukte überhaupt funktionieren. Allein das Konstrukt der Spmut-Cas9 lässt eine schwache ON-Target-Aktivität im Fall der 759-Guide vermuten (**Abbildung 11**). Die wildtypische Cas9-Nuklease im miniAAV-Vektor diene als Referenz zu den modifizierten Cas9-Konstrukten. Im HEK293T-EGFP-Assay zeigte sie eine konstant hohe ON-Target-Aktivität und ist somit der einzige CRISPR-miniAAV-Vektor, bei dem sich eine suffiziente CRISPR-Effizienz nachweisen lässt. Damit konnte zumindest gezeigt werden, dass der miniAAV-Vektor und der HEK293T-EGFP-Assay entsprechend des in **Abbildung 8** dargestellten Schemas funktioniert. Darüber hinaus offenbarte die WT-Cas9 überraschenderweise für alle drei SNP-Guides eine konstant niedrige OFF-Target-Aktivität. Im Fall der 749-Guide lag sie sogar auf Höhe des Basisniveaus, auch wenn es sich hier um die Schwächste aller getesteten sgRNAs handelte (**Abbildung 9**). Die WT-Cas9 wies im miniAAV-Vektor somit eine unerwartet gute Spezifität auf, was im Vergleich zu den HEK293T-EGFP-Assays aus den Vorarbeiten (**Abbildung 5**) eine deutliche Verbesserung bei erhaltener Effizienz darstellt. Die Positivkontrolle des über die Firma *Addgene* bestellten e1.1-

Cas9-Konstrukts ließ unabhängig vom Expressionsvektor sowohl im miniAAV, als auch im px-Vektor kaum bis keine Aktivität erkennen und präsentierte sich damit ähnlich insuffizient, wie die eigens im Institut reproduzierte Variante. Das Problem scheint damit nicht bei der Reproduktion der Konstrukte, sondern eher an deren Interaktion mit sgRNAs und Zielsequenzen zu liegen. Zur Überprüfung, ob die Opt-Cas9-Konstrukte überhaupt funktionieren, wurde als Positivkontrolle die Guide für einen Protospacer des *EMX1*-Gens herangezogen (**Abbildung 12**), deren Testung mit den Konstrukten in der Literatur bereits umfassend beschrieben war (Slaymaker et al. 2016; Kleinstiver et al. 2016b). Es ist anzumerken, dass hier lediglich die Effizienz überprüft wurde, ohne OFF-Target-Effekte zu berücksichtigen. Für die Variante der Spmut-Cas9 konnte hier eine deutliche ON-Target-Aktivität verzeichnet werden, die auch erheblich über die der WT-Cas9 hinausging. Die übrigen Konstrukte dagegen ließen erneut keine CRISPR-Aktivität erkennen.

Aufgrund der Tatsache, dass die Opt-Cas9-Konstrukte unabhängig vom Expressionsvektor eine ungenügende CRISPR-Aktivität im Vergleich zur WT-Cas9 aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass die Modifizierungen der Cas9-Nuklease für die niedrige Effizienz verantwortlich sind. Diese Eingriffe in die Enzymstruktur können einen negativen Einfluss auf die Interaktion mit sgRNA und der Bildung des CRISPR/Cas9-Komplexes haben. Ähnliche Effekte wurden bereits bei Strukturveränderungen der sgRNA beobachtet, die eine kompromittierte Interaktion mit der SpCas9 zur Folge hatten (O'Reilly et al. 2019). Es konnte zudem ausgeschlossen werden, dass der Fehler allein am Mutageneseprozess zur Generierung der Konstrukte liegt, da die kommerziell erworbene Positivkontrolle der e1.1-Cas9-Varianten ebenfalls keine Reaktion gezeigt hat, weder im miniAAV- noch im px-Vektor. Ein wichtiger Befund war die hohe ON-Target-Aktivität, die von der Spmut-Cas9 mit der *EMX1*-Guide erreicht werden konnte. Damit liegt der Nachweis für die prinzipielle Funktionstüchtigkeit zumindest einer der Cas9-Varianten und die vermutlich erfolgreiche Rekonstruktion der Spmut-Cas9 durch Mutagenese in Anlehnung an die Literatur vor. Vollständige Gewissheit konnte jedoch nicht erreicht werden, da keine Aussage über die Spezifität und OFF-Target-Aktivität möglich ist. Die wichtige Erkenntnis ist jedoch, dass sich die Cas9-Varianten in dieser Form nicht für die Verwendung mit den drei SNP-Guides eignen, da die Funktion vermutlich stark Guide-abhängig ist und bestimmte, bisher nicht genau definierbare Umstände erfordert. Die WT-Cas9 präsentierte sich dagegen nicht nur mit einer deutlich stärkeren Effizienz, sondern auch mit einer stark verbesserten Spezifität. Hier scheint die Kombination mit dem

erstmals getesteten miniAAV-Vektor eine entscheidende Rolle zu spielen. Dieser zeichnet sich aus durch verkürzte Sequenzen des mini159bp-CMV-Promotors für die Cas9-Nuklease. Eine solche Verkürzung kann gleichbedeutend sein mit einer schwächeren Funktion und damit verminderter Expression. Dabei ist bekannt, dass sich eine Verringerung der OFF-Target-Aktivität und somit Verbesserung der Spezifität, wie hier beobachtet, durch die Verringerung der Cas9-Expression erreichen lässt (Li et al. 2019). Dies erscheint sinnvoll in Anbetracht einer niedrigeren Cas9-Konzentration in der Zelle und somit geringerer Aktivität. Daraus lässt sich schließen, dass der verkürzte Cas9-Promotor im miniAAV im Vergleich zum px-Vektor eine entsprechend schwächere Expression bewirkt, die zu einer geringeren OFF-Target-Aktivität führt. Alternativ kämen für einen solchen Expressionsverlust auch die Enzymmodifikationen an sich infrage, ein entsprechender Effekt wurde allerdings in der Arbeit von Kleinstiver et al. 2016 ausgeschlossen.

Zur Untersuchung der Expressionsraten und dem Cas9-Gehalt in den Zellen der HEK293T-EGFP-Assays wurden anschließend Western Blot-Analysen durchgeführt. Hierbei sollte der Frage nachgegangen werden, ob die verkürzten Regulator-Sequenzen des miniAAV-Vektors eine geringere Expression der Cas9-Nukleasen bewirken und ob die deutlich bessere Effizienz der WT-Cas9 im Vergleich zu den Opt-Cas9 auch auf einer höheren Expression beruht. Bei der Quantifizierung der Western Blots zeigte sich schließlich, dass die Konstrukte im miniAAV-Vektor verglichen zur Positivkontrolle im px-Vektor eine deutlich geringere, aber untereinander ähnliche Expressionsrate aufwiesen (**Abbildung 13**). Damit ergab sich grundsätzlich ein anderes Muster als in den HEK293T-EGFP-Assays, wobei die WT-Cas9 die höchste ON-Target-Aktivität zeigte bei gleichzeitig schwacher Expressionsrate im Western Blot. Umgekehrt wurde das Ae1.1-px-Konstrukt am stärksten exprimiert, hatte aber eine deutlich niedrigere CRISPR-Effizienz. Diese Befunde zeigen den schwächenden Einfluss des miniAAV-Vektors und der verkürzten Promotor-Sequenzen auf die Expression der Cas9-Nuklease und erklären somit die verbesserte Spezifität der WT-Cas9 im HEK293T-EGFP-Assay (Li et al. 2019). Dabei darf jedoch nicht der Einfluss einer solchen Expressionsschwäche auf die Effizienz vernachlässigt werden. Dass entsprechend modifizierte Promotoren einen solchen Effekt ausüben können, wurde bereits festgestellt (Senís et al. 2014). Gleichzeitig lässt sich ausschließen, dass die geringe CRISPR-Aktivität der Opt-Cas9-Konstrukte auch auf einer geringeren Expression beruht, da insbesondere der Ae1.1-Cas9-px-Vektor zwar hoch-exprimiert, aber kaum CRISPR-aktiv ist. Damit sind sehr wahrscheinlich die Modifikationen der

Konstrukte für die Funktionseinschränkung verantwortlich, ohne großen Einfluss auf die Expression zu haben (Kleinstiver et al. 2016b). Vorerst kann die verminderte Expressionsrate der WT-Cas9 als plausible Erklärung für die gesteigerte Spezifität im miniAAV-Vektor dienen. Dagegen ist sie nicht der Grund für die konsequent schwache Aktivität der modifizierten Opt-Cas9-Konstrukte.

Auf der Suche nach Erklärungen für die schlechte Effizienz der Opt-Cas9-Konstrukte muss ein Vergleich zu den früheren Arbeiten von Kleinstiver et al. (2016) und Slaymaker et al. (2016) gezogen werden. Die Aussage, durch die modifizierten Cas9-Nukleasen würden eine Verbesserung der Spezifität bei Erhaltung der Effizienz erreicht, steht dabei in Konflikt mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen und der konsequent niedrigen Aktivitäten der Opt-Cas9-Konstrukte. Zum einen verwendeten Kleinstiver et al. (2016) bei der Konstruktion der HiFi-Cas9 eine auf den menschlichen Expressionsapparat angepasste DNA-Sequenz der SpCas9-Nuklease, die überwiegend andere Basentriplets beinhalten als die bakterielle SpCas9, welche für unsere Versuche herangezogen wurde. Die Aminosäuresequenz blieb dabei stets gleich, eine Vergleichbarkeit wird damit allerdings erschwert. Im Falle der e1.0-Cas9 von Slaymaker et al. (2016) offenbarte sich ebenfalls an einem Mutageneselokus die Verwendung eines abweichenden Basentriplets. Der Effekt dieser Abweichung ist jedoch als gering zu bewerten, da die Varianten der Spmut-Cas9 und e1.1-Cas9 in ihren Sequenzen identisch zu unseren Konstrukten waren und sich in den Versuchen keine signifikant besseren Ergebnisse zeigten. Im Weiteren wurden die Cas9-Varianten in beiden Arbeiten überwiegend mit Guides getestet, die am 5'-Ende ein oder mehrere Guanin-Basen aufweisen, was als gängige Praxis und vorteilhaft beschrieben wird, um eine bessere Spezifität und Effizienz der CRISPR-Funktion zu erreichen (Cho et al. 2014; Kleinstiver et al. 2016a; Nahar et al. 2018). In dieser Arbeit lag einzig bei der 756-Guide ein 5'-G vor. Allein dieser Faktor kann bei der 749- und 759-Guide zu einer prinzipiell schlechteren Funktion führen und ist ein ständiges Hindernis für den Therapieansatz, da das sgRNA-Design hauptsächlich von der Lage des SNP abhängig ist und wenig Einfluss auf die Zusammensetzung des 5'-Endes genommen werden kann. Im Zusammenhang mit modifizierten Cas9-Varianten wird auch nicht empfohlen ein solches Guanin-haltiges 5'-Ende zu forcieren und *Mismatches* zu riskieren, weil die Effizienz darunter leidet (Kleinstiver et al. 2016a). Prinzipiell zeigen die Cas9-Konstrukte aber auch für die 756-Guide mit einem Guanin-haltigen 5'-Ende keine höhere Aktivität, die Funktion der Cas9-Varianten ist für alle SNP-Guides vergleichbar ungünstig. Es ist also zu bezweifeln, dass

dieser Faktor einen größeren Einfluss hat. Eine gemeinsame Erkenntnis aus der Literatur ist außerdem, dass die optimierten Cas9-Varianten eine Inkompatibilität mit trunkierten sgRNAs aufweisen, was ebenfalls eine Optimierungsmöglichkeit des CRISPR/Cas9-Systems darstellt (Fu et al. 2014a). Entsprechende Versuche der Kombination optimierter Cas9-Nukleasen und optimierter sgRNAs ließen eine deutliche Verschlechterung der allgemeinen CRISPR-Effizienz erkennen. Optimierung bedeutet bei beiden Komponenten, Schwächung der DNA-Interaktion zur Vermeidung marginal inkompatibler OFF-Targets. Wird dabei allerdings eine gewisse Grenze überschritten, verringert sich auch das Bindungsvermögen am ON-Target. Am Institut waren solche modifizierten Guide-RNAs für die entsprechenden SNPs bereits getestet worden und eine spätere Kombination mit den generierten Opt-Cas9-Konstrukten vorgesehen.

Zuletzt unterscheidet sich die grundsätzliche Testmethode, z.B. ist bei Kleinstiver et al. (2016) und Slaymaker et al. (2016) der Transport mit einem dualen Vektor-System erfolgt, während in dieser Arbeit die Konstrukte mit dem noch kaum erprobten miniAAV-Vektor kombiniert wurden. Darüber hinaus waren die genannten Arbeitsgruppen wesentlich freier in der Auswahl und dem Design der sgRNAs, als es in dieser Arbeit durch den vorgegebenen SNP-Bezug der Fall ist. Unter den vielen getesteten Guides wird jedoch neben einer Verbesserung der CRISPR-Aktivität auch eine Abnahme der Effizienz für einige sgRNAs beschrieben, was eine gewisse Guide-Abhängigkeit für die Funktion der Cas9-Nuklease andeutet. Am Ende steht die Feststellung, dass wesentliche Faktoren für den hier angestrebten Therapieansatz mit den modifizierten Cas9-Varianten nicht umsetzbar sind. Die Funktion der Opt-Cas9-Konstrukte scheint an besondere Bedingungen gebunden zu sein, die sie relativ empfindlich und unflexibel machen, beispielsweise gegenüber der Kombination mit trunkierten Guide-RNAs. Darüber hinaus erschweren zahlreiche methodische Unterschiede einen direkten Vergleich. Durch die größere Freiheit im Versuchsdesign von Kleinstiver et al. (2016) und Slaymaker et al. (2016) kann außerdem eine Verzerrung der Ergebnisse ins Positive vorliegen. Neben einer erheblichen Optimierung der CRISPR-Funktion für einige Guides wird für andere bereits eine Abnahme der Effizienz beschrieben. Funktion und Optimierbarkeit der Cas9-Varianten weisen also eine gewisse Guide-Abhängigkeit auf. Die Inkompatibilität der modifizierten Cas9-Varianten mit modifizierten Guides kann sich zudem auch auf die Kombination mit modifizierten Promotor-Sequenzen übertragen, wie sie im miniAAV-Vektor vorliegen. Dies würde die beschriebene Guide-Abhängigkeit steigern und erklärt, warum in der EMX1-Kontrolle lediglich die Spmut-Cas9 funktioniert.

Es ist anzumerken, dass dieses Projekt auf ein Therapiekonzept hinarbeitet und die Ziele deshalb praxisorientiert und nicht grundlagenorientiert formuliert wurden. Es stellte sich deshalb die Frage, ob die Opt-Cas9-Varianten speziell für diesen Therapieansatz und speziell für die gewählten SNP-Guides anwendbar sind. Welche Faktoren einen Einfluss auf die Funktion haben und unter welchen Bedingungen die Cas9-Varianten am besten funktionieren, war nicht die primäre Fragestellung, da die Bedingungen bereits durch das Therapiekonzept vorgegeben waren und die Cas9-Konstrukte auch direkt unter diesen Bedingungen getestet wurden. Die Analyse der Opt-Cas9-Varianten in Kombination mit dem miniAAV-Vektor für diesen BVMD-assoziierten Therapieansatz sind somit vermutlich eher ungeeignet. Die Modifikation hat eine gewisse Empfindlichkeit der Cas9-Varianten gegenüber den Funktionsbedingungen zur Folge, was womöglich zu einer Inkompatibilität mit dem ebenfalls modifizierten miniAAV-Vektor, trunkierten sgRNAs und zu einer starken Abhängigkeit vom Guide-Design geführt hat. Daraus ergibt sich ein eher umschriebener und sehr spezifischer Anwendungsbereich, der sich nicht mit den besonderen Bedingungen des angestrebten therapeutischen Konzepts vereinbaren lässt. Mit diesem Fazit findet sich ein Abschluss für das Optimierungsprojekt des CRISPR/Cas9-Systems und dem Versuch, durch Modifizierung der sgRNA oder der Cas9-Nuklease eine Verbesserung der CRISPR-Funktion in Spezifität und Effizienz zu erreichen. Die Modifizierung der Cas9-Nuklease kann dabei grundsätzlich eine Möglichkeit zur Verbesserung der Spezifität einzelner Guides sein, dies muss allerdings evidenzbasiert für jeden Einzelfall ermittelt werden, da momentan keine Regelmäßigkeit erkennbar ist.

Unabhängig davon ergab sich die unerwartete Erkenntnis, dass allein die Kombination der wildtypischen Cas9-Nuklease mit dem miniAAV-Vektor zu einer Verbesserung der Spezifität führen kann. Im Folgenden sollte der miniAAV-Vektor in einem HEK293T-EGFP-Assay direkt mit den Ergebnissen der Vorarbeiten im px-Vektor verglichen werden, wobei die beiden Vektoren WT-Cas9-miniAAV und WT-Cas9-px mit den zwei starken Guides 759B_C_20mer und 534_C_18mer getestet wurden (**Abbildung 14**). Da für den miniAAV-Vektor bereits eine schwächere Expression nachgewiesen werden konnte, wurde hinsichtlich der CRISPR-Aktivität eine Verbesserung der Spezifität bei leicht verminderter Effizienz erwartet. Im HEK293T-EGFP-Assay hat sich diese Erwartung bestätigt. Beide Guides zeigten Vektor-abhängig eine ähnlich gute Effizienz, die ON-Target-Aktivität im miniAAV-Vektor war jedoch in beiden Fällen um etwa die Hälfte geringer als die im px-Vektor. Anhand der 759-Guide ließ sich schließlich sehr

gut die parallele Verbesserung der Spezifität im Gegensatz zum px-Vektor erkennen, mit einer OFF-Target-Aktivität auf Niveau der Leerkontrolle. Die 534-Guide zeigte diese Spezifität bereits im px-Vektor. Dies erklärt sich vermutlich durch den *In-PAM*-Charakter dieses SNP, der als Variante eine neue PAM-Sequenz bildet, wodurch die entsprechende Guide hochspezifisch wird (Wu et al. 2020; Jiang et al. 2013).

Wie erwartet konnte durch den miniAAV-Vektor nur bei der 759-Guide eine Spezifizierung erreicht werden. Dabei ist jedoch auffällig, dass die ON-Target-Aktivität in etwa um denselben Betrag abnahm wie die OFF-Target-Aktivität. Die Effizienz ist somit im negativen Sinne genauso von den verkürzten Promotoren und der verminderten Expression betroffen wie die Spezifität, was auch den Erkenntnissen der Literatur entspricht (Senís et al. 2014).

7.2 Evaluation verschiedener CRISPR-AAV-Vektoren am genomischen Target

Anhand des CRISPR/Cas9-Systems aus WT-Cas9 und den beiden Guides 759B_C_20mer und 534_C_18mer sollte der miniAAV-Vektor schließlich zum einen mit dem px-Vektor als Referenz, zum anderen mit einem dualen pAAV-Vektorsystem verglichen werden, wobei im letzteren Falle Cas9 und sgRNA in separate pAAV-Vektoren kloniert und anschließend co-transfiziert wurden (**Tabelle 53**). Für die CRISPR-Aktivität im miniAAV-Vektor war im Vergleich zum px-Vektor wieder eine geringere Effizienz zu erkennen. Für beide Guides konnten CRISPR-Ereignisse festgestellt werden, wobei die 759-Guide tendenziell eine höhere Effizienz aufwies. Beim Vergleich der CRISPR-Effizienzen zwischen beiden Vektor-Typen waren deutliche Unterschiede auszumachen. Im HEK293T-EGFP-Assay betrug die Effizienz für den miniAAV-Vektor ca. die Hälfte des px-Vektors. Am genomischen Target im Zellsystem zeigte der miniAAV nur noch eine Effizienz von 9-12 %, was um den Faktor 4 bis 5 schwächer ist als die des px-Vektors mit einer Effizienz um die 50 %. Das beste Ergebnis für beide Guides wurde dagegen mit dem dualen pAAV-System erreicht mit einer Effizienz für die 759-sgRNA von 64 %, jedoch lediglich in einem einfach durchgeführten Versuch ohne Ausschluss zufällig entstandener Werte. Hier ist eine Wiederholung der Versuchsreihe notwendig, um das Ergebnis zu replizieren. Für den miniAAV-Vektor liegt also ein deutlicher Verlust der CRISPR-Effizienz am genomischen ON-Target vor. Auf genomischer Ebene scheint die Expressionsrate und die damit verbundene Verfügbarkeit der Cas9-Nuklease eine weitaus größere Rolle zu spielen als im HEK293T-EGFP-Assay, da insgesamt ein größeres Spektrum an einflussnehmenden Faktoren möglich ist, wobei die Mechanismen größtenteils undefiniert

bleiben. Der duale Vektor-Ansatz präsentierte sich schließlich als der effizienteste. Eine Überlegenheit der dualen Vektor-Transfektion gegenüber eines single Vektors konnte bereits in der Literatur gezeigt werden (Tabebordbar et al. 2016). Nachteile wie die Voraussetzung, dass dieselbe Zelle von beiden Vektoren transduziert werden muss, werden dabei vermutlich von Vorteilen hinsichtlich einer erhöhten Expression ausgeglichen.

Es kann festgehalten werden, dass der *All-in-one*-CRISPR-miniAAV-Vektor auf genomischer Ebene eine vorhandene, aber sehr schlechte CRISPR-Effizienz aufweist und sich in dieser Form nicht für einen therapeutischen Einsatz eignet. Dabei scheint eine zu geringe Cas9-Expression im miniAAV-Vektor das Hauptproblem darzustellen. Eine effiziente Alternative könnte der Ansatz mit einem dualen pAAV-Vektor-System bieten.

7.3 Evaluation der viralen Transduktionskompetenz von CRISPR-AAV-Vektoren

Neben der Funktion des CRISPR/Cas9-Systems ist ein weiterer limitierender Faktor der Transport in die Zielzelle. Der Therapieansatz sieht hierfür das Verpacken des CRISPR-Vektors in Viruspartikel vor, welche nach Injektion ins Auge die RPE-Zellen mit den CRISPR-Komponenten transduzieren sollen. Dahingehend sollte nun die Kompetenz des AAV-Vektors überprüft werden, transduktionskompetente Viruspartikel zu bilden. Hierzu erfolgte zunächst GFP-vermittelt eine Überprüfung der Transduzierbarkeit verschiedener Zelltypen mit verschiedenen AAV-Serotypen. Zuletzt wurden die gewonnenen Erkenntnisse genutzt, um eine erste vollständige Anwendung des Therapieprozesses zu erproben, aus viraler Transduktion von CRISPR-AAV-Vektoren in Zielzellen mit nachfolgender Genomanalyse und Bestimmung der CRISPR-Effizienz.

Zunächst wurde GFP-basiert die Transduktionskompetenz eines AAV-Vektors in verschiedenen Zelltypen getestet, wobei die Effizienz anhand des zellulären Fluoreszenzsignals bestimmt wurde. Neben HEK293T-Zellen wurden dazu primäre Fibroblasten-Zellen und hiPSC-RPE-Zellen eines BVMD-Patienten verwendet (**Abbildung 16**). Außerdem wurde ein Vergleich zweier AAV-Serotypen angestellt, Serotyp 2 (AAV2), der als spezifisch für Strukturen des Auges gilt (Lebherz et al. 2008; Srivastava 2016) und Serotyp 6 (AAV6), der üblicherweise einen Tropismus für muskuloskelettale Strukturen aufweist (Asokan et al. 2012; Srivastava 2016), in institutsinterner Evidenz jedoch ebenfalls eine gute Effizienz für hiPSC-RPE-Zellen gezeigt hatte (**Abbildung 17**). Es stellte sich heraus, dass sich mit dieser Methode allein die HEK293T-Zellen suffizient transduzieren ließen, wohingegen die

Fibroblasten- und hiPSC-RPE-Zellen kaum GFP-positive Zellen zeigten. Anhand der HEK293T-Zellen war schließlich für den AAV6 eine etwas kräftigere Fluoreszenz auszumachen. Es muss allerdings angemerkt werden, dass es sich bei der Transduktionslösung lediglich um ein grob gefiltertes Zelllysate handelte. Für höhere Standards sollten jedoch aufgereinigte Viruspartikel verwendet werden, deren Titer zusätzlich bestimmt und spezifisch eingestellt wird, da mit erhöhter Reinheit auch die Transduktionseffizienz steigt (Ayuso et al. 2010). Ein weiterer Faktor für eine schwache Fluoreszenzentwicklung, insbesondere nach dem Splitten, ist die Verwendung von Polybrene als Transduktionskatalysator. Es erleichtert zwar die Transduktion, ist aber auch dafür bekannt, die Zellproliferation zu hemmen (Lin et al. 2011). Grundsätzlich könnten für die schlechte Effizienz weitere Faktoren verantwortlich sein, da die virale Transduktion abhängig von multiplen Bindungsfaktoren ist (Zengel und Carette 2020). Dazu kommt, dass der AAV2 neben dem Auge auch eine sehr gute Effizienz für Nierenzellen aufweist (Wu et al. 2006), zu denen auch die HEK293T-Zellen zählen. Es ist hier also auch von einer starken Transduktionsrate auszugehen, womöglich noch potenter als für die beiden anderen Zelllinien. Diese hatten sich außerdem bereits in der Kultivierung als deutlich empfindlicher erwiesen als die sehr einfach zu kultivierenden und leicht transfizierbaren HEK293T-Zellen.

Die Erkenntnisse aus dem Serotypvergleich wurden schließlich genutzt, um unter den günstigsten Bedingungen den vollständigen Therapieansatz zu erproben. Hierzu wurde die effiziente WT-Cas9 mit den starken Guides 759B_C_20mer und 534_C_18mer in dem effizienten dualen pAAV-Vektorsystem des Serotyps AAV6 in HEK293T-Zellen getestet und in einer anschließenden ON-Target Analyse auf genomischer Ebene die CRISPR-Effizienz bestimmt (**Tabelle 54**). Im günstigsten Fall wurde von den beiden Guides eine ähnlich gute, womöglich etwas schwächere Effizienz erwartet als im Transfektionsversuch. Diese Erwartung konnte nur teilweise erfüllt werden. Während die CRISPR-Effizienz der 759-Guide auf 52 % fiel, im Vergleich zu den 64 % in der Transfektion, verschlechterte sich die Aktivität der 534-Guide von vorher 51 % auf nun 16 %. In diesem Falle würde sich lediglich die 759-Guide für eine praktische Anwendung empfehlen. Die Verringerung der CRISPR-Effizienz ist dabei wohl in der Transduktionsmethodik begründet und der Verwendung eines nur grob aufgereinigten Virusansatzes, der die Übertragungsrate bei der Transduktion unter die der Transfektion sinken lässt. Bei einem professionell aufgereinigten und vorbereiteten Transduktionsansatz wäre dahingehend eine Verbesserung zu erwarten (Ayuso et al. 2010). Trotzdem ist eine so

dramatische Verschlechterung bei der 534-Guide überraschend. Möglicherweise kann hier eine Schwelle der CRISPR- und Transduktionseffizienz unterschritten worden sein, ab der sich die allgemeine Aktivität deutlich reduziert. Das Ergebnis ist dabei nur zum Teil repräsentativ für die CRISPR-Effizienz, da der Ansatz des dualen Transfektionsschemas auf der Bedingung beruht, dass eine Zelle sowohl den Guide- als auch den Cas9-Vektor erhält. Da die Zellen beim FACS nur nach der GFP-gekoppelten sgRNA gesortet wurden, ist nicht garantiert, dass eine Zelle, die mit sgRNA transduziert wurde, auch eine Cas9-Sequenz erhalten hat. Dieser Faktor der gemeinsamen Transduktionseffizienz von sgRNA- und Cas9-Vektor müsste zusätzlich und unabhängig bestimmt werden, um eine präzise Aussage über die CRISPR-Effizienz treffen zu können. Insgesamt muss auch berücksichtigt werden, dass es sich hier nur um einen einmalig durchgeführten Versuch handelt und das Ergebnis zufällig entstanden sein kann. Um die Werte zu validieren, müsste die Versuchsreihe wiederholt werden.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass das CRISPR-Transduktions-Konzept aus dualen CRISPR-pAAV-Vektoren und Viruspartikelbildung in HEK293T-Zellen funktioniert, allerdings mit unterschiedlich guter Effizienz in Abhängigkeit der Guide. Für den praktischen Gebrauch müsste diese Aktivität validiert und zuverlässig erhöht werden. Zuletzt steht außerdem die Verbesserung der Transduzierbarkeit der RPE-Zellen als eigentliches Zielgewebe aus.

7.4 Ausblick und weiterführende Aspekte

Der Werkzeugkasten zur gentherapeutischen Behandlung der BVMD beinhaltet bei diesem Ansatz das CRISPR/Cas9-System aus einer SNP-spezifischen sgRNA und einer Cas9-Nuklease, sowie eines oder mehrerer AAV-Vektoren als Transportmittel in das Zielgewebe. Jede dieser Komponenten ist dabei für sich und in Kombination so zu optimieren, dass der hohe Anspruch an effizienter und spezifischer Funktion im praktischen Gebrauch gegeben ist. Hierfür wurden bereits wichtige Schritte getan und entscheidende Erkenntnisse gewonnen. Für die spätere Behandlung ist allerdings erforderlich, die therapeutischen Komponenten genau auf den individuellen Haplotyp des BVMD-Patienten abzustimmen. Die Ermittlung der günstigsten Komponentenzusammensetzung muss dabei evidenzbasiert im Einzelnen ausgetestet werden.

7.4.1 Das SNP-spezifische CRISPR/Cas9-System und alternative Gentherapie-Strategien

Zu Beginn steht die genetische Analyse des Patienten auf die individuelle Zusammensetzung des Mutations-tragenden Haplotypen und die Identifikation targetierbarer SNPs im *BEST1*-Gen. Aus dem Set der 22 als geeignet bewerteten und hinreichend frequent in der Bevölkerung vertretenen SNPs sind hier insbesondere die exonisch verorteten Polymorphismen von Interesse, an den Positionen 429 des Exon 2, 534 des Exon 3 und im Exon 10 die SNPs 749, 756, 759. Da diese im codierenden Bereich liegen, führt bereits der Einsatz einer einzelnen sgRNA zum CRISPR-vermittelten Einfügen eines *Indels* im Leseraster und dem Ausschalten des gesamten Allels. Voraussetzung ist dabei der heterozygote Charakter der *BEST1*-Haplotypen zur Unterscheidung der beiden Allele. Hinsichtlich der Guides wurden in den Vorarbeiten schon umfassende Untersuchungen bezüglich ihrer Funktion und Optimierung durchgeführt, um effiziente Varianten für die praktische Anwendung bestimmen zu können. Für die sgRNAs besteht dabei die Möglichkeit der Trunkierung von 20 bp auf bis zu 17 bp, um eine Erhöhung der Spezifität zu erreichen (Fu et al. 2014a), oder das Einfügen von *Mismatches* in Abschnitten jenseits der *Seed*-Sequenz (Lin et al. 2014). Die Testungen erfolgten dabei für beide Ausprägungen der SNPs und für 7 der 22 Polymorphismen konnten bereits vielversprechende Kandidaten ausfindig gemacht werden. Aufgabe wird es allerdings sein, dieses Set an sgRNAs für weitere SNPs zu erweitern und für jede SNP-assoziierte Guide die Optimierungsmaßnahmen einzeln durchzuspielen. Die Auswahl an Möglichkeiten zur Optimierung des CRISPR/Cas9-Systems wurde in dieser Arbeit erweitert durch die Modifizierung der Cas9-Nuklease zur Verbesserung insbesondere der Spezifität. Das Fazit lautet hier, dass dieser Ansatz theoretisch anwendbar ist, Cas9-Varianten jedoch Guide-abhängig oftmals ihre Effizienz verlieren. In diesem Szenario, in dem aufgrund der SNP-Assoziation grundsätzlich kein großer Spielraum bei der Auswahl der Guides und eine Inkompatibilität der Cas9-Varianten mit modifizierten sgRNAs besteht, ist die Anwendung allerdings wenig vielversprechend. Dennoch könnte es sich lohnen, in kritischen Fällen auf diese Methode zurückzugreifen und sgRNA-Cas9-Kombinationen hinsichtlich ihrer Funktion auszutesten.

Darüber hinaus existieren noch weitere Ansätze, um das Spektrum an möglichen CRISPR-Targets im *BEST1*-Lokus zu erweitern. Eine Limitierung ist dabei das Vorhandensein einer Cas9-spezifischen PAM-Sequenz (Ran et al. 2013). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass

Modifikationen der Enzymstruktur es der SpCas9 erlauben, alternative PAM-Sequenzen zuverlässig zu erkennen (Kleinstiver et al. 2015). Diese neuen PAM-Sequenzen könnten in die SNP-Auswahlkriterien zur Identifikation weiterer Targets im *BEST1*-Gen einfließen und so das Spektrum an Möglichkeiten erweitern. Eine Alternative bieten außerdem orthologe Cas9-Nukleasen abseits der SpCas9, die eigene spezifische PAM-Sequenzen besitzen, wie die Cas9-Nuclease des *Staphylokokkus aureus* (SaCas9) mit der Erkennungssequenz ‚NNGRRT‘ (Ran et al. 2015).

Es ist jedoch fraglich, ob die Anzahl an adressierbaren SNPs und der dafür benötigten hocheffizienten sgRNAs ausreicht, um tatsächlich jeden BVMD-Patienten mit der gewählten Methodik zu therapieren. Daher wird es in Einzelfällen erforderlich sein, alternative Targets ausfindig zu machen und beispielsweise intronische SNPs einzubeziehen oder die Mutation selbst zu adressieren. Diese individuellen Targets werden allerdings auch die individuelle und von Grund auf neue Entwicklung der Therapiekomponenten erfordern, wie sie in den Vorarbeiten und dieser Arbeit für die identifizierten SNPs erfolgt ist. Dies würde das Design und die Testung entsprechender sgRNAs beinhalten, die Durchführung möglicher Optimierungsoptionen und Kombinationen mit der Cas9-Nuclease inklusive möglicher Varianten, sowie der geeignetsten Transportmethode. Da sich Stand heute bei vielen dieser Sachverhalte kaum Regelmäßigkeiten erkennen lassen, müssten all diese Faktoren aufwändig im Einzelnen untersucht werden, um Evidenzen über deren Funktionalität zu erhalten. Dieses Fehlen an erkennbaren Mustern beinhaltet Problematiken wie die Diskrepanz zwischen dem theoretisch Vorhergesagten *ON-Target-Score* der designten Guides und deren experimentell ermittelter Effizienz, die Notwendigkeit der experimentellen Effizienzbestimmung bei Optimierungsversuchen wie der Trunkierung und dem Einfügen von *Mismatches*, genauso wie das händische Austesten der geeigneten sgRNA-Cas9-AAV-Kombination. Es wird ersichtlich, dass die Entwicklung eines Therapieschemas in solchen Einzelfällen in Zukunft einfacher gestaltet werden muss, um solche Therapieoptionen in Ansätzen ökonomisch anbieten zu können. Dafür wird neben der momentan eher praktisch orientierten Forschung an den gegebenen SNPs auch ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden Einflussfaktoren notwendig sein.

Neben der intensiven Erforschung der Funktionsweise des CRISPR/Cas9-Systems im Körper beschäftigt sich ein weiteres Feld zunehmend mit der Reaktion des Körpers auf das

CRISPR/Cas9-System selbst. Durch dessen bakteriellen Ursprung wird die Gefahr einer immunologischen Reaktion auf die einzelnen Komponenten diskutiert (Adli 2018), insbesondere da die Bakterienstämme der am häufigsten eingesetzten Cas9-Varianten der SaCas9 und SpCas9 in der Bevölkerung ebenfalls eine hohe Durchseuchung aufweisen. Eine entsprechende Studie zur Untersuchung einer möglichen, in der Population vorbestehenden Immunogenität dieser beiden Cas9-Varianten ließ bereits vermuten, dass bis zu 2/3 der Bevölkerung vorbestehende, humorale und zelluläre Abwehrmechanismen des adaptiven Immunsystems gegen die bakteriellen Cas9-Nukleasen aufweisen könnten (Charlesworth et al. 2019). Dies birgt das Risiko, dass therapeutisch angewendete CRISPR-Komponenten durch adaptierte Antikörper oder T-Lymphozyten neutralisiert werden und somit die individuelle Wirksamkeit der Therapie verringern (Moreno et al. 2018). Ein möglicher Ansatz zur Umgehung dieser Problematik ist die Humanisierung der Cas9-Nuklease (Moreno et al. 2018). Entsprechende Formen der Cas9-Sequenz wurden bereits entwickelt und erfolgreich angewendet (Kleinstiver et al. 2016a). Weiter werden auch hier orthologe Cas9-Varianten untersucht, die durch bisher fehlenden Menschenkontakt keine Immunogenität aufweisen sollten. Entsprechende Versuche ergaben vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich ausbleibender Kreuzreaktionen zu bekannten Cas9-Nukleasen (Moreno et al. 2018). Das Immunsystem stellt insbesondere ein Problem dar, wenn das CRISPR/Cas9-System in Geweben angewendet wird, die durch die immunologischen Faktoren erreicht werden können. Bezogen auf das in dieser Arbeit formulierte Therapiekonzept muss allerdings auf das Auge als immunprivilegiertes Organ hingewiesen werden mit seiner Eigenschaft, ein vom systemischen Kreislauf isoliertes Kompartiment darzustellen (Strauss 2011), was das Risiko einer immunologischen Intervention in der therapeutischen Anwendung deutlich reduzieren sollte.

Letztendlich beruht das Therapiekonzept auf der Hypothese, dass nach dem Ausschalten des mutierten Allels die physiologische Funktion des RPE allein durch die Expression der verbliebenen Kopie des wildtypischen Allels des *BEST1*-Gens wiederhergestellt werden kann. Dabei ist allerdings die Problematik einer möglichen Haploinsuffizienz zu bedenken, mit der Gefahr, dass die Expression über ein Allel zur Funktionswiederherstellung nicht ausreicht. Ein Positivbeispiel bietet dabei allerdings das Krankheitsbild der ARB, die autosomal rezessive Form der Bestrophinopathien (Burgess et al. 2008). Bei dieser auf natürliche Weise entstehenden NMD-induzierten Nonsense-Mutationen zeigen heterozygote

Mutationsträgern mit ebenfalls nur einer Kopie des wildtypischen Allels meist keinen klinischen Phänotyp (Hufendiek et al. 2020), was die formulierte Hypothese stützt. Der Therapieerfolg wird sich in der klinischen Verbesserung des BVMD-Phänotyps zeigen.

Die Möglichkeiten der Gentherapie entwickeln sich rasch weiter, wobei auch das Gebiet der erblichen Augenerkrankungen immer häufiger zur Erprobung verschiedener gentherapeutischer Ansätze dient. Die Therapiestrategie richtet sich dabei nach dem genetischen Modus der Erkrankung, wobei sich zwei jeweils bevorzugte Herangehensweisen zuordnen lassen: (1) die Gensupplementierung als additiver Ansatz, um fehlendes Genmaterial bei autosomal rezessiven und X-chromosomal vererbten Netzhauterkrankungen einzubringen (Guziewicz et al. 2018) und (2) der Gen-Knockout als subtraktiver Ansatz, der darauf abzielt, einen dominant-negativen oder *gain-of-function*-Effekt bei autosomal dominant vererbten Erkrankungen zu unterdrücken. Dieser kann Allel-spezifisch durch Ausschaltung nur des mutierten Allels erfolgen (Shin et al. 2022), oder Allel-unabhängig durch Ausschaltung beider Allele des betroffenen Gens und anschließender Gensupplementierung (*Ablate-and-Replace*) (Tsai et al. 2018).

Die Gensupplementierung, bei der fehlendes Genmaterial vornehmlich mittels eines AVV-Vektors eingebracht wird, konnte beispielsweise bei der ARB als rezessiver Bestrophinopathie-Form bereits in einem Tiermodell erfolgreich angewandt werden, was die Produktion von intaktem BEST1 erhöhte (Guziewicz et al. 2018). Der Einsatz eines solchen Gen-additiven Verfahrens wird auch bei autosomal dominanten Formen wie ADVIRC und BVMD zur Symptumlinderung diskutiert. Die vermehrte Expression nicht-mutierten BEST1-Genmaterials führt hier zu verhältnismäßig mehr normalen BEST1-Untereinheiten und erhöht somit die Wahrscheinlichkeit, mehr intakte Kanalkomplexe zu bilden. Studien zeigen, dass damit die Funktionalität des BEST1-Kanals in hiPSC-RPE-Zellen mit entsprechenden BEST1-Mutationen in einigen Fällen verbessert werden konnte (Ji et al. 2019; Sinha et al. 2020). Es bleibt jedoch fraglich, ob dies langfristig zu einer Symptumlinderung führt oder die Erkrankung aufgrund der weiterhin entstehenden mutierten Kanäle fortschreitet.

Der Therapieansatz des Allel-spezifischen Knockouts eines mutierten Gens, wie er auch in dieser Arbeit verfolgt wurde, konnte in mehreren Studien bereits erfolgreich beschrieben werden. In einem iPSC-Zellmodell von Huntington-Patienten wurde eine sehr hohe Spezifität und gute Effizienz der Genomeditierung erreicht, wobei zur Targetierung des autosomal

dominant vererbten *HTT*-Gens ebenfalls ein CRISPR/Cas9-System mit SNP-spezifischer sgRNA eingesetzt wurde (Shin et al. 2022). Ähnliches ließ sich bei der Targetierung von BVMD-Mutationen in hiPSC-RPE-Zellen feststellen. Hier ergaben sich nicht nur eine hohe Spezifität und Effizienz im *Deep Sequencing*, sondern auch eine nachweislich verbesserte Chlorid-Leitfähigkeit in allen Zelllinien (Sinha et al. 2020). Bei der Allel-spezifischen Behandlung autosomal dominanter *RHO*-Mutationen konnte das CRISPR/Cas9-System mittels AAV-Vektor erfolgreich in einem Mausmodell angewendet werden. In der Folge wurde hier nicht nur eine Downregulation der Proteinexpression, sondern auch eine Verbesserung der Sehschärfe und Netzhautfunktion festgestellt, womit sich ein eindeutig therapeutischer Effekt im Vergleich zur Kontrolle zeigte (Patrizi et al. 2021).

Alternativ dazu existieren bereits *proof-of-concept*-Studien zur *Ablate-and-Replace*-Strategie. In einer Studie zur autosomal dominant vererbten Retinitis pigmentosa (adRP) wurden beispielsweise in einem *RHO*-Knockin-Mausmodell zunächst beide Allele des *RHO*-Gens über ein CRISPR/Cas9-System exklusiv ausgeschaltet und anschließend die Expression des WT-Gens über eine Gensupplementierung mit *RHO*-cDNA sichergestellt. In der Folge zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Symptomatik (Tsai et al. 2018). Dieses Therapiekonzept konnte bereits auch bei *gain-of-function*-Mutationen im humanen BEST1-Gen erfolgreich angewendet werden. In den behandelten hiPSC-Zellen ließ sich im Verlauf eine Verbesserung der Chlorid-Leitfähigkeit feststellen (Zhao et al. 2021). Der Vorteil bei diesem Ansatz ist, dass nicht zwischen mutiertem und natürlichem Allel unterschieden werden muss und es wird spekuliert, ob damit womöglich ein breiteres Patientenspektrum bei dominanten Erkrankungen mit *gain-of-function*-Mutationen therapiert werden kann (Tsai et al. 2018).

7.4.2 Das AAV-Transportsystem und alternative Transportsysteme

Ein wichtiger Faktor des Therapieansatzes ist der Transport des CRISPR/Cas9-Systems in das Zielgewebe. Für diese Art von Gentransfer stellt heute der AAV-Vektor den Goldstandard dar (Wang et al. 2019), birgt allerdings das grundlegende Problem einer begrenzten Transportkapazität von 4,7 kb (Dong et al. 1996; Wang et al. 2019), wobei im Falle des CRISPR/Cas9-Systems allein die DNA-Sequenz der Cas9-Nuklease eine Größe von 4,2 kb besitzt. Zuzüglich der sgRNA und der erforderlichen Promotor-Sequenzen überschreitet das die Kapazitäten des Vektors. Das Problem lässt sich allerdings über verschiedene Wege umgehen. Im Falle dieser Arbeit wurde ein miniAAV-Vektor konstruiert über Verkürzung der

expressionsregulatorischen Sequenzen (Myslinski et al. 2001; Senís et al. 2014). Dadurch wird die Transportkapazität erhöht und beide CRISPR-Komponenten haben Platz im selben Vektor, wovon man sich eine verbesserte Transporteffizienz verspricht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für den miniAAV-Vektor und seine verkürzten Promotoren jedoch eine abgeschwächte Expressionsleistung der Genfracht nachgewiesen werden. Im Falle der wildtypischen Cas9-Nuklease bedeutete dies eine Verbesserung der CRISPR-Spezifität bei moderater Abnahme der Effizienz, die empfindlichen Cas9-Varianten reagierten dagegen mit einer deutlich reduzierten Aktivität. Dass die Kombination aus Promotor-Variante und dem CRISPR/Cas9-System Einfluss auf die CRISPR-Effizienz hat, war bereits bekannt (Senís et al. 2014). Es sorgte allerdings auch für eine Inkompatibilität zwischen miniAAV-Vektor und Opt-Cas9-Konstrukten, da sich die Modifizierungen auf beiden Seiten zu sehr schwächen. Für zukünftige Versuche bedeutet das, dass lediglich eine der beiden Komponenten in modifizierter Form vorliegen darf. Eine Kombination des miniAAV-Vektors mit trunkierten sgRNAs war dagegen als kompatibel beschrieben worden (Senís et al. 2014). Leider zeigte der miniAAV-Vektor eine weitere Schwäche im Bereich der genomischen ON-Targets. Hier konnten schließlich mit der WT-Cas9 ebenfalls nur eine sehr niedrige CRISPR-Aktivität erreicht werden. Insgesamt muss der Einsatz des modifizierten miniAAV-Vektors für das *in vivo*-Verfahren kritisch betrachtet werden. Eine angemessene Alternative findet sich für den dualen pAAV-Vektor-Ansatz, bei dem die Sequenzen der Cas9-Nuklease und der sgRNA auf zwei Vektoren aufgeteilt werden (Tabebordbar et al. 2016). Dieses Verfahren konnte sowohl bei der Transfektion als auch teilweise bei der Transduktion solide Ergebnisse hinsichtlich der CRISPR-Aktivität hervorbringen. Der Kritikpunkt einer reduzierten Transporteffizienz durch die Bedingung der gleichsam Internalisierung von sgRNA- und Cas9-Vektor in ein und dieselbe Zelle (Wu et al. 2020) wird dabei augenscheinlich durch das Einsetzen einer ausreichend hohen Menge und die letztendlich hohe Expressionsrate ausgeglichen. Hierbei muss bedacht werden, dass nur auf die CRISPR-Effizienz geachtet wurde und der Optimierungseffekt hinsichtlich der CRISPR-Spezifität, der durch die Kombination von miniAAV-Vektor und WT-Cas9 erreicht wurde, wahrscheinlich verloren ging. Für den AAV-vermittelten Transport des CRISPR/Cas9-Systems tun sich weitere Alternativen auf. Eine davon ist beispielsweise der Einsatz von orthologen Cas9-Nukleasen anderer Bakterienstämme, wie die Variante des *Staphylokokkus aureus*, dessen SaCas9 als DNA-Sequenz lediglich eine Größe von 3,2 kb aufweist bei ähnlich guter CRISPR-Effizienz wie die SpCas9 (Ran et al. 2015). Es ist allerdings zu bedenken, dass diese

Cas9-Variante aufgrund ihrer eignen PAM-Sequenz (*NNGRRT*) einer eigenen SaCas9-spezifischen SNP-Analyse im *BEST1*-Gen bedarf.

Neben der Verkürzung der Promotorsequenzen lässt sich die CRISPR-Aktivität über eine weitere Vektor-assoziierte Modifikation in Form eines *self limiting* AAV-Vektors steuern. Dieser weist eine intrinsische ON-Target-Sequenz für die transportierte Cas9-Nuklease auf, sodass sie durch ein *self cleavage* ihren eigenen Expressionsvektor deaktiviert und so ihre Aktivität herunter reguliert. Da eine hohe Cas9-Expression OFF-Target-Effekte fördert (Zuris et al. 2015), kann diese Aktivität durch eine verminderte Expression verringert und die Spezifität erhöht werden. Es ist auch hier zu beachten, dass dabei eventuell auch die Effizienz leidet (Li et al. 2019). Bei dieser Methode besteht allerdings ein erhöhtes Risiko der Integration von Vektorbestandteilen in das Genom über die CRISPR-induzierten DSB in genomischer und vektorieller DNA (Li et al. 2019; Hanlon et al. 2019). Grundsätzlich kann das Risiko der Genomintegration wie auch eine immunologische Reaktion bei der Verwendung eines AAV-Vektors nicht ausgeschlossen werden. Im Rahmen der Nutzbarmachung des AAV-Vektors für die gentherapeutische Forschung wurden allerdings entscheidende Modifikationen vorgenommen, die eine Senkung dieses Risikos zur Folge hatten. Beispielsweise wurden codierende Sequenzen für virale Proteine entfernt und so die Pathogenität reduziert (Wang et al. 2019). In frühen Versuchen am menschlichen Auge zeigten AAV-Vektoren außerdem eine grundsätzlich sehr geringe Immunogenität und Zytotoxizität (Bennett 2003), wobei das Auge als immunprivilegierter Raum sicher auch eine entscheidende Rolle spielt (Strauss 2011).

Abseits des AAV-Vektors sind auch nicht-virale Gentransfermethoden eine Option. Unter diese Kategorie fallen sogenannte *lipid-based nanoparticles* (LNP). Diese Vesikel aus einer Doppelschicht amphiphiler Lipide haben sich zu einer beliebten und effizienten Form des Nukleinsäuretransports *in vivo* entwickelt. Die zu transportierende DNA wird dabei im hydrophilen Kern des LNP eingeschlossen, der einen Schutz gegen enzymatischen Abbau und immunologische Reaktionen bietet (Chen et al. 2020). Mittels dieser Methode gelang bereits der erfolgreiche *in vivo-Transport* eines CRISPR/Cas9-Systems in die menschliche Leber und die dadurch vermittelte Behandlung einer Form der Amyloidose (Gillmore et al. 2021). Durch die gute Durchblutung und begünstigte Aufnahme von Lipiden ist das hepatische Gewebe besonders gut für diesen Ansatz geeignet (Finn et al. 2018). Ein Vorteil besteht dabei in der nicht-permanenten Expression der CRISPR-Komponenten, wodurch OFF-Target-Ereignisse

reduziert werden. Es wird außerdem der direkte Transport von ganzen Cas9-Nukleasen anstelle der DNA-Sequenz ermöglicht, was aufgrund der begrenzten Aktivitätsdauer und zügigem Abbau ebenfalls zu einem geringeren OFF-Target-Risiko beiträgt (Dever et al. 2016). Grundsätzlich weisen LNPs allerdings eine geringe Variabilität bezüglich adressierbarer Gewebetypen wie dem RPE auf, da außerhalb von Leberzellen die Aufnahme der Vesikel deutlich ineffektiver ist (Chen et al. 2020).

7.4.3 Analyse von OFF-Target-Effekten

Neben der Entwicklung eines effizienten CRISPR/Cas9-Systems ist die Sicherheit dieses Systems ein wichtiger Aspekt. Es ist bekannt, dass neben der Aktivität am ON-Target auch unspezifische OFF-Target-Effekte an ähnlichen Sequenzen im Genom auftreten können (Hsu et al. 2013). Dies beruht auf der Tatsache, dass die sgRNA jenseits ihrer *Seed*-Sequenz (Jinek et al. 2012) ein gewisses Maß an unspezifischen Basenpaarungen (*Mismatches*) erlaubt (Fu et al. 2013). Vor der Anwendung eines CRISPR/Cas9-Systems *in vivo* muss somit ausgeschlossen werden, dass entsprechende unerwünschte OFF-Target-Effekte auftreten, die möglicherweise Störungen des Phänotyps verursachen. Hierzu ist eine genomweite OFF-Target-Analyse notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit ist dafür eine Kontrolle via *Next Generation Sequencing* (NGS) vorgesehen. Nach der *in vitro* Behandlung von Zellen mit dem finalen CRISPR/Cas9-System soll ein NGS von mindestens 100 behandelten Zellen erfolgen und eine anschließende bioinformatische Analyse auf genomweit auftretende *Indels* über den Abgleich der behandelten Zell-DNA mit einem Referenzgenom. Darüber hinaus existiert eine Reihe von alternativen Methoden zur OFF-Target-Identifikation. Zum einen ermöglicht das *OFFfinder*-Tool eine Vorhersage von möglichen OFF-Targets durch den Abgleich der sgRNA-Sequenz mit ähnlichen Sequenzen im Genom (Bae et al. 2014). Über die Zell-basierte GUIDE-Seq-Methode (Tsai et al. 2015) und das biochemische SITE-Seq-Verfahren (Cameron et al. 2017) lassen sich OFF-Targets durch die Markierung von CRISPR-vermittelten DSB bestimmen. Hinsichtlich der Integration von größeren Sequenzen in das Genom oder dem Auftreten von Chromosomenmutationen durch fehlerhafte Rekombination an den DSB-Stellen ist eine Kontrolle mittels *Short*- oder *Long-Read-NGS-Assays* möglich (Chon et al. 2013). Ob unvermeidbare OFF-Target-Effekte im Genom letztendlich auch relevante pathologische Konsequenzen haben, muss empirisch erhoben werden.

Vor der finalen Anwendung ist die Kenntnis des genauen Wirkprofils von großer Bedeutung, um das Auftreten von unerwünschten Nebenwirkungen zu vermeiden. Außerdem wird abzuklären sein, wie sich die Wirkung des entwickelten CRISPR-AAV-Systems in der Praxis an hiPSC-RPE-Zellen von BVMD-Patienten äußern wird. Durch die Editierung am ON-Target im *BEST1*-Gen wird schließlich über NHEJ das Einfügen von *Indels* provoziert, was zu einer *Frame-Shift* Mutation und somit Ausschaltung des mutierten Allels führen soll. Ob dies in der Praxis tatsächlich zu einer ausbleibenden Expression der fehlerhaften Proteinvariante führt, bleibt abzuwarten. Daneben besteht das Risiko einer Haploinsuffizienz und der Frage, ob die Expression eines funktionstüchtigen Allels ausreicht, um eine physiologische BEST1-Funktion wiederherzustellen. Das entscheidende Kriterium wird dabei sein, ob sich eine Besserung des Krankheitsphänotyps einstellt.

Literaturverzeichnis

- Adli, Mazhar (2018): The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. In: *Nat Commun* 9 (1), S. 1911. DOI: 10.1038/s41467-018-04252-2.
- Asokan, Aravind; Schaffer, David V.; Samulski, R. Jude (2012): The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20 (4), S. 699–708. DOI: 10.1038/mt.2011.287.
- Auton, Adam; Brooks, Lisa D.; Durbin, Richard M.; Garrison, Erik P.; Kang, Hyun Min; Korbel, Jan O. et al. (2015): A global reference for human genetic variation. In: *Nature* 526 (7571), S. 68–74. DOI: 10.1038/nature15393.
- Ayuso, E.; Mingozzi, F.; Montane, J.; Leon, X.; Anguela, X. M.; Haurigot, V. et al. (2010): High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency. In: *Gene Ther* 17 (4), S. 503–510. DOI: 10.1038/gt.2009.157.
- Bae, Sangsu; Park, Jeongbin; Kim, Jin-Soo (2014): Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 30 (10), S. 1473–1475. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu048.
- Bainbridge, James W. B.; Smith, Alexander J.; Barker, Susie S.; Robbie, Scott; Henderson, Robert; Balaggan, Kamaljit et al. (2008): Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. In: *The New England journal of medicine* 358 (21), S. 2231–2239. DOI: 10.1056/NEJMoa0802268.
- Barrangou, Rodolphe; Fremaux, Christophe; Deveau, Hélène; Richards, Melissa; Boyaval, Patrick; Moineau, Sylvain et al. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. In: *Science (New York, N.Y.)* 315 (5819), S. 1709–1712. DOI: 10.1126/science.1138140.
- Bassuk, Alexander G.; Zheng, Andrew; Li, Yao; Tsang, Stephen H.; Mahajan, Vinit B. (2016): Precision Medicine: Genetic Repair of Retinitis Pigmentosa in Patient-Derived Stem Cells. In: *Sci Rep* 6 (1), S. 19969. DOI: 10.1038/srep19969.
- Bennett, J. (2003): Immune response following intraocular delivery of recombinant viral vectors. In: *Gene therapy* 10 (11), S. 977–982. DOI: 10.1038/sj.gt.3302030.
- Best, F. (1905): II. Über eine hereditäre Maculaaffektion. In: *Ophthalmologica* 13 (3), S. 199–212. DOI: 10.1159/000290318.
- Bitner, Hanna; Schatz, Patrik; Mizrahi-Meissonnier, Liliana; Sharon, Dror; Rosenberg, Thomas (2012): Frequency, genotype, and clinical spectrum of best vitelliform macular dystrophy: data from a national center in Denmark. In: *American Journal of Ophthalmology* 154 (2), 403-412.e4. DOI: 10.1016/j.ajo.2012.02.036.
- BOON, CAMIEL J. F.; KLEVERING, B. JEROEN; Leroy, Bart P.; HOYNG, CAREL B.; Keunen, Jan E. E.; Hollander, Anneke I. den (2009): The spectrum of ocular phenotypes caused by mutations in the BEST1 gene. In: *Progress in retinal and eye research* 28 (3), S. 187–205. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2009.04.002.
- Boye, Shannon E.; Boye, Sanford L.; Lewin, Alfred S.; Hauswirth, William W. (2013): A comprehensive review of retinal gene therapy. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 21 (3), S. 509–519. DOI: 10.1038/mt.2012.280.
- Brandl, Caroline; Zimmermann, Stephanie J.; Milenkovic, Vladimir M.; Rosendahl, Sibylle M. G.; Grassmann, Felix; Milenkovic, Andrea et al. (2014): In-depth characterisation of Retinal Pigment

Epithelium (RPE) cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC). In: *Neuromol Med* 16 (3), S. 551–564. DOI: 10.1007/s12017-014-8308-8.

Buch, P. K.; Bainbridge, J. W.; Ali, R. R. (2008): AAV-mediated gene therapy for retinal disorders: from mouse to man. In: *Gene Ther* 15 (11), S. 849–857. DOI: 10.1038/gt.2008.66.

Buchholz, David E.; Pennington, Britney O.; Croze, Roxanne H.; Hinman, Cassidy R.; Coffey, Peter J.; Clegg, Dennis O. (2013): Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. In: *STEM CELLS Translational Medicine* 2 (5), S. 384–393. DOI: 10.5966/sctm.2012-0163.

Burgess, Rosemary; Millar, Ian D.; Leroy, Bart P.; Urquhart, Jill E.; Fearon, Ian M.; Baere, Elfrida de et al. (2008): Biallelic mutation of BEST1 causes a distinct retinopathy in humans. In: *American journal of human genetics* 82 (1), S. 19–31. DOI: 10.1016/j.ajhg.2007.08.004.

Burnight, Erin R.; Gupta, Manav; Wiley, Luke A.; Anfinson, Kristin R.; Tran, Audrey; Triboulet, Robinson et al. (2017): Using CRISPR-Cas9 to Generate Gene-Corrected Autologous iPSCs for the Treatment of Inherited Retinal Degeneration. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 25 (9), S. 1999–2013. DOI: 10.1016/j.ymthe.2017.05.015.

Cameron, Peter; Fuller, Chris K.; Donohoue, Paul D.; Jones, Brittnee N.; Thompson, Matthew S.; Carter, Matthew M. et al. (2017): Mapping the genomic landscape of CRISPR-Cas9 cleavage. In: *Nature methods* 14 (6), S. 600–606. DOI: 10.1038/nmeth.4284.

Carroll, Jeffrey B.; Warby, Simon C.; Southwell, Amber L.; Doty, Crystal N.; Greenlee, Sarah; Skotte, Niels et al. (2011): Potent and selective antisense oligonucleotides targeting single-nucleotide polymorphisms in the Huntington disease gene / allele-specific silencing of mutant huntingtin. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 19 (12), S. 2178–2185. DOI: 10.1038/mt.2011.201.

Chang, Yao-Fu; Imam, J. Saadi; Wilkinson, Miles F. (2007): The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. In: *Annu. Rev. Biochem.* 76 (1), S. 51–74. DOI: 10.1146/annurev.biochem.76.050106.093909.

Charlesworth, Carsten T.; Deshpande, Priyanka S.; Dever, Daniel P.; Camarena, Joab; Lemgart, Viktor T.; Cromer, M. Kyle et al. (2019): Identification of preexisting adaptive immunity to Cas9 proteins in humans. In: *Nat Med* 25 (2), S. 249–254. DOI: 10.1038/s41591-018-0326-x.

Chen, Fengqian; Alphonse, Martin; Liu, Qi (2020): Strategies for nonviral nanoparticle-based delivery of CRISPR/Cas9 therapeutics. In: *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* 12 (3), e1609. DOI: 10.1002/wnan.1609.

Cho, Seung Woo; Kim, Sojung; Kim, Yongsub; Kweon, Jiyeon; Kim, Heon Seok; Bae, Sangsu; Kim, Jin-Soo (2014): Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. In: *Genome research* 24 (1), S. 132–141. DOI: 10.1101/gr.162339.113.

Chon, Hyongi; Sparks, Justin L.; Rychlik, Monika; Nowotny, Marcin; Burgers, Peter M.; Crouch, Robert J.; Cerritelli, Susana M. (2013): RNase H2 roles in genome integrity revealed by unlinking its activities. In: *Nucleic acids research* 41 (5), S. 3130–3143. DOI: 10.1093/nar/gkt027.

Christie, Kathleen A.; Courtney, David G.; DeDionisio, Larry A.; Shern, Connie Chao; Majumdar, Shyamasree de; Mairs, Laura C. et al. (2017): Towards personalised allele-specific CRISPR gene editing to treat autosomal dominant disorders. In: *Sci Rep* 7 (1), S. 16174. DOI: 10.1038/s41598-017-16279-4.

Chylinski, Krzysztof; Makarova, Kira S.; Charpentier, Emmanuelle; Koonin, Eugene V. (2014): Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. In: *Nucleic Acids Res* 42 (10), S. 6091–6105. DOI: 10.1093/nar/gku241.

Cideciyan, Artur V.; Aleman, Tomas S.; Boye, Sanford L.; Schwartz, Sharon B.; Kaushal, Shalesh; Roman, Alejandro J. et al. (2008): Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. In: *PNAS* 105 (39), S. 15112–15117. DOI: 10.1073/pnas.0807027105.

Cordes, Magdalena; Bucichowski, Piotr; Alfaar, Ahmad S.; Tsang, Stephen H.; Almedawar, Seba; Reichhart, Nadine; Strauß, Olaf (2020): Inhibition of Ca²⁺ channel surface expression by mutant bestrophin-1 in RPE cells. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 34 (3), S. 4055–4071. DOI: 10.1096/fj.201901202RR.

Cross, Harold E.; Bard, Leslie (1974): Electro-Oculography in Best's Macular Dystrophy. In: *American Journal of Ophthalmology* 77 (1), S. 46–50. DOI: 10.1016/0002-9394(74)90603-5.

Davidson, Alice E.; Millar, Ian D.; Urquhart, Jill E.; Burgess-Mullan, Rosemary; Shweikh, Yusrah; Parry, Neil et al. (2009): Missense mutations in a retinal pigment epithelium protein, bestrophin-1, cause retinitis pigmentosa. In: *American journal of human genetics* 85 (5), S. 581–592. DOI: 10.1016/j.ajhg.2009.09.015.

Deltcheva, Elitza; Chylinski, Krzysztof; Sharma, Cynthia M.; Gonzales, Karine; Chao, Yanjie; Pirzada, Zaid A. et al. (2011): CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. In: *Nature* 471 (7340), S. 602–607. DOI: 10.1038/nature09886.

Dever, Daniel P.; Bak, Rasmus O.; Reinisch, Andreas; Camarena, Joab; Washington, Gabriel; Nicolas, Carmencita E. et al. (2016): CRISPR/Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. In: *Nature* 539 (7629), S. 384–389. DOI: 10.1038/nature20134.

Dong, J. Y.; Fan, P. D.; Frizzell, R. A. (1996): Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. In: *Human Gene Therapy* 7 (17), S. 2101–2112. DOI: 10.1089/hum.1996.7.17-2101.

Du, Hongjun; Lim, Siok Lam; Grob, Seanna; Zhang, Kang (2011): Induced pluripotent stem cell therapies for geographic atrophy of age-related macular degeneration. In: *Seminars in Ophthalmology* 26 (3), S. 216–224. DOI: 10.3109/08820538.2011.577498.

Esvelt, Kevin M.; Mali, Prashant; Braff, Jonathan L.; Moosburner, Mark; Yaung, Stephanie J.; Church, George M. (2013): Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. In: *Nat Methods* 10 (11), S. 1116–1121. DOI: 10.1038/nmeth.2681.

Finn, Jonathan D.; Smith, Amy Rhoden; Patel, Mihir C.; Shaw, Lucinda; Youniss, Madeleine R.; van Heteren, Jane et al. (2018): A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. In: *Cell Reports* 22 (9), S. 2227–2235. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.02.014.

Fu, Yanfang; Foden, Jennifer A.; Khayter, Cyd; Maeder, Morgan L.; Reyon, Deepak; Joung, J. Keith; Sander, Jeffry D. (2013): High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. In: *Nat Biotechnol* 31 (9), S. 822–826. DOI: 10.1038/nbt.2623.

Fu, Yanfang; Reyon, Deepak; Keith Joung, J. (2014a): Chapter Two - Targeted Genome Editing in Human Cells Using CRISPR/Cas Nucleases and Truncated Guide RNAs. In: Jennifer A. Doudna und Erik J. Sontheimer (Hg.): *Methods in Enzymology : The Use of CRISPR/Cas9, ZFNs, and TALENs in Generating Site-Specific Genome Alterations*, Bd. 546: Academic Press, S. 21–45. Online verfügbar unter <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128011850000027>.

Fu, Yanfang; Sander, Jeffrey D.; Reyon, Deepak; Cascio, Vincent M.; Joung, J. Keith (2014b): Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. In: *Nature biotechnology* 32 (3), S. 279–284. DOI: 10.1038/nbt.2808.

Gallemore, Ron P.; Hughes, Bret A.; Miller, Sheldon S. (1997): Retinal pigment epithelial transport mechanisms and their contributions to the electroretinogram. In: *Progress in retinal and eye research* 16 (4), S. 509–566. DOI: 10.1016/S1350-9462(96)00037-7.

Gao, Xue; Tao, Yong; Lamas, Veronica; Huang, Mingqian; Yeh, Wei-Hsi; Pan, Bifeng et al. (2018): Treatment of autosomal dominant hearing loss by in vivo delivery of genome editing agents. In: *Nature* 553 (7687), S. 217–221. DOI: 10.1038/nature25164.

Gillmore, Julian D.; Gane, Ed; Taubel, Jorg; Kao, Justin; Fontana, Marianna; Maitland, Michael L. et al. (2021): CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis. In: *The New England journal of medicine* 385 (6), S. 493–502. DOI: 10.1056/NEJMoa2107454.

Guziewicz, Karina E.; Cideciyan, Artur V.; Beltran, William A.; Komáromy, András M.; Dufour, Valerie L.; Swider, Malgorzata et al. (2018): BEST1 gene therapy corrects a diffuse retina-wide microdetachment modulated by light exposure. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (12), E2839–E2848. DOI: 10.1073/pnas.1720662115.

Hanlon, Killian S.; Kleinstiver, Benjamin P.; Garcia, Sara P.; Zaborowski, Mikołaj P.; Volak, Adrienn; Spirig, Stefan E. et al. (2019): High levels of AAV vector integration into CRISPR-induced DNA breaks. In: *Nat Commun* 10 (1), S. 4439. DOI: 10.1038/s41467-019-12449-2.

Hartzell, H. Criss; Qu, Zhiqiang; Yu, Kuai; Xiao, Qinghuan; Chien, Li-Ting (2008): Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. In: *Physiological Reviews* 88 (2), S. 639–672. DOI: 10.1152/physrev.00022.2007.

Heyer, Wolf-Dietrich; Ehmsen, Kirk T.; Liu, Jie (2010): Regulation of homologous recombination in eukaryotes. In: *Annu. Rev. Genet.* 44 (1), S. 113–139. DOI: 10.1146/annurev-genet-051710-150955.

Hollander, Anneke I. den; Roepman, Ronald; Koenekoop, Robert K.; CREMERS, FRANS P. M. (2008): Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. In: *Progress in retinal and eye research* 27 (4), S. 391–419. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2008.05.003.

Horvath, Philippe; Barrangou, Rodolphe (2010): CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. In: *Science (New York, N.Y.)* 327 (5962), S. 167–170. DOI: 10.1126/science.1179555.

Hsu, Patrick D.; Lander, Eric S.; Zhang, Feng (2014): Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. In: *Cell* 157 (6), S. 1262–1278. DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.010.

Hsu, Patrick D.; Scott, David A.; Weinstein, Joshua A.; Ran, F. Ann; Konermann, Silvana; Agarwala, Vineeta et al. (2013): DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. In: *Nature biotechnology* 31 (9), S. 827–832. DOI: 10.1038/nbt.2647.

Huang, Ni; Lee, Insuk; Marcotte, Edward M.; Hurles, Matthew E. (2010): Characterising and predicting haploinsufficiency in the human genome. In: *PLOS Genetics* 6 (10), e1001154. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001154.

Hufendiek, Karsten; Hufendiek, Katerina; Jägle, Herbert; Stöhr, Heidi; Book, Marius; Spital, Georg et al. (2020): Clinical Heterogeneity in Autosomal Recessive Bestrophinopathy with Biallelic Mutations in the BEST1 Gene. In: *International journal of molecular sciences* 21 (24). DOI: 10.3390/ijms21249353.

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. In: *J Bacteriol* 169 (12), S. 5429–5433. DOI: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.

J.R. Sparrow, D. Hicks (2010): The Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease. In: *Current Molecular Medicine*.

Jansen, Ruud; van Embden, Jan D. A.; Gaastra, Wim; Schouls, Leo M. (2002): Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. In: *Mol Microbiol* 43 (6), S. 1565–1575. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.

Ji, Changyi; Kittredge, Alec; Hopiavuori, Austin; Ward, Nancy; Chen, Shoudeng; Fukuda, Yohta et al. (2019): Dual Ca²⁺-dependent gates in human Bestrophin1 underlie disease-causing mechanisms of gain-of-function mutations. In: *Communications biology* 2, S. 240. DOI: 10.1038/s42003-019-0433-3.

Jiang, Wenyan; Bikard, David; Cox, David; Zhang, Feng; Marraffini, Luciano A. (2013): RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. In: *Nat Biotechnol* 31 (3), S. 233–239. DOI: 10.1038/nbt.2508.

Jinek, Martin; Chylinski, Krzysztof; Fonfara, Ines; Hauer, Michael; Doudna, Jennifer A.; Charpentier, Emmanuelle (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096), S. 816–821. DOI: 10.1126/science.1225829.

Johnson, Adiv A.; Guziewicz, Karina E.; Lee, C. Justin; Kalathur, Ravi C.; Pulido, Jose S.; Marmorstein, Lihua Y.; Marmorstein, Alan D. (2017): Bestrophin 1 and retinal disease. In: *Progress in retinal and eye research* 58, S. 45–69. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2017.01.006.

Johnson, Adiv A.; Lee, Yong-Suk; Chadburn, Andrew J.; Tammara, Paolo; Manson, Forbes D.; Marmorstein, Lihua Y.; Marmorstein, Alan D. (2014): Disease-causing mutations associated with four bestrophinopathies exhibit disparate effects on the localization, but not the oligomerization, of Bestrophin-1. In: *Experimental Eye Research* 121, S. 74–85. DOI: 10.1016/j.exer.2014.02.006.

Johnson, Adiv A.; Lee, Yong-Suk; Stanton, J. Brett; Yu, Kuai; Hartzell, Criss H.; Marmorstein, Lihua Y.; Marmorstein, Alan D. (2013): Differential effects of Best disease causing missense mutations on bestrophin-1 trafficking. In: *Human molecular genetics* 22 (23), S. 4688–4697. DOI: 10.1093/hmg/ddt316.

Kamao, Hiroyuki; Mandai, Michiko; Okamoto, Satoshi; Sakai, Noriko; Suga, Akiko; Sugita, Sunao et al. (2014): Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. In: *Stem Cell Reports* 2 (2), S. 205–218. DOI: 10.1016/j.stemcr.2013.12.007.

Kane Dickson, Veronica; Pedi, Leanne; Long, Stephen B. (2014): Structure and insights into the function of a Ca(2+)-activated Cl(-) channel. In: *Nature* 516 (7530), S. 213–218. DOI: 10.1038/nature13913.

Kleinstiver, Benjamin P.; Pattanayak, Vikram; Prew, Michelle S.; Tsai, Shengdar Q.; Nguyen, Nhu T.; Zheng, Zongli; Joung, J. Keith (2016a): High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. In: *Nature* 529 (7587), S. 490–495. DOI: 10.1038/nature16526.

Kleinstiver, Benjamin P.; Pattanayak, Vikram; Prew, Michelle S.; Tsai, Shengdar Q.; Nguyen, Nhu T.; Zheng, Zongli; Joung, J. Keith (2016b): High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. In: *Nature* 529 (7587), S. 490–495. DOI: 10.1038/nature16526.

Kleinstiver, Benjamin P.; Prew, Michelle S.; Tsai, Shengdar Q.; Topkar, Ved V.; Nguyen, Nhu T.; Zheng, Zongli et al. (2015): Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. In: *Nature* 523 (7561), S. 481–485. DOI: 10.1038/nature14592.

Koo, Taeyoung; Lu-Nguyen, Ngoc B.; Malerba, Alberto; Kim, Eunji; Kim, Daesik; Cappellari, Ornella et al. (2018): Functional Rescue of Dystrophin Deficiency in Mice Caused by Frameshift Mutations Using

Campylobacter jejuni Cas9. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 26 (6), S. 1529–1538. DOI: 10.1016/j.ymthe.2018.03.018.

Krämer, F.; White, K.; Pauleikhoff, D.; Gehrig, A.; Passmore, L.; Rivera, A. et al. (2000): Mutations in the VMD2 gene are associated with juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best disease) and adult vitelliform macular dystrophy but not age-related macular degeneration. In: *Eur J Hum Genet* 8 (4), S. 286–292. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200447.

Krämer, Franziska; Mohr, Nicole; Kellner, Ulrich; Rudolph, Günther; Weber, Bernhard H. F. (2003): Ten novel mutations in VMD2 associated with Best macular dystrophy (BMD). In: *Human Mutation* 22 (5), S. 418. DOI: 10.1002/humu.9189.

Krohne, Tim U.; Westenskow, Peter D.; Kurihara, Toshihide; Friedlander, David F.; Lehmann, Mandy; Dorsey, Alison L. et al. (2012): Generation of retinal pigment epithelial cells from small molecules and OCT4 reprogrammed human induced pluripotent stem cells. In: *STEM CELLS Translational Medicine* 1 (2), S. 96–109. DOI: 10.5966/sctm.2011-0057.

Lacassagne, Emmanuelle; Dhuez, Aurore; Rigaudière, Florence; Dansault, Anouk; Vêtu, Christelle; Bigot, Karine et al. (2011): Phenotypic variability in a French family with a novel mutation in the BEST1 gene causing multifocal best vitelliform macular dystrophy. In: *Molecular Vision* 17, S. 309–322.

Lakkaraju, Aparna; Umapathy, Ankita; Tan, Li Xuan; Daniele, Lauren; Philp, Nancy J.; Boesze-Battaglia, Kathleen; Williams, David S. (2020): The cell biology of the retinal pigment epithelium. In: *Progress in retinal and eye research*, S. 100846. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2020.100846.

Le Cong; Ran, F. Ann; Cox, David; Lin, Shuailiang; Barretto, Robert; Habib, Naomi et al. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121), S. 819–823. DOI: 10.1126/science.1231143.

Lebherz, Corinna; Maguire, Albert; Tang, Waixing; Bennett, Jean; Wilson, James M. (2008): Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. In: *The journal of gene medicine* 10 (4), S. 375–382. DOI: 10.1002/jgm.1126.

Li, Ang; Lee, Ciaran M.; Hurley, Ayrea E.; Jarrett, Kelsey E.; Giorgi, Marco de; Lu, Weiqi et al. (2019): A Self-Deleting AAV-CRISPR System for In Vivo Genome Editing. In: *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 12, S. 111–122. DOI: 10.1016/j.omtm.2018.11.009.

Lieber, Michael R. (2008): The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (1), S. 1–5. DOI: 10.1074/jbc.R700039200.

Lin, Paul; Correa, Diego; Lin, Yuan; Caplan, Arnold I. (2011): Polybrene inhibits human mesenchymal stem cell proliferation during lentiviral transduction. In: *PloS one* 6 (8), e23891. DOI: 10.1371/journal.pone.0023891.

Lin, Yanni; Cradick, Thomas J.; Brown, Matthew T.; Deshmukh, Harshavardhan; Ranjan, Piyush; Sarode, Neha et al. (2014): CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences. In: *Nucleic Acids Res* 42 (11), S. 7473–7485. DOI: 10.1093/nar/gku402.

Liu, Xiaoxi; Homma, Ayaka; Sayadi, Jamasb; Yang, Shu; Ohashi, Jun; Takumi, Toru (2016): Sequence features associated with the cleavage efficiency of CRISPR/Cas9 system. In: *Sci Rep* 6 (1), S. 19675. DOI: 10.1038/srep19675.

Long, Chengzu; Amoasii, Leonela; Mireault, Alex A.; McAnally, John R.; Li, Hui; Sanchez-Ortiz, Efrain et al. (2016): Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of

muscular dystrophy. In: *Science (New York, N.Y.)* 351 (6271), S. 400–403. DOI: 10.1126/science.aad5725.

Makarova, Kira S.; Aravind, L.; Wolf, Yuri I.; Koonin, Eugene V. (2011): Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. In: *Biol Direct* 6 (1), S. 38. DOI: 10.1186/1745-6150-6-38.

Makarova, Kira S.; Wolf, Yuri I.; Alkhnbashi, Omer S.; Costa, Fabrizio; Shah, Shiraz A.; Saunders, Sita J. et al. (2015): An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. In: *Nat Rev Microbiol* 13 (11), S. 722–736. DOI: 10.1038/nrmicro3569.

Mali, Prashant; Aach, John; Stranges, P. Benjamin; Esvelt, Kevin M.; Moosburner, Mark; Kosuri, Sriram et al. (2013): CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. In: *Nat Biotechnol* 31 (9), S. 833–838. DOI: 10.1038/nbt.2675.

Mandai, Michiko; Watanabe, Akira; Kurimoto, Yasuo; Hiram, Yasuhiko; Morinaga, Chikako; Daimon, Takashi et al. (2017): Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. In: *N Engl J Med* 376 (11), S. 1038–1046. DOI: 10.1056/NEJMoa1608368.

Mao, Zhiyong; Bozzella, Michael; Seluanov, Andrei; Gorbunova, Vera (2008): Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. In: *DNA Repair* 7 (10), S. 1765–1771. DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.06.018.

Marchant, D.; Yu, K.; Bigot, K.; Roche, O.; Germain, A.; Bonneau, D. et al. (2007): New VMD2 gene mutations identified in patients affected by Best vitelliform macular dystrophy. In: *Journal of Medical Genetics* 44 (3), e70. DOI: 10.1136/jmg.2006.044511.

Marmorstein, A. D.; Marmorstein, L. Y.; Rayborn, M.; Wang, X.; Hollyfield, J. G.; Petrukhin, K. (2000): Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (23), S. 12758–12763. DOI: 10.1073/pnas.220402097.

Marmorstein, Alan D.; Cross, Harold E.; Peachey, Neal S. (2009): Functional roles of bestrophins in ocular epithelia. In: *Progress in retinal and eye research* 28 (3), S. 206–226. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2009.04.004.

Marmorstein, Alan D.; Kinnick, Tyson R.; Stanton, J. Brett; Johnson, Adiv A.; Lynch, Ronald M.; Marmorstein, Lihua Y. (2015): Bestrophin-1 influences transepithelial electrical properties and Ca²⁺ signaling in human retinal pigment epithelium. In: *Molecular Vision* 21, S. 347–359.

Marquardt, A.; Stöhr, H.; Passmore, L. A.; Krämer, F.; Rivera, A.; Weber, B. H. (1998): Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease). In: *Hum Mol Genet* 7 (9), S. 1517–1525. DOI: 10.1093/hmg/7.9.1517.

Maruotti, Julien; Wahlin, Karl; Gorrell, David; Bhutto, Imran; Luty, Gerard; Zack, Donald J. (2013): A simple and scalable process for the differentiation of retinal pigment epithelium from human pluripotent stem cells. In: *STEM CELLS Translational Medicine* 2 (5), S. 341–354. DOI: 10.5966/sctm.2012-0106.

Milenkovic, Andrea; Brandl, Caroline; Milenkovic, Vladimir M.; Jendryke, Thomas; Sirianant, Lalida; Wanitchakool, Potchanart et al. (2015): Bestrophin 1 is indispensable for volume regulation in human retinal pigment epithelium cells. In: *PNAS* 112 (20), E2630-9. DOI: 10.1073/pnas.1418840112.

Milenkovic, Andrea; Milenkovic, Vladimir M.; Wetzel, Christian H.; Weber, Bernhard H. F. (2018): BEST1 protein stability and degradation pathways differ between autosomal dominant Best disease and

autosomal recessive bestrophinopathy accounting for the distinct retinal phenotypes. In: *Hum Mol Genet* 27 (9), S. 1630–1641. DOI: 10.1093/hmg/ddy070.

Miller, Alexandria N.; Vaisey, George; Long, Stephen B. (2019): Molecular mechanisms of gating in the calcium-activated chloride channel bestrophin. In: *eLife* 8. DOI: 10.7554/eLife.43231.

Miller, Victor M.; Xia, Haibin; Marrs, Ginger L.; Gouvion, Cynthia M.; Lee, Gloria; Davidson, Beverly L.; Paulson, Henry L. (2003): Allele-specific silencing of dominant disease genes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (12), S. 7195–7200. DOI: 10.1073/pnas.1231012100.

Mohler, Charles W.; Fine, Stuart L. (1981): Long-term Evaluation of Patients with Best's Vitelliform Dystrophy. In: *Ophthalmology* 88 (7), S. 688–692. DOI: 10.1016/S0161-6420(81)34965-3.

Mojica, F. J.; Díez-Villaseñor, C.; Soria, E.; Juez, G. (2000): Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. In: *Mol Microbiol* 36 (1), S. 244–246. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x.

Mojica, F. J. M.; Díez-Villaseñor, C.; García-Martínez, J.; Almendros, C. (2009): Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. In: *Microbiology (Reading, England)* 155 (Pt 3), S. 733–740. DOI: 10.1099/mic.0.023960-0.

Monteys, Alex Mas; Ebanks, Shauna A.; Keiser, Megan S.; Davidson, Beverly L. (2017): CRISPR/Cas9 Editing of the Mutant Huntingtin Allele In Vitro and In Vivo. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 25 (1), S. 12–23. DOI: 10.1016/j.ymthe.2016.11.010.

Moreno, Ana M.; Palmer, Nathan; Alemán, Fernando; Chen, Genghao; Pla, Andrew; Chew, Wei Leong et al. (2018): Exploring protein orthogonality in immune space: a case study with AAV and Cas9 orthologs. In: *bioRxiv*, S. 245985. DOI: 10.1101/245985.

Myslinski, E.; Amé, J. C.; Krol, A.; Carbon, P. (2001): An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene. In: *Nucleic Acids Res* 29 (12), S. 2502–2509. DOI: 10.1093/nar/29.12.2502.

Nachtigal, Anna-Lena; Milenkovic, Andrea; Brandl, Caroline; Schulz, Heidi L.; Duerr, Lisa M. J.; Lang, Gabriele E. et al. (2020): Mutation-Dependent Pathomechanisms Determine the Phenotype in the Bestrophinopathies. In: *International journal of molecular sciences* 21 (5). DOI: 10.3390/ijms21051597.

Nahar, Smita; Sehgal, Paras; Azhar, Mohd; Rai, Manish; Singh, Amrita; Sivasubbu, Sridhar et al. (2018): A G-quadruplex motif at the 3' end of sgRNAs improves CRISPR-Cas9 based genome editing efficiency. In: *Chemical communications (Cambridge, England)* 54 (19), S. 2377–2380. DOI: 10.1039/C7CC08893K.

Nordström, S.; Thorburn, W. (1980): Dominantly inherited macular degeneration (Best's disease) in a homozygous father with 11 children. In: *Clinical Genetics* 18 (3), S. 211–216. DOI: 10.1111/j.1399-0004.1980.tb00874.x.

O'Reilly, Daniel; Kartje, Zachary J.; Ageely, Eman A.; Malek-Adamian, Elise; Habibian, Maryam; Schofield, Annabelle et al. (2019): Extensive CRISPR RNA modification reveals chemical compatibility and structure-activity relationships for Cas9 biochemical activity. In: *Nucleic Acids Res* 47 (2), S. 546–558. DOI: 10.1093/nar/gky1214.

Owji, Aaron P.; Wang, Jiali; Kittredge, Alec; Clark, Zada; Zhang, Yu; Hendrickson, Wayne A.; Yang, Tingting (2022): Structures and gating mechanisms of human bestrophin anion channels. In: *Nature communications* 13 (1), S. 3836. DOI: 10.1038/s41467-022-31437-7.

- Patrizi, Clarissa; Llado, Manel; Benati, Daniela; Iodice, Carolina; Marrocco, Elena; Guarascio, Rosellina et al. (2021): Allele-specific editing ameliorates dominant retinitis pigmentosa in a transgenic mouse model. In: *American journal of human genetics* 108 (2), S. 295–308. DOI: 10.1016/j.ajhg.2021.01.006.
- Petrukhin, K.; Koisti, M. J.; Bakall, B.; Li, W.; Xie, G.; Marknell, T. et al. (1998): Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy. In: *Nat Genet* 19 (3), S. 241–247. DOI: 10.1038/915.
- Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Wright, Jason; Agarwala, Vineeta; Scott, David A.; Zhang, Feng (2013): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. In: *Nat Protoc* 8 (11), S. 2281–2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143.
- Ran, F. Ann; Le Cong; Yan, Winston X.; Scott, David A.; Gootenberg, Jonathan S.; Kriz, Andrea J. et al. (2015): In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9. In: *Nature* 520 (7546), S. 186–191. DOI: 10.1038/nature14299.
- Renner, A. B.; Kellner, U. (2016): Hereditäre Makuladystrophien. In: *Klin Monbl Augenheilkd* 233 (10), S. 1124–1141. DOI: 10.1055/s-0042-100474.
- Robert E. Kingston, Claudia A. Chen, John K. Rose: Calcium Phosphate Transfection. 01 August 2003. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0901s63>.
- Ruan, Guo-Xiang; Barry, Elizabeth; Yu, Dan; Lukason, Michael; Cheng, Seng H.; Scaria, Abraham (2017): CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing as a Therapeutic Approach for Leber Congenital Amaurosis 10. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 25 (2), S. 331–341. DOI: 10.1016/j.ymthe.2016.12.006.
- Sander, Jeffry D.; Joung, J. Keith (2014): CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. In: *Nature biotechnology* 32 (4), S. 347–355. DOI: 10.1038/nbt.2842.
- Senís, Elena; Fatouros, Chronis; Große, Stefanie; Wiedtke, Ellen; Niopek, Dominik; Mueller, Ann-Kristin et al. (2014): CRISPR/Cas9-mediated genome engineering: an adeno-associated viral (AAV) vector toolbox. In: *Biotechnology Journal* 9 (11), S. 1402–1412. DOI: 10.1002/biot.201400046.
- Shin, Jun Wan; Hong, Eun Pyo; Park, Seri S.; Choi, Doo Eun; Seong, Ihn Sik; Whittaker, Madelynn N. et al. (2022): Allele-specific silencing of the gain-of-function mutation in Huntington's disease using CRISPR/Cas9. In: *JCI insight* 7 (19). DOI: 10.1172/jci.insight.141042.
- Shin, Jun Wan; Kim, Kyung-Hee; Chao, Michael J.; Atwal, Ranjit S.; Gillis, Tammy; MacDonald, Marcy E. et al. (2016): Permanent inactivation of Huntington's disease mutation by personalized allele-specific CRISPR/Cas9. In: *Human molecular genetics* 25 (20), S. 4566–4576. DOI: 10.1093/hmg/ddw286.
- Singh, Ruchira; Shen, Wei; Kuai, David; Martin, Jessica M.; Guo, Xiangrong; Smith, Molly A. et al. (2013): iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. In: *Hum Mol Genet* 22 (3), S. 593–607. DOI: 10.1093/hmg/dds469.
- Sinha, Divya; Steyer, Benjamin; Shahi, Pawan K.; Mueller, Katherine P.; Valiauga, Rasa; Edwards, Kimberly L. et al. (2020): Human iPSC Modeling Reveals Mutation-Specific Responses to Gene Therapy in a Genotypically Diverse Dominant Maculopathy. In: *American journal of human genetics* 107 (2), S. 278–292. DOI: 10.1016/j.ajhg.2020.06.011.
- Slaymaker, Ian M.; Gao, Linyi; Zetsche, Bernd; Scott, David A.; Yan, Winston X.; Zhang, Feng (2016): Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. In: *Science (New York, N.Y.)* 351 (6268), S. 84–88. DOI: 10.1126/science.aad5227.
- Smith, Alexander J.; Bainbridge, James W.; Ali, Robin R. (2009): Prospects for retinal gene replacement therapy. In: *Trends in genetics : TIG* 25 (4), S. 156–165. DOI: 10.1016/j.tig.2009.02.003.

Smith, Cory; Abalde-Atristain, Leire; He, Chaoxia; Brodsky, Brett R.; Braunstein, Evan M.; Chaudhari, Pooja et al. (2015): Efficient and allele-specific genome editing of disease loci in human iPSCs. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 23 (3), S. 570–577. DOI: 10.1038/mt.2014.226.

Song, Liujiang; Llanga, Telmo; Conatser, Laura M.; Zaric, Violeta; Gilger, Brian C.; Hirsch, Matthew L. (2018): Serotype survey of AAV gene delivery via subconjunctival injection in mice. In: *Gene therapy* 25 (6), S. 402–414. DOI: 10.1038/s41434-018-0035-6.

Srivastava, Arun (2016): In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. In: *Current opinion in virology* 21, S. 75–80. DOI: 10.1016/j.coviro.2016.08.003.

Stöhr, Heidi; Marquardt, Andreas; Nanda, Indrajit; Schmid, Michael; Weber, Bernhard H. F. (2002): Three novel human VMD2-like genes are members of the evolutionary highly conserved RFP-TM family. In: *Eur J Hum Genet* 10 (4), S. 281–284. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5200796.

Strauss (2011): The Retinal Pigment Epithelium. University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City (UT). Strauss O. The Retinal Pigment Epithelium. 2011 Jan 26. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center; 1995–. PMID: 21563333. Online verfügbar unter <https://europepmc.org/article/NBK/nbk54392#free-full-text>.

Sun, Hui; Tsunenari, Takashi; Yau, King-Wai; Nathans, Jeremy (2002): The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (6), S. 4008–4013. DOI: 10.1073/pnas.052692999.

Tabebordbar, Mohammadsharif; Zhu, Kexian; Cheng, Jason K. W.; Chew, Wei Leong; Widrick, Jeffrey J.; Yan, Winston X. et al. (2016): In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 351 (6271), S. 407–411. DOI: 10.1126/science.aad5177.

Takahashi, Kazutoshi; Okita, Keisuke; Nakagawa, Masato; Yamanaka, Shinya (2007): Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. In: *Nat Protoc* 2 (12), S. 3081–3089. DOI: 10.1038/nprot.2007.418.

Takahashi, Kazutoshi; Yamanaka, Shinya (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. In: *Cell* 126 (4), S. 663–676. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

Tsai, Shengdar Q.; Zheng, Zongli; Nguyen, Nhu T.; Liebers, Matthew; Topkar, Ved V.; Thapar, Vishal et al. (2015): GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. In: *Nature biotechnology* 33 (2), S. 187–197. DOI: 10.1038/nbt.3117.

Tsai, Yi-Ting; Wu, Wen-Hsuan; Lee, Ting-Ting; Wu, Wei-Pu; Xu, Christine L.; Park, Karen S. et al. (2018): Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Based Genome Surgery for the Treatment of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. In: *Ophthalmology* 125 (9), S. 1421–1430. DOI: 10.1016/j.ophtha.2018.04.001.

Veitia, Reiner A. (2007): Exploring the molecular etiology of dominant-negative mutations. In: *Plant Cell* 19 (12), S. 3843–3851. DOI: 10.1105/tpc.107.055053.

Wang, Dan; Tai, Phillip W. L.; Gao, Guangping (2019): Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. In: *Nature reviews. Drug discovery* 18 (5), S. 358–378. DOI: 10.1038/s41573-019-0012-9.

- Wang, Ruiying; Preamplume, Gan; Terns, Michael P.; Terns, Rebecca M.; Li, Hong (2011): Interaction of the Cas6 ribonuclease with CRISPR RNAs: recognition and cleavage. In: *Structure* 19 (2), S. 257–264. DOI: 10.1016/j.str.2010.11.014.
- Weingeist, T. A.; Kobrin, J. L.; Watzke, R. C. (1982): Histopathology of Best's macular dystrophy. In: *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 100 (7), S. 1108–1114. DOI: 10.1001/archophth.1982.01030040086016.
- Wiedenheft, Blake; Sternberg, Samuel H.; Doudna, Jennifer A. (2012): RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. In: *Nature* 482 (7385), S. 331–338. DOI: 10.1038/nature10886.
- Wu, Junjiao; Tang, Beisha; Tang, Yu (2020): Allele-specific genome targeting in the development of precision medicine. In: *Theranostics* 10 (7), S. 3118–3137. DOI: 10.7150/thno.43298.
- Wu, Zhijian; Asokan, Aravind; Samulski, R. Jude (2006): Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 14 (3), S. 316–327. DOI: 10.1016/j.ymthe.2006.05.009.
- Xiao, Qinghuan; Hartzell, H. Criss; Yu, Kuai (2010): Bestrophins and retinopathies. In: *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 460 (2), S. 559–569. DOI: 10.1007/s00424-010-0821-5.
- Yang, Tingting; Liu, Qun; Kloss, Brian; Bruni, Renato; Kalathur, Ravi C.; Guo, Youzhong et al. (2014): Structure and selectivity in bestrophin ion channels. In: *Science (New York, N.Y.)* 346 (6207), S. 355–359. DOI: 10.1126/science.1259723.
- Yardley, Jill; Leroy, Bart P.; Hart-Holden, Niki; Lafaut, Bart A.; Loeys, Bart; Messiaen, Ludwine M. et al. (2004): Mutations of VMD2 splicing regulators cause nanophthalmos and autosomal dominant vitreoretinopathy (ADVIRC). In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45 (10), S. 3683–3689. DOI: 10.1167/iops.04-0550.
- Zengel, James; Carette, Jan E. (2020): Structural and cellular biology of adeno-associated virus attachment and entry. In: *Advances in virus research* 106, S. 39–84. DOI: 10.1016/bs.aivir.2020.01.002.
- Zetsche, Bernd; Volz, Sara E.; Zhang, Feng (2015): A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. In: *Nat Biotechnol* 33 (2), S. 139–142. DOI: 10.1038/nbt.3149.
- Zhang, Jian-Ping; Li, Xiao-Lan; Li, Guo-Hua; Chen, Wanqiu; Arakaki, Cameron; Botimer, Gary D. et al. (2017): Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. In: *Genome Biol* 18 (1), S. 35. DOI: 10.1186/s13059-017-1164-8.
- Zhao, Qingqing; Kong, Yang; Kittredge, Alec; Li, Yao; Shen, Yin; Zhang, Yu et al. (2021): Distinct expression requirements and rescue strategies for BEST1 loss- and gain-of-function mutations. In: *eLife* 10. DOI: 10.7554/eLife.67622.
- Zuris, John A.; Thompson, David B.; Shu, Yilai; Guilinger, John P.; Bessen, Jeffrey L.; Hu, Johnny H. et al. (2015): Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. In: *Nat Biotechnol* 33 (1), S. 73–80. DOI: 10.1038/nbt.3081.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
A.D.	Aqua destillata
AAT	alpha1-Antitrypsin
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Amp	Ampicillin
ARB	autosomal rezessive Bestrophinopathie
AS	Aminosäure
AVMD	adulte vitelliforme Makuladystrophie
BEST	Bestrophin
bp	Basenpaar
BVMD	Best'sche vitelliforme Makuladegeneration
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
cDNA	complementary DNA
Cl ⁻	Chlorid
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalovirus
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
crRNA	CRISPR RNA
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
d.h.	Das heißt
DMD	Duchenne Muscular Dystrophy
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSB	Double-strand Break
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
EOG	Elektrookulographie
et al.	et aliter
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	fetal calf serum
F-Primer	forward Primer
g	Gramm
G	Guanin
GFP	Green Fluorescent Protein
GUIDE-Seq	Genome-wide Unbiased Identification of DSBs Enabled by Sequencing
h	Stunde
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution

HDR	Homology Direct Repair
HEK293T-Zellen	Human Embryonic Kidney -Zellen
HiFi	High Fidelity
hiPSC	Human Induced Pluripotent Stem Cells
ICC	Immunocytochemie
kb	Kilobase
KØ	Krohne-ohne Puffer
LB	lysogeny broth Medium
LCA	Leber'sche kongenitale Amaurose
LNP	Lipid-based Nanoparticle
M	molar
mAK	monoklonaler Antikörper
min	Minute
ml	Milliliter
ng	Nanogramm
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NMD	Nonsense-Mediated Decay
nt	Nukleotid
Opt	optimiert
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
POS	Photoreceptor Outer-Segment
RE	Restriktionsenzym
RP	Retinitis pigmentosa
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm.	rounds per minute
R-Primer	reverse Primer
RSV	respiratorisches Synzytial-Virus
RT	Raumtemperatur
SaCas9	<i>Staphylococcus aureus</i> Cas9
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
sec	Sekunde
sgRNA	single guide RNA
SITE-Seq	Selective Enrichment and Identification of Tagged Genomic DNA ends by Sequencing
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SpCas9	<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9
Spmut	SpCas9 mutiert
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
tracrRNA	trans activated CRISPR RNA
V	Volt
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor
WB	Western Blot
WT	wildtypisch

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Bestrophin1-Proteins als Homopentamer	4
Abbildung 2: Stadien der BVMD in der Funduskopie	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung der zellulären DNA-Reparaturmechanismen	13
Abbildung 4: Ausschnitt des <i>BEST-1</i> Locus mit den 22 SNPs aus der Analyse	52
Abbildung 5: HEK293T-EGFP-Assays der Guides für SNP 749, 756 und 759.....	54
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Konstruktion des <i>All-in-one</i> -miniAAV-Vektors	55
Abbildung 7: Beispielhafte Darstellung der Mutagenesen für das Konstrukt der HiFi-Cas. Roter Rahmen in A und B: Markierung der ersten beiden Basen des Codons der zu substituierender Aminosäure...	56
Abbildung 8: Transfektionsschema des HEK293T-EGFP-Assays	60
Abbildung 9: Ergebnisse des HEK293T-EGFP-Assays für die Guide 749_A_20mer; n≥3	61
Abbildung 10: Ergebnisse des HEK293T-EGFP-Assays für die Guide 756_C1_20mer; n≥4	63
Abbildung 11: Ergebnisse des HEK293T-EGFP-Assays für die Guide 759B_C_20mer; n≥5	64
Abbildung 12: Ergebnisse des HEK293T-EGFP-Assays für die Guide des <i>EMX1</i> -Lokus; n≥3	65
Abbildung 13: Ergebnisse der Western Blot Analyse in HEK293T-Zellen; n=10	67
Abbildung 14: Ergebnisse des HEK293T-EGFP-Assays der Guides 759 und 534 im miniAAV- und px-Vektor; n=2	68
Abbildung 15: Beispielhafte Sequenzierung mehrerer Bakterienklone für den SNP 534 in <i>SnapGene</i>	70
Abbildung 16: Zelluläre Fluoreszenzentwicklung nach Transduktion mit einem AAV-GFP-Vektor.....	74
Abbildung 17: Zelluläre Fluoreszenzentwicklung nach Transduktion verschiedener AAV-Serotypen .	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Bakterienstämme und deren Herkunft	20
Tabelle 2: Verwendete Zelllinien und deren Herkunft.....	20
Tabelle 3: Verwendete Vektoren, deren Verwendung und deren Herkunft	20
Tabelle 4: Verwendete PCR- und Sequenzierprimer, ihre Sequenz und ihre Verwendung.....	21
Tabelle 5: Verwendete Mutagenese-Primer, ihre Sequenz und ihre Verwendung	22
Tabelle 6: Verwendete sgRNA-Primer, ihre Sequenz und ihre Verwendung.....	22
Tabelle 7: Durch Klonierung hergestellte Vektorkonstrukte und ihre Verwendung	23
Tabelle 8: Verwendete Reaktionssysteme und ihr Hersteller	24
Tabelle 9: Verwendete Enzyme und deren Hersteller	24
Tabelle 10: Verwendete primäre Antikörper	25
Tabelle 11: Verwendete Sekundärantikörper	25
Tabelle 12: Verwendete Molekularmassenstandards, ihre Verwendung und ihre Hersteller	25
Tabelle 13: Verwendete Chemikalien und ihre Hersteller	25
Tabelle 14: Verwendete Zusätze in der Zellkultur und ihre Hersteller	26
Tabelle 15: Erstellte Medien für die Zellkultur, ihre Bestandteile und deren Mengenzusatz	27
Tabelle 16: Verwendete Puffer und Lösungen mit ihrer jeweiligen Zusammensetzung.....	27
Tabelle 17: Verwendete Geräte und deren Hersteller	28
Tabelle 18: Verwendete Software und deren Hersteller	30
Tabelle 19: Komponenten und deren Menge für einen Standardansatz der Go-Taq-PCR.....	32
Tabelle 20: Verwendetes PCR-Programm zur Amplifikation des SpCas9-Fragments	32
Tabelle 21: Zusammensetzung eines 1%igen Agarosegels	32
Tabelle 22: Ligationsansatz zum Einbringen des eluierten PCR-Produkts in einen pGem-T-Vektor	33
Tabelle 23: Zusammensetzung eines Standard-Sequenzierungsansatzes.....	35
Tabelle 24: Programmeinstellung am Thermocycler für ein Cycle Sequencing.....	35
Tabelle 25: Zusammensetzung des Q5-Mutagenese-Ansatzes	36
Tabelle 26: Verwendetes Mutagenese-Programm des Thermocyclers.....	36
Tabelle 27: Ansatz des KLD-Verdau	36
Tabelle 28: Ansatz des Doppelverdau der miniAAV-WT-Cas- und der pGem-Opt-Cas-Vektoren.....	37
Tabelle 29: Verdau des Addgene-Vektors zur Exzision der Cas9-Sequenz	38
Tabelle 30: Komponenten und Mengen im BbsI-Verdau.....	38
Tabelle 31: Komponenten des Restriktionsverdau des pGem-T-Vektors mit EcoRI und BamHI	38
Tabelle 32: Zusammensetzung des Phosphorylierungsansatzes	39

Tabelle 33: Ligation der verschiedenen Cas9-Fragmente in einen mit RE-geschnittenen miniAAV-Vektor	39
Tabelle 34: Komponenten des Ligationsansatzes zwischen sgRNA und miniAAV-Vektor	40
Tabelle 35: Ligationsansatz des EMX1-Fragments in einen mit RE-geschnittenen EGxxFP-Vektor	40
Tabelle 36: Ansatz zum Exonuklease-Verdau von Ligationsprodukten	40
Tabelle 37: Zusammensetzung des Go-Taq Ansatzes für eine Colony-PCR	41
Tabelle 38: PCR-Programm im Thermocycler für eine Colony-PCR	41
Tabelle 39 Zusammensetzung eines 500 µl Standard-Transfektionsansatzes einer 6-Well-Schale	43
Tabelle 40: Zusammensetzung des Transfektionsansatzes für einen HEK293T-EGFP-Assay	44
Tabelle 41: Zusammensetzung eines Transfektionsansatzes für einen Transduktions-Assay	45
Tabelle 42: Zusammensetzung eines Transduktionsansatzes	46
Tabelle 43: Reaktionsansatz des Exo-AAP-Verdau für eine Probe	48
Tabelle 44: Komponenten eines 8%igen SDS-Gels	48
Tabelle 45: Komponenten eines 3%igen SDS-Gels	49
Tabelle 46: 5ml Ansatz des Primärantikörpers gegen die Cas9-Nuklease nach Western Blot	49
Tabelle 47: 5ml Ansatz des Primärantikörpers gegen das β -Tubulin nach Western Blot	50
Tabelle 48: 10 ml Ansatz des 2°AK gegen maus-typischen 1°AK nach Western Blot	50
Tabelle 49: Liste der optimierten Cas9-Konstrukte (pGem-Opt-Cas)	57
Tabelle 50: Über <i>Addgene</i> erworbenes Plasmid als Positiv-Kontrolle	57
Tabelle 51: Zusammensetzung der CRISPR-miniAAV-Vektoren	58
Tabelle 52: Target Sequenzierung für die Transfektion mit CRISPR-miniAAV- und px-Vektoren; n=2. 71	
Tabelle 53: Target Sequenzierung für die Transfektion mit einem dualen pAAV-Vektorsystem; n=1. 72	
Tabelle 54: Ergebnis des Target Sequenzierung für die duale Transduktion von HEK293T-Zellen; n=1	76

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich abschließend herzlich bei denjenigen Personen bedanken, die an die an dieser Doktorarbeit beteiligt waren und unterstützend mitgewirkt haben.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Weber für die Möglichkeit, mich mit dieser Arbeit an einem solch aktuellen und interessanten Forschungsprojekt zu beteiligen und in diesem Feld promovieren zu dürfen. Ihre Aufsicht und Wegweisung waren mir eine wertvolle Hilfe zum Vervollständigen dieser Arbeit, und durch die Teilnahme an den wöchentlichen Lab-Meetings und Journal Clubs hatte ich Gelegenheit, viel über das wissenschaftliche Arbeiten von ihnen und ihren Kollegen zu lernen.

Mein besonderer Dank gilt Andrea Milenkovic für ihre außergewöhnliche und enge Betreuung über den gesamten Prozess hinweg. Ihre Verfügbarkeit zur unmittelbaren Klärung von Problemen und Finden von Lösungen, ihre Geduld zur Erläuterung der wissenschaftlichen Grundlagen und das stetige Vorantreiben des Projekts entgegen jedweden Widerständen haben diese Doktorarbeit erst ermöglicht und mich stets beeindruckt. Vielen Dank für die investierte Zeit, die Zusammenarbeit hat mir viel Freude bereitet und mich nachhaltig geprägt.

Zuletzt möchte ich all jenen Kollegen am Institut meinen Dank aussprechen, die mich in dieser Zeit auf praktischer und theoretischer Ebene immer freundlich und engagiert unterstützt und zur Gestaltung einer sehr angenehmen Zeit beigetragen haben. Hier möchte ich schließlich Dr. med. Patricia Berber hervorheben, die mir neben ihrer zusätzlichen mentalen Unterstützung v.a. eine große persönliche Bereicherung während meines Aufenthalts war.

Eidesstattliche Erklärung

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

Regensburg, den

Lorenz Happel